

CNPq – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

Título do Projeto: Melhoramento de cepas de *Aspergillus* para produção de proteínas alvo através da manipulação de genes envolvidos no processo de “*unfolded protein response*”
Pesquisador responsável: Carlos Alberto Labate

Introdução

A dependência de fontes de energia oriundas de combustíveis fósseis e o impacto ambiental causado pela sua utilização, têm gerado um grande interesse por parte de pesquisadores, políticos e o público em geral, em utilizar fontes de energia renováveis. A utilização de fontes renováveis na obtenção de combustíveis torna-se uma importante alternativa, pois gera menor quantidade de poluentes, e permite o desenvolvimento sustentável da economia e da sociedade humana (Apergis and Payne, 2014).

A biomassa lignocelulósica, formada de celulose, hemicelulose e lignina, é o composto renovável mais abundante na Terra (Liu et al., 2013). A conversão desse composto complexo envolve etapas como o pré-tratamento das matérias-primas, hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose a açúcares fermentescíveis, e a fermentação de açúcares em vários produtos, incluindo o etanol (Sanchez, 2009). Dentre as etapas citadas, a hidrólise enzimática é uma das etapas limitantes do processo devido ao alto custo de obtenção das enzimas lignocelulolíticas. Como a produção de etanol está relacionada ao mercado de *commodities*, o custo de converter a matéria-prima ao produto final deve ser o mais baixo possível para manter sua rentabilidade (Klein-Marcuschamer et al., 2012).

Para baratear esse processo, fungos filamentosos tem sido alvo de intenso estudo, pois são organismos capazes de secretar naturalmente uma grande variedade de enzimas ao meio externo. Dessa forma, o metabolismo desses organismos podem ser direcionados a secretar grandes quantidades de enzimas de interesse.

Aspergillus spp. é um fungo filamentoso amplamente utilizado para a produção de enzimas de interesse, pois além de secretar várias dezenas de gramas por litro de enzimas nativas, apresenta características ideais para ser utilizado na indústria como boa capacidade fermentativa e rápido crescimento em meios quimicamente definidos (Valkonen et al., 2003; Fleißner & Dersch, 2010).

Ainda que *Aspergillus* apresentem características ideais para serem bons produtores de enzimas em escala industrial, a produção de enzimas heterólogas é baixa. Os pesquisadores acreditam que muitos problemas podem ocorrer durante a iniciação da tradução, alongação, enovelamento dessas proteínas que as impedem de serem tornarem ativas. Estratégias pontuais têm sido utilizadas para aumentar a produção de enzimas como a inserção de múltiplas cópias dos genes de interesse, uso de promotores fortes, fusão do gene de interesse a proteínas que são bem secretadas e super-expressão de genes como foldases e chaperonas. Essas estratégias tem sido utilizadas com sucesso em alguns sistemas de produção de enzimas heterólogas, mas a produção de muitas proteínas ainda permanece problemática (Valkonen et al., 2003).

Pesquisadores tem observado que a super-expressão de genes que codificam enzimas de interesse ativa um sistema de resposta ao stress na célula chamado de *Unfolded Protein Response* (UPR) (Saloheimo et al., 1999). O UPR é ativado quando a demanda por proteínas na célula excede a capacidade de enovelamento do retículo endoplasmático (RE), organela onde as proteínas direcionadas para a secreção devem passar para serem corretamente enoveladas. Assim, proteínas mal enoveladas se acumulam e ativam um grande conjunto de genes responsáveis pelo correto enovelamento de proteínas, degradação das proteínas mal enoveladas e outros envolvidos em demais funções na via secretória (Walter & Ron, 2011).

Como o UPR expande a capacidade do RE no enovelamento de proteínas, um esforço por parte da comunidade científica tem surgido com o objetivo de explorar essa via de modo a aumentar a produção de proteínas de interesse.

