

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA

MARIA CECÍLIA DE SOUZA LELIS

**Desenvolvimento de sistema de controle de fluxo de carbono em vias metabólicas
sintéticas de levedura**

Araraquara

2022

MARIA CECÍLIA DE SOUZA LELIS

Desenvolvimento de sistema de controle de fluxo de carbono em vias metabólicas sintéticas de levedura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli

Araraquara

2022

-
- L541d** Lelis, Maria Cecília de Souza.
Desenvolvimento de sistema de controle de fluxo de carbono em vias metabólicas sintéticas de levedura / Maria Cecília de Souza Lelis. – Araraquara: [S.n.], 2022.
58 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área Análises Clínicas.
- Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.
1. Limoneno. 2. Canalização de substrato. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Pedrolli, Danielle Biscaro, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de sistema de controle de fluxo de carbono em vias metabólicas sintéticas de levedura

AUTORA: MARIA CECÍLIA SOUZA LELIS

ORIENTADORA: DANIELLE BISCARO PEDROLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELLE BISCARO PEDROLI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Profa. Dra. MILCA RACHEL DA COSTA RIBEIRO LINS (Participação Virtual)
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC

Dra. GRACIELY GOMES CORRÊA (Participação Virtual)
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Araraquara, 08 de dezembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Mudar para uma outra cidade, outro estado e começar um mestrado em meio a uma pandemia não foi nem um pouco fácil. Perder família, amigos e conhecidos por quem temos um carinho, estar longe, ver tudo isso acontecendo e não adoecer é mais difícil ainda. Não existe saúde mental que aguento.

Meus pais, Jorge e Socorro, e minha família pelo apoio incondicional, emocional e financeiros. Que a nossa parceria perdure por muito tempo!

Meus cachorros, Marujo e Frida, por ajudar a relaxar nos momentos estressantes. Meus tios, minha avó e meus primos, por todo carinho e companheirismo ao longo dos anos.

Diversas pessoas que me ajudaram durante os tempos difíceis da depressão, onde não conseguia me levantar da cama ou me alimentar. Larissa Cazeiro, Gabriela Barbosa, Laura Araújo, Caio Lima, Marina Mastria, Ana Carolina Zanette, Amanda Serpelloni, Mariana Guidi, dona Marlene, Alef Henrique e Almiro Neto.

Acolhimento das mulheres incríveis espaço novo em folha em todas as vezes que precisei. Flávia, Délis, Manu e Rebeca: vocês possuem um espaço imenso no meu coração.

A mulheres incríveis que conheci nos tempos de pandemia, Suzana Veiga e Aretha Guimarães. Obrigada por todas as palavras de incentivo e fofocas trocadas!

Ao Studio Flex. Não sei onde estaria sem vocês. Meu corpo e minha mente agradecem eternamente. Juiana, July, Roberta, Samara, Bia, Thais, Geovanna, Ana Julia, Bruna, Ana Flávia, Amanda e Marina. As aulas e os dias são mais divertidos com vocês!

Aos meus amigos de graduação: Rayana Araújo, Lilian Minako, Priscila Rocha, Izabelle Noguchi, Érico Jorge e Euzênio Moreira.

Aos meus amigos Taís Caires, Laura Angioletto, Larissa Carioca, Joanne Paula, Isadora Rosa, Rafaela Cinque, Juliana Viana, Ingrid Correia, Giovanna Maklounf, Nicolas Daniel, Guilherme Kundlatsch e Gabriel Brenner.

Ao apoio dos amigos da SynBio BR, principalmente Luiza Hesketh e Thiago Lima, e do SynBio Lab.

A Aleksander e Renata Weinstock por todo apoio emocional nos dias difíceis e apoio físico enquanto me recuperava da cirurgia.

A todas as mulheres que vieram antes de mim e lutaram para que eu tivesse o direito de estudar. A luta continua, pois não seremos livres enquanto todas as mulheres não forem.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento da pesquisa no Brasil no estado de São Paulo, e pelo apoio na realização deste trabalho (processo nº 2020/06165-5).

A minha orientadora, Danielle Pedrolli, pela orientação.

“Coma arroz, tenha fé nas mulheres
O que eu não sei agora
Ainda posso aprender
Lentamente, lentamente
Se eu aprender, posso ensinar as outras
Se as outras aprendem antes
Eu devo acreditar
Que elas voltarão e me ensinarão”

— *Fran Winant*

RESUMO

O limoneno é um monoterpene cíclico amplamente utilizado por seu aroma agradável na indústria de cosméticos, sendo também utilizado nas indústrias de biomateriais e biocombustíveis por ser um precursor químico nestes ramos. Assim, a produção em microrganismos surge como uma opção rápida e prática para atender a demanda comercial. Entretanto, a rota metabólica dos terpenoides compete por recursos com a maquinaria celular. Até o momento, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que foram construídas visando o aumento da produção de terpenos, sofrem com o acúmulo de isopentil pirofosfato (IPP), um dos precursores da rota dos isoprenoides, que é tóxico para a célula em altas concentrações. Através da reconstrução dos genes *IDI1*, *ERG20^W* e *CILS*, buscamos aumentar o fluxo de carbono pela via de biossíntese de monoterpene e reduzir a disponibilidade citoplasmática de IPP, visando direcionar o fluxo de carbono para a produção de limoneno pela canalização de substrato, que consiste na formação de complexos proteicos formados por enzimas que catalisam reações subsequentes em uma via metabólica. Assim, buscou-se clonar os genes das enzimas da via metabólica fusionados a synzips, que consistem em peptídeos sintéticos capazes de formar heterodímeros. Desta forma, sondamos três configurações para a canalização de substrato, heterodímero linear, heterotrímero linear e heterotetrâmero em anel, para comparar a capacidade de produção de limoneno entre as linhagens. Para as etapas de clonagem, utilizamos o plasmídeo pYES2, que possui origem de replicação para *Escherichia coli* e *S. cerevisiae*. As etapas consistiram em ligar ao plasmídeo os genes CILS-synzip21 e ERG20w-synzip19, para formar o heterodímero, IDI1-synzip18, CILS-synzip21 e ERG20w-synzip19, para formar o heterotrímero, e ligar CILS-synzip20 aos genes anteriores, para formar o heterotetrâmero.

Palavras-chave: limoneno, canalização de substrato, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Limonene is a cyclic monoterpene widely used for its pleasant aroma in the cosmetics industry, being also used in the biomaterials and biofuels industries for being a chemical precursor in these branches. Thus, production in microorganisms appears as a quick and practical option to meet commercial demand. However, the terpenoid metabolic pathway competes for resources with the cellular machinery. So far, the *Saccharomyces cerevisiae* strains that were built to increase terpene production suffer from the accumulation of isopentanyl pyrophosphate (IPP), one of the precursors of the isoprenoid pathway, which is toxic to the cell in high concentrations. Through the reconstruction of the *IDII*, *ERG20W* and *CILS* genes, we seek to increase the carbon flux through monoterpene biosynthesis and reduce the cytoplasmic availability of IPP, aiming to direct the carbon flux to the production of limonene by channeling the substrate, which consists of formation of protein complexes formed by enzymes that catalyze subsequent reactions in a metabolic pathway. Thus, we sought to clone the genes of the enzymes of the metabolic pathway fused to synzips, which consist of synthetic peptides capable of forming heterodimers. In this way, we probed three configurations for channeling substrate, linear heterodimer, linear heterotrimer and ring heterotetramer, to compare the limonene production capacity between the strains. For the cloning steps, we used the pYES2 plasmid, which has an origin of replication for *Escherichia coli* and *S. cerevisiae*. The steps consisted of linking the CILS-synzip21 and ERG20w-synzip19 genes to the plasmid, to form the heterodimer, IDI1-synzip18, CILS-synzip21 and ERG20w-synzip19, to form the heterotrimer, and linking CILS-synzip20 to the previous genes, to form the heterotetramer.

Key words: limonene, substrate channeling, *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista de primers e oligonucleotídeos utilizados no projeto.	30
Tabela 2 Lista de primers desenhados para as clonagens com o plasmídeo pYES2.	34
Tabela 3 Quantidade de reagentes utilizada na reação de ligação pela metodologia golden gate. Inseto 1: CILS-Synzip21; Inseto2: ERG20W-Synzip19.	36
Tabela 4 Protocolo da reação de golden gate	36
Tabela 5 Quantidade de cada componente utilizado na reação de sequenciamento.	37
Tabela 6 Condições da reação de sequenciamento.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química do limoneno e seus derivados. (A) Limoneno, (B) Alfa-terpineol e (C) Mentol. As estruturas foram desenhadas utilizando o software ChemDraw.	16
Figura 2 Representação esquemática da via do mevalonato. A via do mevalonato está presente em archeas, leveduras, plantas e outros eucariotos, como os humanos. As estruturas foram desenhadas com o software ChemDraw.	18
Figura 3 Engenharia metabólica de <i>S. cerevisiae</i> para a produção de isoterpenoides. A figura descreve as rotas metabólicas modificadas geneticamente que levam à biossíntese de isoterpenóides na linhagem <i>S. cerevisiae</i> ILHA LIM4A. As setas verdes indicam fluxos de carbono aumentados através da superexpressão dos genes envolvidos nas conversões. As setas vermelhas indicam fluxos de carbono reduzidos pelas vias através da diminuição da atividade catalítica da enzima responsável pelas conversões. Abreviações: EfmvaS, <i>Enterococcus faecalis</i> hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintase; EfmvaE, <i>E. faecalis</i> acetoacetil-CoA tiolase/HMG-CoA redutase; HMG2K6R, mutante K6R de HMG-CoA redutase 2; ERG12, mevalonato cinase; ERG8, fosfomevalonato cinase; MVD1, mevalonato pirofosfato descarboxilase; IDI1, difosfato de isopentenil: difosfato de dimetilalil isomerase; ERG20, farnesil pirofosfato sintase; ERG20 ^W , ERG20 N127W mutante, geranilpirofosfato sintase; ERG9, esqualeno sintase; IPP, pirofosfato de isopentenil; DMAPP, pirofosfato de dimetilalil; GPP, pirofosfato de geranil; FPP, farnesil pirofosfato; GGPP, pirofosfato de geranilgeranil; MTS, monoterpene sintase; STS, sesquiterpene sintase (figura reproduzida de PENG et al. (2018b)).	20
Figura 4. Configurações em heterodímero linear (A), heterotrímero linear (B) e heterotetrâmero em anel (C) que serão construídas empregando os SYNZIPs 18, 19, 20 e 21.	28
Figura 5 Representação esquemática do processo de inibição e ativação do promotor GAL. A presença de glicose (hexágonos azuis) impede a transcrição dos genes que estão sob o controle do promotor. A inibição visa que a célula possa crescer sem a necessidade da produção de moléculas. A presença de sacarose ou galactose (bolas laranjas) reverte este processo, permitindo que os genes sejam transcritos.	29
Figura 6 Mapa do plasmídeo pJT11. O plasmídeo possui uma origem de replicação F1 e gene de resistência a ampicilina ampR para clonagem em <i>E. coli</i> , origem de replicação 2 μ ori para <i>S. cerevisiae</i> , e gene para complementação de auxotrofia na síntese de leucina LEU2 em <i>S. cerevisiae</i> . Imagem gerada pelo software Benchling.	32
Figura 7 Mapa do plasmídeo pYES2. O plasmídeo possui uma origem de replicação F1 e gene de resistência a ampicilina ampR para clonagem em <i>E. coli</i> , origem de replicação 2 μ ori para <i>S. cerevisiae</i> , e gene para complementação de auxotrofia na síntese de uracila URA3 em <i>S. cerevisiae</i> . O plasmídeo possui um sítio múltiplo de clonagem contendo os sítios de restrição	

na seguinte ordem: HindIII, Acc65I, KpnI, Ecl136II, SacI, BamHI, EcoRI, BseJI, NotI, XhoI, PaeI e XbaI. Imagem gerada utilizando o software Benchling.	33
Figura 8 Representação esquemática da ordem de clonagem dos insertos no plasmídeo pYES2 com suas respectivas enzimas de restrição.	35
Figura 9 Plasmídeo utilizado no início do desenvolvimento do projeto. pJT11 antes (A) e após (B) a inserção das synzips 19 e 21. As setas em (A) representam como o plasmídeo foi dividido para que fossem inseridas a synzips. O par SZ21c-CILS_fw/SZ19n-ERG20_rv amplifica 5573bp do plasmídeo, correspondente a menor parte de (A). O par SZ19c-linker-ERG_fw/SZ21n-linker-CILS_rv amplifica do terminador de ERG20W ao terminador de CILS, inserindo um linker entre os genes das enzimas e das synzips e corresponde a 7552bp. Imagem gerada pelo software Benchling.	40
Figura 10 Eletroforese dos produtos de PCR para inserção da synzips 19 e 21 junto aos genes ERG20 ^W e CILS, respectivamente. O par 1 corresponde ao par SZ19c-linker-ERG_fw/SZ21n-linker-CILS_rv e amplifica 7552bp. O par 2 corresponde ao par SZ21c-CILS_fw/SZ19n-ERG20_rv e amplifica 5573bp.	42
Figura 11 Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação das synzips 19 e 21. C1: controle negativo, sem enzima presente na reação; C2: controle negativo, sem DNA molde na reação; 1-5: produtos correspondentes synzip 19; 10-14: correspondente a synzip 21. Os produtos de PCR possuem 394bp e 243bp para as synzip 19 e 21, respectivamente. A baixa resolução da eletroforese para synzip19 pode ser devido a fatores como o tampão de corrida utilizado, o próprio gel de agarose ou baixo anelamento do primer na temperatura utilizada.	43
Figura 12 Eletroforese da reação de amplificação para confirmação da inserção de synzip19 em pJT11. Observa-se que nas colônias 3 e 6 os fragmentos foram produzidos em baixa quantidade, tendo uma resolução baixa na imagem.	44
Figura 13 Eletroforese dos produtos de PCR do gene IDI1. A) Amplificação com o par SpeI_Gal10_Fw/ BsaI_SZ18_Linkers_IDI1_Rv. Os números 39 e 41 são referentes as células de ILHA LIM14A e 56 e 61 de ILHA LIM1A. B) Amplificação do par 2 (BsaI_SynZip18_TRPL15a_Fw/SpeI_RPL15a_Rv). C7: controle negativo, sem enzima presente na reação; C8: controle negativo, sem DNA molde; E: reação realizada com o DNA extraído da célula 56 de ILHA LIM1A, utilizando o par 2 de primers.	44
Figura 14 Eletroforese dos produtos de PCR da CILS-synzip20. C1: controle negativo do par 1 (XhoI_GAL2_Fw/ BsaI_Synzip20_Linkers_CILS1_Rv), sem polimerase; C2: controle negativo do par 1, sem DNA molde; A: reação com o par 1; C3: controle negativo sem polimerase do par 2 (BsaI_Synzip20_TRPL41B_Fw/ XhoI_TPRL41B_Rv); C4: controle negativo sem DNA molde do par 2; B: reação com o par 2.	45
Figura 15 Eletroforese das amplificações de prospecção de colônias recombinantes. Porção superior: plasmídeo pJT11, pJT11 com as synzips 19 e 21 nos genes ERG20W e CILS (controles), respectivamente. De cada lado do marcador de tamanho estão duas amostras de colônias transformadas com a ligação pJT11_ERG20W-synzip19_CILS-synzip21 + IDI1_synzip18. Porção inferior: os poços de 1 a 10 são prospecções da ligação pJT11_ERG20W-synzip19_CILS-synzip21 com CILS_synzip20. Todas as colônias selecionadas para teste resultaram negativas para a clonagem. Os plasmídeos pJT11 e pJT11_ERG20W-synzip19_CILS-synzip21 foram utilizados como controles.	46
Figura 16 Média das áreas do pico para diferentes concentrações de limoneno quantificadas em HPLC (b) Curva de calibração. O R ² obtido foi maior que 0,99.	47
Figura 17 Construções em pYES2. (A) Heterodímero, (B) heterotrímero, (C) heterotetrâmero, que possui uma cópia a mais de CILS. Imagem gerada pelo software Benchling.	48
Figura 18 Eletroforese dos produtos de PCR. Par 3 é referente a amplificação de ERG20w-Synzip19, com produto de 2106 bp. Par 4 é relativo à amplificação de CILS-Synzip21, com 2775 bp. Par 1 e par 2 referem-se aos pares de primer que visam a amplificação de CILS-S	

