



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

**Desenvolvimento de circuito sintético lógico para
controle preciso e eficiente da expressão gênica em
Saccharomyces cerevisiae.**

Daniela Vieira Duarte

Orientadora: Prof^a. Janice Lisboa De Marco

Coorientadora: Dr^a. Viviane Castelo Branco Reis

Fevereiro - 2019

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

**Desenvolvimento de circuito sintético lógico para
controle preciso e eficiente da expressão gênica em
Saccharomyces cerevisiae.**

Daniela Vieira Duarte

Orientadora: Prof^a. Janice Lisboa De Marco

Coorientadora: Dr^a. Viviane Castelo Branco Reis

*Dissertação de mestrado apresentada ao departamento
de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.*

Fevereiro – 2019

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação da Professora Dr. Janice Lisboa De Marco com apoio financeiro da CAPES.

Banca Examinadora

Prof^a Dr^a. Janice Lisboa De Marco
Presidente da Banca

Prof. Dr. Georgios Joannis Pappas Júnior
Universidade de Brasilia

Dr. João Ricardo M. de Almeida
Embrapa Agroenergia

Dra. Isabel Garcia Sousa
Universidade de Brasilia
Suplente

“Que seria das estrelas, se não fosse a noite escura?”

Dante Veoleci

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem Ele, nada seria e nada conseguiria.

À minha mãe e meu pai por sempre estarem do meu lado e terem paciência para me ouvir falar durante horas sobre experimentos, mesmo não entendendo nada do que estava dizendo. Agradeço em especial ao meu irmão e a toda a minha família por me darem o apoio emocional necessário para completar esta jornada.

À minha orientadora Janice pela oportunidade e pela confiança que depositou em mim. Sou muito grata pela oportunidade!

À minha coorientadora Viviane Reis, sem seu apoio e as nossas discussões científicas nunca conseguiria ter chegado tão longe.

Aos professores Fernando Araripe e Lidia Pepe por me receberem de braços abertos e permitirem que essa oportunidade fosse aproveitada.

Ao pesquisador Dr. Elibio Rech e a professora Cintia Coelho por confiarem em mim e permitirem que eu fizesse parte deste projeto de estudo das integrases.

À Isabel e Verenice pela ajuda com os experimentos de citometria.

Aos meus amigos da época do ensino médio, Arícia, Natália, Débora, Lucas e Diego pela paciência e pelos momentos de distração.

A todos os amigos do laboratório, em especial aos meus amigos e colegas do Lab 2: Carol, Yasmin, Júlia, Tiago, Luiza, Myrna, Chris, Roberta, Vanessa, Igor, Catarina, Francisco, Pedro. Vocês sempre são muito prestativos e me ajudaram tanto cientificamente quanto emocionalmente durante todo o processo, muito obrigada! E também quero agradecer especialmente à minha

companheira de bancada, Ana Laura, sempre disposta a ajudar a todos e cheia de energia!

Aos funcionários da Biomol Ivone, Márcia, Thompson e José, não somente pelo apoio técnico, mas também pelas conversas descontraídas.

A todos os professores que participaram da minha formação.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência para a correção do meu trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Índice

Lista de Figuras	i
Lista de tabelas	i
Lista de abreviaturas e símbolos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
1 Introdução	1
1.1 Circuitos sintéticos	1
1.2 Circuitos sintéticos lógicos	6
1.3 Integrases	8
1.4 Circuitos sintéticos e integrases	10
2 Objetivos	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 Material e Métodos	13
3.1 Células	13
3.2 Meios de cultura	13
3.3 Soluções	15
3.4 Kits utilizados	21
3.5 Oligonucleotídeos (<i>primers</i>)	22
3.6 Marcadores de massa molecular	23
3.6.1 Marcadores de massa molecular para DNA	23
3.6.2 Marcador de massa molecular para proteína	23
3.7 Enzimas	23
3.8 Vetores	24
3.9 Preparação de células bacterianas competentes	25
3.9.1 Preparo de células bacterianas quimicamente competentes	25
3.9.2 Preparo de células bacterianas competentes para eletroporação	26
3.10 Manipulação de DNA	27
3.11 Mini preparação de plasmídeos por lise alcalina	27
3.12 Precipitação de DNA	28
3.13 Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose	28
3.14 Recombinação <i>in vitro</i>	28
3.15 Recombinação <i>in vivo</i>	29
3.16 Transformação de alta eficiência de levedura	29
3.17 Transformação de <i>S. cerevisiae</i> por eletroporação	30

3.18	Transformação de levedura <i>One Step</i>	30
3.19	Extração de DNA genômico de levedura.....	31
3.20	Extração de DNA genômico de levedura para PCR	31
3.21	Curva de crescimento celular de tolerância ao cobre	32
3.22	Indução por cobre	32
3.23	Indução por galactose	33
3.24	Citometria de fluxo	33
3.25	Extração de proteínas na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.26	Quantificação de proteínas pelo método de Bradford.....	34
3.27	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	34
4	Resultados e Discussão	36
4.1	Construção do circuito sintético.....	36
4.1.1	Construção do vetor integrativo HO- <i>EGFP</i>	40
4.1.2	Construção do vetor centromérico contendo as integrases.....	43
4.2	Crescimento das linhagens na presença de cobre	48
4.3	Ensaio para expressão de <i>EGFP</i>	49
4.4	Gel de proteína não desnaturante	54
4.5	Caracterização dos dispositivos genéticos	59
4.5.1	Construção dos vetores centroméricos contendo <i>UkG1</i>	60
4.5.2	Construção dos vetores centroméricos contendo as integrases	63
4.5.3	Análise funcional das integrases 4 e 8.....	66
5	Conclusão	70
6	Perspectivas	71
7	Referências	72
8	Anexos	81

Lista de Figuras

Figura 1- Representação dos primeiros circuitos sintéticos.....	3
Figura 2- Representação esquemática de um circuito de retroalimentação..	4
Figura 3- Representação esquemática de um circuito de memória genética.....	5
Figura 4- Representação da atividade da integrase e seus sítios de reconhecimento. .	9
Figura 5- Estratégia para a construção do Circuito Genético em <i>S. cerevisiae</i>	36
Figura 6- Circuito lógico das integrases.....	38
Figura 7- Esquema representativo do funcionamento do circuito genético.....	39
Figura 8- Esquema do cassete de expressão da e mapa físico do vetor HO-EGFP....	41
Figura 9- Padrão de restrição de clones com vetor HO-EGFP.....	42
Figura 10- Confirmação da integração do cassete de expressão HO-EGFP por PCR.	43
Figura 11- Mapa físico do vetor centromérico contendo os cassetes de expressão das integrases.....	44
Figura 12- Esquema da montagem do vetor centromérico com as integrases.....	45
Figura 13- PCRs para confirmação da orientação das integrases.....	46
Figura 14- Perfil de restrição do plasmídeo YCINT..	47
Figura 15- Teste de tolerância ao cobre..	48
Figura 16- Curva de crescimento em cobre..	49
Figura 17- Caracterização genotípica DV01 e DV28 após indução em diferentes concentrações e tempos com cobre.	52
Figura 18- Caracterização genotípica DV01 e DV28 após indução com galactose.	53
Figura 19- Detecção da atividade da EGFP em DV01 e DV28 após 14 horas com diferentes concentrações de cobre..	55
Figura 20- Perfil de restrição do plasmídeo YCEGFP.....	56
Figura 21- Avaliação da fluorescência da proteína EGFP..	57
Figura 22- Estratégia para caracterização dos dispositivos genéticos que compõe o circuito.....	59
Figura 23- Cassete de expressão do gene repórter UKG1.....	61
Figura 24 – Confirmação da clonagem com os vetores contendo as <i>yUkG1</i>	62
Figura 25- Construção dos vetores pYESInt4 e pYESInt8.....	64
Figura 26- Construção dos vetores centroméricos contendo o cassete com o promotor P_{Gal} e as integrases.....	65
Figura 27- Confirmação dos clones DVInt 4 e DVInt 8.....	66
Figura 28- Avaliação das linhagens contendo o cassete do gene reporter..	67
Figura 29- Análise funcional da integrase 4.....	68
Figura 30- Análise funcional da integrase 8.....	68

Lista de tabelas

Tabela 1- Representação da Tabela verdade..	7
Tabela 2- Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho..	22
Tabela 3- Enzimas de restrição utilizadas neste trabalho..	24
Tabela 4- Vetores utilizados no trabalho.....	24

Tabela 5- Tabela verdade do circuito XOR.	37
Tabela 6- Linhagens Obtidas neste trabalho.	47

Lista de abreviaturas e símbolos

ARS - *Autonomously replicating sequence* (sequência de replicação autônoma)

CEN - Centrômero

Da - Dalton

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTT - ditioneitol

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetra-acético

g - Força gravitacional

GRAS - *Generally regarded as safe* (Geralmente reconhecido como seguro)

Int - Integrase

kb - quilobase

LB - Meio Luria-Bertani

MD - Meio mínimo com glicose

MGa - Meio mínimo com galactose

MRaf - Meio mínimo com rafinose

OD₆₀₀ - Densidade celular óptica medida a 600 nm

PAGE - *polyacrilamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)

pb - Par de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RNase A - Ribonuclease A

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecilsulfato de sódio

TAE - Tampão tris-acetato-EDTA

TEMED - N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina

YNB - Base nitrogenada de leveduras sem aminoácido

YPA - meio complexo de levedura com adenina

YPD - meio complexo para levedura

Ω - Unidade de medida de resistência elétrica (Ohm)

Resumo

A Biotecnologia tem avançado cada vez mais no sentido de modificar organismos para gerar células que produzam de forma eficiente e com menor desvio metabólico um produto de interesse. Os circuitos sintéticos genéticos, produto da Biologia Sintética, podem ser utilizados para modular a expressão de diversos genes, inclusive para o controle de genes específicos de vias metabólicas de forma mais precisa. Os circuitos também podem alterar a expressão de genes dependendo de estímulos externos em um biorreator, por exemplo. A construção de circuitos sintéticos lógico com o objetivo de desenvolver organismos biológicos artificiais com comportamento previsível e regulável tem sido o maior desafio. A utilização de ferramentas como as integrases para a construção de circuitos sintéticos baseados na lógica Booleana já foram utilizadas em bactérias, plantas e em células de mamíferos. Recentemente, foram caracterizadas 11 integrases ortogonais e não há relatos de sua utilização na construção de circuitos em *Saccharomyces cerevisiae* até o momento. Portanto, foi construído um circuito sintético lógico do tipo XOR (Ou exclusivo) utilizando as integrases 4, 5 e 8. Como sinais de entrada foram usados o cobre e a galactose e o sinal de saída foi a emissão de fluorescência da GFP (*Green fluorescent protein*). Entretanto, esse circuito não foi funcional. Com o objetivo de verificar os possíveis problemas passamos a estudar a funcionalidade das integrases individualmente. Avaliamos as integrases 4 e 8 sob o controle do promotor responsivo a galactose ($P_{Gal1/Gal10}$). A integrase 4 apresentou a capacidade de ativar o dispositivo genético ao contrário da integrase 8. Portanto, a integrase 4 se mostra funcional em levedura, abrindo caminho para a utilização de integrases como novas ferramentas moleculares para o desenvolvimento e construção de circuitos sintéticos.

Abstract

Biotechnology field has advanced in recent years to modify organisms to generate cells that synthesize a product of interest more efficiently and with less metabolic deviation, as well as to develop organisms with new functions. Synthetic circuits, a recent product of the evolution of synthetic biology, could be used to modulate the expression of several genes, including the control of specific genes of metabolic pathways in a more precise way. Circuits can also alter the expression of genes depending on external stimuli like in a bioreactor, for example. The design of synthetic genetic circuits aiming the development of artificial biological organisms with adjustable and predictable behavior has been a great challenge. The utilization of molecular tools such as integrases for the construction of genetic circuits based on Boolean logic is already being carried out in bacteria, in plants and mammalian cells. Recently, 11 orthogonal integrase have been characterized and there is no report on their use in the yeast *S. cerevisiae* so far. Therefore, a synthetic XOR (exclusive OR) genetic circuit was developed using integrases 4, 5 and 8. The inputs used were cooper and galactose and the output was the fluorescence of GFP (Green fluorescent Protein). However, the circuit was not functional. Aiming to identify the possible problems, we studied the functionality of the integrases individually. Integrases 4 and 8 were tested under the control of a promoter responsive to galactose ($P_{Gal1/Gal10}$). The Integrase 4 was able to activate he genetic switch, unlike integrase 8. Thus we have shown that integrase 4 was functional in yeast, paving the way to the utilization of these integrases as a new molecular tool for the development and construction of genetic circuits in yeasts.

1 Introdução

1.1 Circuitos sintéticos

A Biotecnologia tem avançado cada vez mais no sentido de modificar organismos para gerar células que produzam de forma eficiente e com menor desvio metabólico um produto de interesse (Ostergaard *et al.*, 2000; Nielsen e Keasling, 2011). Para isso, são utilizadas diversas técnicas de engenharia metabólica, edição genômica e biologia sintética (Kavšček *et al.*, 2015). A engenharia metabólica envolve o estudo do fluxo das vias metabólicas, das modificações genéticas necessárias (deleção ou mutação de genes e super expressão de genes, nativos ou heterólogos) para que seja possível a obtenção do produto de interesse da forma mais eficiente possível (Ostergaard *et al.*, 2000; Nielsen e Jewett, 2008; Julleson *et al.*, 2015). Para a edição gênica são usadas várias técnicas desde recombinação homóloga, meganucleases (transposons, recombinases e intron), nucleases modificadas como TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*), ZNF (*zinc finger nuclease*) até as mais recentes técnicas de CRISPR/Cas (Cheng e Alper, 2014; Doudna e Charpentier, 2014).