O UPR é ativado pelo fator transcricional HAC1 em *Saccharomyces cerevisiae* (homólogo HACA em *A. nidulans*), que se liga a regiões específicas nos promotores dos genes alvo,

chamadas de “*Unfolded Protein Response Element*” (UPRE) (Patil & Walter, 2004). Para gerar o fator transcricional ativo, um mecanismo de *splicing* não convencional envolvendo a proteína transmembrana do RE, IRE1, deve remover um íntron do RNAm do fator HAC1/A (Walter & Ron, 2011).

Em 2004, foi descoberto que apenas a ligação de HAC1 não garante um complexo proteína-DNA suficiente para ativar a transcrição de genes em *S. cerevisiae*. O gene *gcn4* codifica um fator de transcrição que atua em várias respostas de stress como UPR, escassez de aminoácidos e glicose, e irradiação ultravioleta. GCN4 (homólogo CPCA em *A. nidulans*) está presente em níveis basais, e não é capaz de se ligar a UPRES na ausência de HAC1. Quando HAC1 é produzido, GCN4 é recrutado para a UPRE, formando um complexo ternário mais estável entre o promotor, GCN4 e HAC1 induzindo a transcrição (Patil & Walter, 2004).

Genes que codificam HAC1/A têm sido utilizados para a obtenção de alta produção de proteínas com sucesso. Resultados satisfatórios têm sido obtidos em leveduras e também em fungos filamentosos (Valkonen et al., 2003).

Estudos que visam obter linhagens com maior produção de proteínas não têm sido realizados com o fator transcricional GCN4/CPCA. Entretanto, diante da necessidade de formar um complexo estável entre esse fator e HAC1/A, a expressão constitutiva de ambos os fatores em um único hospedeiro pode ser uma estratégia interessante. Diante do exposto, a necessidade de desenvolver linhagens produtoras de enzimas de interesse, principalmente aquelas envolvidas na degradação de polissacarídeos da parede celular de plantas para a produção do etanol celulósico, justifica a realização do presente trabalho.

Neste sentido, o objetivo central desse projeto é obter linhagens de *A. nidulans* melhoradas quanto à secreção de proteínas heterólogas de interesse por meio da expressão constitutiva dos genes *hacA* e *cpcA*, e conseqüentemente do UPR.

O projeto será executado nas instalações físicas do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) que integra o Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas/SP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Obter linhagens de *A. nidulans* melhoradas quanto à secreção de proteínas heterólogas por meio da indução constitutiva do UPR.

2.2. Objetivos específicos

- Construir cassetes para expressão constitutiva de *hacA* e *cpcA*;
- Transformação da linhagem *A. nidulans* TNO com os cassetes construídos;

3. METODOLOGIA

3.1. Micro-organismos e vetores utilizados

Os fungos *A. nidulans* TNO (pyrG89; pyroA4; Δ ku70; cho1), *A. fumigatus* Af293, serão obtidos pela Fungal Genetic Stock Center (FGSC, Kansas City, EUA). A linhagem de *S. cerevisiae* FGSC 9721 e o plasmídeo pRS426 foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo H. Goldman, FCFRP-USP.

3.2. Construção dos cassetes de expressão por recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*

3.2.1. Extração de DNA total de *A. nidulans* e *A. fumigatus*

Para a obtenção de biomassa, esporos de *A. nidulans* TNO serão inoculados em meio mínimo (MM) líquido e incubados *overnight* a 37°C e 150 RPM. O micélio será coletado por filtração, triturado com nitrogênio líquido e a extração de DNA total será realizada utilizando o kit *DNeasy Plant Mini* (Qiagen) segundo instruções do fabricante.

Para a obtenção de DNA total de *A. fumigatus*, será realizado o mesmo procedimento.