Synzip21, com 2775 bp. Par 1 e par 2 referem-se aos pares de primer que visam a amplificação de CILS-Synzip20; eles amplificam 2117 bp e 233bp, respectivamente.	49
Figura 19 Eletroforese da reação de digestão do possível pYES2_ dímero com EcoRI e XbaI. As amostras que possuem a letra C em frente aos números referem-se aos controles da reação, aquelas que não possuem enzima. Nos controles, é possível enxergar os plasmídeos em vários níveis de enovelamento.	51
Figura 20 Eletroforese da reação de digestão de pYES2_ dímero com BamHI e XbaI. As amostras seguem a ordem de reação e controle em seguida. A: colônias 1, 3 e 4. B: colônias 5 a 10.	52
Figura 21 Eletroforese da reação com o par 2 para amplificação de IDI1-Synzip18. A reação produz um fragmento de 357bp, compatível com o exemplificado na figura. As amostras 38, 29 e 41 referem-se as colônias da linhagem ILHA LIM14A utilizadas no experimento.....	53
Figura 22 Eletroforese da reação com o par 1 para amplificação e clonagem de IDI1-Synzip18. Os números 38, 39 e 41 referem-se as colônias da linhagem ILHA LIM14A utilizadas no experimento.	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>Isoprenoides.....</i>	<i>14</i>
1.2 <i>Limoneno</i>	<i>15</i>
1.3 <i>Chassi.....</i>	<i>16</i>
1.4 <i>A via do mevalonato</i>	<i>17</i>
1.5 <i>Canalização de fluxo e Synzips.....</i>	<i>18</i>
1. OBJETIVO.....	22
1.1 <i>Objetivo Geral.....</i>	<i>22</i>
1.2 <i>Objetivos Específicos</i>	<i>22</i>
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 <i>Meios de Cultura</i>	<i>23</i>
2.1.1 <i>Meio Luria Bertani (LB).....</i>	<i>23</i>
2.1.2 <i>Meio Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC)</i>	<i>23</i>
2.1.3 <i>Meio Yeast Peptone Dextrose (YPD)</i>	<i>23</i>
2.1.4 <i>Meio Mínimo Sintético (SM)</i>	<i>23</i>
2.1.5 <i>Meio Sintético Complexo com Alta Concentração de Glicose (SCGHG).....</i>	<i>23</i>
2.1.6 <i>Meio Sintético Complexo sem Uracila (SC-U).....</i>	<i>24</i>
2.2 <i>Linhagens.....</i>	<i>24</i>
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	<i>24</i>
2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae.....</i>	<i>24</i>
2.3 <i>Soluções</i>	<i>25</i>
2.3.1 <i>Ampicilina</i>	<i>25</i>
2.3.2 <i>Gentamicina (G-418)</i>	<i>25</i>
2.3.3 <i>Tampão Tris-Acetato EDTA (TAE).....</i>	<i>25</i>
2.3.4 <i>Solução de dNTPs</i>	<i>25</i>
2.4 <i>Preparo de Células de E. coli Quimicamente Competentes.....</i>	<i>25</i>
2.5 <i>Preparo de Células de E. coli Eletricamente Competentes</i>	<i>26</i>
2.6 <i>Transformação de E. coli Top10 Quimicamente Competente por Choque Térmico .</i>	<i>26</i>
2.7 <i>Transformação de E. coli Top10 Eletrocompetente</i>	<i>27</i>
2.8 <i>Clonagem Gênica</i>	<i>27</i>

2.9	<i>Clonagem por Golden Gate</i>	<i>35</i>
2.10	<i>Eletroforese em Gel de Agarose.....</i>	<i>36</i>
2.11	<i>Sequenciamento do Tipo Sanger</i>	<i>36</i>
2.12	<i>Precipitação de DNA.....</i>	<i>37</i>
2.13	<i>Calibração para Quantificação de Limoneno</i>	<i>38</i>
3.	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	<i>38</i>
3.1	<i>Clonagem em pJT11</i>	<i>38</i>
3.2	<i>Adequação da Metodologia de Quantificação de Limoneno</i>	<i>47</i>
3.3	<i>Clonagem em pYES2.....</i>	<i>47</i>
4.	<i>CONCLUSÃO.....</i>	<i>54</i>
5.	<i>REFÊRENCIAS</i>	<i>55</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1 Isoprenoides

Os isoprenoides, também chamados de terpenos ou terpenoides, são a maior e mais diversa classe de metabólitos secundários. Apesar de ser predominante em plantas, os terpenos também ocorrem em outros organismos, como fungos e animais (MOSER; PICHLER, 2019). A sua classificação ocorre através do número de carbonos presente na estrutura, sendo eles: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Algumas de suas funções biológicas são a regulação do crescimento vegetal, defesa das plantas contra insetos e outras plantas e formação da membrana celular em animais. Na saúde, possuem atividades antimaláricas, como a artemisinina, anti-inflamatória e antiproliferativa, como o paclitaxel. Devido ao seu dinamismo e riqueza estrutural, os terpenoides são moléculas de interesse comercial nas áreas farmacêutica, alimentícia, cosmética, agrícola, produção de biomateriais e de biocombustíveis (CARSANBA; PINTADO; OLIVEIRA, 2021; LI et al., 2020; NIU et al., 2017; TETALI, 2019).

A obtenção de isoprenoides geralmente ocorre através de material vegetal, porém, é uma maneira impraticável para atender as demandas do mercado devido a condições ambientais, que impactam tanto na velocidade de crescimento vegetal quanto no conteúdo de terpenos produzidos. O melhoramento vegetal não é uma opção devido a expressão específica de tecidos vegetais e a evaporação dos terpenos no ambiente. Além de serem produzidos em uma baixa quantidade, uma parte dos terpenos é perdida no ambiente devido a sua volatilidade e são obtidos também em misturas complexas juntamente com outros metabólitos secundários (WANG et al., 2018; ZHUANG; CHAPPELL, 2015). O melhoramento vegetal acaba sendo descartado, visto que é necessária a expressão específica de tecidos vegetais (LEAVELL; MCPHEE; PADDON, 2016). A síntese química de terpenos requer bastante esforço, visto que apresentam uma estrutura complexa. Ademais, sínteses químicas costumam formar misturas racêmicas, e se o desejado é a obtenção de apenas um enantiômero, é necessário adicionar mais etapas de separação e purificação, gerando uma grande quantidade de resíduos (MAFU; ZERBE, 2018; ZHUANG; CHAPPELL, 2015).

Como alternativa, a biologia sintética permite, com o auxílio da engenharia metabólica, a produção destes metabólitos em microrganismos pela síntese heteróloga das moléculas e design e implementação racional das modificações genéticas, possibilitando a criação de

moléculas artificiais, pela da reestruturação da rota metabólica. Dessa forma, as aplicações da engenharia metabólica anseiam diminuir custos, aumentar o rendimento, aumentar a eficiência, aumentar a aceitabilidade do consumidor final e utilizar fontes renováveis para tornar o processo mais sustentável (GARCÍA-GRANADOS, LERMA-ESCALERA, MORONES-RAMÍREZ, 2019; HU et al., 2020; KOTOPKA, LI, SMOLKE, 2018).

1.2 Limoneno

O limoneno é um dos terpenos mais comuns, presente em mais de 300 plantas. É um monoterpeno monocíclico, cujo óleo é incolor, geralmente obtido como resíduo da indústria cítrica (WANG et al., 2018). Por possuir um aroma agradável, ele é amplamente utilizado como fragrância e flavorizante de bebidas, comidas, cosméticos e produtos de limpeza. Também é utilizado como aditivo em biocombustíveis, solvente orgânico verde, uma nova fonte para produção de bioplásticos e precursor de outras moléculas aromáticas (JONGEDIJK et al., 2016; VIEIRA et al., 2018). Além disso, o limoneno também possui propriedades farmacológicas, como atividades antioxidantes, antinociceptiva, gastroprotetiva e antiproliferativa (ALEXANDRINO et al., 2022; EDDIN et al., 2021).

A estrutura química do limoneno permite que ele possa ser modificado para produção de outras moléculas (figura 1), devido a presença de duas duplas ligações e possibilidade de hidroxilação (GAO et al., 2020). O limoneno pode ser oxidado em mentol, que possui um valor de mercado maior, por exemplo. A sua completa hidrogenação permite que ele seja adicionado a combustíveis, pois diminui a viscosidade e aumenta a capacidade de uso de um combustível em um motor (JONGEDIJK et al., 2016). Devido às suas diversas aplicações, a taxa de produção do limoneno aumentou, bem como o seu valor de mercado, que deve atingir cerca de 2 bilhões de dólares em 2024 (LI et al., 2021).

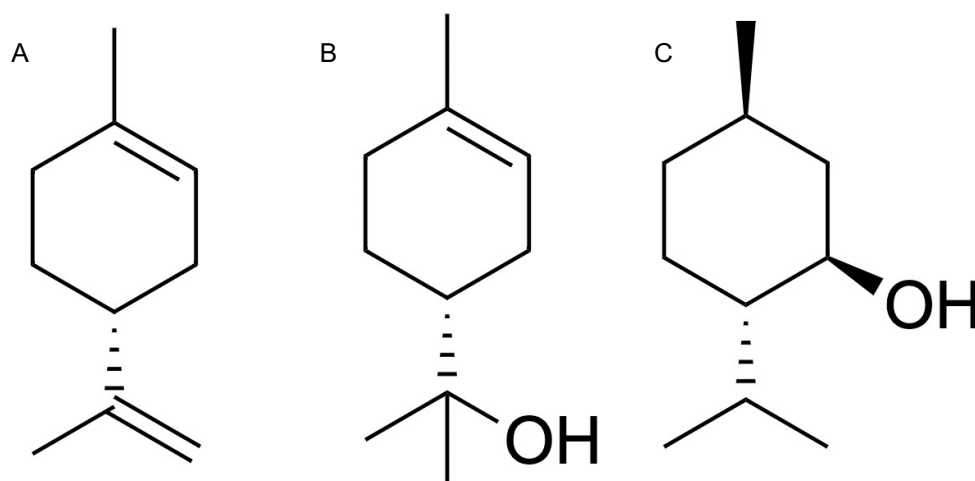


Figura 1 Estrutura química do limoneno e seus derivados. (A) Limoneno, (B) Alfa-terpineol e (C) Mentol. As estruturas foram desenhadas utilizando o software *ChemDraw*.

A fim de obter uma produção que satisfaça as necessidades do mercado, as quantidades obtidas devem ser em g/L. O melhor rendimento obtido até o momento foi 950 mg/L após 96 h de fermentação pela cepa de *S. cerevisiae* LIM141M (PENG et al., 2022), superando as produções de anteriores, também em *S. cerevisiae*, CHENG et al. (2019) e IGNEA et al. (2019a) de 178,7 mg/L e 167,38 mg/L, respectivamente.

1.3 Chassi

Dentre os microrganismos com características adequadas a produção de isoprenoides, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta um grande potencial (WALLS; RIOS-SOLIS, 2020). Além de possuir naturalmente a via do mevalonato, a levedura é capaz de acumular uma grande quantidade de ergosterol e possui um conjunto de enzimas de redução-oxidação que permitem que o citocromo P450 faça modificações no esqueleto carbônico dos terpenos. É também uma levedura de fácil manipulação, possui um rápido crescimento, é bem caracterizada, utilizada em diversos bioprocessos industriais e possui o GRAS status (CHENG et al., 2019; VICKERS et al., 2017; WANG et al., 2018).

As características de *Saccharomyces cerevisiae* levaram diversos grupos de pesquisa a produzirem diversos terpenos, principalmente aquele que podem ser utilizados na farmacoterapia, como foi o caso da artemisinina, canabinoides e seus análogos, taxadieno e

vimblastina e óleos essenciais para aromaterapia (LUO et al., 2019; NOWROUZI et al., 2020; RO et al., 2006; ZHANG et al., 2022).

Devido a um grande esforço da comunidade de biologia sintética, diversas ferramentas, como MoClo, EasyGuide e ActiveE, foram desenvolvidas para a manipulação genética de *S. cerevisiae* (JACOBUS et al., 2022; MALCI et al., 2022; MALCL et al., 2021), o que deve fomentar o uso da levedura para diversas finalidades. A combinação de ferramentas genéticas com engenharia metabólica e fermentação em larga escala é uma promessa sustentável e efetiva para a produção de terpenoides.

1.4 A via do mevalonato

Todos os terpenos possuem como esqueleto unidades de uma molécula de cinco carbonos chamada de isopreno, que, por sua vez, é derivada do isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero, dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Em leveduras, ambas as moléculas podem ser produzidas pela via do mevalonato (MEV), que, além de ocorrer em eucariotos, também ocorre em Archea, citoplasma de plantas e algumas bactérias. A via do MEV é iniciada pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA pela enzima tiolase. Em seguida, outra molécula de acetil-CoA é adicionada ao acetoacetil-CoA para gerar 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) pela HMG-CoA sintase. Após isso, a HMG-CoA redutase, utilizando NADPH como cofator, produz o ácido mevalônico a partir do HMG-CoA. A fosforilação de mevalonato para mevalonato 5-difosfato é feita numa reação sequencial por duas enzimas quinases, a mecalonato e a fosfomevalonato. A última reação da via do MEV é a descarboxilação pela mevalonato difosfato descarboxilase para formar o IPP, que sofre isomerização pela isopentenil difosfato delta-isomerase (IDI) para formar o DMAPP. A partir deste ponto, as terpeno sintases catalisam as reações de condensação entre IPP e DMAPP para formar geranyl pirofosfato (GPP), uma estrutura com 10 carbonos. Posteriormente, a adição de 5 carbonos gera o farnesil pirofosfato (FPP), precursor de sesquiterpenos, diterpenos, ubiquinona e esteróis (CHATZIVASILEIOU et al., 2019; IGNEA et al., 2019b; NIU et al., 2017).

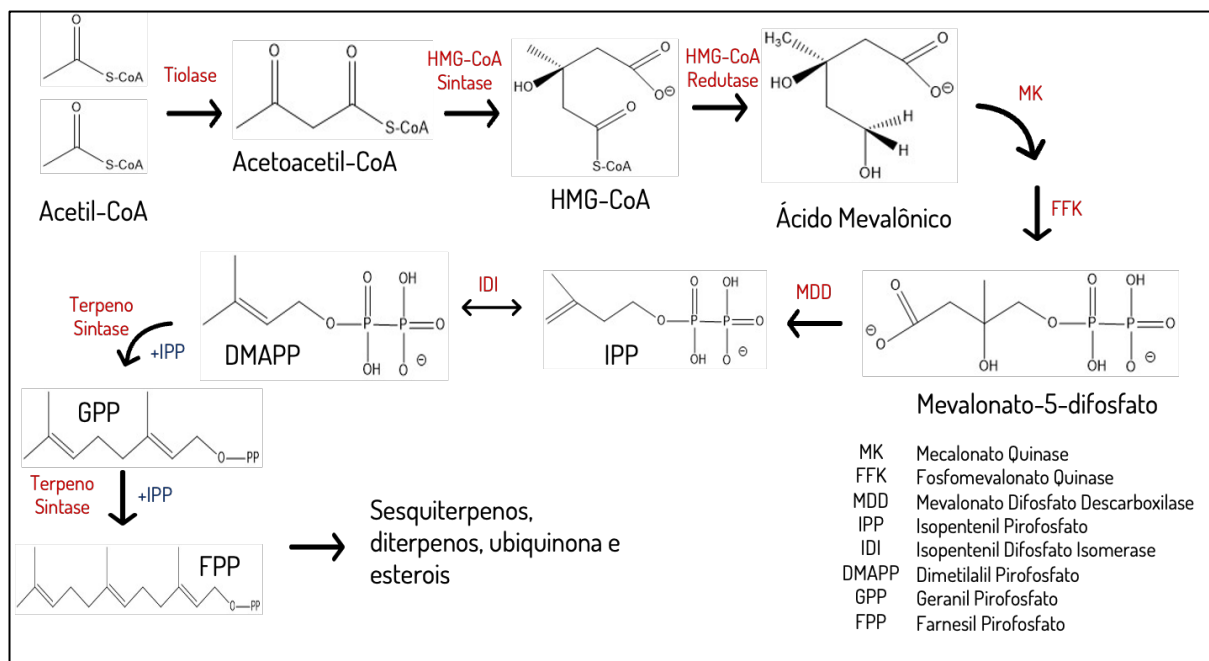


Figura 2 Representação esquemática da via do mevalonato. A via do mevalonato está presente em archeas, leveduras, plantas e outros eucariotos, como os humanos. As estruturas foram desenhadas com o software *ChemDraw*.

1.5 Canalização de fluxo e Synzips

Em organismos vivos, a canalização de fluxo ocorre pela ausência ou presença de determinadas moléculas que regulam uma ou mais vias metabólicas. Em plantas, por exemplo, isso ocorre através da canalização de auxina para a formação de novos tecidos, onde os transportadores de auxina amplificam o fluxo da molécula por difusão (STOMA et al., 2008).

O metabolismo celular é complexo, onde diversas enzimas, metabólitos e fatores regulatórios interagem tanto nos compartimentos celulares quanto no citosol (DUSSÉAUX et al., 2020). Assim, melhorar a produção de uma dada molécula torna-se um desafio de diversas formas, visto que o encontro de todos estes fatores pode limitar o crescimento e sobrevivência celular, se o fluxo metabólico de uma via for limitado por um metabólito instável, tóxico ou houver competição por recursos com outra via metabólica (PAREEK et al., 2021). Além disso, acaba tornando-se necessário realizar o controle do fluxo metabólico com a expressão de mais de um gene, visto que somente um gene não é capaz de controlar todas as modificações que podem ser ocasionadas na via (PEREIRA et al., 2016).

O acúmulo de intermediários tóxicos limita o potencial de biossíntese de monoterpenos e afeta o crescimento celular. Este acúmulo se deve pela discrepância entre o alto fluxo de carbono pela via do mevalonato e a baixa taxa de consumo de IPP e DMAPP, ocasionada pela limitação intencional da síntese de FPP e pela baixa eficiência das monoterpeno sintases (PENG et al., 2018b). Além disso, a concorrência com a farnesil pirofosfato sintase pelo substrato GPP, limita ainda mais a biossíntese de limoneno. Visando preencher esta lacuna e buscar equilibrar as taxas de produção de IPP, este projeto tem a finalidade de melhorar a produção de monoterpenos. A via metabólica de biossíntese de terpenos, bem como as modificações genéticas realizadas na linhagem ILHA LIM4A (PENG et al. 2018b) são apresentadas na figura 3.