A Biologia Sintética vem contribuir no sentido de ajustar de forma fina o fluxo metabólico. Dentre as formas de atuação na Biologia Sintética neste tópico podemos citar a engenharia de promotores, com o uso de promotores sintéticos e híbridos, e o uso de circuitos genéticos para controle fino e preciso de pontos chaves da via metabólica e até mesmo para a identificação de novas vias metabólicas (Medema *et al.*, 2011).

Para que haja um bom rendimento do produto de interesse não basta apenas expressar os genes codificadores das enzimas da via, mas regular o nível de expressão de cada uma para que não haja acúmulo de produtos intermediários da via. (Nielsen e Keasling, 2011).

Outra abordagem da engenharia metabólica é identificar novas vias metabólicas. No caso de organismos não cultiváveis que possam “clusters”

ainda não caracterizados, capazes de produzir drogas ou químicos úteis, os circuitos genéticos podem ser usados para testar esses “clusters” gênicos (ou aglomerados gênicos) (Frasch *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2013).

Além disso, por permitirem que os organismos sejam capazes de responder a condições ambientais transientes, os circuitos genéticos podem promover respostas em uma célula de acordo com as condições do biorreator; gerar células terapêuticas que respondam a determinado estímulo relacionado a uma doença no corpo humano e serem usados no desenvolvimento de biosensores para monitoramento de condições ambientais e produção de kits de diagnósticos, dentre outros (Nielsen *et al.*, 2013).

Os circuitos sintéticos nada mais são que circuitos genéticos com uma abordagem da engenharia, onde se faz analogia do controle de transcrição dos organismos vivos com circuitos eletrônicos (Mcadams e Shapiro, 1995; Nielsen *et al.*, 2013). A principal estratégia para a construção de circuitos sintéticos é utilizar partes vindas de outros contextos genéticos em um organismo para que ele possa gerar respostas previsíveis (Elowitz e Leibler, 2000; Chen *et al.*, 2018). Os primeiros circuitos sintéticos desenvolvidos foram o interruptor genético (*toggle switch*) e o circuito oscilatório, ambos em *Escherichia coli* (Elowitz e Leibler, 2000; Gardner *et al.*, 2000). O primeiro, um circuito que possui dois estados transcricionais, em que ambos se reprimem. Após o primeiro estímulo o estado transcricional permanece ativo até o segundo estímulo (Figura 1A) (Gardner *et al.*, 2000). O circuito oscilatório é um dispositivo genético com três repressores, onde um reprime o outro, de forma cíclica, gerando uma resposta oscilatória (Figura 1 B) (Elowitz e Leibler, 2000).

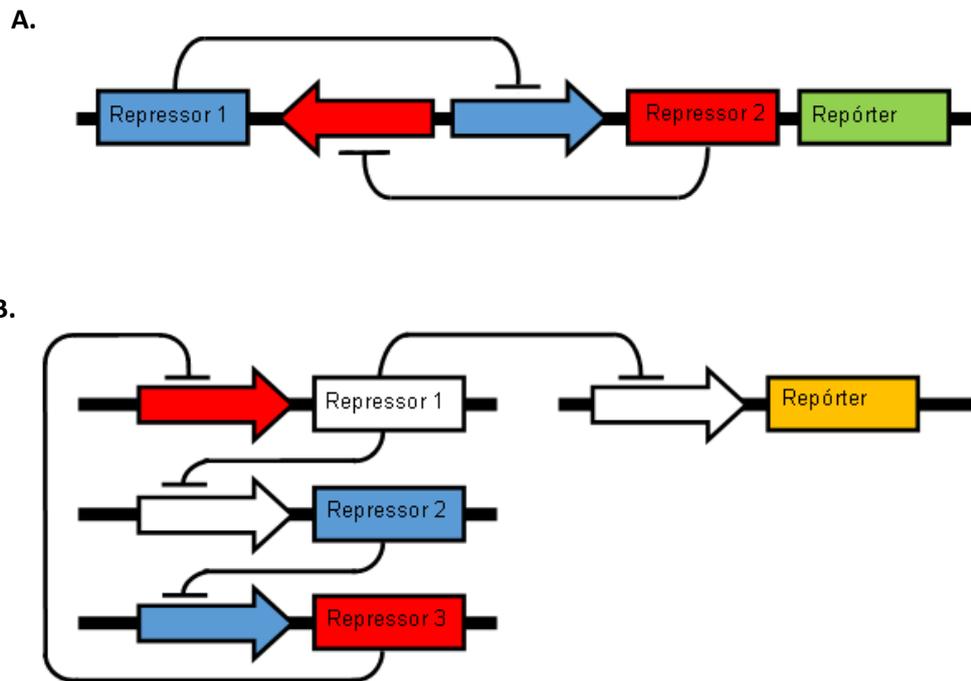


Figura 1- Representação dos primeiros circuitos sintéticos. A. Interruptor genético composto por dois repressores e um gene repórter. **B.** Circuito oscilatório composto por 3 repressores e um gene repórter. Modificado de Way (2014).

Posteriormente outros tipos de circuitos sintéticos foram desenvolvidos como os baseados em retroalimentação, comunicação celular, baseados em RNA, portas lógicas e memória permanente. Os circuitos sintéticos baseados em retroalimentação são capazes de contar eventos, onde um sinal atua como um regulador positivo ou negativo da tradução e atua em conjunto com uma sequência de ativadores transcricionais que é capaz de contar os pulsos de um sinal (Figura 2) (Bashor *et al.*, 2008; Friedland *et al.*, 2009). Nos circuitos sintéticos de comunicação celular, baseados em *quorum sensing*, são montados dois dispositivos, um na célula emissária (*sender*) e outro na célula receptora (*receiver*), onde a primeira célula produz um estímulo para a segunda célula (Liu *et al.*, 2011).

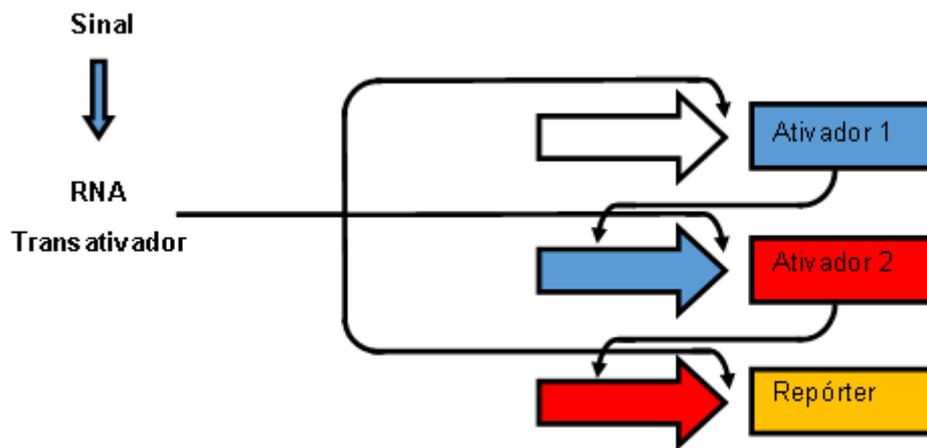


Figura 2- Representação esquemática de um circuito de retroalimentação. O circuito de retroalimentação positiva composto por 2 ativadores e um gene repórter, além de um RNA transativador. Modificado de Way (2014).

Os dispositivos baseados em RNA requerem a presença de uma molécula que irá promover a mudança de conformação estrutural do RNA (estrutura em grampo), ativando ou reprimindo a transcrição ou tradução (Bayer e Smolke, 2005). Os circuitos sintéticos que envolvem portas lógicas são circuitos que se baseiam na lógica Booleana, onde um conjunto de sinais de entrada pode gerar ou não um sinal de saída. Com a combinação de diferentes sinais de entrada e saída, é possível realizar operações lógicas que são representadas através de portas lógicas. Esses circuitos se caracterizam pela busca de aumento da previsibilidade e controle sobre o organismo, utilizando-se de sinais de entrada (como indutores) e sinais de saída (como gene repórter ou a expressão de uma molécula de interesse) (Weiss e Basu, 2002).

Os circuitos sintéticos de memória se baseiam na memória genética. Esta se caracteriza pela capacidade de um organismo ou população de gravar estímulos transientes, sem a necessidade constante do estímulo. Em alguns circuitos sintéticos, a memória é transiente, ou seja, a informação armazenada após o estímulo só é perdida a partir de um segundo estímulo, estes são

chamados os circuitos sintéticos de memória reversível (Inniss e Silver, 2013). No entanto, existem os circuitos sintéticos que causam uma mudança de forma permanente na célula, de forma que as próximas gerações, mesmo que não sejam expostas ao estímulo inicial, são capazes de manter a informação (Ham *et al.*, 2008). Esse tipo de memória é denominado memória permanente, sendo associado a mudanças no DNA (Siuti *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

Ajo-Franklin e colaboradores (2007) desenvolveram um circuito de memória que é ativado a partir de um interruptor genético. Neste circuito sintético, um estímulo ambiental leva a produção de um elemento ativador que vai promover a ativação de um promotor autorregulado, ou seja, o promotor produz seu próprio ativador, levando assim ao estado de memória, onde o sistema permanece ligado permanente (Figura 3) (Ajo-Franklin *et al.*, 2007; Burrill e Silver, 2011). Por fim, temos os circuitos de memória permanente que se baseiam na utilização de integrases e excisionases que são capazes de causar modificações no DNA, levando-o a diferentes estados alternados (Bonnet *et al.*, 2012; Siuti *et al.*, 2013).

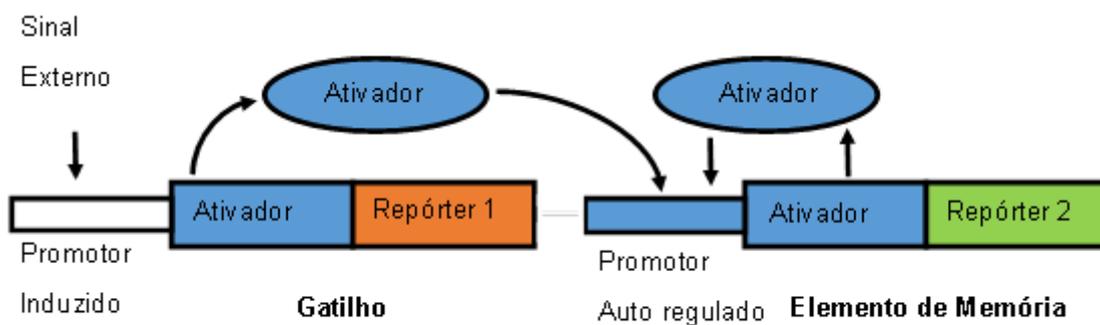


Figura 3- Representação esquemática de um circuito de memória genética. Para a ativação deste circuito sintético, é necessário um sinal externo que ativará um elemento gatilho no circuito sintético, promovendo a transcrição de um ativador que irá ativar a transcrição de um promotor autorregulado. Desta forma, a partir da ativação do circuito sintético é ativado um elemento de memória, tornando o circuito sintético ligado permanentemente. Modificado de Way (2014).

Assim como os circuitos eletrônicos, os circuitos genéticos podem ser analógicos ou digitais. Nos circuitos analógicos, os sinais para a ativação do circuito são variáveis contínuas, ou seja, dentro de um intervalo são infinitas possibilidades, como as concentrações de um indutor por exemplo. Assim, a resposta a esse tipo de circuito é proporcional ao estímulo do indutor (Nielsen *et al.*, 2013; Roquet e Lu, 2014). No caso dos circuitos digitais, suas variáveis são binárias e discretas, sendo descritas, portanto dois estados, sendo 0 (o estado desligado) ou 1 (estado ligado). Dentro dos circuitos digitais, também são possíveis construir circuitos que são capazes de gravar alguma condição transitória no organismo (Siuti *et al.*, 2013; Roquet e Lu, 2014).

1.2 Circuitos sintéticos lógicos

Dentro dos circuitos digitais, alguns circuitos podem ser descritos através de operações lógicas, denominada álgebra Booleana. Esses circuitos são descritos como circuitos lógicos.

A partir de um sinal de entrada (“input”), ou seja, um estímulo externo que irá ativar ou reprimir um promotor surgem respostas ou um sinal de saída (“output”). A partir da combinação de diferentes sinais de entrada pode-se obter ou não um sinal de saída. Para o entendimento dos circuitos sintéticos lógicos, é necessário o conceito de álgebra Booleana.

A álgebra Booleana é muito utilizada para a descrição de circuitos eletrônicos e também está sendo muito utilizada para o circuito sintético lógico. Essa álgebra tem como princípio a existência de apenas duas variáveis, ou seja, podem ser V ou F (falso ou verdadeiro), H ou L (alto ou baixo), 1 ou 0. Na eletrônica e nos circuitos sintéticos lógicos, os circuitos são descritos como 1 ou 0. As portas lógicas das álgebras Booleanas representam operações que podem ser feitas através da combinação de diferentes sinais de entrada

gerando um sinal de saída, tais como multiplicação lógica (AND), adição lógica (OU) ou exclusiva (XOR), entre outras (Güntzel e Nascimento 2001). A representação através de uma tabela dessas operações é denominada tabela da verdade. Por exemplo, na operação lógica do tipo AND (E), só haverá um sinal de saída quando ambos os sinais de entrada estiverem presentes. Por outro lado, na operação do tipo OR (ou), só haverá sinal de saída quando um ou outro sinal ou ainda ambos estiverem presentes (Tabela 1).

Tabela 1- Representação da Tabela verdade. Tabela verdade representando as operações do tipo AND e do tipo OR.