3.2.2. Obtenção do gene *hacA* e *cpcA* de *A. nidulans*

Esporos do fungo *A. nidulans* serão inoculados em meio mínimo (MM) líquido e incubados a 37°C a 150 RPM. Após 48 h, 20 mM de DTT (Sigma), indutor do UPR, será adicionado ao micélio crescido e após 1 h, o micélio será coletado por filtração, triturado com nitrogênio líquido e

a extração do RNA total será realizada utilizando *TRIzol® Reagent* (Life Technologies) segundo instruções do fabricante.

O cDNA será sintetizado com *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Life Technologies) de acordo com instruções do fabricante.

Para amplificar o gene *hacA* e *cpcA* será utilizada a enzima *Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.3. Isolamento de sequências de DNA de *A. nidulans* e de *A. fumigatus*

As seguintes sequências de DNA serão obtidas por PCR: gene *pyroAfu*, responsável pela biossíntese de piridoxina em *A. fumigatus* 293, promotor do gene *gpdA* que codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em *A. nidulans*, região terminadora do gene *trpC* que codifica triptofano sintase em *A. nidulans* e as regiões 3' UTR e 5' UTR do RNA mensageiro de *hacA* de *A. nidulans*. Para a construção do cassete de expressão contendo o gene *cpcA*, também será necessária a amplificação por PCR das regiões 3' UTR e 5' UTR do RNA mensageiro de *cpcA* de *A. nidulans*.

As reações de PCR serão realizadas de acordo com as instruções do fabricante da *Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific), e as temperaturas de anelamento irão variar a cada par de *primer* utilizado.

3.3. Preparo de células competentes de *S. cerevisiae* e transformação

O preparo e a transformação de células competentes de *S. cerevisiae* será realizado conforme descrito por Malavazi & Goldman (2012).

3.4. Extração de DNA total de *S. cerevisiae*

As colônias transformantes de *S. cerevisiae* serão inoculadas em 10 mL de meio SC-URA⁻ e incubadas a 30°C por 48 h sob agitação constante. Após esse período, as células serão utilizadas para a extração de DNA total conforme descrito no item 3.2.1.

3.5. Transformação do fungo *A. nidulans*

O fungo *A. nidulans* será transformado conforme descrito por Segato e colaboradores (2012). As células de *A. nidulans* serão submetidas a duas transformações, cada uma com um cassete de expressão. Portanto, não será realizada co-transformação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apergis N, Payne JE. Renewable energy, output, CO2 emissions, and fossil fuel prices in Central America: Evidence from a nonlinear panel smooth transition vector error correction model. *Energy Economics* 42 (2014) 226–232.
- Fleißner A, Dersch P. Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87 (2010) 1255-1270.
- Klein-Marcuschamer D, Oleskowicz-Popiel P, Simmons BA, Blanch HW. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol Bioeng* 109 (2012) 1083-1087.
- Liu G, Qin Y, Li Z, Qu Y. Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. *Biotechnol Adv* 31 (2013) 962-975.
- Malavazi I, Goldman GH. Gene disruption in *Aspergillus fumigatus* using a PCR-based strategy and in vivo recombination in yeast. *Methods Mol Biol* 845 (2012) 99-118.
- Patil CK, Li H, Walter P. Gcn4p and novel upstream activating sequences regulate targets of the unfolded protein response. *PLoS Biol* 2 (2004) 1208-1223.
- Saloheimo M, Lund M, Penttilä ME. The protein disulphide isomerase gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source. *Mol Gen Genet* 262 (1999) 35-45.
- Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* 27 (2009) 185-194.
- Segato F, Damásio ARL, Gonçalves TA, de Lucas RC, Squina FM, Deckerd SR, Prade RA. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. *Enzyme Microb Tech* 51 (2012) 100–106.
- Valkonen M, Ward M, Wang H, Penttilä M, Saloheimo M. Improvement of foreign-protein production in *Aspergillus niger* var. *awamori* by constitutive induction of the unfolded-protein response. *Appl Environ Microbiol* 69 (2003) 6979–6986.
- Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 25 (2011) 1081-1086.