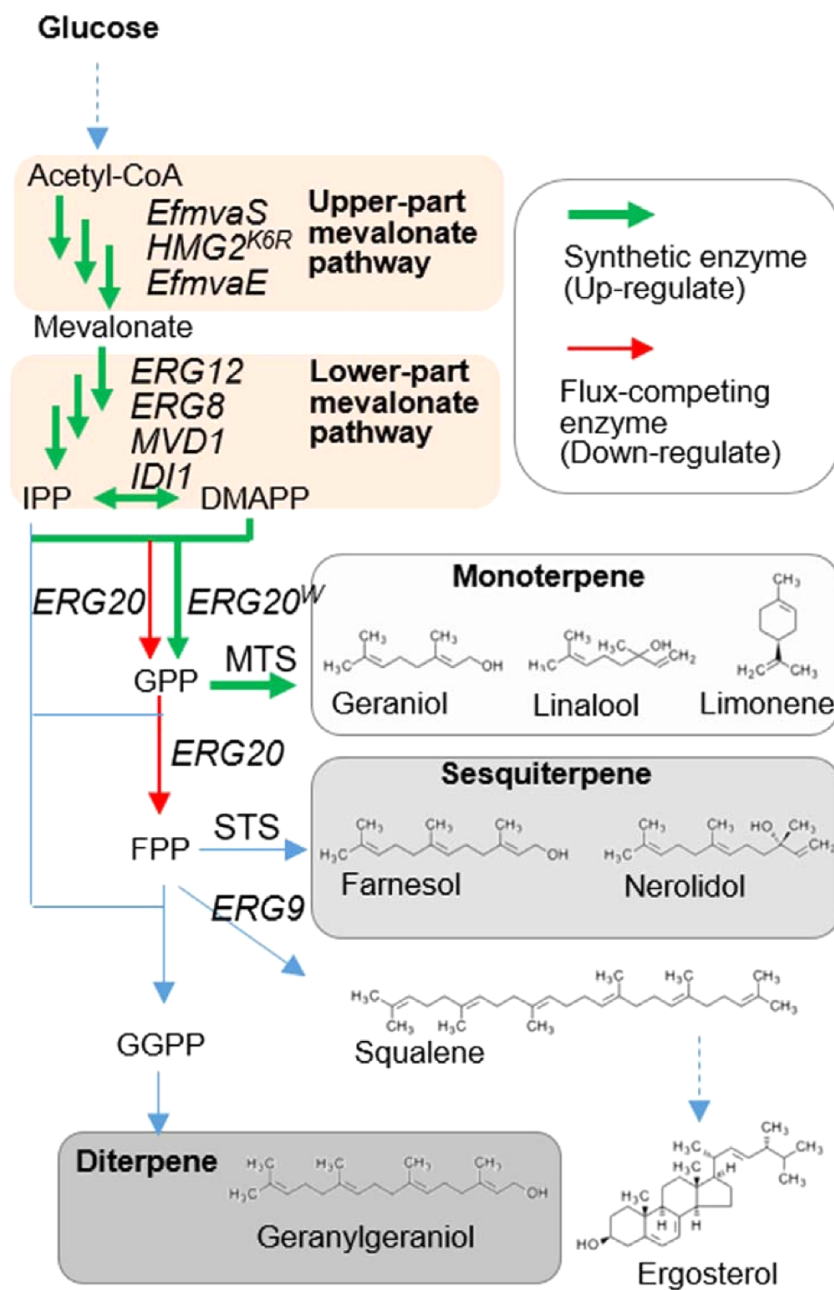


Figura 3 Engenharia metabólica de *S. cerevisiae* para a produção de isoterpenóides. A figura descreve as rotas metabólicas modificadas geneticamente que levam à biossíntese de isoterpenóides na linhagem *S. cerevisiae* ILHA LIM4A. As setas verdes indicam fluxos de carbono aumentados através da superexpressão dos genes envolvidos nas conversões. As setas vermelhas indicam fluxos de carbono reduzidos pelas vias através da diminuição da atividade catalítica da enzima responsável pelas conversões. Abreviações: *EfmvaS*, *Enterococcus faecalis* hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintase; *EfmvaE*, *E. faecalis* acetoacetyl-CoA tiolase/HMG-CoA redutase; HMG2K6R, mutante K6R de HMG-CoA redutase 2; *ERG12*, mevalonato cinase; *ERG8*, fosfomevalonato cinase; *MVD1*, mevalonato pirofosfato descarboxilase; *IDI1*, difosfato de isopentenil: difosfato de dimetilalil isomerase; *ERG20*, farnesil pirofosfato sintase; *ERG20^W*, *ERG20* N127W mutante, geranilpirofosfato sintase; *ERG9*, esqualeno sintase; IPP, pirofosfato de isopentenil; DMAPP, pirofosfato de dimetilalil; GPP, pirofosfato de geranil; FPP, farnesil pirofosfato; GGPP, pirofosfato de geranylgeranil; MTS, monoterpene sintase; STS, sesquiterpene sintase (figura reproduzida de PENG et al. (2018b)).

Uma solução que muitas células naturalmente empregam para facilitar a catálise sequencial em vias metabólicas é a canalização de substrato, caracterizada pela formação de complexos proteicos composto por enzimas que catalisam reações subsequentes em uma mesma via metabólica. Os complexos enzimáticos diminuem a distância a ser percorrida, por difusão, pelo metabólito até encontrar a próxima enzima, podendo diminuir a exposição da célula a intermediários tóxicos, também dificultando o acesso de vias competidoras ao metabólito (KUZMAK et al., 2019).

As três reações que levam à conversão de IPP a GPP são catalisadas pelas enzimas:

- *IDII*, difosfato de isopentenil: difosfato de dimetilalil isomerase
- *ERG20^W*, geranilpirofosfato sintase mutante N127W
- *CILS*, *Citrus limon* limoneno sintase (monoterpeno sintase específica para síntese de limoneno)

Os genes correspondentes às três enzimas citadas foram clonados, separadamente, em fusão com diferentes peptídeos de interação chamados SYNZIPs, que são peptídeos sintéticos, formados por aproximadamente 50 aminoácidos, capazes de formar heterodímeros. Além disso, alguns deles dimerizam com mais de um parceiro, permitindo a construção de estruturas mais complexas, como é o caso daquelas utilizadas no projeto. A synzip 18 é capaz de formar dímeros com as synzips 19, 20 e 21, a synzip 19 também forma dímeros com as synzips 20 e 21, e a synzip 20 forma dímeros com a synzip 21. Ao mesclar as synzips, tem-se a formação de trímeros e tetrâmeros (THOMPSON et al., 2012).

1. OBJETIVO

1.1 Objetivo Geral

Construir um processo sintético de canalização de substrato para a biossíntese de limoneno em *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente engenheirada, visando minimizar o acúmulo de intermediários da via e aumentar a disponibilidade de GPP para a limoneno sintase, reduzindo assim o fluxo de conversão para FPP. Portanto, a canalização de substrato pretendida se aplica às conversões: $IPP \leftrightarrow DMAPP \rightarrow GPP \rightarrow \text{limoneno}$.

1.2 Objetivos Específicos

Clonar os genes *IDII* (difosfato de isopentenil: difosfato de dimetilalil isomerase), *CILS* (*Citrus limon* limoneno sintase) e *ERG20^W* (geranilpifosfato sintase mutante N127W) em fusão com peptídeos sintéticos de dimerização denominados Synzips 18 a 21, de forma a gerar os genes *IDII-SYNZIP18*, *ERG20^W-SYNZIP19*, *CILS-SYNZIP21* e *CILS-SYNZIP20*.

Introduzir os genes *ERG20^W-SYNZIP19* e *CILS-SYNZIP21* na linhagem *S. cerevisiae* VZL1303 para formar complexo do tipo heterodímero linear.

Introduzir os genes *IDII-SYNZIP18*, *ERG20^W-SYNZIP19* e *CILS-SYNZIP21* na linhagem *S. cerevisiae* VZL1303, para formar complexo do tipo heterotrímero linear.

Introduzir os genes *IDII-SYNZIP18*, *ERG20^W-SYNZIP19*, *CILS-SYNZIP21* e *CILS-SYNZIP20* na linhagem *S. cerevisiae* VZL1303, para formar complexo do tipo heterotetrâmero em anel.

Comparar a produção de limoneno pelas linhagens construídas nos itens anteriores entre si e com a relatada na literatura científica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Meios de Cultura

2.1.1 Meio Luria Bertani (LB)

O meio Luria Bertani (LB) é composto por 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de ágar bacteriológico para meio sólido. Após dissolução em 1 L de água destilada, o pH foi ajustado para 7,0 e o meio foi autoclavado por 15 minutos sob temperatura de 120°C e pressão de 1,1 atm.

2.1.2 Meio *Super Optimal Broth with Catabolite Repression* (SOC)

O meio SOC é composto por 5 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de triptona, 0,584 g/L de NaCl, 0,186 g/L de KCl, 2,4 g/L de MgSO₄. Após a pesagem e dissolução em 1 L de água destilada, o pH foi justado para o valor de 7,5. Em seguida, o meio foi autoclavado por 15 minutos sob temperatura de 120°C e pressão de 1,1 atm. Após a autoclavagem, foram adicionados 20 mL de glicose 20% estéril ao meio.

2.1.3 Meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD)

O meio YPD é composto por 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona bacteriológica. Após a pesagem e dissolução em 1 L de água destilada, o meio foi autoclavado por 15 minutos sob temperatura de 120°C e pressão de 1,1 atm. Após a autoclavagem, foram adicionados 20 mL de glicose 20% estéril ao meio e adicionado o antibiótico geneticina (G-418) 200 µg mL⁻¹ quando necessário.

2.1.4 Meio Mínimo Sintético (SM)

O meio mínimo sintético para leveduras é formado por 6,7 g/L de base nitrogenada de levedura e 20 g/L de glicose. Após a pesagem e dissolução em 1 L de água destilada, o meio foi autoclavado por 15 minutos sob temperatura de 120°C e pressão de 1,1 atm. A solução de glicose foi preparada e autoclavada separadamente do meio.

2.1.5 Meio Sintético Complexo com Alta Concentração de Glicose (SCGHG)

O meio SCGHG é composto por 1,7 g/L de base nitrogenada de levedura sem sulfato de amônia, 1,6 g/L da mistura de aminoácidos *leucine drop-out*, 1,6 g/L de glutamato e 200 g/L

de glicose. Após a pesagem e dissolução em 1 L de água destilada, o meio foi autoclavado por 15 minutos sob temperatura de 120°C e pressão de 1,1 atm. A solução de glicose foi preparada e autoclavada separadamente do meio.

2.1.6 Meio Sintético Complexo sem Uracila (SC-U)

O meio SC-U é composto por 6,7 g/L de base nitrogenada de levedura com sulfato de amônio, sem aminoácidos; e 2 g/L de suplemento de meio sintético para levedura sem uracila. Após a pesagem e dissolução em 1 L de água destilada, o meio foi autoclavado por 15 minutos sob temperatura de 120°C e pressão de 1,1 atm. Adicionou-se o antibiótico G-418 200 µg mL⁻¹ quando necessário.

2.2 Linhagens

2.2.1 *Escherichia coli*

A linhagem de *E. coli* Top10 foi utilizada nas etapas de clonagem gênicas e propagação de plasmídeos.

2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens de *S. cerevisiae* ILHA LIM4A e ILHA o401RI4 seriam utilizadas nos trabalhos de produção de limoneno. ILHA LIM4A é uma linhagem produtora de limoneno, que seria usada como padrão de produção. ILHA o401RI4 é a linhagem precursora da ILHA LIM4A, que seria utilizada para realizar as modificações metabólicas. As linhagens de *S. cerevisiae* citadas foram desenvolvidas pelo grupo de pesquisa da professora Dra. Claudia E. Vickers (*Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology*, the University of Queensland, Australia), a qual cedeu as linhagens e participou como colaboradora do projeto. Devido a pandemia de COVID-19 e a interrupções das atividades laboratoriais, a linhagem ILHA 401RI4 foi perdida, tanto no nosso laboratório quanto no laboratório da professora Vickers, e não foi possível recuperá-la. Assim, buscamos outras opções de células de *S. cerevisiae* e recebemos a linhagem VZL1303, cedida pela professora Dra. Maysa Furlan, da UNESP. A linhagem VZL1303 foi desenvolvida pelo laboratório da professora Maysa e é resultante do cruzamento entre duas linhagens de *S. cerevisiae*, CEN.PK2 e *ERG7* DAmP; foi utilizada em um trabalho anterior para a produção de um triterpeno pentacíclico (SOUZA-

MOREIRA et al., 2016). A célula contendo o plasmídeo pYES2 foi cultivada em meio SC-U. A célula vazia, sem a presença de plasmídeos, foi cultivada em meio YPD.

2.3 Soluções

2.3.1 Ampicilina

A solução estoque foi preparada na concentração de 100 mg/mL e utilizada a 100 µg/mL em soluções finais. O antibiótico foi dissolvido em água deionizada e esterilizado por filtração, em um filtro de poro 0,22 µm para seringa descartável de 5 mL. As soluções estoque foram aliquotadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -20 °C.

2.3.2 Gentamicina (G-418)

A solução estoque foi preparada na concentração de 200 mg/mL e utilizada a 200 µg/mL em soluções finais. O antibiótico foi dissolvido em água deionizada e esterilizado por filtração, em um filtro de poro 0,22 µm para seringa descartável de 5 mL. As soluções estoque foram aliquotadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -20 °C.

2.3.3 Tampão Tris-Acetato EDTA (TAE)

Para 1 L do tampão estoque 50X, adicionou-se 242 g de Tris-base em aproximadamente 600 mL de água deionizada, 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 mL da solução de EDTA 0,5 M (pH 8,0) e completando-se o volume para 1 litro com água deionizada. Para a solução de uso 1X, diluiu-se 20 mL de TAE 50X para um volume final de 1 L.

2.3.4 Solução de dNTPs

A solução foi preparada em água miliQ adicionando-se volumes iguais (10 µL) de cada dNTP (dGTP, dCTP, dATP e dTTP) com concentrações individuais de 100 mM. Em seguida, completou-se o volume para 100 µL ao adicionar 60 µL de água miliQ. A solução foi aliquotada em 10 microtubos com 10 µL de dNTPs, resultando em uma solução a 10 mM.

2.4 Preparo de Células de *E. coli* Quimicamente Competentes

Foi preparada uma pré-cultura da bactéria em 5 mL de meio LB, adicionando o antibiótico necessário, a qual foi deixada em crescimento durante a noite a 37 °C e 220 rpm. Foi medida a densidade ótica (DO) a 600 nm da pré-cultura e inoculou-se a 100 mL de meio

LB de forma que atingisse uma DO de 0,03 - 0,05. As bactérias foram novamente incubadas a 37 °C e 220 rpm até que alcançassem uma DO de 0,3 - 0,4. As células foram transferidas para dois tubos Falcon de 50 mL previamente resfriado em gelo e foram centrifugadas por 10 min a 4.000 rpm a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e os tubos foram imediatamente transferidos para o gelo. O *pellet* foi ressuspensionado em 20 mL de CaCl₂ 0,1M e previamente resfriado em gelo, onde permaneceu sendo incubado no gelo durante 20 minutos. As amostras foram centrifugadas novamente por 10 min a 3.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi cuidadosamente ressuspensionado em 2 mL de solução de CaCl₂ 0,1M e glicerol 10% (v/v). As células foram aliquotadas em volumes de 50 a 100 µL/tubo e armazenadas no freezer a -80 °C.

2.5 Preparo de Células de *E. coli* Eletricamente Competentes

Inoculou-se 1mL de uma cultura fresca de *E. coli* em 500 mL de caldo LB e foi deixado para crescimento durante 16 h, agitadas a 37°C e 220 rpm em shaker. As células cresceram até atingir uma DO de aproximadamente 0,5 – 0,7. Em seguida, as células foram resfriadas em gelo por 20 min. A partir desta etapa, todas as células foram mantidas em banho de gelo e todos os recipientes utilizados também foram resfriados em gelo antes de adicionar as células. Em seguida, as células foram coletadas e transferidas para uma garrafa de centrífuga fria e foram centrifugadas a 4000 x g por 15 minutos a 4°C. Cuidadosamente, o sobrenadante foi despejado e descartado. O *pellet* foi ressuspensionado suavemente em 500 mL de glicerol 10% (v/v) gelado. As amostras foram centrifugadas pela segunda vez 4000 x g por 15 minutos a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi despejado e descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 250 mL de glicerol 10% (v/v) gelado. As amostras foram centrifugadas pela terceira vez na rotação 4000 x g por 15 minutos a 4 °C. O *pellet* foi ressuspensionado em 20 mL de glicerol 10% gelado e transferido para dois tubos estéreis de 50 mL do tipo Falcon. Pela quarta vez, as amostras foram centrifugadas numa velocidade de 4000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então despejado e descartado, e o *pellet* foi ressuspensionado para um volume final de 2 mL de glicerol 10% (v/v). As células foram aliquotadas em volumes de 50 a 100 µL por microtubo e armazenadas no freezer a -80 °C.

2.6 Transformação de *E. coli* Top10 Quimicamente Competente por Choque Térmico

As células de *E. coli* quimiocompetentes foram retiradas do freezer -80 °C e descongeladas em gelo. Utilizou-se 50 µL da solução de células para cada transformação e

controles. Adicionou-se de 20-50 µg de plasmídeo intacto ou 50-100 µg de reação de ligação a 50 µL de células competentes. DNA e células foram incubados juntos no gelo por 30 min. Em seguida, a mistura foi incubada em banho-maria a 42°C por 30 s e transferida imediatamente para o gelo por 2 min. Foram adicionados 250 µL de meio SOC para cada transformação, que foram incubadas por 1 h em shaker a 37°C e 220 rpm. A seguir, as células foram plaqueadas em meio LB com adição de ampicilina (100 µg mL⁻¹) para seleção dos transformantes. As células transformantes que cresceram após 16 h foram inoculadas em meio LB líquido com adição de ampicilina (100 µg mL⁻¹). Os plasmídeos foram extraídos das culturas de *E. coli* transformantes por uso de kit comercial do tipo miniprep e quantificados. Em seguida, realizou-se a digestão do plasmídeo com enzimas de restrição para uma seleção das possíveis clonagens.