A	B	AND
0	0	0
1	0	0
0	1	0
1	1	1

A	B	OR
0	0	0
1	0	1
0	1	1
1	1	1

Usando a álgebra Booleana, foi desenvolvido em *E. coli* um circuito sintético do tipo AND (Moon *et al.*, 2012). Esse circuito é composto por dois promotores induzíveis, um controlando a produção de uma chaperona, e outro promotor controlando a produção de um fator de transcrição. Apenas com a geração de ambos, a chaperona pode atuar no promotor que gera o estímulo de saída, a proteína fluorescente RFP (Moon *et al.*, 2012). Outro exemplo de circuito sintético lógico foi a construção do circuito do tipo OR em levedura. Neste estudo, eles utilizaram dois sinais de entrada, cloreto de sódio e galactose (Regot *et al.*, 2010). Caso um ou outro esteja presente, haverá sinal de saída, no caso, produção de GFP. Caso ambos sejam presentes, também haverá um sinal de resposta, caracterizando assim um sistema lógico do tipo OR.

A construção de circuitos sintéticos lógico com o objetivo de desenvolver organismos biológicos artificiais com comportamento previsível e regulável tem

sido o maior desafio (Brophy e Voigt, 2014; Chen *et al.*, 2018). Quando essa lógica de 0 ou 1 é aplicada a circuitos biológicos, percebe-se que as células não se comportam todas da mesma forma, então obter uma resposta tudo ou nada é uma das maiores barreiras na construção de circuitos, dado a natureza estocástica dos processos moleculares (Hsiao *et al.*, 2016). Várias abordagens para contornar este problema foram feitas, inclusive a análise da resposta da população como um todo, e não apenas de uma célula (Mathis e Ackermann, 2016). Porém, uma das abordagens que têm sido usadas é a utilização das integrases, pois caso o sinal de saída a ser considerado seja a inversão do DNA, as integrases são capazes de gerar respostas duradouras, caracterizando uma memória permanente (Ham *et al.*, 2008). Além disso, a descoberta de novas integrases nos permite utilizá-las de forma combinada para a criação de circuitos cada vez mais digitais (Yang *et al.*, 2014).

1.3 Integrases

As integrases são uma classe de proteínas virais que mediam a integração e a excisão dos fagos no genoma durante o ciclo de vida lisogênico e lítico (Smith e Thorpe, 2002). As integrases reconhecem dois sítios com aproximadamente 50 pb conhecidos como *attB* (*attachment Bacteria* ou sítio de ligação de bactéria) e *attP* (*Attachment Phage* ou sítio de ligação do fago). Dependendo da orientação dos sítios, elas são capazes de realizar a integração/ excisão ou a inversão da orientação do segmento de DNA, gerando dois outros sítios denominados *attL* (*attachment Left* ou sítio de ligação esquerdo) e *attR* (*attachment Right* ou sítio de ligação direito). Existem dois tipos de integrases: as integrases do tipo tirosina e do tipo serina. (Ross e Landy, 1982; Grindley *et al.*, 2006).

As integrases do tipo tirosina, como Cre recombinase (sistema CreA/loxP) necessitam de um fator de integração e proteínas acessórias para a realização da excisão e a integração. A maioria dos estudos realizados em *Saccharomyces cerevisiae* utiliza essa integrases como ferramentas para engenharia genômica (Merrick *et al.*, 2018; Snoeck *et al.*, 2019). O mecanismo

de excisão deste tipo de integrase baseia-se na formação de estado intermediário parecido com a junção de *Holliday* (Ross e Landy, 1982). Já as integrases do tipo serina não necessitam de proteínas acessórias, apenas sítios de 50 pb de reconhecimento. A integrase se liga covalentemente a extremidade 5' da fita de DNA, promove a quebra das duplas fitas, muda sua conformação, invertendo a sequência, antes da religação. A quebra na dupla fita ocorre no centro da sequência *attP* e *attB*, e após a inversão, os sítios *attP* e *attB* são parcialmente invertidos, gerando uma nova sequência que é denominada *attL* e *attR* (Figura 4). Para a reversão da ação da integrase, é necessária a expressão de um fator denominado RDF (recombination directionality factor ou fator direcional de recombinação) que auxilia a integrase a agir nos sítios *attL* e *attR*, não sendo possível a reversão pela própria integrase devido à modificação dos sítios *attP* e *attB* (Smith e Thorpe, 2002; Grindley *et al.*, 2006; Merrick *et al.*, 2018). Portanto, as integrases do tipo serina são capazes de realizar a inversão de um segmento de DNA de forma permanente e irreversível pela mesma, gerando assim uma memória permanente, não sendo necessário gasto de energia ou adição constante de químicos para a manutenção do fenótipo (Ham *et al.*, 2008). (Siuti *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

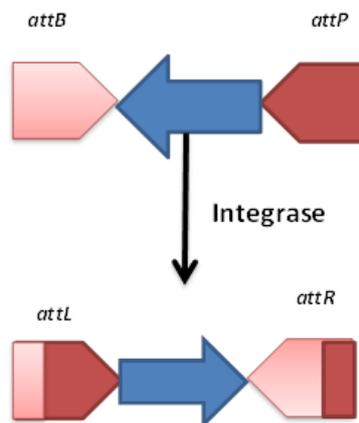


Figura 4- Representação da ação da integrase e seus sítios de reconhecimento.

Em rosa está o sítio *attB* e em vermelho o sítio *attP*. Em azul está representado um gene de interesse que tem sua orientação modificada após a modificação da integrase. Os novos sítios formados são denominados *attL* e *attR*.

Já foram descritas várias integrases do tipo serina tais como phiBT1, TP901, R4, Bxb1, MR11, A118, phiK38, phiC31, Wβ e SPBC (Brown *et al.*, 2011). Recentemente Yang e colaboradores (2014) descreveram 11 integrases funcionais em *E. coli*, sendo altamente ortogonais. Essa propriedade confere a integrase a característica de não reconhecer o sítio de outra integrase, evitando a inversão do segmento de DNA no lugar errado.

1.4 Circuitos sintéticos e integrases

As integrases são muito utilizadas na construção de circuitos mais complexos, ou seja, com mais de uma porta lógica. A utilização destas integrases permite a construção de virtualmente todos os tipos de portas lógicas expressas pela Lógica Booleana (Siuti *et al.*, 2013). As serina-integrases já foram testadas em bactérias, leveduras, células de mamíferos e de aves (Yang *et al.*, 2014; Hsiao *et al.*, 2016; Merrick *et al.*, 2018). Como o mecanismo de funcionamento dessas integrases não depende de fatores intrínsecos do organismo hospedeiro, os circuitos podem ser testados em levedura e posteriormente testados em células de mamíferos mantendo um comportamento esperado (Folliard *et al.*, 2017).

Alguns estudos envolvendo as serina-integrases e sua aplicação para a construção de circuitos sintéticos lógicos estão sendo feitos. Foram utilizadas as integrases phiC31 e Bxb1 em *E. coli* para construir todas as 16 portas lógicas booleanas utilizando combinações de promotores e terminadores, com resultados promissores (Siuti *et al.*, 2013). Mais recentemente, um grupo de pesquisa desenvolveu uma ferramenta capaz de prever a resposta de circuitos lógicos baseados em integrases. Foi realizada a predição e confirmação em larga escala de circuitos sintéticos lógicos em células de mamíferos (113 circuitos genéticos foram testados), confirmando a funcionalidade de 96.5% (Weinberg *et al.*, 2017).

Foram testados 10 serina-integrases diferentes em *S. cerevisiae* (phiBT1, TP901, R4, Bxb1, MR11, A118, phiK38, phiC31, Wβ e SPBC) e todas

mostraram ser funcionais com potencial aplicação de ferramentas para modificação genética (Xu e Brown, 2016). Yang *et al.* (2014) usaram diferentes integrases para a construção de circuitos de memória permanente em *E. coli*.

Estas integrases foram utilizadas como componentes de circuito. A integrase 2 foi utilizada como parte de um circuito baseado em RNA capaz de gerar uma memória genética em *E. coli*. Quando há uma alteração no pH do meio, a integrase 2 é produzida, promovendo uma alteração na sequência do promotor (anteriormente invertida no sentido da transcrição), ativando o gene repórter permanentemente, gerando assim uma memória genética (Pham *et al.*, 2017). As integrases 5, 7, Bxb1 e Tp901 foram utilizadas em um circuito que baseado em portas lógicas do tipo NOT em cascata. Neste circuito, só haverá um sinal de saída (produção de sfGFP) na ausência de um sinal de entrada (Guiziou *et al.*, 2019). Na presença do sinal de entrada as integrases atuaram invertendo a sequência do promotor P7, de forma que não haveria mais a produção do gene repórter.

A levedura *S. cerevisiae* é reconhecida como modelo para o estudo da biologia dos organismos eucariotos, sendo um dos microrganismos mais estudados e caracterizados (Ostergaard *et al.*, 2000; Sherman, 2002). Possui um rápido crescimento celular com tempo de geração de aproximadamente 90 minutos, facilidade de obtenção de réplicas e isolamento de mutantes, uma genética e fisiologia bem conhecida, permite que modificações genéticas robustas sejam realizadas, além de ser viável com diversos marcadores de seleção, seja por auxotrofia ou por resistência à drogas (Sherman, 2002). Devido ao fato desta levedura ter sido utilizada pelo homem há milhares de anos para o processamento de alimentos e produção de bebidas, obteve o status GRAS (*Generally Regarded as Safe*), ou seja, não há restrição para o consumo humano, nem animal (Ostergaard *et al.*, 2000). Além disso, os estudos das áreas “ômicas” como a transcriptômica, metabolômica, por exemplo, geraram dados que permitiram a construção de modelos computadorizados para realizar previsões do comportamento *in vivo* da célula, (Siddiqui *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2016; Ando e García Martín, 2019). Portanto, neste trabalho, serão utilizadas as integrases do tipo serina para a construção e validação de um circuito lógico na levedura *S. cerevisiae*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um circuito genético lógico envolvendo três diferentes integrases para controle preciso e eficiente da expressão gênica em *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Construir uma linhagem de *S. cerevisiae* com o gene repórter integrado
- b) Construir o circuito lógico em *S. cerevisiae*
- c) Analisar a funcionalidade desse circuito

3 Material e Métodos

3.1 Células

As linhagens celulares usadas neste trabalho foram a bactéria *Escherichia coli* XL10-gold (Agilent Technologies) e a levedura *S. cerevisiae*, linhagens haplóides CENPK 111-32 D (*MATa MAL2-8c SUC2 leu2-3*) (Diderich *et al.*, 2001) e RE1006 (*MATa can1-100, his3-11,15, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52*) (R. Strich).

3.2 Meios de cultura

Meio LB (Luria-Bertani) com modificações

Extrato de levedura	0,5%
Peptona	1%
NaCl	1%
Ágar*	1,5%

*Adicionado em meio sólido

Para seleção foi utilizado o antibiótico ampicilina (100 µg/mL)

Meio SOB

Triptona	2%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	0,06%
KCl	0,05%
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Meio SB

Peptona	3%
Extrato de levedura	2%
MOPS	1%

Meio YPD

Extrato de levedura	1%
Peptona	2%
Glicose	2%
Ágar*	2%

*Adicionado em meio sólido

Meio mínimo MD

Yeast Nitrogen Base Without amino acids and ammonium sulphate (Difco)	0,17%
Sulfato de amônio	0,5%
Glicose	2%
Ágar*	2%

*Adicionado em meio sólido

Quando necessário foi adicionado 0,003% L-leucina, 0,002% de L-histidina, 0,002% de L-triptofano e 0,002% de uracila.

2YPDA

Extrato de levedura	2%
Peptona	5%
Glicose	4%
Adenina	0,008%

Para a seleção foi adicionado o antibiótico 300 µg/mL G418 .

Meio MRaf

Yeast Nitrogen Base Without amino acids and ammonium sulphate (Difco)	0,17%
Sulfato de amônio	0,5%
Rafinose	2%
Ágar*	2%

Meio MGal

Yeast Nitrogen Base Without amino acids and ammonium sulphate (Difco)	0,17%
Sulfato de amônio	0,5%
Galactose	2%
Ágar*	2%

3.3 Soluções

Antibióticos

- Solução de ampicilina (1000X)

Ampicilina 100 mg/mL

Dissolvido em água milli Q e esterilizada por filtração em membrana de 0.22 µm.

- Solução G418

G418 50 mg/mL

Dissolvido em água milli Q e esterilizada por filtração em membrana de 0.22 µm.

Aminoácidos

Todos os aminoácidos foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm.

Aminoácido	Concentração estoque	Concentração Final
L-Leucina	1% (p/v)	0,03%
L-Histidina	1% (p/v)	0,02%
L-Triptofano	1% (p/v)	0,02%
Uracila	0,2% (p/v)	0,02%

Os aminoácidos foram adicionados ao meio de cultura quando necessário.

Preparo de células competentes

- Tampão de transformação I pH 5,8

RbCl	12 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,9 g/L
Acetato de potássio 1M pH7,5	0,03 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 g/L
Glicerol	150 g/L

A solução estoque de acetato de potássio 1 M pH 7,5 foi ajustada com ácido acético glacial e esterilizada por filtração em membrana de 0.22 µm. O pH do tampão de transformação foi ajustado com ácido acético 0,2 M e a solução foi esterilizada por filtração.

- Tampão de transformação II pH 6,8

MOPS 1 M pH 6,8	0,02 M
RbCl	1,2 g/L
CaCl ₂	11 g/L
Glicerol	150 g/L

A solução estoque de MOPS 1 M teve seu pH ajustado com NaOH. A solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0.22 µm.

- Solução de Magnésio 2M

MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 M
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 M

A solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0.22 µm.

Mini preparação de plasmídeos por lise alcalina

- Tampão TE

Tris-HCL pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

- Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1% (p/v)

Solução preparada pouco antes do uso.