2.7 Transformação de *E. coli* Top10 Eletrocompetente

A *E. coli* eletrocompetente foi retirada do freezer -80 °C e aguardou-se dessolidificação da solução contendo as células. Pegou-se 50 µL da solução de célula para cada transformação e controles. Adicionou-se de 2-3 µL de ligação a 50 µL de células competentes. DNA e células foram incubados juntos no gelo por 3 min. Em seguida, a mistura foi inserida em uma cuveta e levada ao eletroporador, onde sofreu um choque elétrico de 1900 V por 3 s. Foram adicionados 250 µL de meio SOC para cada transformação, que foram incubadas por 1 h em shaker a 37 °C e 220 rpm. Após a incubação, as células foram plaqueadas em meio LB com adição de ampicilina (100 µg mL⁻¹) para seleção dos transformantes. As células transformantes que cresceram após 16 h foram inoculadas em meio LB líquido com adição de ampicilina (100 µg mL⁻¹). Os plasmídeos foram extraídos das culturas de *E. coli* transformantes por uso de kit comercial do tipo miniprep e quantificados. Em seguida, realizou-se a digestão do plasmídeo com enzimas de restrição para uma seleção das possíveis clonagens.

2.8 Clonagem Gênica

Foram almejadas três configurações para a canalização de substrato: heterodímero linear, heterotrímero linear e heterotetrâmero em anel (figura 4). O dímero será composto por ERG20^w-SYNZIP19 e CILS-SYNZIP21. O trímero terá a adição de IDI1-SYNZIP18 aos genes ERG20^w-SYNZIP19 e CILS-SYNZIP21. Para formar o tetrâmero, será adicionada uma cópia extra da enzima *C/LS* fusionada à SYNZIP20. A limoneno sintase parece ser pouco eficiente na conversão de GPP em limoneno (PENG et al., 2018b), o que justifica o a inserção de uma cópia extra da enzima.

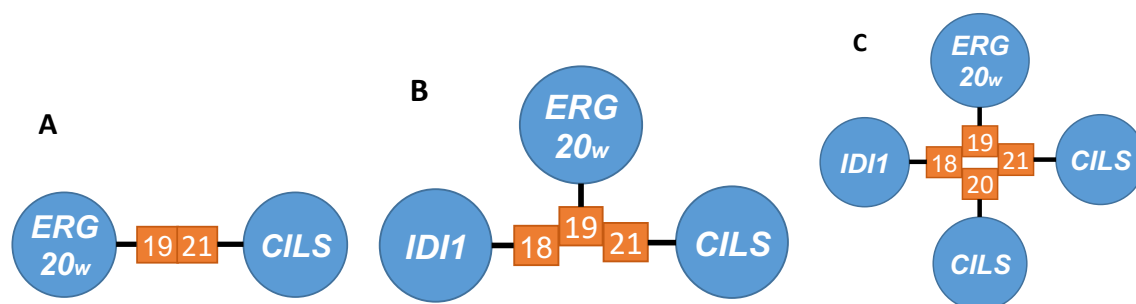


Figura 4. Configurações em heterodímero linear (A), heterotrímero linear (B) e heterotetrâmero em anel (C) que serão construídas empregando os SYNZIPs 18, 19, 20 e 21.

Os genes correspondentes às enzimas em fusão com as SYNZIPs foram construídos sob controle de variações do promotor *GAL* (PENG et al., 2018a). O Promotor *GAL* foi escolhido para essas construções por ser forte e por sofrer repressão pela glicose, o que permite o crescimento da cultura sem produção de terpenos para fins de propagação. A substituição da glicose por galactose ou sacarose reverte o processo de inibição, iniciando o processo produtivo (PENG et al., 2018a), conforme a representação esquemática na figura 5.

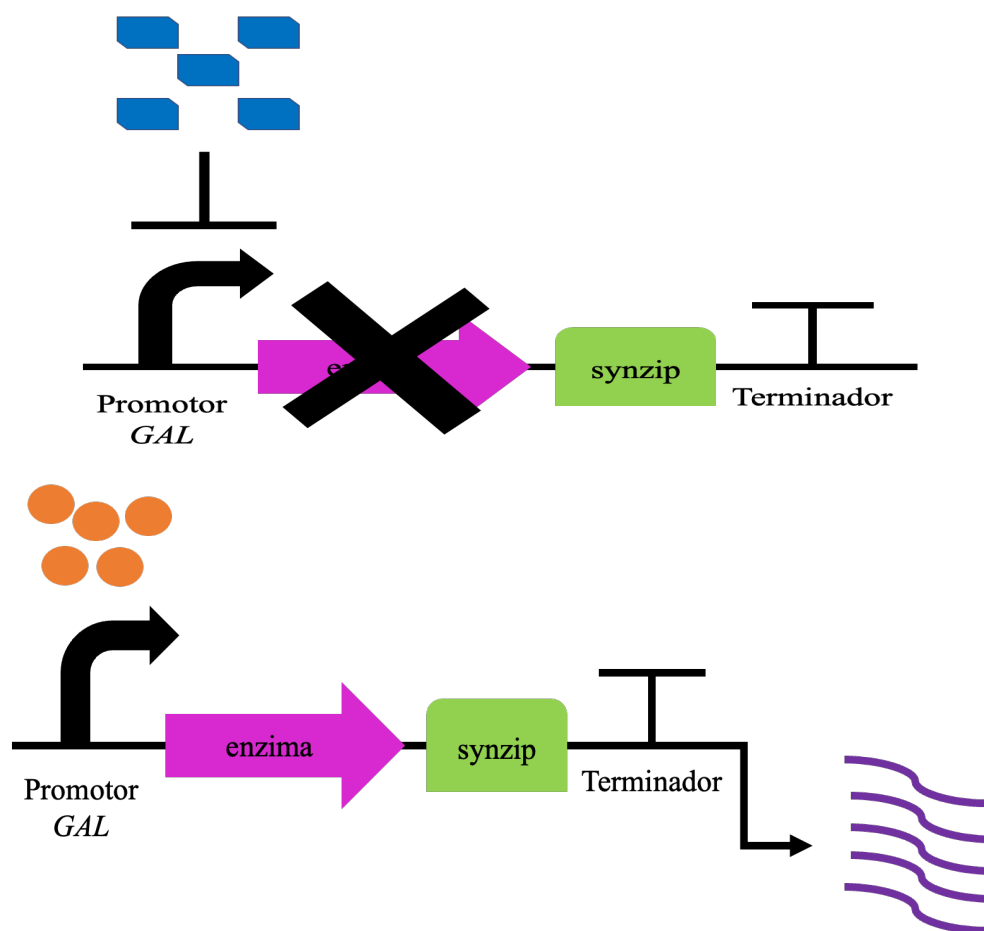


Figura 5 Representação esquemática do processo de inibição e ativação do promotor *GAL*. A presença de glicose (hexágonos azuis) impede a transcrição dos genes que estão sob o controle do promotor. A inibição visa que a célula possa crescer sem a necessidade da produção de moléculas. A presença de sacarose ou galactose (bolas laranjas) reverte este processo, permitindo que os genes sejam transcritos.

As sequências gênicas e regulatórias (DNA) foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os primers específicos, listados na tabela 1. As sequências de todas synzips foram otimizadas para *S. cerevisiae* com a ferramenta Codon Optimization Tool, da empresa IDT, disponível online. As clonagens em plasmídeos foram realizadas por emprego de enzimas de restrição (*BsaI*, *SpeI* e *XhoI*) e ligação de DNA (T4 DNA ligase). Inicialmente, foi utilizado o plasmídeo *shuttle E. coli/S. cerevisiae* pJT11 (figura 6) para as clonagens.

Tabela 1 Lista de primers e oligonucleotídeos utilizados no projeto.

Gene	Nome do primer	Primer	Função
CILS-Synzip21	SZ21c-CILS_fw	TCTGGGTCTCCTTGAGAAGG AGATCGCTAGACTGAGAAA AGAGATAGCGGCCCTAAGG GACCGTCTTGCTCATAAAAA GTAATAGTGACCATGGCGGA TTGAG	Inserir a synzip21 no gene <i>CILS</i> ; amplificar de <i>CILS</i> a <i>ERG20^W</i>
	SZ19n-ERG_rv	TCTGGGTCTCAAAGAGAGAA CAATTAAAGCAAAAACCTGG CTGCCCTTCGTAACAAGTTA GACGCATACAAGAACAGGC TATAATAGTGACCTGCAGGA AGTTTTGTAG	amplificar do terminador de <i>CILS</i> ao terminador de <i>ERG20^W</i>
ERG20^W-Synzip19	SZ19c-linker- ERG_fw	TCTGGGTCTCCTCTTTTGTTTC AGCTCTTCGTTACGGTTCTTT AGCTCCTCCTTCTTATTCTCC AATGATTCTAGTTCATTTCCT GATCCTGATCCTCCTCCTGAT CCTCCTGATCCTCCTTTGCTT CTCTTGTAACCTTTGTTCAAG	Inserir a synzip19 no gene <i>ERG20^W</i> ; amplificar do terminador de <i>CILS</i> ao terminador de <i>ERG20^W</i>
	SZ21n-linker- CILS_rv	CTGGGTCTCCTCAAGATAAG CGTTCTCATTCTCTATTACTG CAACGTCATTCTCAAGCTGG GCGACTTCGTTTCCTCCTGA TCCTGATCCTGATCCTCCTCC TGATCCACCCTTTGTACCTG GTGATGC	
Synzip19	Synzip19_fw	AGCCTGTTCTTGTATGCGTC	Confirmar que as synzips foram inseridas no plasmídeo
	Synzip19_rv	TCAGTCGCAGAAGCCAAATG	
Synzip21	Synzip21_fw	CACATGGCATTACCCGCATC	
	Synzip21_rv	CTCTCAATCCGCCATGGTC	
IDI1-Synzip18	SpeI_Gal10_Fw (par 1)	TCTGACTAGTCTCCTTGACG TTAAAGTATAGAGG	Amplificar <i>IDI1</i> do genoma de <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> , inserir
	BsaI_SZ18_Linker_ IDI1_Rv (par 1)	TCTGGGTCTCCCTCATTCTCT AGTCTTGCTAAATCATTCTCT AGCGTCGCAGCAATGCTTCCT GATCCTGATCCTCCTCCTGAT	

		CCTCCTGATCCTCCTAGCATT CTATGAATTTGCCTGTC	synzip18 no gene para formar o heterotrímero linear e o heterotetrâmero em anel
	BsaI_SynZip18_ TRPL15a_Fw (par 2)	CTGGGTCTCCTGAGAACGCA CGTTTGGAGAAGGACATAGC AAACCTTGAAAGGGACCTTG CAAAGTTGGAGAGGGAAGA GGCATACTTTTAATAAGCTG GTTGATGGAAAATATAATTT TATTG	
	SpeI_RPL15a_Rv (par 2)	TCTGACTAGTGGAAAAACGG GAAGAAAAGGAAAG	
CILS-Synzip20	XhoI_GAL2_Fw (par 1)	TCTGCTCGAGGGTCACGTGA TCTATATTCGAAAGG	Inserir a synzip20 no gene <i>CILS</i> e formar o heterotetrâmero em anel
	BsaI_Synzip20_ Linker_CILS1_Rv (par1)	TCTGGGTCTCCCTCCTGAAT GGCTCTCAGAAAGTTCCTCGA CTGTGCTTCCTCCTGATCCTG ATCCTGATCCTCCTCCTGAT CCACCCTTTGTACCTGGTGA TGC	
	BsaI_Synzip20_ TRPL41B_Fw (par 2)	TCTGGGTCTCGGGAGTTGGA AAAGCGTAATGCCGAGCTA AAAAACAGGAAAGAAGAGC TAAAGAACCTAGTCGCACAC CTGAGACAGGAGCTGGCAG CTCATAAATACGAATAGTGA CCATGGCGGATTGAGAGCA AATCGTTAAG	
	XhoI_TPRL41B_Rv (par 2)	GTCCTCGAGACGCCACAGAA ACCTCAGAATAAG	

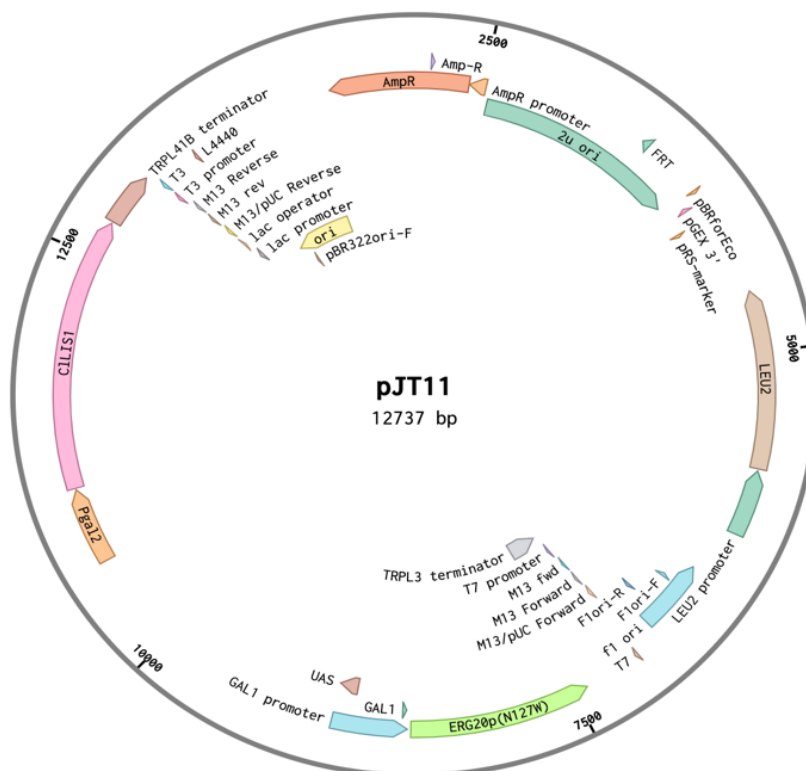


Figura 6 Mapa do plasmídeo pJT11. O plasmídeo possui uma origem de replicação F1 e gene de resistência a ampicilina *ampR* para clonagem em *E. coli*, origem de replicação 2 μ ori para *S. cerevisiae*, e gene para complementação de auxotrofia na síntese de leucina *LEU2* em *S. cerevisiae*. Imagem gerada pelo software *Benchling*.

Devido à perda da linhagem ILHA 401RI4, acabamos mudando não apenas a linhagem, como também o plasmídeo, passando a utilizar o pYES2 (figura 7). Com isso, foi realizada uma nova estratégia de clonagem, utilizando os primers da tabela 2. Pudemos reaproveitar os primers referentes a clonagem do gene *CILS*-Synzip20, e os primers *BsaI*_SZ18_Linkers_IDI1_Rv e *BsaI*_SynZip18_TRPL15a_Fw, referentes a IDI1-Synzip18. Para *CILS*-Synzip21 e *ERG20w*-Synzip19 foi necessário o design de novos primers, a partir de pJT11 com adição das synzips 19 e 21, para que eles pudessem ser clonados no plasmídeo pYES2. Dessa vez, foram utilizadas as enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI, *Xba*I e *Xho*I. O esquema de reações está exemplificado na figura 8. Cada inserto foi digerido separadamente para posterior ligação de todos os insertos juntos. A clonagem foi sucedida desta forma, pois o gene *CILS* possui cinco sítios de restrição para *Eco*RI. Após a reação de digestão, todas as enzimas foram inativadas termicamente.

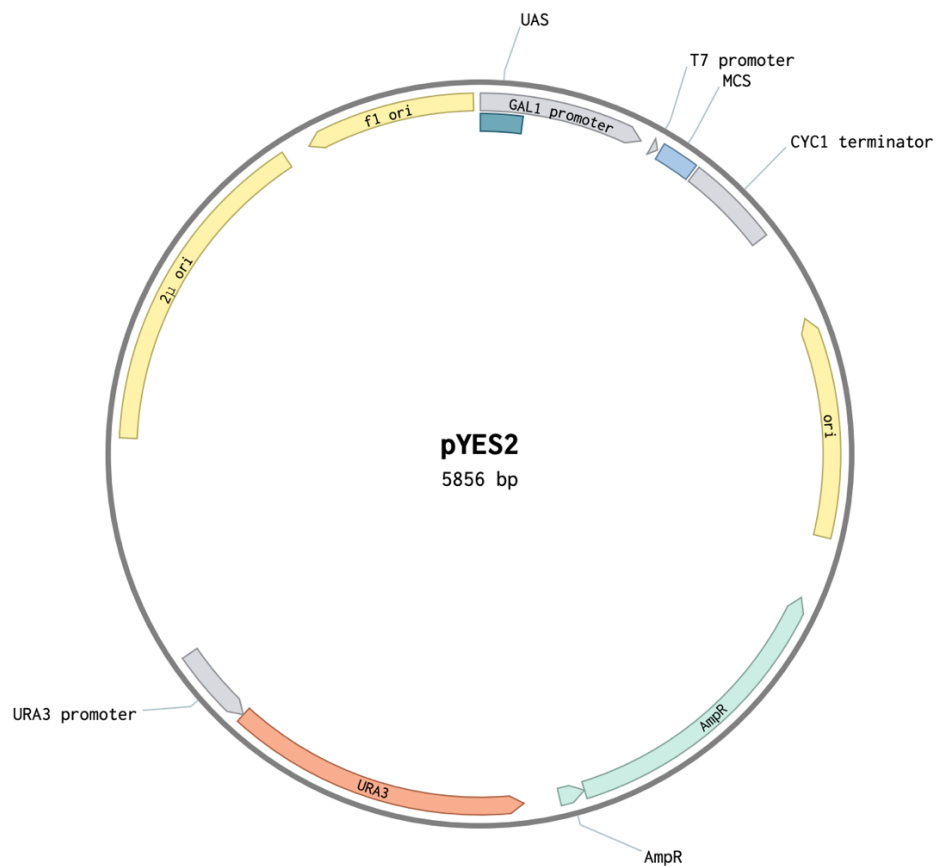


Figura 7 Mapa do plasmídeo pYES2. O plasmídeo possui uma origem de replicação F1 e gene de resistência a ampicilina *ampR* para clonagem em *E. coli*, origem de replicação 2μ ori para *S. cerevisiae*, e gene para complementação de auxotrofia na síntese de uracila *URA3* em *S. cerevisiae*. O plasmídeo possui um sítio múltiplo de clonagem contendo os sítios de restrição na seguinte ordem: *HindIII*, *Acc65I*, *KpnI*, *Ecl136II*, *SacI*, *BamHI*, *EcoRI*, *BseJI*, *NotI*, *XhoI*, *PaeI* e *XbaI*. Imagem gerada utilizando o software *Benchling*.

Tabela 2 Lista de primers desenhados para as clonagens com o plasmídeo pYES2.

Gene	Nome do Primer	Primer	Função
IDII-Synzip18	BamHI_PGal10_Fw (par1)	TCTGGGATCCCTCCTTGA CGTTAAAGTATAGAGG	Amplificar <i>IDII</i> do genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , inserir synzip18 no gene e formar o trímero e o tetrâmero
	EcoRI_RPL15a_Rv (par 2)	TCTGGAATTTCGGAAAAAC GGGAAGAAAAGGAAAG	
ERG20w-Synzip19	EcoRI_ERG20-SZ19_M13/pUC_fw	TCTGGAATTCCCCAGTC ACGACGTTGTAAAAC	Amplificar o gene a partir de pJT11-dímero para inserir em pYES2 e formar o dímero, trímero e tetrâmero.
	ERG20_PGAL1_rv	TCTCCTCGAGGAAGTAC GGATTAGAAGCCGCC	
CILS-Synzip21	XhoI_PGAL2_CILS1-SZ21_fw	TCTCCTCGAGGGGTCAC GTGATCTATATTTCG	Amplificar o gene a partir de pJT11-dímero para inserir em pYES2 e formar o dímero, trímero e tetrâmero.
	XbaI_M13/pUC_CILS1_rv	TCTCTCTAGAAGCGGAT AACAATTTCACACAGG	

Após a realização das PCRs, os fragmentos de *IDII*-Synzip18 e *CILS*-Synzip20 (tabela 1) foram purificados utilizando kit comercial de purificação de DNA. Os fragmentos foram então digeridos com as suas enzimas correspondentes, *XhoI* e *BsaI* para *IDII*-synzip18 e *SpeI* e *BsaI* para *CILS*-synzip20. O plasmídeo pJT11 contendo as synzips 19 e 21 foi digerido de acordo com a enzimas denominadas para a estratégia de clonagem utilizando sempre de 800 a 1000 ng de DNA nas reações, sendo utilizada também *XhoI* para o trímero e *SpeI* para o tetrâmero. Para a digestão do plasmídeo, adicionou-se a enzima FastAP, que degenera a terminação fosfato e impede que o plasmídeo se religue.

Após a digestão, utilizou-se novamente o kit comercial para purificação da reação e, em seguida, foi realizada a etapa de ligação. Após isso, os tubos com a reação foram incubados a 65 °C por 10 minutos para inativação da T4 DNA ligase e prosseguiu-se com a transformação de *E. coli* Top10. Após a transformação, a *E. coli* foi cultivada em meio LB com adição de ampicilina (100 µg mL⁻¹) para seleção dos transformantes e manutenção do plasmídeo. Os

plasmídeos foram extraídos das culturas de *E. coli* transformantes por uso de kit comercial do tipo miniprep.

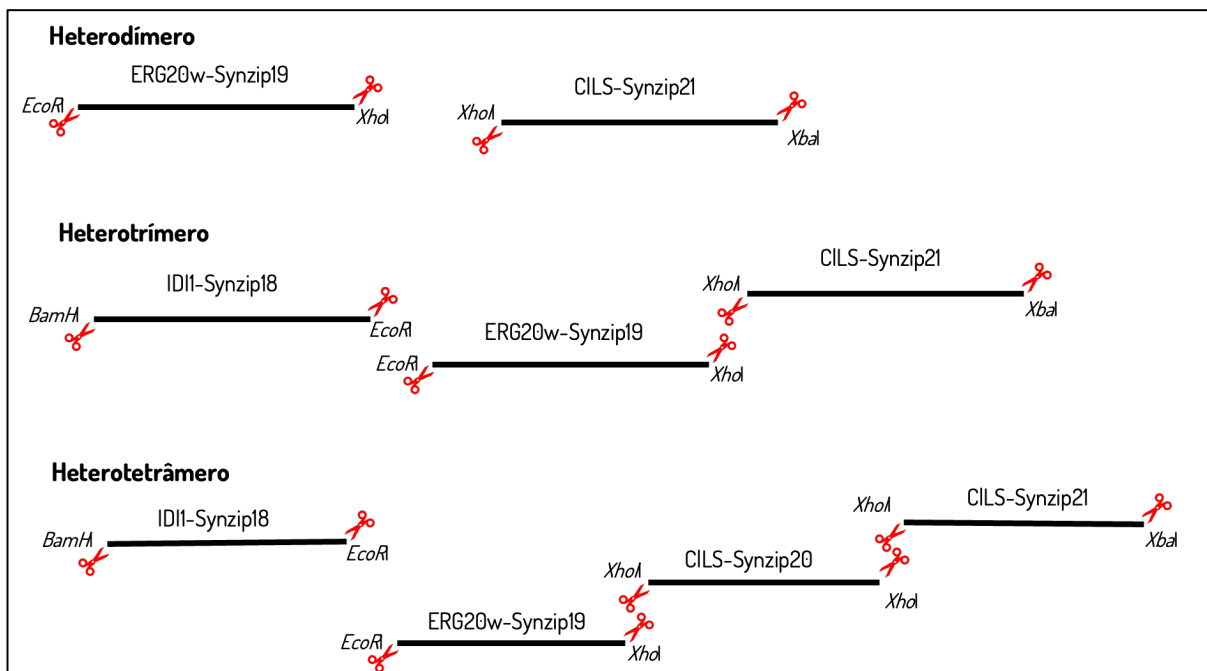


Figura 8 Representação esquemática da ordem de clonagem dos insertos no plasmídeo pYES2 com suas respectivas enzimas de restrição.

2.9 Clonagem por Golden Gate

Em um tubo de PCR, foram montadas duas reações com quantidades equimolares de insertos, conforme a tabela 5. As reações foram homogeneizadas e levadas ao termociclador, onde seguiu-se o protocolo apresentado na tabela 6. Os fragmentos de PCR utilizados na reação foram amplificados com os primers referentes a *CILS-Synzip21* e *ERG20^w-Synzip19*, presentes na tabela 1. O produto desta reação gerou o plasmídeo pJT11_Synzip-19-21 (figura 6B). Na tabela 6, é apresentado o protocolo utilizado na reação.

Tabela 3 Quantidade de reagentes utilizada na reação de ligação pela metodologia golden gate. Inseto 1: CILS-Synzip21; Inseto2: ERG20W-Synzip19.

Componentes	Tubo de Reação	Tubo Controle
H₂O	14,9 µL	16 µL
Inseto 1 100ng	1 µL	1 µL
Inseto 2 100ng	1,1 µL	-
<i>Bsa</i>I	0,5 µL	0,5 µL
T4 DNA ligase	0,5 µL	0,5 µL
Tampão	2 µL	2 µL
Total	20 µL	20 µL

Tabela 4 Protocolo da reação de golden gate

	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
60 ciclos	Ativação da <i>Bsa</i> I	37	5
	Ativação da ligase	16	5
	Inativação da <i>Bsa</i>I	55	15
	Inativação da ligase	85	20

2.10 Eletroforese em Gel de Agarose

O gel de agarose 1% para foi feito dissolvendo-se 1% (m/v) de agarose em tampão TAE 1X e acrescentando brometo de etídeo, para corar o DNA, na proporção 1 µL de corante para 10 mL de gel. Após o preparo do gel, este foi colocado na cuba de eletroforese e as amostras e o marcador de peso molecular foram aplicados em poços individuais. A corrida foi realizada com voltagem constante a 110 V durante 45 min. Após a corrida, uma foto do gel foi registrada no fotodocumentador.

2.11 Sequenciamento do Tipo Sanger

Após a quantificação e seleção das possíveis clonagens, as amostras foram submetidas a reação de sequenciamento para confirmação da clonagem. Utilizou-se 50 ng do produto de PCR para a reação, que seguiu o protocolo apresentado na tabela 7. O Big Dye Mix contém dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA Polimerase, MgCl₂ e Tris-HCl. As condições da reação de sequenciamento estão apresentadas na tabela 8. Após a reação, a amostra é iniciada a purificação da amostra. Adiciona-se 45 µL de composto SAM e 10 µL de resina e mantida sob agitação a 2000 rpm durante 30 min para homogeneização.

Tabela 5 Quantidade de cada componente utilizado na reação de sequenciamento.

Componentes	Volume Total de 20 µL
Big Dye Mix	1
Tampão de sequenciamento 5x	3,5
Primer 3,2 µM	2
Amostra de DNA	2
H₂O miliQ	11,5

Tabela 6 Condições da reação de sequenciamento.

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
96 °C	1 min	1
96 °C	10 s	
TM do primer	5 s	25
60 °C	4 min	
60 °C	5 min	1
4 °C	infinito	

2.12 Precipitação de DNA

Como alternativa para a purificação dos fragmentos de PCR, fragmentos de digestão e ligação, utilizamos a precipitação de ácidos nucleicos por etanol e acetato de sódio.

Para isso, adicionou-se um sal catiônico em alta concentração, como o acetato de sódio 3 M em um volume correspondente a 10% da amostra (1 µL para 10 µL de reação), e etanol absoluto em um volume correspondente a 3 vezes o volume da reação (30 µL para 10 µL de reação). A mistura foi homogeneizada e incubada durante uma hora em ultrafreezer -80 °C ou durante 16 h a -20 °C. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados durante 30 minutos, sob rotação de 13.000 rpm e temperatura de 4 °C. Em seguida, removeu-se cuidadosamente o sobrenadante de maneira que não afetasse o *pellet* formado. O etanol induz

a transição estrutural nas moléculas de ácido nucleico, agregando-as e, assim, precipitam. A precipitação com etanol absoluto, além de concentrar os ácidos nucleicos, ajuda a remover resíduos das reações presentes na amostra, tais como enzimas e tampão. Em uma segunda etapa, adicionou-se 50 μL de etanol 70% e seguiu-se para uma nova centrifugação a 4°C durante 5 minutos em rotação máxima, o etanol 70% é utilizado para remover os resíduos de sais. Removeu-se novamente o sobrenadante e os microtubos foram em banho seco por 10 minutos a 45 °C até que todo o etanol evaporasse. Por fim, o DNA foi ressuspensionado em água miliQ com ajuda do agitador vórtex. O ácido nucleico purificado foi quantificado na leitura de placas Infinite® M200 Pro (Tecan).

2.13 Calibração para Quantificação de Limoneno

Foram preparadas soluções-padrão de limoneno (Sigma Aldrich) em dodecano de forma que elas pudessem ser diluídas 40 vezes em etanol, seguindo a metodologia de PENG et al. (2018b). As concentrações das soluções diluídas foram de 10, 25, 50, 100, 150 e 200 mg L^{-1} e analisadas em triplicata. O sistema utilizado foi da classe Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments) consistindo de bomba modelo LC-20AD, controlador de sistema CBM-20A, detector fotodiodo SPD-M20A e coluna Poroshell 120 EC-C18 de 50 x 3 mm com tamanho de partícula 2.7 μm (Agilent Technologies), em forno isotérmico a 35°C, onde injetou-se 20 μL de amostra sob um fluxo constante de 1,2 mL min^{-1} utilizando uma mistura de solvente A (água ultrapura) e solvente B (45% de acetonitrila, 45% de metanol e 10% de água), com gradiente linear de 70% de solvente B durante 8 minutos. O solvente B foi degaseificado usando ultrassom por 10 minutos. O monoterpene foi monitorado na absorbância de 202 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Clonagem em pJT11

Como ambas as construções, heterotrímero e heterotetrâmero, utilizam os genes de ERG20^W-Synzip19 e CILS-Synzip21, e eles já estavam presentes no plasmídeo pJT11, a reconstrução do plasmídeo foi iniciada por eles. Como as sequências da synzips são pequenas, elas foram inseridas como *overhangs* nos oligonucleotídeos usados para reação de PCR. Assim, adotou-se a estratégia de construir dois pares de primers (SZ21c-CILS_fw e SZ19n-ERG20_rv, SZ19c-linker-ERG_fw e SZ21n-linker-CILS_rv) que pudessem amplificar cerca de metade do

plasmídeo, como ilustrado na figura 9. Desta forma, um dos produtos da PCR contém o esqueleto do plasmídeo sem alteração, e o outro produto contém os genes *CILSI* e *ERG20w* fusionados às synzips 21 e 19, respectivamente, que foram inseridas às extremidades N-terminal das proteínas na PCR através dos primers. Cada primer foi desenhado para conter também o sítio da enzima *BsaI* em sua extremidade para que a etapa de corte e ligação ocorresse em apenas um passo, pela reação de golden gate. Os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% (figura 10).

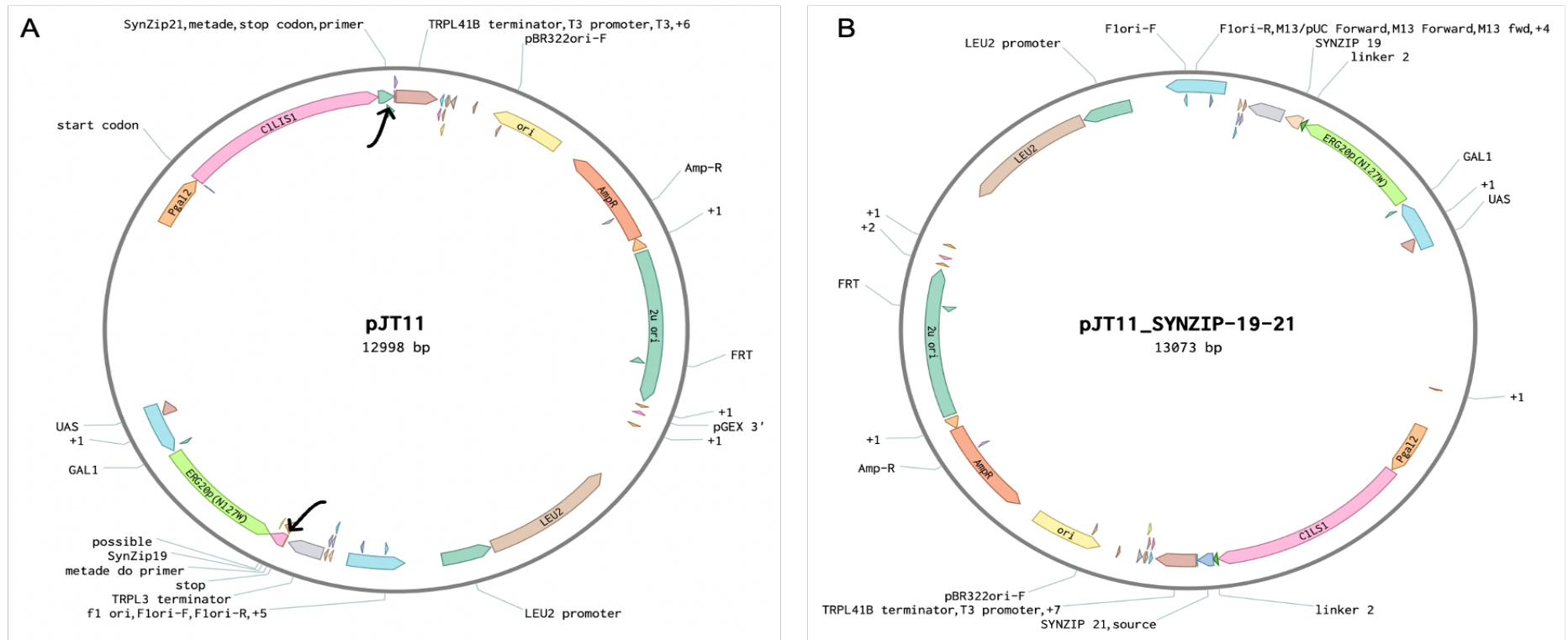


Figura 9 Plasmídeo utilizado no início do desenvolvimento do projeto. pJT11 antes (A) e após (B) a inserção das synzips 19 e 21. As setas em (A) representam como o plasmídeo foi dividido para que fossem inseridas a synzips. O par SZ21c-CILS_fw/SZ19n-ERG20_rv amplifica 5573bp do plasmídeo, correspondente a menor parte de (A). O par SZ19c-linker-ERG_fw/SZ21n-linker-CILS_rv amplifica do terminador de ERG20W ao terminador de CILS, inserindo um linker entre os genes das enzimas e das synzips e corresponde a 7552bp. Imagem gerada pelo software *Benchling*.

Para confirmar esta clonagem, desenhou-se primers que visavam o sequenciamento, entretanto, os primers anelaram próximo a sequência de interesse, resultando em baixa resolução no resultado do sequenciamento para as synzips, permitindo apenas a identificação precisa dos genes correspondentes à *CILS* e à *ERG20^W*. Assim, a clonagem foi confirmada por reações de PCR com primers que anelam especificamente nas synzips. Para synzip-19 foi amplificada uma sequência de 394bp e, para synzip-21, 243bp (figuras 11 e 12). Todas as colônias testadas possuíam o plasmídeo com os genes contendo as synzips 19 e 21. No entanto, observamos que a reação de amplificação para verificar a clonagem da synzip 19 apresentou a formação de produtos inespecíficos. Apesar das tentativas de mudança de temperatura de anelamento, com a finalidade diminuir essa ocorrência, não foi possível encontrar uma temperatura que amplificasse somente a região de interesse, pelo contrário, o aumento de temperatura resultou na formação de mais produtos inespecíficos, com diversos tamanhos de fragmentos. As primeiras bandas presentes no gel de eletroforese (figura 11), de cima para baixo, são referentes ao plasmídeo molde com diferentes níveis de enovelamento.