- Solução III pH 5,0

Acetato de sódio	3 M
ácido acético	2 M

Transformação de *S. cerevisiae* por eletroporação

- Tampão de transformação

Acetato de lítio	0,1 M
DTT	10 mM
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

Extração de DNA genômico de levedura

- Tampão SE

Sorbitol	1 M
EDTA pH 7,5	100 mM

Extração de DNA genômico de levedura para PCR

- Tampão I

Sorbitol	1 M
EDTA-Na ₂	100 mM

pH ajustado para 7,5.

- Tampão II

Tris-HCl	50 mM
EDTA-Na ₂	20 mM
SDS	0,35 M

pH ajustado para 7,4.

Soluções para eletroforese em gel de agarose

- Brometo de Etídio

EtBr	10 mg/mL
------	----------

- Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X

Tris	2 M
Ácido acético	1 M
EDTA pH 8	0,05 M

- Tampão de amostra

TAE 20X	50%
Glicerol	30%
Azul de bromofenol	0,25%

Citometria de Fluxo

- PBS 1X

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

Extração de Proteínas em levedura

- Solução estoque do mix de inibidores
1 tablete de Complete Tablets Mini EDTA-free Easy pack dissolvida em 1 mL de água destilada

Reagente de Bradford

- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate

Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida

- Acrilamida:bisacrilamida (29:1)

Acrilamida	29% (p/v)
Bisacrilamida	1% (p/v)

- Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Tris-base	1,5 M
-----------	-------

O pH foi ajustado para 8,8 adicionando-se HCl.

- Tris-HCl 1 M pH 6,8

- Tris-base
- | | |
|--|-----|
| | 1 M |
|--|-----|

O pH foi ajustado para 6,8 adicionando-se HCl.

- SDS 10% (p/v)

- Persulfato de amônio 10% (p/v)

- TEMED

Adquirido como solução pronta para uso

- Tampão de amostra não desnaturante 5X

Tris-HCl pH 6,8	60mM
Glicerol	25% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

- Tampão de amostra desnaturante 5X

Tris-HCl pH 6,8	60mM
SDS	2% (p/v)
Beta-mercaptoetanol	14,4 mM
Glicerol	25% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

- Tampão de corrida Tris-Glicina 5X

Tris	16,7 g/L
Glicina	104,5 g/L
SDS	0,5% (p/v)

- Gel separador 12,5%

Acrilamida: Bis-acrilamida (30:0,8)	12,5 mL
Tris-HCL 1,5 M (pH 8,8)	3,75 mL
Água destilada	13,21 mL
SDS 10% (p/v)	0,3 mL
APS 10% (p/v)	0,225 mL
TEMED	0,015 mL

- Gel concentrador 5%

Acrilamida: Bis-acrilamida (30:0,8)	2,5 mL
Tris-HCL 1 M (pH 6,8)	5 mL
Água destilada	12,15 mL
SDS 10% (p/v)	0,2 mL
APS 10% (p/v)	0,15 mL
TEMED	0,015 mL

Coloração do gel por Comassie Brilliant Blue

- Solução corante

<i>Comassie Brilliant Blue G-250</i>	0,25% (p/v)
Metanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial	7% (v/v)

3.4 Kits utilizados

- Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen): Purificação de plasmídeos em grande escala
- In-Fusion HD Cloning Kit (clontech): Clonagem de fragmentos por recombinação homóloga
- NEBBuilder HiFi DNA Assembly (NEB): Clonagem de fragmentos por recombinação homóloga
- Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega): Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose e purificação de produtos de PCR
- Wizard Plus SV minipreps DNA purification System (Promega): Extração de DNA plasmidial de bactérias

3.5 Oligonucleotídeos (*primers*)

Tabela 2- Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho. Sítios de restrição estão sublinhados. Sequências de homologia para recombinação encontram-se em caixa baixa.

<i>Primer</i>	Sequência	Sítio de restrição
HO-EGFP F	GCAGGTCGAC <u>GGATACT</u> TTCCAAAGAGCGCCCAACGCGA	BamHI
HO-EGFP R	CAAGCTAAAC <u>AGATCT</u> CCGGTAGAGGTGTGGTCAATAA	BglII
Int 4 F	ACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCgactctcctccgtgcgtc	
Int 4 R	CGGCGCTCGGATCCggtaccggccgcaaattaaag	
Int 5 F	ACACCTCTACCGGCTCGAGtgggcgctatactgcatatg	
Int 5 R	AAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCtaacgaacgcagaattttgca gttattaaacttaaatac	
Int 8 F	TGCGGCCGGTACCGGATCCgagcgccggatcagggag	
Int 8 R	TAGCGCCCACTCGAGccggtagaggtgtggtcaataag	
HO F	CGGCGTTGTTGTACTGTTGCA	
HO R	TGAGATGGCGTATTTCTACTCCA	
TEFp5'	<u>GGAGCTCCCC</u> CACACACACCATAGCTTCAA	SacI
TEFp3'	CGGATTCTTTGTAATTA ³ AAACTTAGATTAGATTG	
Int 4 NF	agggaatatta <u>agct</u> TATAATGATTACCACCAGAAAGGT	HindIII
Int 4 NR	ccctctagat <u>catg</u> CTTAGAAAGTCCAGTGGATATCAAT	SphI
Int 8 NF	agggaatatta <u>agctt</u> ATAATGAAGGTCGCTGTTTACTGTAGA	HindIII
Int 8 NR	ccctctagat <u>catg</u> CTTAGTAGAATTCGATAGAGGTAATCT	SphI
GALIN F	cggtacccggg <u>gatcc</u> ACGGATTAGAAGCCGCCGA	BamHI
CYCIN R	ccaagcttgcattgc <u>ctgcag</u> CCGCAAATTAAGCCTTCGA	PstI
HO-UkG F	ccccacacacattagcttcaa	
HO-UkG R	taacgaacgcagaattttcgagt	

3.6 Marcadores de massa molecular

3.6.1 Marcadores de massa molecular para DNA

- 2-log DNA ladder, 100-10.000 pb (New England Biolabs)
- O'Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder 75-20.000 pb (Thermo Scientific)
- 1 kb DNA Ladder, 250-10.000 pb (Promega).
- 1 kb DNA Ladder, 500-10.000 pb (Sinapse)

3.6.2 Marcador de massa molecular para proteína

- Pierce Unstained Protein MW Marker, 14,4- 116 KDa (Thermo Scientific)

3.7 Enzimas

Para os procedimentos de PCR e ligação foram utilizadas as seguintes enzimas:

- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)
- Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
- My Taq Mix (Bioline)
- Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen)
- T4 DNA ligase (USB)

Tabela 3- Enzimas de restrição utilizadas neste trabalho. As temperaturas de incubação e os tampões recomendados também estão descritos.

Enzimas	Temperatura	Tampão (New England Biolabs)
BamHI	37 °C	NEBuffer 3.1
BglII	37 °C	NEBuffer 3.1
HindIII	37 °C	NEBuffer 2.1
SacI	37 °C	NEBuffer 1.1
SpeI	37 °C	CutSmart
SphI	37 °C	NEBuffer 2.1
PvuI	37 °C	NEBuffer 3.1
PvuII	37 °C	NEBuffer 3.1

3.8 Vetores

Tabela 4- Vetores utilizados no trabalho.

Vetor	Descrição	Referência
pBluescript SK	Vetor para clonagem de produtos de PCR	Stratagene
YCplac111	Vetor centromérico contendo gene para complementação do fenótipo da deleção do gene LEU2	Gietz e Surgino 1988
YCplac33	Vetor centromérico contendo gene para complementação do fenótipo da deleção do gene URA3	Gietz e Surgino 1988
HO-Poly-KanMX4-HO	Vetor de levedura para integração no <i>locus</i> HO com marca de seleção que confere resistência a G418	Voth et al 2001

pYES2	Vetor contendo o promotor P_{Gal1} e o terminador CYC1 com gene para complementação do fenótipo da deleção do gene URA3	Invitrogen
-------	---	------------

3.9 Preparação de células bacterianas competentes

As células de *E. coli* competentes foram preparadas de duas maneiras diferentes, para transformação por choque térmico ou por eletroporação. Inicialmente a linhagem XL10-gold foi semeada em meio LB ágar a partir de um estoque armazenado a -80 °C e incubadas por 16 horas a 37 °C.

3.9.1 Preparo de células bacterianas quimicamente competentes

Para a transformação de *E. coli* foi adotado o protocolo proposto por (Hanahan, 1983) com adaptações. Uma colônia isolada da bactéria foi inoculada em 10 mL de meio SOB em um frasco Erlenmeyer de 125 mL e incubada a 200 rpm e 37 °C por 16 h. Um a dois mL deste pré-inóculo foram adicionados a 100 mL de meio SOB e incubados por tempo suficiente para que a OD₆₀₀ chegasse a 0,3. A cultura foi então resfriada por 15 minutos em banho de água-gelo e as células foram centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuscitado em 32 mL de tampão de transformação I e incubado em gelo por 15 minutos. As células foram então centrifugadas novamente e ressuscitadas em 4 mL de tampão de transformação II. Ao final do protocolo, as células foram separadas em alíquotas de 100 µL e congeladas em gelo seco. O armazenamento foi feito a -80 °C. No procedimento de transformação o DNA foi adicionado a uma alíquota de células competentes e incubado em gelo por 40 minutos. Em seguida as células foram então incubadas a 42 °C por 90 s e novamente incubadas em gelo por 5 minutos. As células receberam 1 mL de meio LB e foram incubadas por 1 h a 37 °C sendo em seguida plaqueadas em meio seletivo.

3.9.2 Preparo de células bacterianas competentes para eletroporação

Foi adotado o protocolo proposto por (Dower et al., 1988), com modificações. Uma colônia isolada da bactéria foi incubada em 10 mL de meio SB durante a noite sob agitação de 250 rpm a 37°C. Depois 0,5 mL dessa cultura foi diluída em 500 mL de meio SB, contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2 M e 2,5 mL de solução estoque de magnésio 2 M em um frasco de 1 litro. As células foram incubadas por 2 a 3 horas sob forte agitação (250 rpm) a 37 °C até atingir uma OD₆₀₀ de 0,7 a 0,9 (meio da fase exponencial). Posteriormente, o frasco foi resfriado em gelo antes de centrifugar (3.000 x g por 20 minutos a 4 °C). As células foram ressuspensas em 25 mL de glicerol 10% (v/v) gelado com o auxílio de pipetas pré-resfriadas. Após esse procedimento, foram adicionados 75 mL de glicerol 10% (v/v) gelado e as células foram centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e essa lavagem com glicerol foi repetida. As células foram ressuspensas em 25 mL de glicerol 10% gelado com o auxílio de pipetas pré resfriadas e as amostras foram transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas com glicerol 10% (~ 1 a 2 mL) para uma OD₆₀₀ de 200 a 250. As células foram separadas em alíquotas de 100 µL em gelo seco e armazenadas a -80 °C. Para a transformação, as células de uma alíquota foram transferidas para uma cubeta de eletroporação de 1 mm resfriadas. O DNA foi acrescentado, sendo pipetado cuidadosamente e incubados no gelo por 5 minutos. Os parâmetros do choque foram 2 KV, 25 µF e 200 Ω. Posteriormente foram adicionados 950 µL de SOC a temperatura ambiente imediatamente após o choque e as células foram incubadas a 37°C por 60 minutos com agitação a 250 rpm. As células foram semeadas em meio adequado para seleção.

3.10 Manipulação de DNA

Os métodos usados para a manipulação de DNA, tais como digestão, ligação, PCR, precipitação de DNA, eletroforese foram os descritos por (Sambrook *et al.*, 1989) e seguindo as recomendações dos fabricantes das enzimas utilizadas em cada procedimento.

Foram utilizadas as enzimas *Phusion DNA polymerase* (Thermo Scientific), a *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), *My Taq Mix* (bioline) e a *Taq Platinum High Fidelity* (Invitrogen) de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes, para as ampliações de fragmentos por PCR dependendo da aplicação.

3.11 Mini preparação de plasmídeos por lise alcalina

Para a extração plasmidial, foi realizado protocolo descrito anteriormente com modificações (Birnboim e Doly, 1979). Colônias isoladas de *E. coli* foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado e cresceram a 37 °C, a 200 rpm durante 16 h. As células foram centrifugadas a 10.000 x g por 2 minutos e o precipitado foi ressuscitado em 200 µL de TE. Foram adicionados 360 µL da Solução II, misturando gentilmente por inversão do tubo e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 300 µL de Solução III e a reação foi misturada invertendo-se o tubo e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Depois, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 750 µL de isopropanol. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos antes de ser centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 200 µL de TE. Foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e misturado vigorosamente com o auxílio do vortex. A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foram adicionados 750 µL de etanol 100% gelado e a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 750 µL de etanol gelado 70%, sendo centrifugado a 10.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente após o precipitado estar

totalmente seco, o DNA plasmidial foi ressuspensionado em 100 μL de H_2O deionizada com 1 μL de RNase 10 mg/mL.

Em alguns casos, também foram utilizados kits de extração de plasmídeos Wizard SV Plus (Promega) e Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen) conforme orientação do fabricante.

3.12 Precipitação de DNA

Para a precipitação de DNA (Sambrook *et al.*, 1989), foram adicionados 0,3 M acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol 100%. A mistura foi incubada durante 16 horas a -20°C . Após a incubação, submeteu-se o tubo a uma centrifugação a $12.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C . Posteriormente o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 μL de etanol 70% gelado. O material foi novamente centrifugado a $12.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C . Finalmente descartou-se o sobrenadante, o precipitado submetido à secagem e em seguida, ressuspendeu-se o mesmo em um volume adequado de água deionizada.

3.13 Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose

Para a purificação dos fragmentos de DNA, foi utilizado o kit *Wizard SV Gel and Purification System* (Promega), segundo as instruções do fabricante.

3.14 Recombinação *in vitro*

A montagem das sequências de DNA foi realizada por recombinação *in vitro* utilizando o kit *In-fusion* (Clontech) (Zhu *et al.*, 2007) ou kit *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* (New England BioLabs). Os fragmentos foram amplificados com oligonucleotídeos que continham sequências homólogas ao vetor ou aos próprios fragmentos para a montagem dos plasmídeos. A incubação dos fragmentos de DNA com o *mix* fornecido foi feita segundo

recomendação do fabricante. Posteriormente o material foi usado na transformação de *E. coli*.

3.15 Recombinação *in vivo*

Para a montagem do DNA plasmidial, os fragmentos de DNA possuem sequências homólogas entre si. Todos os fragmentos, incluindo o vetor previamente digerido, foram utilizados para transformar *S. cerevisiae* por eletroporação na concentração final de 1 µg com proporção molar de 1 inserto para 1 de vetor.

3.16 Transformação de alta eficiência de levedura

O protocolo utilizado foi descrito por (Gietz e Schiestl, 2007). Uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio líquido YPD e foi incubada por 16 horas a 200 rpm e 30 °C. Após o crescimento, $2,5 \times 10^8$ células, determinado por meio da câmara de Neubauer, foi incubada em 50 mL de meio 2YPDA pré-aquecido para uma concentração final de 5×10^6 células/mL. As células foram incubadas no shaker a 30 °C a 200 rpm até atingir a concentração de 2×10^7 células/mL. As células foram centrifugadas a $3.000 \times g$ por 5 minutos a 20 °C e o sedimento foi ressuscitado em 25 mL de água estéril. Este procedimento de lavagem foi repetido. Após a centrifugação, as células foram ressuscitadas em 1 mL de H₂O estéril e transferidas para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL para uma nova centrifugação a $3.000 \times g$ por 30 s, descartando-se o sobrenadante. As células foram ressuscitadas em 1 mL de H₂O estéril e foram aliqüotadas 100 µL de célula em tubos de 1,5 mL para a transformação. As células foram centrifugadas a $13.000 \times g$ por 30 s para remover o sobrenadante e serem ressuscitadas no mix. Para o mix, é necessário 240 µL de PEG 3350 (50%), 36 µL de acetato de lítio 1 M e 50 µL de DNA carreador 2 mg/mL previamente desnaturado em água fervente por 5 minutos. Foram adicionados 34 µL de DNA (o total de DNA utilizado foi 7 µg) ao mix de transformação. As células foram ressuscitadas vigorosamente e incubadas a 42 °C por 40 minutos. Após esse tempo, foram centrifugadas a $13.000 \times g$ por 30 segundos e o

sobrenadante foi removido com uma micropipeta. Posteriormente adicionou-se 1 mL de YPD às células e incubaram-se por 2 a 3 horas a 30 °C. Em seguida, as células foram plaqueadas em YPD com o antibiótico apropriado e incubadas a 30 °C por 2 dias.

3.17 Transformação de *S. cerevisiae* por eletroporação

Foi utilizado o protocolo proposto por (Becker e Guarente, 1991) com adaptações. Uma colônia isolada foi crescida em 3 mL de YPD por 16 horas. Foi feito um inóculo em 100 mL de YPD com OD₆₀₀ inicial de 0,1. Todas as centrifugações deste protocolo foram realizadas utilizando o rotor de ângulo fixo F15- 6X100 da Thermo Scientific. As células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos quando a cultura atingiu a OD₆₀₀ 0,8. As células foram ressuspensas com 25 mL de tampão de transformação. As células foram incubadas em temperatura ambiente por 1 h, homogeneizando suavemente a cada 10 minutos. As células foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com 25 mL de água milli-Q estéril gelada duas vezes. Após esse processo, o sedimento foi lavado novamente em 10 mL de 1 M de sorbitol gelado duas vezes. O precipitado celular foi ressuspensado em 100 µL de 1 M sorbitol. Para cada transformação, foi utilizado 40 µL. Adicionou-se 1 µg de DNA em uma alíquota de célula, incubando no gelo por 5 minutos. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm e submetida ao choque nos seguintes parâmetros: 1,5 kV, 25 µF, 200 Ω. Posteriormente foi adicionado sorbitol gelado imediatamente e incubado por 30 minutos, mesmo para seleção auxotrófica.

3.18 Transformação de levedura *One Step*

O protocolo utilizado foi descrito anteriormente por (Chen *et al.*, 1992). A cultura de levedura foi inoculada e crescida sob agitação a 30 °C até a fase estacionária. Após este período, 200 µL de células foram coletadas em tubos do tipo Eppendorf e centrifugadas durante 5 segundos à velocidade máxima. As células foram ressuspensas em tampão *One Step* (0,2 M acetato de Lítio,

40% (p/v) de PEG 4000 e 100mM de DTT). O plasmídeo foi adicionado na concentração entre 50 a 1000 ng em um volume final de 100 µL. As células foram incubadas durante 1 hora a 45 °C e em seguida, plaqueadas em meio seletivo adequado.

3.19 Extração de DNA genômico de levedura

A extração de DNA genômico foi realizada conforme previamente descrito, com modificações (Burke, 2000). Todas as centrifugações deste protocolo foram feitas utilizando a centrífuga *Hettich* Micro 120. Uma colônia foi inoculada e crescida sob agitação por 16 horas em 5 mL de meio YPD. As células foram coletadas por centrifugação a 2.000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 0,5 mL de tampão SE. Foi adicionado 10 µL de solução de liticase (20 mg/mL) e a mistura incubada a 37 °C por 60 minutos. As células foram centrifugadas a 2.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 500 µL de solução Tris-HCL 50 mM (pH 7,4) e Na₂EDTA (20 mM). Foram adicionados 50 µL de SDS 10%. A mistura foi incubada a 65 °C por 30 minutos. Depois foi adicionado 200 µL de acetato de potássio 5 M incubado no gelo por 60 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 1 V de isopropanol 100% a temperatura ambiente e os tubos incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados rapidamente por 10 segundos e o sobrenadante descartado. Após seco, o precipitado foi ressuspendido em 300 µL de água deionizada acrescidos de 1,5 µL de RNase (10 mg/mL) em seguida incubado a 37°C por 30 minutos.

3.20 Extração de DNA genômico de levedura para PCR

A extração de DNA de levedura que foi utilizado para as reações de PCR foi realizada conforme descrito anteriormente, com modificações (Drumonde-Neves *et al.*, 2013). Uma colônia isolada de levedura foi inoculada em 1 mL de meio de cultura adequado e incubada a 30 °C por 16 horas. As células foram

centrifugadas a 10.000 x g por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 100 µL de Tampão I e 1,66 µL de liticase (20 mg/mL). As células foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de Tampão II e as células foram incubadas a 65 °C por 5 minutos. Foram adicionados 80 µL de acetato de potássio 5 M e a amostra foi homogeneizada e incubada a -20 °C por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 250 µL de isopropanol e a solução foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 2 minutos, o sobrenadante removido e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%. A seguir, o precipitado foi ressuspensado em 500 µL de água deionizada contendo 100 µg/mL de RNase A.

3.21 Curva de crescimento celular de tolerância ao cobre

Foi feito pré-inóculo da *S. cerevisiae* em 5 mL de meio mínimo durante 16 horas a 28 °C sob agitação de 200 rpm. Posteriormente foi feito o inóculo para OD₆₀₀ inicial de 0,05 sob 5 concentrações diferentes de sulfato de cobre II (0, 50, 100, 200 e 500 µM) em volume final de 100 µL de meio mínimo. A leitura foi feita com o equipamento Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek). As leituras foram efetuadas a cada 30 minutos durante 72 horas a 30 °C sob agitação.

3.22 Indução por cobre

Para este experimento, foi utilizado um protocolo adaptado (Peña *et al.*, 1998). Os pré-inóculos foram feitos em Erlenmeyers de 125 mL contendo 10 mL de meio MD. Em cada frasco foram crescidas colônias isoladas de *S.cerevisiae*. Os pré inóculos foram crescidos por 21 horas a 28 °C e 200 rpm. Os inóculos feitos em frascos de 250 mL com volume de 30 mL de meio mínimo. As leveduras foram induzidas com sulfato de cobre II quando

chegaram a OD₆₀₀ de 1,2. Foram utilizadas diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 200 µM) por diferentes tempos de indução (0, 3, 6, 8, 14, 17 horas).

3.23 Indução por galactose

Protocolo adaptado de (Guthrie e Fink, 1991). As leveduras foram inoculadas a partir de colônias isoladas em frasco de 125 mL com 10 mL de meio MRaf. As colônias foram crescidas por 21 horas a 28°C e 200 rpm e foram inoculadas em 30 mL de meio MGal contendo 2% de galactose. As leveduras foram inoculadas para OD₆₀₀ de 0,3 para a indução com galactose. Foram testados diferentes tempos de indução (0, 3, 6, 9, 14 e 17 horas).

3.24 Citometria de fluxo

O protocolo utilizado foi adaptado (Hsiao *et al.*, 2016). Das amostras utilizadas foram coletados 1 mL de cada clone. A seguir, submeteu-se à centrifugação a 4.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de PBS 1X para ressuspender o precipitado. A diluição das amostras foi realizada para a faixa de 10⁶ células/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata técnica.

Para as leituras, foi utilizado o citômetro BD LSR II (BD Biosciences). Foram analisados 4.000 eventos utilizando o laser argônio a 488 nm para a excitação da GFP. A análise dos dados adquiridos foi feita utilizando-se o *software* FlowJo.

3.25 Extração de proteínas na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Para a extração de proteínas foi utilizado o protocolo descrito por (Dunn e Wobbe, 2001) com adaptações. Foram coletados 5 mL de cultura e concentrados por centrifugação a 13.000 x g durante 3 minutos, posteriormente as células foram lavadas com PBS. O precipitado foi pesado (peso úmido) e as células foram ressuspensas no volume necessário de tampão Tris-HCl 50

mM pH 8,0 (4,5 mL de tampão para cada 1 g de peso úmido de células) contendo Tween 20 na concentração de 1,25% e 30 μ L de mix de inibidores de proteases para cada 1 mL de tampão. Posteriormente, foi adicionada a quantidade necessária de esferas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (4 g para cada 1 g de peso úmido de células). A mistura foi submetida à agitação vigorosa (vortex) por 30 segundos, seguido de incubação no gelo por 30 segundos, este procedimento foi repetido 30 vezes. A parte líquida foi transferida para um tubo e concentrada por centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo e foi armazenado a -20°C até o uso.

3.26 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

A quantificação de proteínas totais foi determinada em triplicata pelo método colorimétrico de BRADFORD, (Bradford, 1976). A curva padrão foi construída utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como proteína padrão nas concentrações 10, 25, 75 e 100 μ g/mL.

A quantificação das proteínas foi determinada por absorvância a 595 nm.

3.27 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Protocolo adaptado (Laemmli, 1970). Para o preparo das amostras foi padronizado a quantidade de 5 μ g de proteínas para todos os géis. No caso do gel desnaturante (SDS-PGE) as amostras foram fervidas por 5 minutos antes da aplicação no gel. A corrida foi conduzida em tampão de corrida desnaturante 1X com uma voltagem a 100 V.

As bandas de proteína do gel desnaturante foram visualizadas após a coloração com Coomassie blue. O gel foi incubado na solução corante por 16 horas sob agitação, seguido de incubação em água, sob agitação, até o aparecimento das bandas.

A fluorescência das proteínas foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. As bandas foram visualizadas utilizando-se o

equipamento Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-Rad), nos comprimentos de onda entre 430-460 nm.

4 Resultados e Discussão

4.1 Construção do circuito sintético

Para atingir o objetivo proposto foram adotadas as estratégias descritas no fluxograma abaixo:

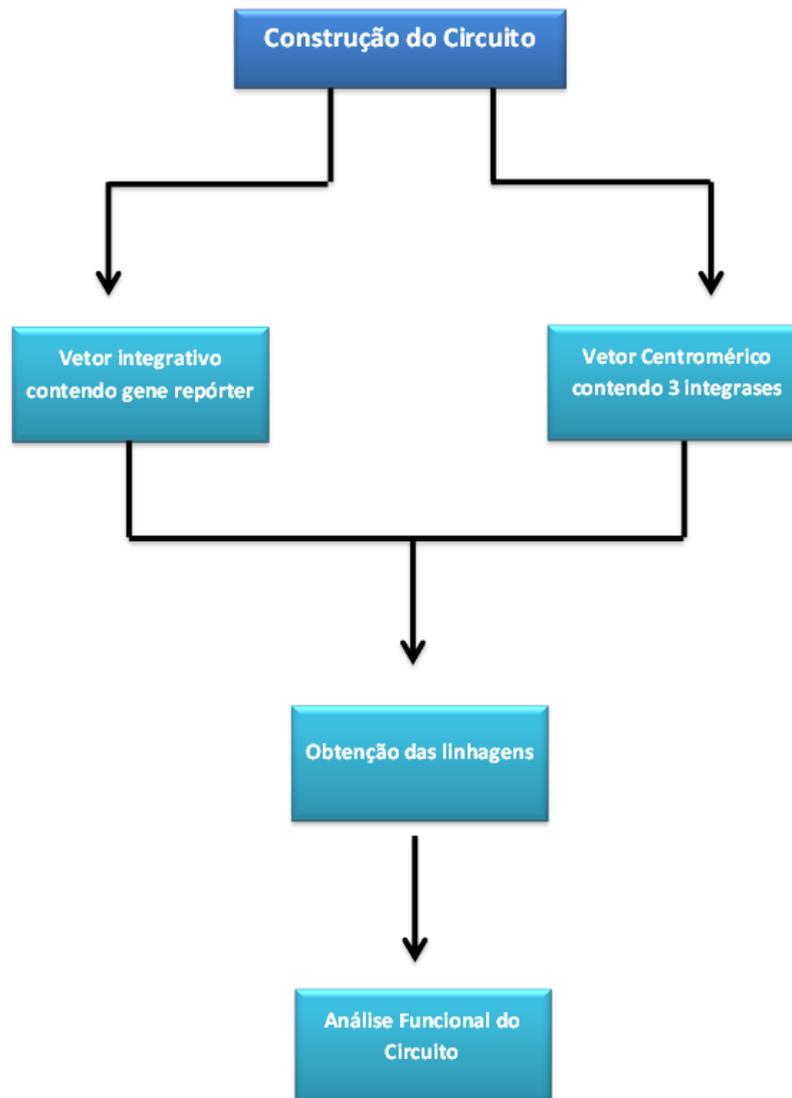


Figura 5- Estratégia para a construção do Circuito Genético em *S. cerevisiae*.