O gene da *IDI1*-synzip18, que completa o heterotrímero linear juntamente com *ERG20^W*-Synzip19 e *CILS*-Synzip21, foi amplificado a partir do genoma das células de *S. cerevisiae* ILHA LIMIA e LIMIA4A. As duas sequências devem ser idênticas, tendo sido amplificadas simultaneamente por precaução (figura 13A). Para inserir a sequência da synzip18 entre a sequência de *IDI1* e o terminador TRPL15a, esta amplificação precisou ser fragmentada. Assim, o par *SpeI*_Gal10_Fw - *BsaI*_SZ18_Linkers_IDI1_Rv amplificou o promotor duplo, formado por *GAL10* e *GAL1*, o gene *IDI1* e inseriu um conector para dar maior estabilidade entre *IDI1* e a synzip18. O par *BsaI*_SynZip18_TRPL15a_Fw - *SpeI*_RPL15a_Rv foi responsável por amplificar o terminador TRPL15a e inserir a synzip18. A conexão entre os dois fragmentos foi feita pela inserção do sítio de restrição de *BsaI*, onde após a reação de digestão, o sítio de restrição da enzima é eliminado e os dois fragmentos são conectados. O passo seguinte seria a ligação do gene amplificado ao plasmídeo contendo os genes *ERG20^W*-synzip19 e *CILS*-synzip21. Entretanto, mesmo após diversas tentativas, essa clonagem nunca resultou no plasmídeo esperado.

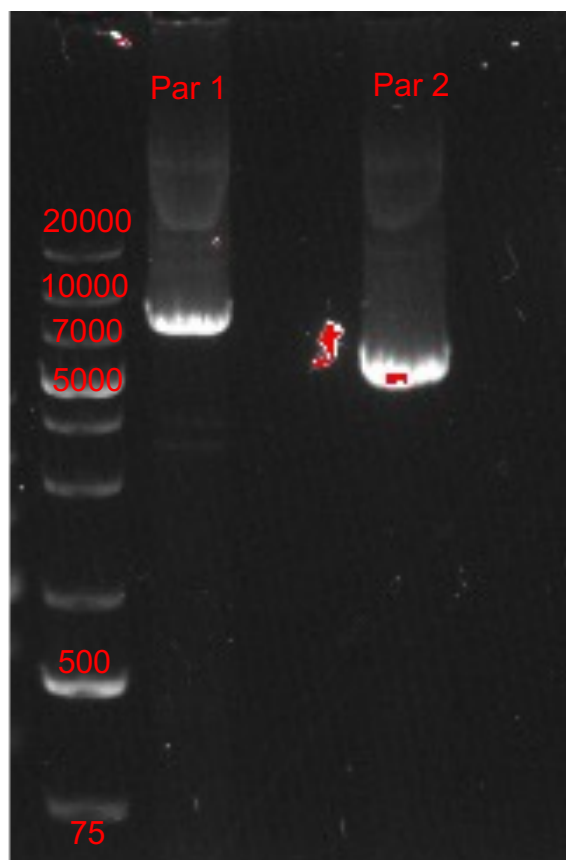


Figura 10 Eletroforese dos produtos de PCR para inserção da synzips 19 e 21 junto aos genes $ERG20^w$ e CILS, respectivamente. O par 1 corresponde ao par SZ19c-linker-ERG_fw/SZ21n-linker-CILS_rv e amplifica 7552bp. O par 2 corresponde ao par SZ21c-CILS_fw/SZ19n-ERG20_rv e amplifica 5573bp.

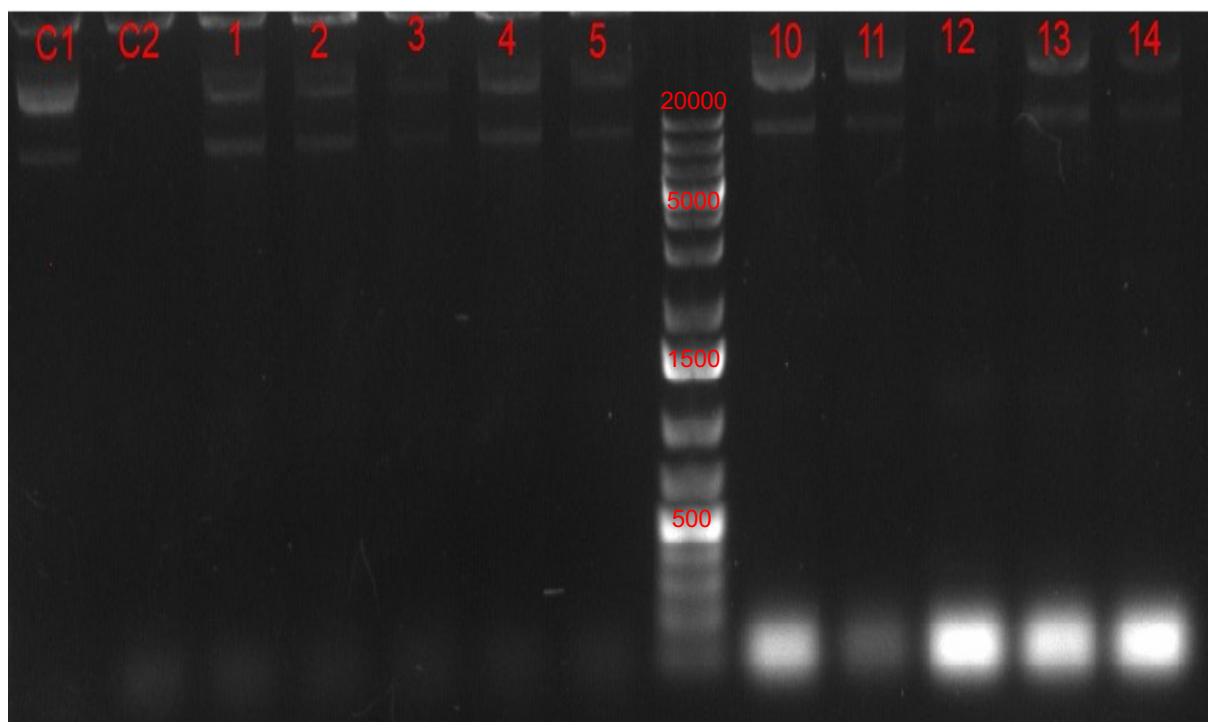


Figura 11 Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação das synzips 19 e 21. C1: controle negativo, sem enzima presente na reação; C2: controle negativo, sem DNA molde na reação; 1-5: produtos correspondentes synzip 19; 10-14: correspondente a synzip 21. Os produtos de PCR possuem 394bp e 243bp para as synzip 19 e 21, respectivamente. A baixa resolução da eletroforese para synzip19 pode ser devido a fatores como o tampão de corrida utilizado, o próprio gel de agarose ou baixo anelamento do primer na temperatura utilizada.

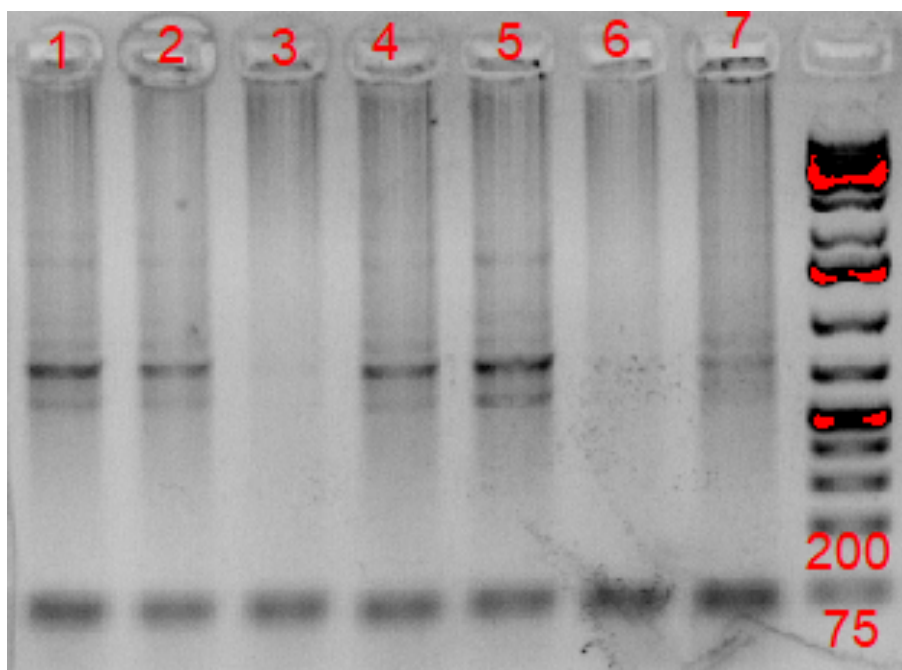


Figura 12 Eletroforese da reação de amplificação para confirmação da inserção de synzip19 em pJT11. Observa-se que nas colônias 3 e 6 os fragmentos foram produzidos em baixa quantidade, tendo uma resolução baixa na imagem.

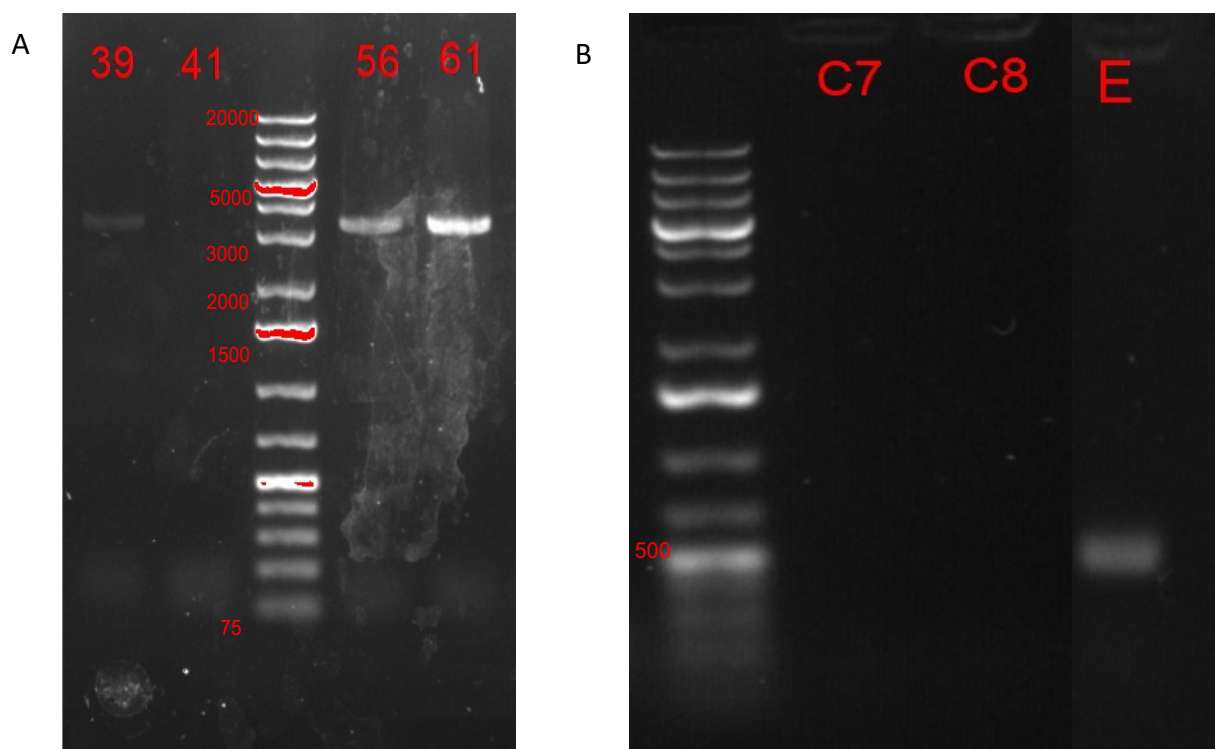


Figura 13 Eletroforese dos produtos de PCR do gene *IDII*. A) Amplificação com o par SpeI_Gal10_Fw/ BsaI_SZ18_Linkers_IDI1_Rv. Os números 39 e 41 são referentes as células de ILHA LIM14A e 56 e 61 de ILHA LIM1A. B) Amplificação do par 2 (BsaI_SynZip18_TRPL15a_Fw/SpeI_RPL15a_Rv). C7: controle negativo, sem enzima presente na reação; C8: controle negativo, sem DNA molde; E: reação realizada com o DNA extraído da célula 56 de ILHA LIM1A, utilizando o par 2 de primers.

A inserção da cópia extra de *CILS* com a synzip-20 para gerar o heterotetrâmero em anel seria feita após a obtenção do heterotrímero. Para inserir a sequência da synzip20 entre a sequência de *CILS* e o terminador TRPL41B, foi necessário amplificar a *CILS* presente no plasmídeo pJT11 e fragmentar essa amplificação em duas partes que fossem conectadas posteriormente. Assim, o par XhoI_GAL2_Fw - BsaI_Synzip20_Link_CILS1_Rv amplificou o promotor GAL2, *CILS*, o conector de *CILS* a synzip18 (linker) e inseriu uma parte da synzip18. Já o par BsaI_Synzip20_TRPL41B_Fw - XhoI_TPRL41B_Rv amplificou o terminador TRPL41B e inseriu a synzip18. A conexão entre os dois fragmentos foi feita pela inserção do sítio de restrição de *BsaI*, onde após a reação de digestão, o sítio é eliminado e os dois fragmentos são conectados.

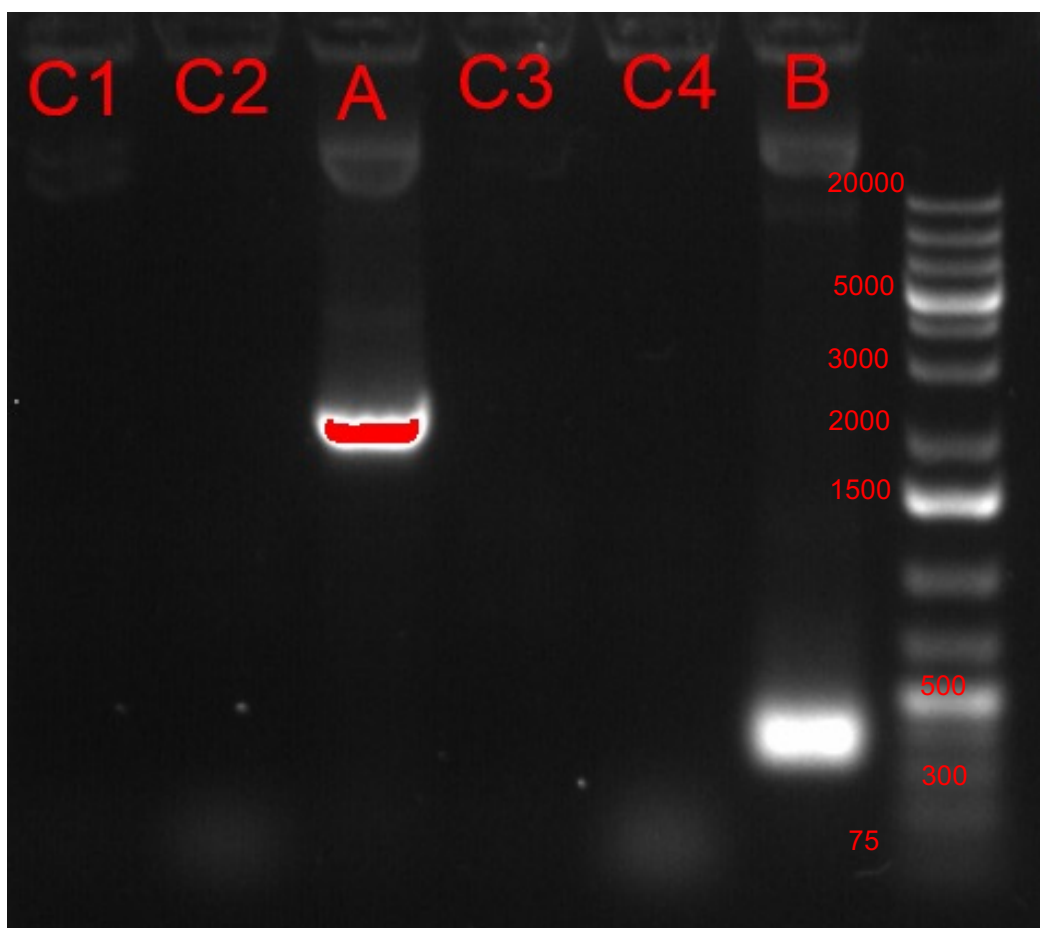


Figura 14 Eletroforese dos produtos de PCR da *CILS*-synzip20. C1: controle negativo do par 1 (XhoI_GAL2_Fw/ BsaI_Synzip20_Link_CILS1_Rv), sem polimerase; C2: controle negativo do par 1, sem DNA molde; A: reação com o par 1; C3: controle negativo sem polimerase do par 2 (BsaI_Synzip20_TRPL41B_Fw/ XhoI_TPRL41B_Rv); C4: controle negativo sem DNA molde do par 2; B: reação com o par 2.

Devido ao tamanho dos plasmídeos ao final de cada clonagem, aproximadamente 15 kb para heterotrímero e 18 kb para heterotetrâmero, preferiu-se realizar as transformações das ligações em células eletrocompetentes ao invés de quimiocompetentes, visto que as células eletrocompetentes são mais capazes de adquirir plasmídeos de tamanhos maiores. A etapa de clonagem do heterotrímero e do heterotetrâmero foi realizada exaustivamente ao longo dos meses de julho até dezembro de 2021, obtendo-se apenas resultados negativos (figura 15). Apesar do plasmídeo ter sido tratado com a fosfatase *FastAP* e não haver crescimento de colônias no controle da transformação de pJT11, ainda assim as colônias resultantes da transformação com a reação de ligação não continham o inserto.