O circuito sintético foi desenhado baseado na porta lógica XOR que consta de dois sinais de entrada (input) e um sinal de saída (output). Só haverá sinal de saída (*EGFP*) quando um dos dois sinais de entrada estiver presente, nunca quando ambos estejam presentes ou ausentes (Tabela 5).

Tabela 5- Tabela verdade do circuito XOR.

A	B	XOR
0	0	0
1	0	1
0	1	1
1	1	0

Os sinais de entrada foram galactose e cobre. O circuito genético sintético desenhado é composto pelas serina-integrases Int 4 (*Streptococcus equi* subsp *equi* 4047); Int 5 (*Streptomyces phage* PhiK38⁺) e Int 8 (*Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435) (Figura 6A) (Yang *et al.*, 2014) . Para a escolha destas integrases, foram observados os dados obtidos de ortogonalidade entre essas integrases e a formação dos sítios *attL* e *attR* das integrases (Yang *et al.*, 2014). Foram analisados a presença de códons de iniciação seguidos por códons de terminação dentro das sequências que seriam formadas após a inversão do promotor nos sítios *attL* e *attR*, de forma que poderia causar uma parada prematura da transcrição. As integrases 4, 5 e 8 atenderam aos critérios de ortogonalidade e não possuíam sítios de iniciação seguidos por códons de terminação dentro dos sítios que foram formados após a inversão. Como sinal de saída foi escolhido o gene repórter *EGFP*, pois é um dos genes repórter mais utilizados na literatura, sendo possível sua detecção sem a necessidade da adição de um indutor ou substrato ou mesmo cofatores para formar o cromóforo (Kaishima *et al.*, 2016).

Para a composição do circuito, o gene Int 4 está sob controle do P_{GAL1} (induzido por galactose), o gene Int 5 sob controle do P_{CUP1} (induzido por cobre) e o gene int 8 e *EGFP* sob controle do promotor constitutivo *TEF1*,

porém, na forma inativa, ou seja, com a sequência no sentido reverso complemento ao da transcrição (Figura 6B). Foram escolhidos os P_{GAL1} e P_{CUP1} , pois para o circuito, optamos por utilizar promotores que sejam efetivamente induzidos e não promotores que seriam desreprimidos, de forma a obter um controle mais preciso da expressão gênica, sem a necessidade de esperar a depleção de algum componente do meio (Weinhandl *et al.*, 2014).

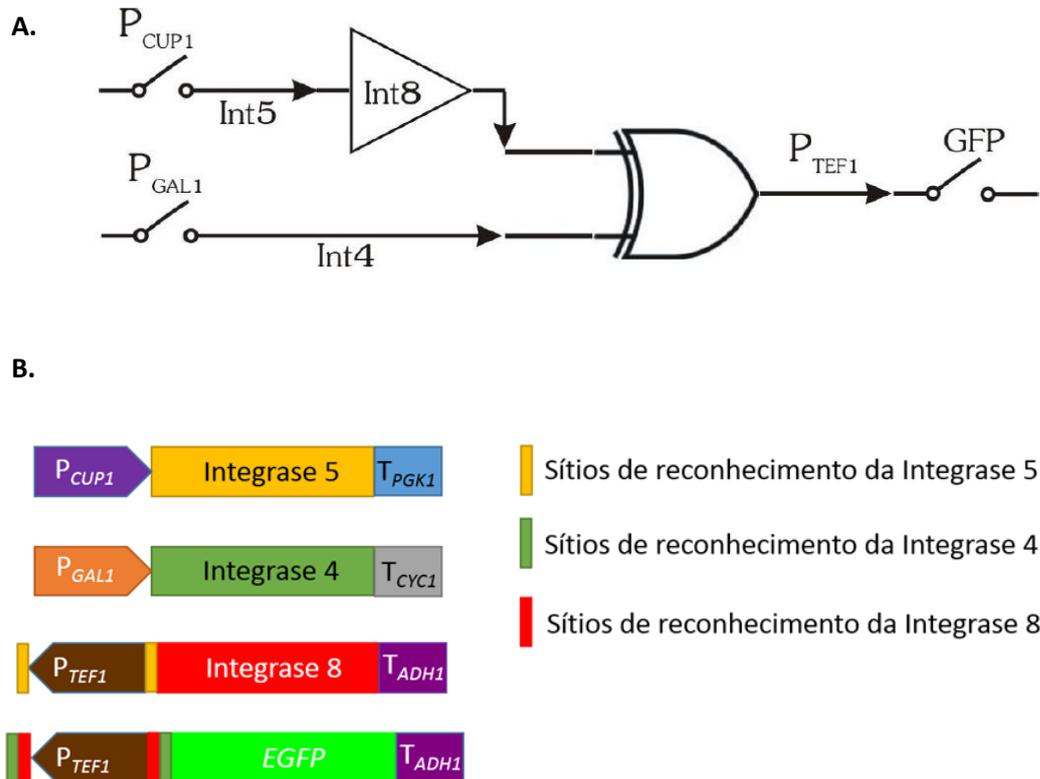
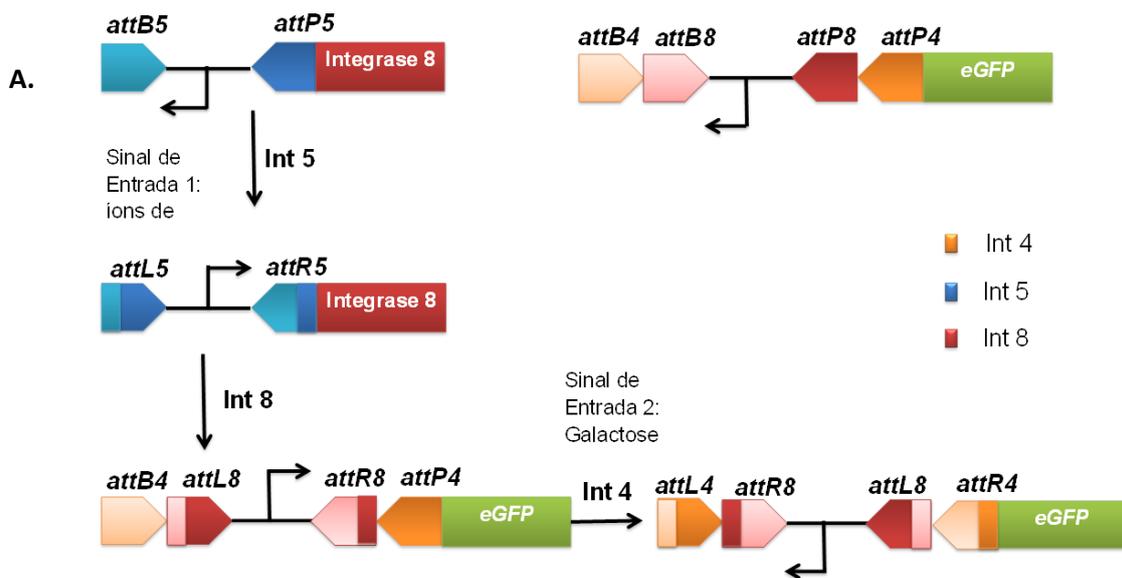


Figura 6- Circuito lógico das integrases. **A** Representação esquemática do circuito lógico XOR contendo as portas lógicas. **B** Esquema representando os cassetes de expressão das integrases e do gene repórter *EGFP*, componentes do circuito lógico.

Na presença do cobre a integrase 5 é expressa e ativa a expressão da integrase 8 através da mudança de orientação do P_{TEF1} da integrase 8 para o sentido em que ocorre a transcrição. A Integrase 8 promove a mudança de orientação do P_{TEF1} que controla a expressão da *EGFP*, ativando a expressão. Como o P_{TEF1} , que controla a expressão da *EGFP*, é flanqueado por sítios de reconhecimento para as integrases 8 e 4, ao se adicionar galactose podemos

ter a ativação do sistema ou a sua repressão, no caso deste indutor ser adicionado posteriormente ao cobre. No primeiro caso a galactose induz a expressão da integrase 4 que promove a mudança de orientação do P_{TEF1} ativando a expressão da *EGFP* permanentemente. No segundo caso, ou seja, quando houve a adição de galactose após o cobre, a expressão da *EGFP* encontra-se ativa, a integrase 4 promove uma nova mudança de orientação do P_{TEF1} , inativando-o (Figura 7).



B.

P_{CUP1}	P_{GAL1}	Int 5	Int 4	Int 8	<i>EGFP</i>
0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	1	1
0	1	0	1	0	1
1	1	1	1	1	0

Figura 7- Esquema representativo do funcionamento do circuito genético. A. Na presença de íons de cobre, o P_{CUP1} ativa a transcrição da integrase 5. A integrase 5 reconhece seus sítios no P_{TEF1} que controla a expressão da integrase 8. A integrase 8 atua sobre os sítios *attB8* e *attP8* no P_{TEF1} que controla a expressão da *EGFP*, promovendo assim sua transcrição. Com a adição do segundo sinal de entrada (galactose), a integrase 4 é produzida e reconhece os sítios que flanqueia o P_{TEF1} , promovendo a inversão do promotor e desativando a expressão do gene *EGFP*. B. Tabela da verdade correspondente ao circuito.

Para o desenvolvimento do circuito, foi necessária a construção de dois vetores: o vetor integrativo contendo o cassete de expressão do gene repórter *EGFP* e o vetor centromérico contendo os cassetes de expressão das integrases. O gene repórter foi integrado ao genoma devido a estabilidade da construção mesmo na ausência da pressão seletiva durante o cultivo (Siddiqui *et al.*, 2012). As integrases foram expressas em um vetor centromérico, por ser um vetor de baixo número de cópias (1 ou 2 por célula). O baixo número de cópias é importante, pois permite um maior controle do circuito sintético, além de permitir dosar a atividade com maior precisão. A integração foi evitada, pois após a ação do circuito, o cassete não seria mais necessário à célula, podendo ser eliminado pelo processo de cura.

4.1.1 Construção do vetor integrativo HO-EGFP

O cassete de expressão da *EGFP* com o P_{TEF1} invertido flanqueado pelos sítios de reconhecimento das integrases 8 (para ativar o sistema) e da integrase 4 (para inativar o sistema) e o terminador do gene *ADH1* foi sintetizado pela empresa *Genone* e, posteriormente clonado no vetor pBluescriptII SK (Figura 8A). O cassete de expressão foi amplificado utilizando os *primers* HO-EGFP F e HO-EGFP R, gerando um produto de 1600 pb. O produto da PCR foi purificado e inserido no vetor HO-poly-KanMX4-HO (Voth *et al.*, 2001) previamente digerido com as enzimas BglII e BamHI, por recombinação *in vitro*, resultando no vetor HO-EGFP (Figura 8B).

O cassete de expressão da *EGFP* foi integrado no *locus* HO de *S. cerevisiae* da linhagem CENPK 111 32-D. O gene HO é responsável pelo homotalismo desta levedura não sendo essencial para a mesma (Goldstein e Mccusker, 1999; Voth *et al.*, 2001).

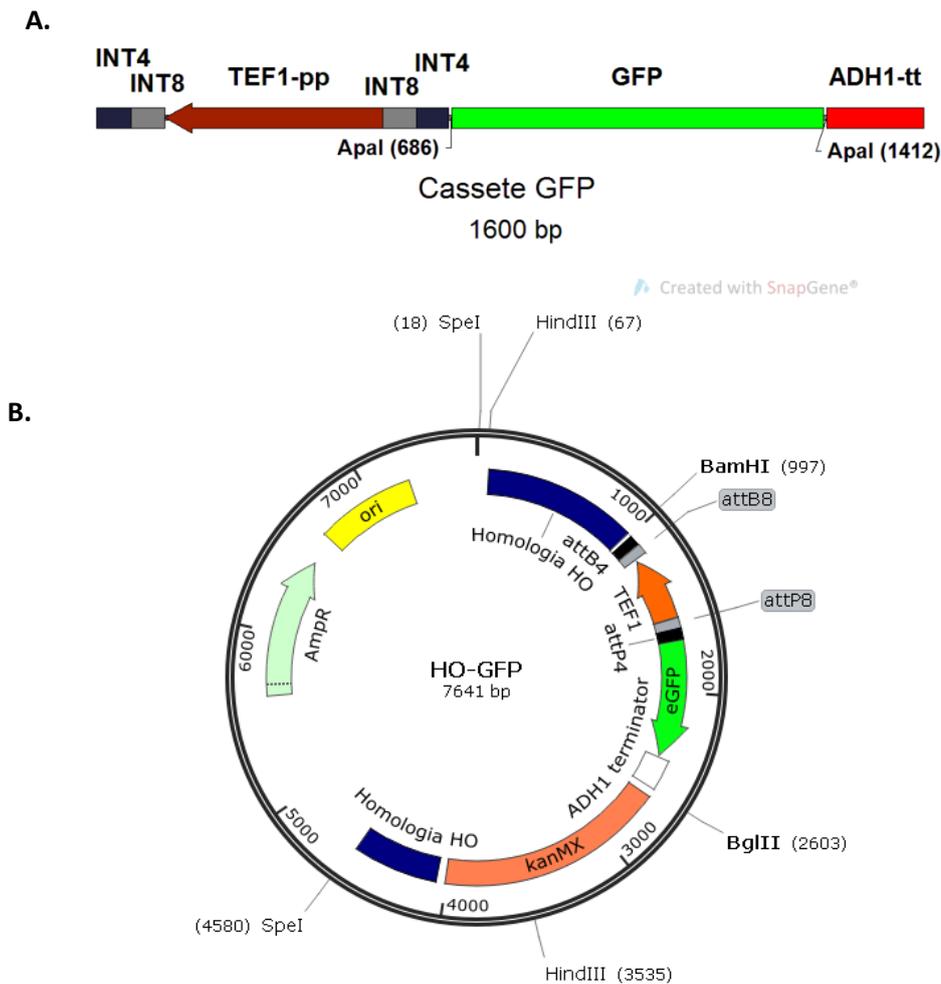


Figura 8- Esquema do cassete de expressão e mapa físico do vetor HO-EGFP. A. Cassete contendo o gene *GFP* com o P_{TEF1} invertido, os sítios de reconhecimento das integrases e o terminador *ADH1*. **B.** Mapa do vetor de integração contendo regiões de homologia ao gene *HO* em azul, o gene *EGFP* em verde com o respectivo P_{TEF1} invertido em laranja. Em rosa encontra-se o cassete *KanMX* que confere resistência a geneticina (G418). Em preto encontram-se os sítios de reconhecimento da integrase 4 e em cinza os sítios de reconhecimento da integrase 8.

Foi feita uma extração plasmidial dos clones obtidos e a confirmação da construção realizada por análise de restrição com a enzima *SpeI*. O perfil de restrição correto libera uma banda em torno de 4,5 kb e outra de 3,0 kb. Conforme pode ser visto na Figura 9 todos os clones analisados apresentaram o perfil esperado.

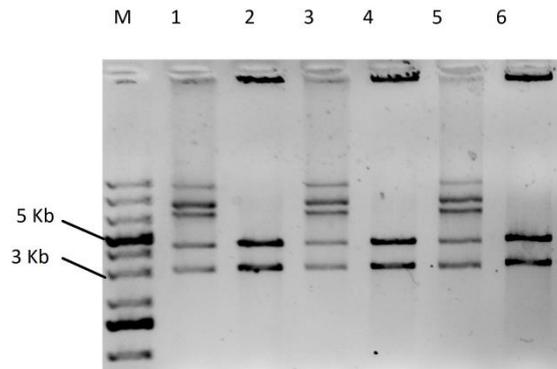


Figura 9- Perfil de restrição de clones com vetor HO-EGFP. Gel de agarose 1%. M: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Nos poços 1, 3 e 5: plasmídeo intacto de três clones diferentes. Nos poços 2, 4 e 6: plasmídeo digeridos com SpeI de três clones diferentes.

Após a confirmação, foi feita uma extração plasmidial com maior rendimento, onde o DNA foi digerido com a enzima SpeI para liberar o cassete contendo apenas a região de homologia com o gene HO e o cassete do gene *EGFP*. A amostra foi precipitada e utilizada para a transformação da linhagem *S. cerevisiae* CENPK 111 32-D que foi selecionado por resistência ao G418.

A confirmação da integração no *locus* HO de *S. cerevisiae* CENPK 111 32-D foi feita por PCR após extração de DNA genômico de três clones selecionados aleatoriamente. Inicialmente foi feita PCR utilizando os *primers* HO-EGFP F e HO-EGFP R para confirmar a presença do cassete de integração na levedura gerando um fragmento de 1600 pb (Figura 10B). Para confirmar o correto local da integração do cassete, foram utilizadas as seguintes combinações de *primers*: HO-EGFP F e HO R, gerando um fragmento de 4.672 pb e HO F e HO-EGFP R gerando um fragmento de 2.654 pb. Conforme observado na Figura 10A, o clone escolhido possui o cassete inserido no *locus* correto, sendo denominado DV00.

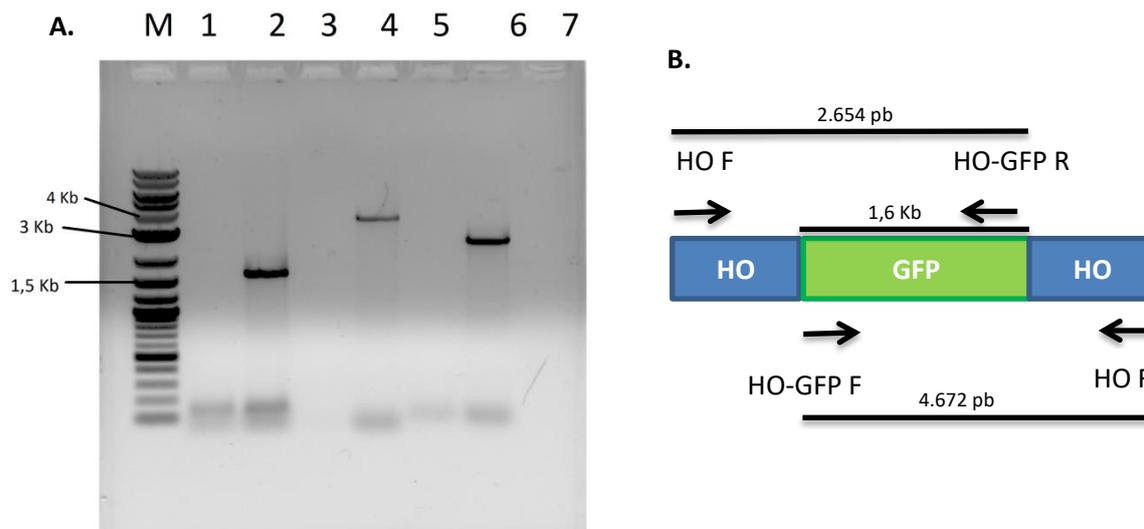


Figura 10- Confirmação da integração do cassete de expressão HO-EGFP por PCR. A. Gel de agarose 1%. M: Marcador 2 log DNA Ladder. PCR do DNA genômico da DV00. Poço 1: Controle da reação de PCR (sem DNA) com *primers* HO-EGFP F e HO-EGFP, poço 2: PCR com *primers* HO-EGFP F e HO-EGFP. Poço 3: Controle da reação de PCR (sem DNA) com *primers* HO-EGFP F e HO R, poço 4: PCR com *primers* HO-EGFP F e HO R. Poço 5: Controle da reação de PCR (sem DNA) com *primers* HO F e HO-EGFP R, poço 6: PCR com *primers* HO F e HO-EGFP R. **B.** Representação esquemática dos produtos de PCR.

4.1.2 Construção do vetor centromérico contendo as integrases

Os cassetes de expressão das integrases, integrase 4 sob controle do P_{GAL1} , integrase 5 sob o controle do P_{CUP1} e a integrase 8 sob controle do P_{TEF1} invertido, foram sintetizados pela empresa *Epoch life Science* e clonados no vetor pBluescript II SK, sendo denominados pBluescriptSKInt4, pBluescriptSKInt5 e pBluescriptSKInt8. Os cassetes de expressão das 3 integrases foram amplificados com os pares de *primers* Int 4 F e Int 4 R, Int 5 F e Int 5 R, Int 8 F e Int 8 R respectivamente, obtendo-se os seguintes fragmentos de 2.100 pb, 2.300 pb e 2.200 pb. (Figura 11).

O vetor YCplac111 (Gietz e Sugino, 1988) foi digerido com as enzimas SphI e SacI. Após a confirmação da digestão, tanto o plasmídeo linearizado quanto os produtos das PCRs das integrases foram eluídos do gel de agarose

e purificados. A linhagem DV00 de *S. cerevisiae* foi transformada com o vetor linear e os 3 fragmentos referentes aos cassetes das integrases para recombinação *in vivo*, resultando no vetor YCINT Também foi realizada uma transformação utilizando o plasmídeo YCplac111 para a obtenção de uma linhagem controle negativo para os experimentos de indução, denominada DV01.

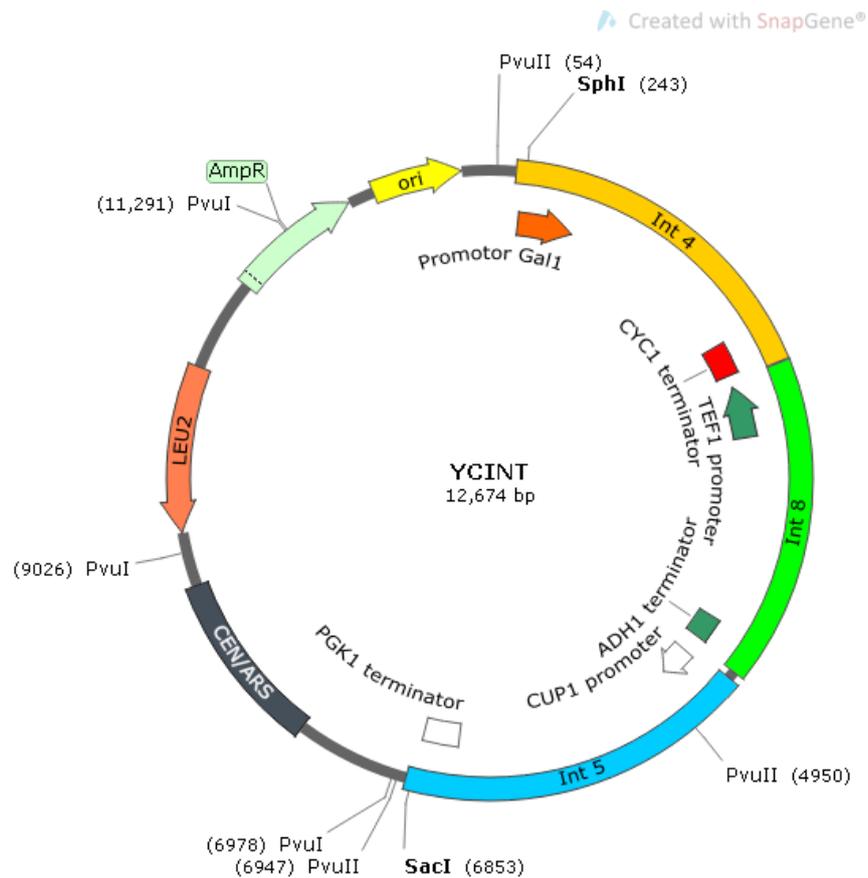


Figura 11- Mapa físico do vetor centromérico contendo os cassetes de expressão das integrases. Em laranja o cassete da integrase 4 e em vermelho o P_{GAL1} e o terminador CYC1. Em verde o cassete da integrase 8 e em verde escuro o P_{TEF1} invertido e o terminador ADH1. Em azul está o cassete da integrase 5 e em branco o P_{CUP1} e o terminador PGK1. Em preto a origem de replicação ARS e o centrômero CEN de levedura, em laranja o cassete *LEU2*. Em verde claro encontra-se o gene *AmpR* que confere resistência ao antibiótico ampicilina. Em amarelo a origem de replicação em bactéria.

Para confirmar a montagem do vetor, foram realizadas reações de PCR do DNA total dos clones selecionados. Foram utilizados os *primers* Int 8 F e Int

8 R (2.200 pb), int 4 F e Int 4 R (2.100 pb), Int 5 F e Int 5 R (2.300 pb). O clone 28 apresentou amplificação de todas as integrases nos tamanhos esperados (Figura 12). A linhagem com o gene repórter integrado e o vetor YCINT foi denominada DV28.

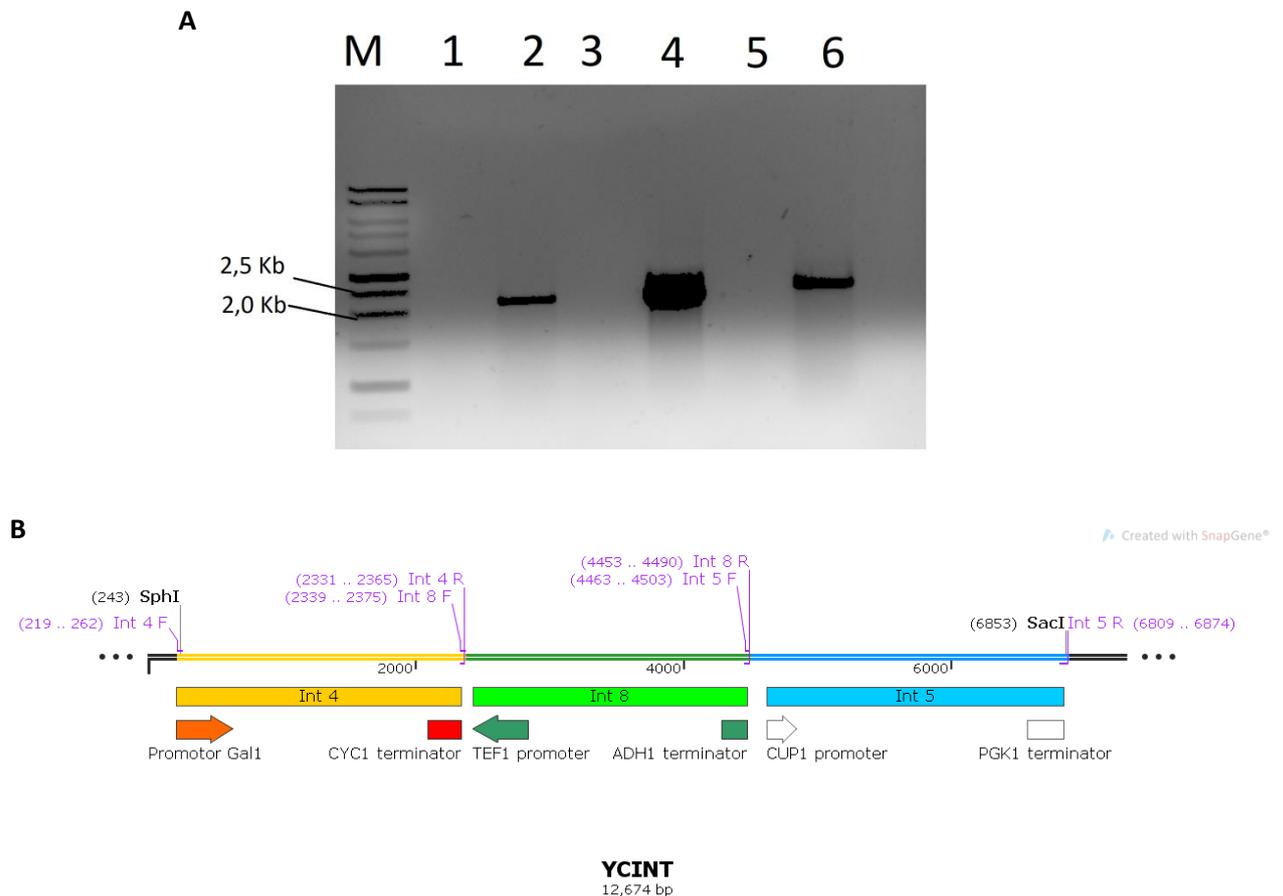


Figura 12- Esquema da montagem do vetor centromérico com as integrases.