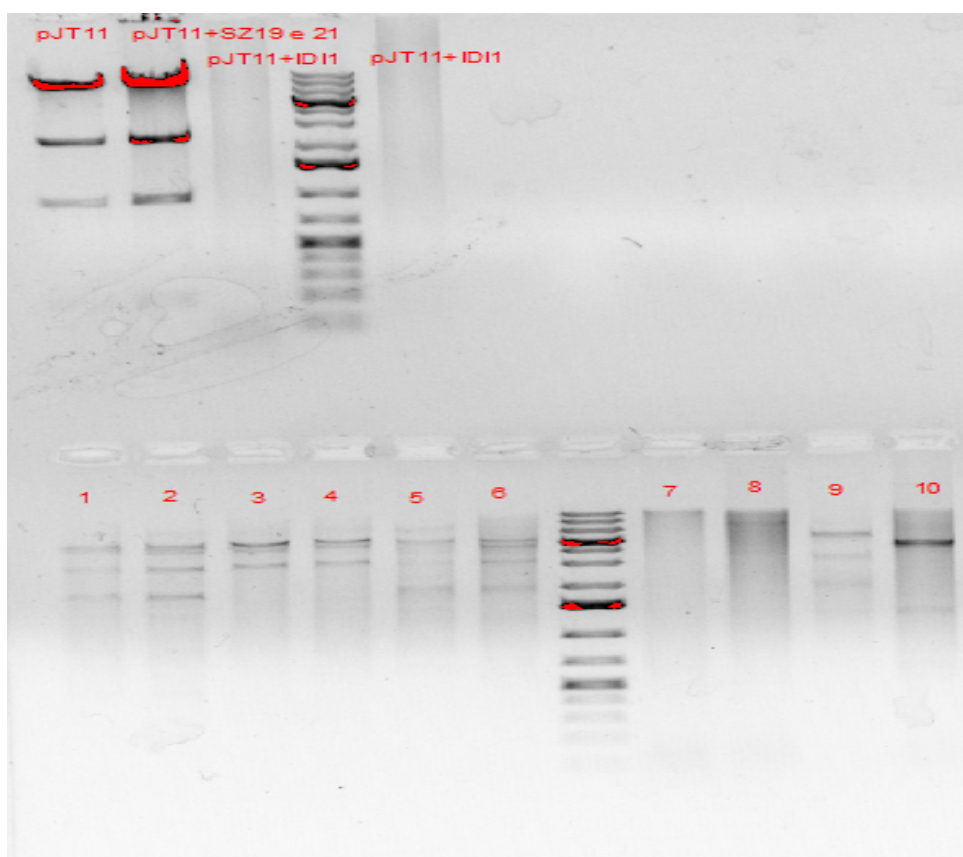


Figura 15 Eletroforese das amplificações de prospecção de colônias recombinantes. Porção superior: plasmídeo pJT11, pJT11 com as synzips 19 e 21 nos genes *ERG20W* e *CILS* (controles), respectivamente. De cada lado do marcador de tamanho estão duas amostras de colônias transformadas com a ligação pJT11_ERG20W-synzip19_CILS-synzip21 + IDI1_synzip18. Porção inferior: os poços de 1 a 10 são prospecções da ligação pJT11_ERG20W-synzip19_CILS-synzip21 com CILS_synzip20. Todas as colônias selecionadas para teste resultaram negativas para a clonagem. Os plasmídeos pJT11 e pJT11_ERG20W-synzip19_CILS-synzip21 foram utilizados como controles.

3.2 Adequação da Metodologia de Quantificação de Limoneno

Pela metodologia original de PENG et al. (2018b) abranger a quantificação de mais terpenos que o objetivo deste projeto, a metodologia foi adaptada a fim de obter um tempo de corrida mais curto e otimizado, voltada somente para a quantificação de limoneno. As áreas do pico correspondentes a concentração de limoneno de cada triplicata não ultrapassaram a variação de mais ou menos 5% entre elas. As médias das áreas do pico correspondentes a cada concentração estão exibidas na figura 16. Em seguida, foi plotado o gráfico de dispersão a fim de obter a equação da reta e o coeficiente de correlação (R^2) entre concentração e área.

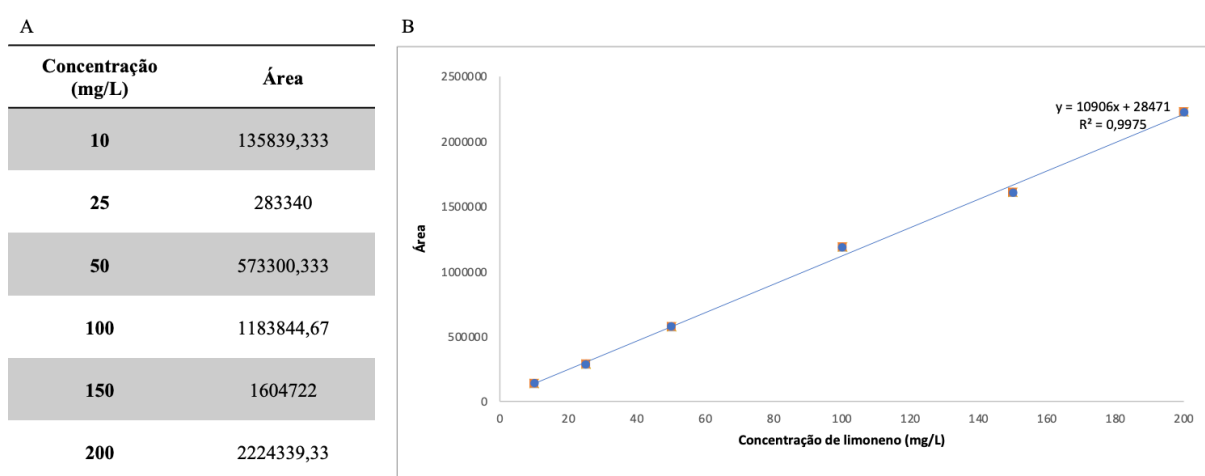


Figura 16 Média das áreas do pico para diferentes concentrações de limoneno quantificadas em HPLC (b) Curva de calibração. O R^2 obtido foi maior que 0,99.

3.3 Clonagem em pYES2

Como as clonagens não estavam funcionando no plasmídeo pJT11, optamos por testar as mesmas construções em pYES2. Também optamos por testar o dímero formado por ERG20w-Synzip19 e CILS-Synzip21 (figura 17), para verificar se a canalização de substrato utilizando apenas estas duas enzimas resulta na variação da produção de limoneno.

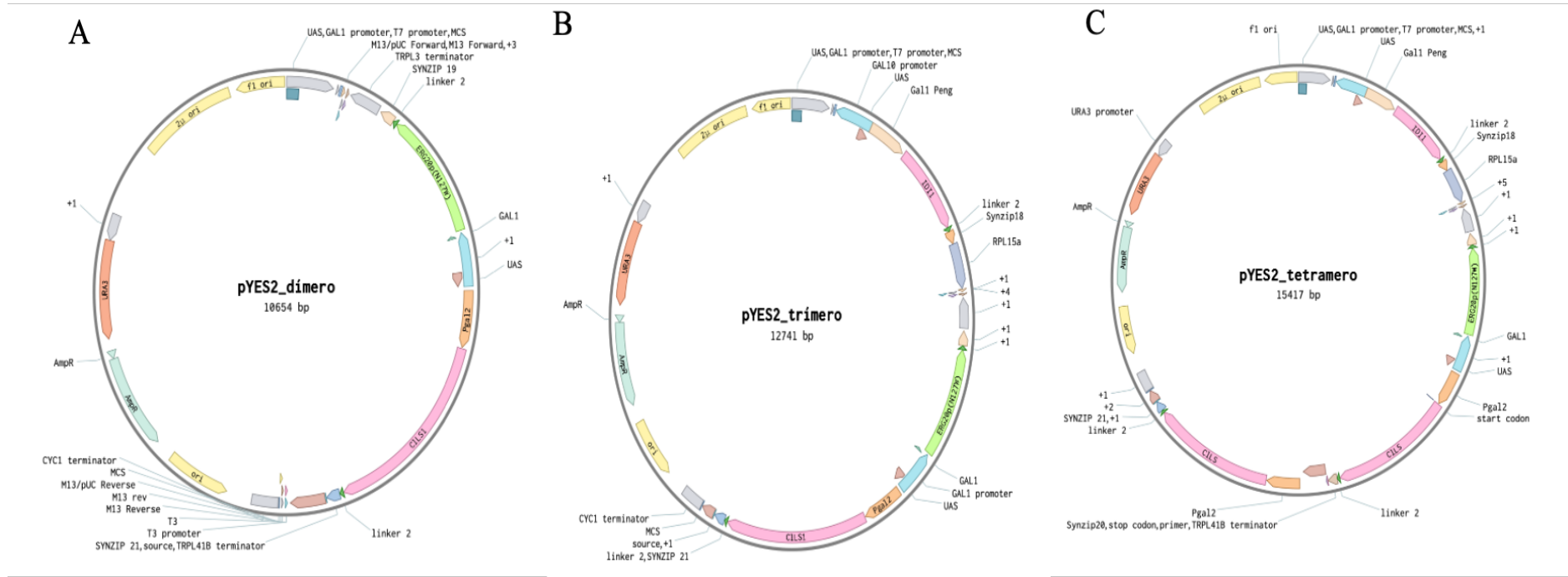


Figura 17 Construções em pYES2. (A) Heterodímero, (B) heterotrímero, (C) heterotetrâmero, que possui uma cópia a mais de *CILS*. Imagem gerada pelo software *Benchling*.

Como foi necessário realizar um novo design de primers, foi necessário reavaliar o funcionamento das reações quanto a temperatura de anelamento. Para que fosse necessário amplificar somente as regiões de interesse do plasmídeo pJT11, nesse caso, as sequências de ERG20w-Synzip19 e CILS-Synzip21, juntamente com seus promotores e terminadores. É possível identificar o resultado desta amplificação na figura 18. Como o plasmídeo pJT11 possui a sequência que anela no primer M13/pUC antes de ERG20w-Synzip19 e após CILS-Synzip21, optou-se por amplificar também essas regiões para facilitar o sequenciamento dos plasmídeos finais.

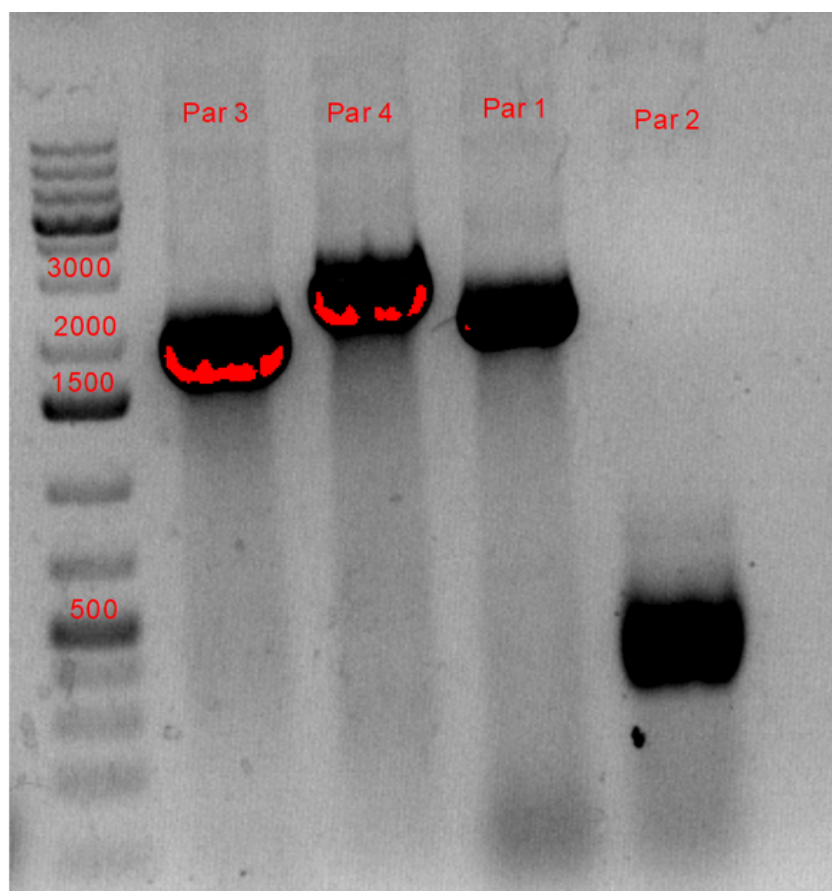


Figura 18 Eletroforese dos produtos de PCR. Par 3 é referente a amplificação de ERG20w-Synzip19, com produto de 2106 bp. Par 4 é relativo à amplificação de CILS-Synzip21, com 2775 bp. Par 1 e par 2 referem-se aos pares de primer que visam a amplificação de CILS-Synzip21, com 2775 bp. Par 1 e par 2 referem-se aos pares de primer que visam a amplificação de CILS-Synzip20; eles amplificam 2117 bp e 233bp, respectivamente.

Com as amplificações de ERG20w-Synzip19 e CILS-Synzip21 feitas, foram realizadas as digestões dos produtos de PCR (*Xho*I e *Xba*I para CILS-Synzip21; *Eco*RI e *Xho*I para ERG20w-Synzip19) e do plasmídeo pYES2 (*Eco*RI e *Xba*I) com as enzimas de restrição para ligação. Após a ligação, foi feita a transformação em *E. coli* top10 eletrocompetente para

posterior extração plasmidial e nova digestão com enzimas que possuem sítios de restrição no plasmídeo para verificação da clonagem. A primeira reação de digestão para verificação da clonagem foi feita com *EcoRI* e *XbaI* (figura 19). Devido a *CILS* possuir cinco sítios de restrição de *EcoRI* em sua sequência, esperava-se que as bandas ficassem bem separadas e visíveis quando fosse feita a análise em eletroforese. No entanto, as bandas foram visíveis apenas em cerca de 5kb e 3kb. Uma segunda reação foi realizada utilizando as enzimas *BamHI* e *XbaI* (figura 20). Nesta reação, deveriam aparecer duas bandas distintas: uma entre 5kb e 6kb e outra entre 4kb e 5kb. Entretanto, não foi possível observar estas bandas nitidamente, portanto, houve falha na reação de ligação.

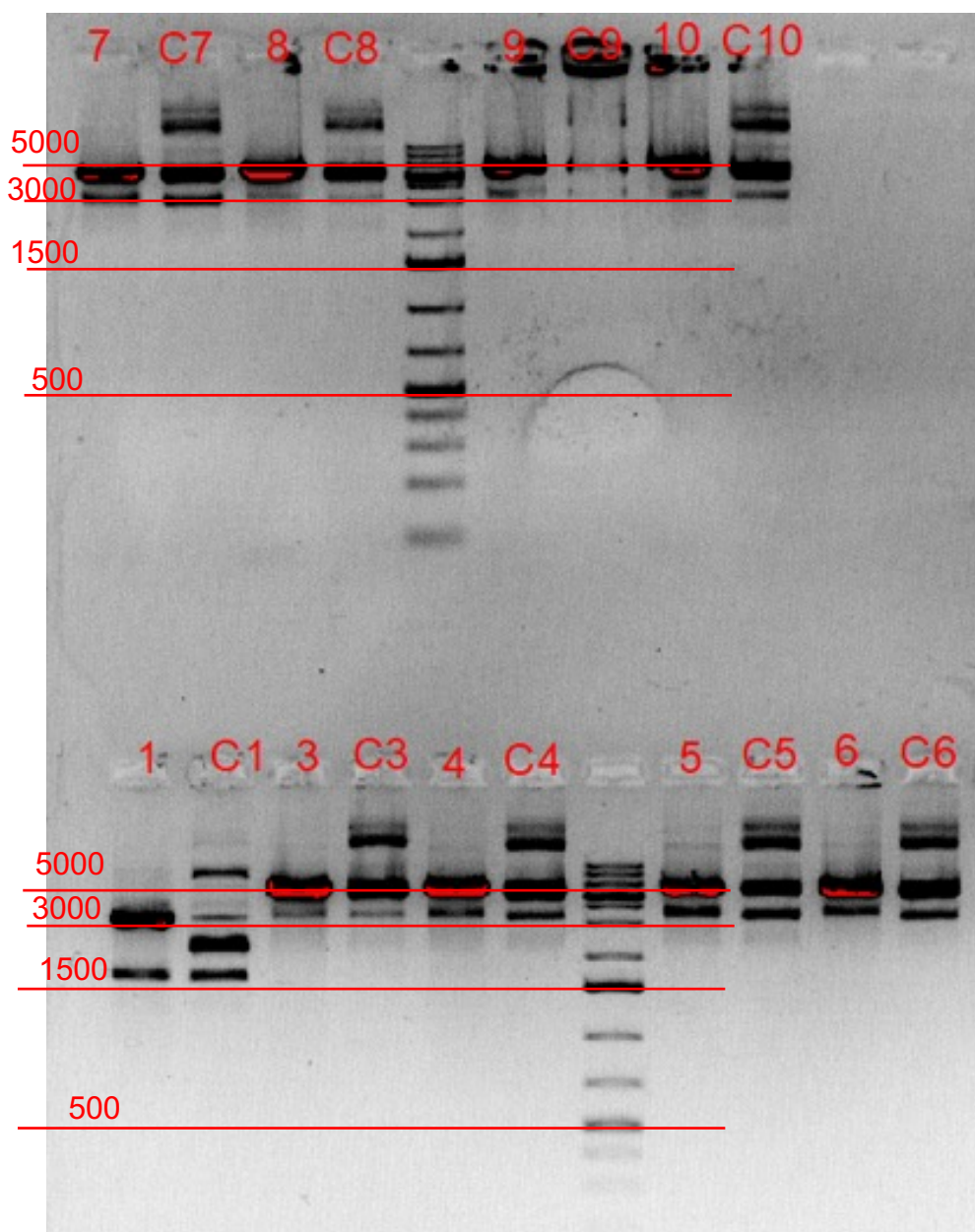


Figura 19 Eletroforese da reação de digestão do possível pYES2_dímero com *EcoRI* e *XbaI*. As amostras que possuem a letra C em frente aos números referem-se aos controles da reação, aquelas que não possuem enzima. Nos controles, é possível enxergar os plasmídeos em vários níveis de enovelamento.

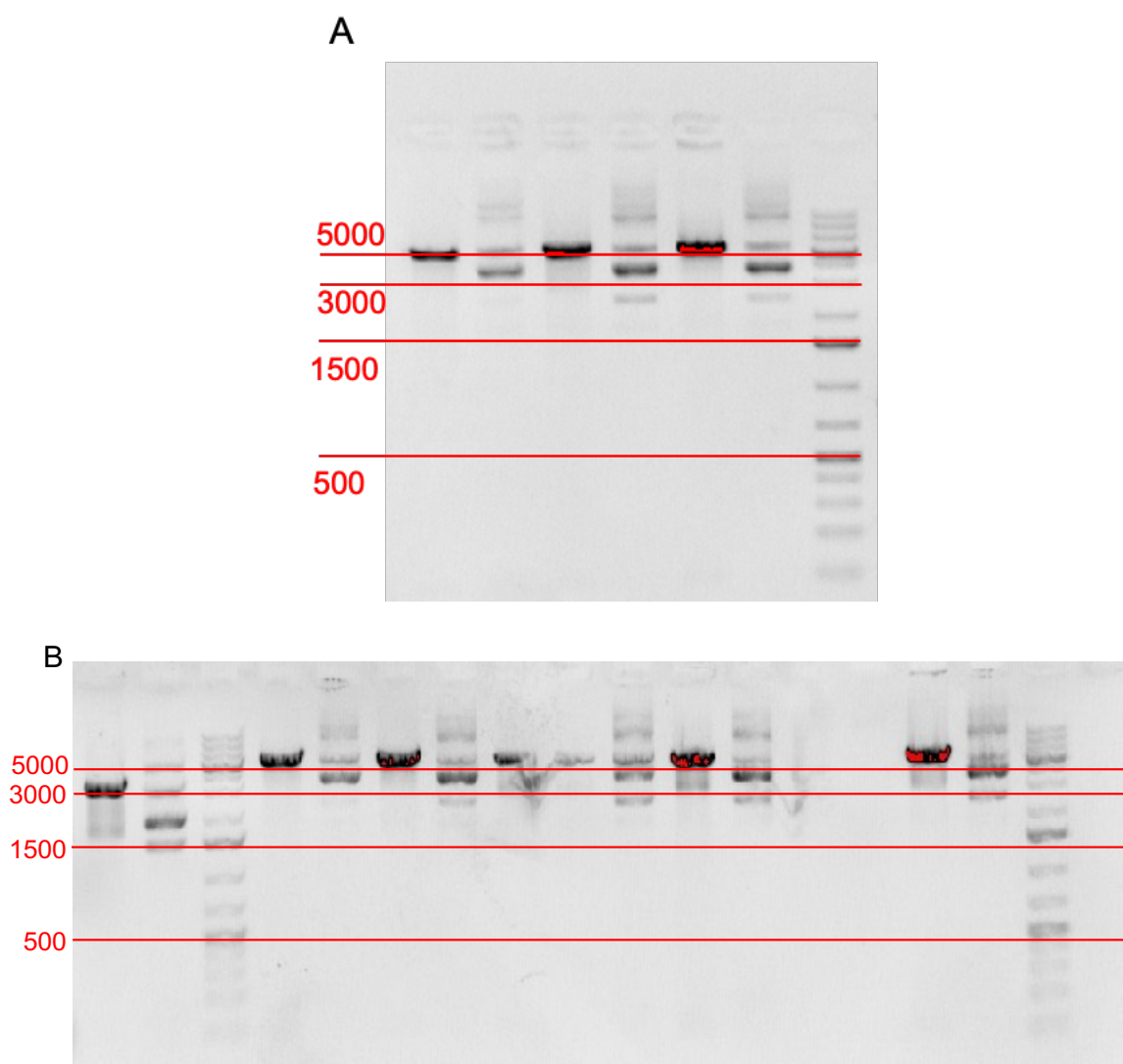


Figura 20 Eletroforese da reação de digestão de pYES2_dímero com *Bam*HI e *Xba*I. As amostras seguem a ordem de reação e controle em seguida. A: colônias 1, 3 e 4. B: colônias 5 a 10.

Para formar o trímero, IDI1-Synzip18 deve ser o primeiro gene a ser inserido no pYES2, visto que será necessária a utilização da enzima *Eco*RI, que corta o gene de *CILS* em cinco partes. Assim, realizamos a amplificação dos pares 2 (figura 21) e 1 (figura 22) de IDI1-Synzip18. A reação foi feita a partir das amostras de *S. cerevisiae* ILHA LIM14A cedidas pela professora Claudia Vickers, pois este gene possui um promotor duplo formado por *GAL1* e *GAL10*. Na figura 20, apresentamos o resultado utilizando duas enzimas DNA polimerases diferentes, *Phusion* e *Time HIFI*. Com a enzima *Phusion*, não houve amplificação visível em nenhuma das amostras. Com a enzima *Time HIFI*, é possível observar uma banda fraca em torno de 1500bp, correspondente ao fragmento produzido na reação, de 1585bp, e outras bandas inespecíficas. Como esta amplificação gerou pouco produto, a amplificação do fragmento ocorreu em duas etapas. Primeiro, foi feita a amplificação do gene a partir do genoma seguida

por uma purificação da reação, com uma nova amplificação do produto da primeira PCR, a fim de obter um rendimento maior para as etapas de digestão e ligação. No presente momento, todos os fragmentos dos genes encontram-se digeridos com os respectivos sítios de restrição a fim de serem inseridos no plasmídeo pYES2.

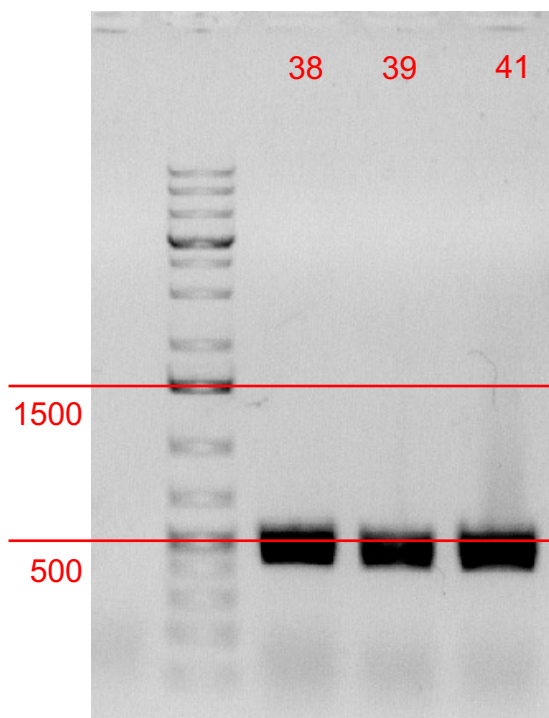


Figura 21 Eletroforese da reação com o par 2 para amplificação de IDI1-Synzip18. A reação produz um fragmento de 357bp, compatível com o exemplificado na figura. As amostras 38, 29 e 41 referem-se as colônias da linhagem ILHA LIM14A utilizadas no experimento.

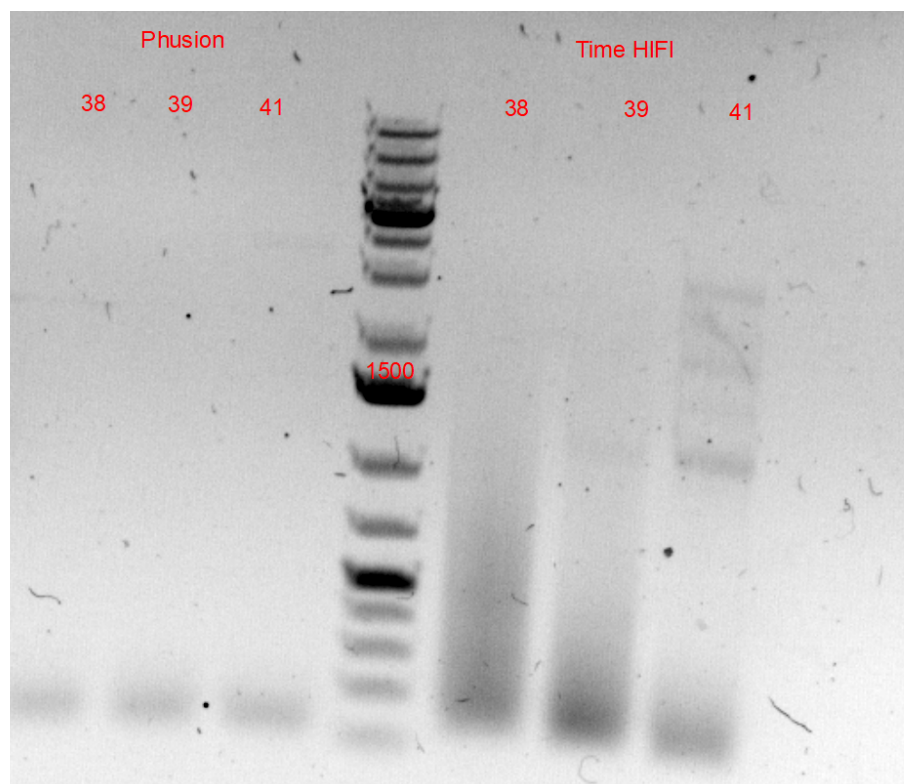


Figura 22 Eletroforese da reação com o par 1 para amplificação e clonagem de IDI1-Synzip18. Os números 38, 39 e 41 referem-se as colônias da linhagem ILHA LIM4A utilizadas no experimento.

4. CONCLUSÃO

Com a metodologia de digestão e ligação simultâneas (golden gate), foi possível clonar as synzips 19 e 21 no plasmídeo pJT11. Devido a dificuldade em clonar os genes no plasmídeo pJT11, precisamos buscar outra forma de concluir o projeto. Assim, selecionamos a linhagem VZL1303 e o plasmídeo pYES2. Esta nova linhagem e o plasmídeo mostraram-se adequados para a produção de um triterpeno pentacíclico em trabalho publicado por outro grupo, o que indicou potencial para uso neste projeto. A metodologia para a quantificação de limoneno foi adaptada de forma eficiente. Infelizmente, as clonagens não puderam ser concluídas a tempo, o que inviabilizou qualquer teste de produção de limoneno. Apesar das falhas na execução do projeto, o tema continua atual e de extrema importância, tanto científica quanto econômica.

5. REFÊRENCIAS

- ALEXANDRINO, T. D. et al. Structural properties and evaluation of the antiproliferative activity of limonene-1,2-diol obtained by the fungal biotransformation of R-(+)- and S-(-)-limonene. *Chirality*, v. 34, n. 6, p. 887–893, 1 jun. 2022.
- CARSANBA, E.; PINTADO, M.; OLIVEIRA, C. Fermentation strategies for production of pharmaceutical terpenoids in engineered yeast. *Pharmaceuticals* MDPI AG, , 1 abr. 2021.
- CHATZIVASILIOU, A. O. et al. Two-step pathway for isoprenoid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 2, p. 506–511, 8 jan. 2019.
- CHENG, S. et al. Orthogonal Engineering of Biosynthetic Pathway for Efficient Production of Limonene in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, v. 8, n. 5, p. 968–975, 17 maio 2019.
- DUSSEÂUX, S. et al. Transforming yeast peroxisomes into microfactories for the efficient production of high-value isoprenoids. *PNAS*, v. 117, n. 50, p. 31789–31799, 2020.
- EDDIN, L. B. et al. Neuroprotective potential of limonene and limonene containing natural products. *Molecules* MDPI AG, , 1 ago. 2021.
- GAO, Q. et al. Recent Advances on Feasible Strategies for Monoterpenoid Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* Frontiers Media S.A., , 1 dez. 2020.
- GARCÍA-GRANADOS, R.; LERMA-ESCALERA, J. A.; MORONES-RAMÍREZ, J. R. Metabolic engineering and synthetic biology: Synergies, future, and challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, n. MAR, 2019.
- HU, Z. et al. Improve the production of d-limonene by regulating the mevalonate pathway of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic beverage fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 47, n. 12, p. 1083–1097, 1 dez. 2020.
- IGNEA, C. et al. Orthogonal monoterpene biosynthesis in yeast constructed on an isomeric substrate. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019a.
- IGNEA, C. et al. Orthogonal monoterpene biosynthesis in yeast constructed on an isomeric substrate. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019b.
- JACOBUS, A. P. et al. EasyGuide Plasmids Support in Vivo Assembly of gRNAs for CRISPR/Cas9 Applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 18 out. 2022.

- JONGEDIJK, E. et al. Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* Springer Verlag, , 1 abr. 2016.
- KOTOPKA, B. J.; LI, Y.; SMOLKE, C. D. Synthetic biology strategies toward heterologous phytochemical production. *Natural Product Reports* Royal Society of Chemistry, , 1 set. 2018.
- KUZMAK, A. et al. Can enzyme proximity accelerate cascade reactions? *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- LEAVELL, M. D.; MCPHEE, D. J.; PADDON, C. J. Developing fermentative terpenoid production for commercial usage. *Current Opinion in Biotechnology* Elsevier Ltd, , 1 fev. 2016.
- LI, J. et al. Simultaneous Improvement of Limonene Production and Tolerance in *Yarrowia lipolytica* through Tolerance Engineering and Evolutionary Engineering. *ACS Synthetic Biology*, v. 10, n. 4, p. 884–896, 16 abr. 2021.
- LI, M. et al. Recent advances of metabolic engineering strategies in natural isoprenoid production using cell factories. *Natural Product Reports* Royal Society of Chemistry, , 1 jan. 2020.
- LUO, X. et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature*, v. 567, n. 7746, p. 123–126, 7 mar. 2019.
- MAFU, S.; ZERBE, P. Plant diterpenoid metabolism for manufacturing the biopharmaceuticals of tomorrow: prospects and challenges. *Phytochemistry Reviews* Springer Netherlands, , 1 fev. 2018.
- MALCI, K. et al. ACTivE: Assembly and CRISPR-Targeted *in Vivo* Editing for Yeast Genome Engineering Using Minimum Reagents and Time. *ACS Synthetic Biology*, 17 out. 2022.
- MALCL, K. et al. Standardization of Synthetic Biology Tools and Assembly Methods for *Saccharomyces cerevisiae* and Emerging Yeast Species. *ACS Synthetic Biology* American Chemical Society, , 2021.
- MOSER, S.; PICHLER, H. Identifying and engineering the ideal microbial terpenoid production host. *Applied Microbiology and Biotechnology* Springer Verlag, , 20 jul. 2019.
- NIU, F.-X. et al. Niu et al 2017 Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids carotenoids and isoprenoids based biofuels. *Synthetic and Systems Biotechnology*, v. 2, p. 167–175, 2017.
- NOWROUZI, B. et al. Enhanced production of taxadiene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, v. 19, n. 1, 1 dez. 2020.
- PAREEK, V. et al. Metabolic channeling: predictions, deductions, and evidence. *Molecular Cell* Cell Press, , 16 set. 2021.

- PENG, B. et al. An Expanded Heterologous GAL Promoter Collection for Diauxie-Inducible Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, v. 7, n. 2, p. 748–751, 16 fev. 2018a.
- PENG, B. et al. Engineered protein degradation of farnesyl pyrophosphate synthase is an effective regulatory mechanism to increase monoterpene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, v. 47, p. 83–93, 1 maio 2018b.
- PENG, B. et al. An in vivo gene amplification system for high level expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.
- PEREIRA, F. et al. Yeast Pathway Kit: A Method for Metabolic Pathway Assembly with Automatically Simulated Executable Documentation. *ACS Synthetic Biology*, v. 5, n. 5, p. 386–394, 20 maio 2016.
- RO, D. K. et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, v. 440, n. 7086, p. 940–943, 13 abr. 2006.
- SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Friedelin Synthase from *Maytenus ilicifolia*: Leucine 482 Plays an Essential Role in the Production of the Most Rearranged Pentacyclic Triterpene. *Scientific Reports*, v. 6, 22 nov. 2016.
- STOMA, S. et al. Flux-based transport enhancement as a plausible unifying mechanism for auxin transport in meristem development. *PLoS Computational Biology*, v. 4, n. 10, 2008.
- TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *PlantaSpringer Verlag*, , 31 jan. 2019.
- THOMPSON, K. E. et al. Synzip protein interaction toolbox: In vitro and in vivo specifications of heterospecific coiled-coil interaction domains. *ACS Synthetic Biology*, v. 1, n. 4, p. 118–129, 20 abr. 2012.
- VICKERS, C. E. et al. Recent advances in synthetic biology for engineering isoprenoid production in yeast. *Current Opinion in Chemical Biology*Elsevier Ltd, , 1 out. 2017.
- VIEIRA, A. J. et al. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions*Elsevier Ireland Ltd, , 1 mar. 2018.
- WALLS, L. E.; RIOS-SOLIS, L. Sustainable Production of Microbial Isoprenoid Derived Advanced Biojet Fuels Using Different Generation Feedstocks: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*Frontiers Media S.A., , 30 out. 2020.
- WANG, C. et al. Microbial platform for terpenoid production: *Escherichia coli* and Yeast. *Frontiers in Microbiology*Frontiers Media S.A., , 12 out. 2018.
- ZHANG, J. et al. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine. *Nature*, v. 609, n. 7926, p. 341–347, 8 set. 2022.

ZHUANG, X.; CHAPPELL, J. Building Terpene Production Platforms in Yeast. *Biotechnol. Bioeng.* v. 112, p. 1854–1864, 2015.