A. Gel de agarose 1%. M: Marcador 1 kb DNA Ladder Promega. Poços 1, 3 e 5: Controle negativo das reações das respectivas PCRs, Int 4, Int 8 e Int 5 (sem DNA). Poço 2: PCR integrase 4. Poço 4: PCR integrase 8. Poço 6: PCR integrase 5. **B.** Representação dos cassetes das integrases juntamente com os *primers* utilizados para recombinação.

Para confirmar a ordem correta das integrases no vetor, foram feitas PCRs a partir da combinação de *primers* que anelam nos diferentes cassetes de expressão das integrases e análise de restrição do plasmídeo YCINT. Nas

PCRs foram utilizados os *primers* Int 4 F e Int 8 R (4.300 pb) e o par Int 8 F e Int 5 R (4.500 pb). Conforme pode ser observado na Figura 13, o clone possui as bandas no tamanho esperado.

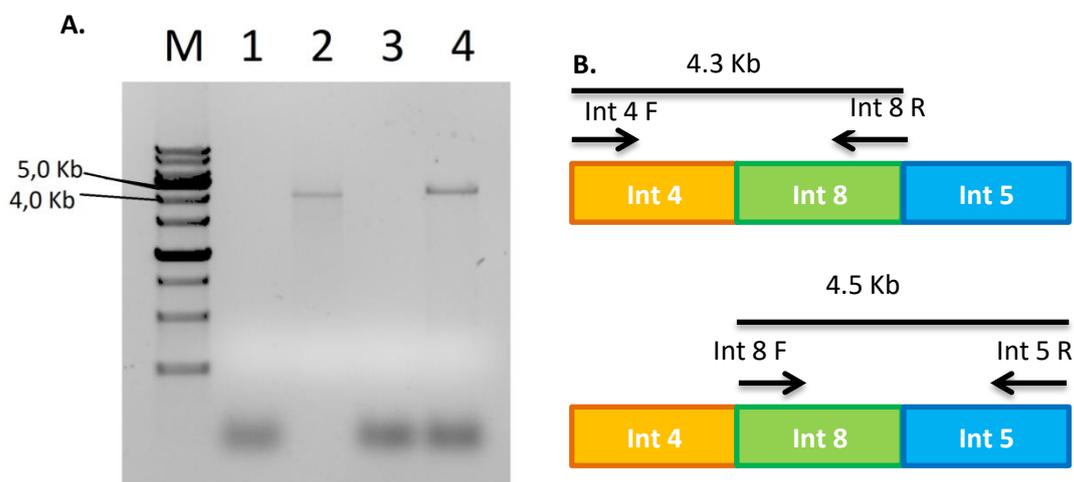


Figura 13- Confirmação da orientação das integrases por PCR. **A.** Gel de agarose 1%. M: Marcador 1kb Ladder Sinapse. PCR do DNA total da DV28. Poço 1: Controle negativo (sem DNA) com *primers* int 4 F e int 8 R, poço 2: PCR com *primers* int 4 F e int 8 R. Poço 3: Controle negativo (sem DNA) com *primers* int 8 F e int 5 R, poço 4: PCR com *primers* int 8 F e int 5 R. **B.** Representação esquemática dos produtos de PCR.

Para a análise de restrição, inicialmente o DNA genômico foi extraído da levedura DV28 e usado para transformar *E. coli*, a fim de se obter o plasmídeo YCINT. Após a extração de DNA plasmidial, a amostra foi digerida com as enzimas de restrição PvuI e PvuII. Com a enzima PvuI esperava-se obter fragmentos de 8.300 pb, 2.200 pb e 2.000 pb. Já com a enzima PvuII o perfil deveria ser de 5.700pb, 4.800 pb e 2.000 pb. Conforme observado na Figura 14, o vetor apresentou os fragmentos esperados para ambas as enzimas, confirmando a correta montagem do vetor YCINT demonstrando ainda que não estão integradas no genoma da levedura já que o vetor foi capaz de se replicar

em *E. coli*. Na Tabela 6 estão representadas as linhagens obtidas após as clonagens realizadas até esta etapa.

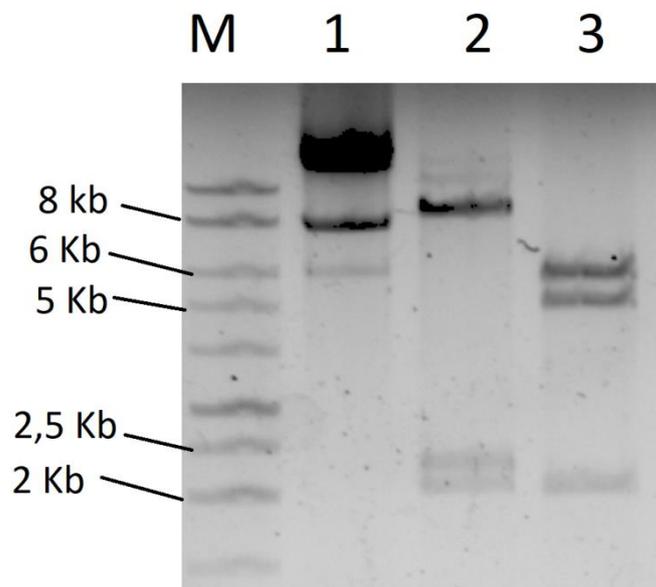


Figura 14- Perfil de restrição do plasmídeo YCINT. Gel de agarose 1%. M: Marcador 1 kb DNA Ladder Promega. Poço 1: YCINT intacto. Poço 2: YCINT digerido com PvuI. Poço 3: YCINT digerido com PvuII.

Tabela 6- Linhagens Obtidas neste trabalho.

Linhagens Obtidas	Descrição
DV00	Linhagem contendo o Cassete HO-EGFP inserido no genoma
DV01	Linhagem controle contendo o cassete HO-EGFP no genoma e o vetor YCplac111
DV28	Linhagem contendo o cassete HO-EGFP no genoma e o vetor YCINT

4.2 Crescimento das linhagens na presença de cobre

O primeiro passo antes de começarem os testes de indução com as linhagens obtidas foi testar a tolerância da linhagem ao sulfato de cobre (II) (Etcheverry, 1990). A levedura *S. cerevisiae* possui em seu genoma o gene *CUP1* em diferentes números de cópias. À medida em que a célula é exposta a concentrações crescentes do íon Cu^{+2} o *locus CUP1* se amplifica no genoma, aumentando assim sua tolerância ao íon tóxico (Etcheverry, 1990). Para que a concentração inicial escolhida não seja tóxica para a linhagem, testamos o crescimento da linhagem DV01 em diferentes concentrações de sulfato de cobre para determinar a faixa ideal para o crescimento e possível indução. O teste foi feito nas concentrações de 50 a 500 μM , pois foi a faixa encontrada na literatura para outras linhagens (Peña *et al.*, 1998; Koller *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2015).

Primeiro, foi feito uma placa com meio mínimo contendo diferentes concentrações de cobre (Figura 15). Observou-se que a concentração de 300 μM foi prejudicial ao crescimento da linhagem.

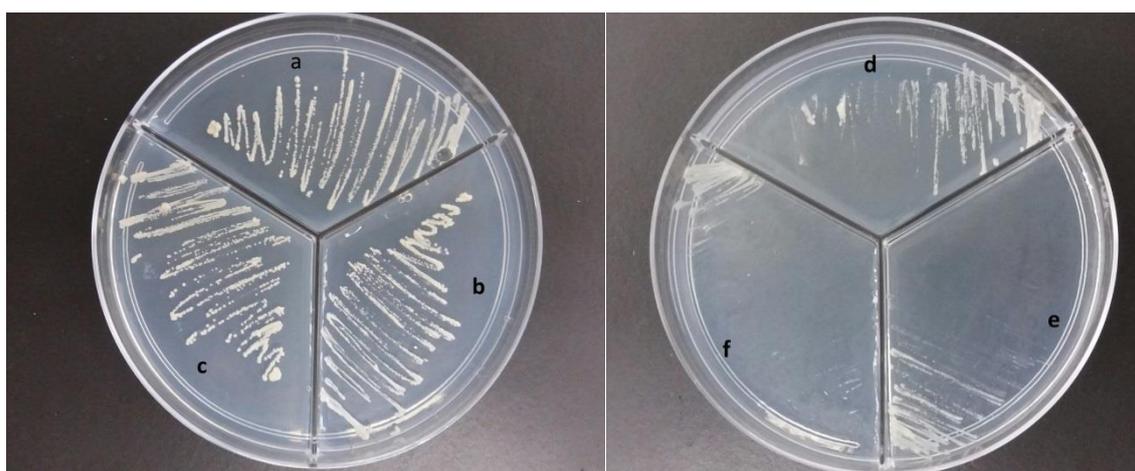


Figura 15- Teste de tolerância ao cobre. Linhagem DV01 plaqueada em diferentes concentrações de cobre para avaliar seu crescimento. **a:** 50 μM . **b:** 100 μM . **c:** 200 μM . **d:** 300 μM . **e:** 400 μM . **f:** 500 μM .

De acordo com a literatura, o crescimento em meio líquido poderia ser diferente já que as linhagens tendem a apresentar maior resistência ao cobre em meio sólido, portanto, para nos certificarmos dos valores a serem usados (0 - 200mM) permitiriam o crescimento da levedura, foi feita uma curva de crescimento com concentrações de cobre variando de 50, 100, 200 e 500 μM , este último ponto foi escolhido para servir de controle negativo (Etcheverry, 1990). Como mostrado na Figura 16, a linhagem apresentou boa tolerância até concentrações de 200 μM , sendo a concentração de 500 μM inibitória ao crescimento da levedura. Sendo assim, para os experimentos de indução, as concentrações escolhidas variaram entre 50, 100 e 200 μM .

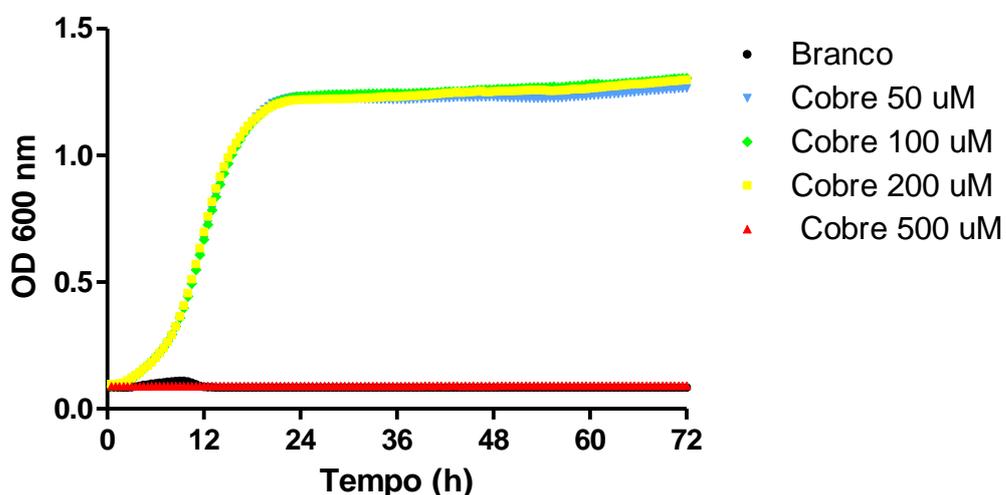


Figura 16- Curva de crescimento em cobre. A linhagem DV01 foi crescida em meio mínimo líquido em diferentes concentrações de cobre (50, 100, 200 e 500 μM).

4.3 Ensaios para expressão de *EGFP*

Com a determinação da faixa de crescimento e escolha das concentrações para a indução do P_{CUP1} , agora faz-se necessária a validação do circuito. Para isso, é necessário comprovar que as integrases são capazes de realizar a mudança de orientação dos promotores que estão flanqueados pelas respectivas sequências de reconhecimento específica da integrase (*attP* e *attB*), ativando a expressão do gene repórter. Os ensaios de citometria de

fluxo após indução com ambos os indutores foram inconclusivos, pois não foram detectados níveis de fluorescência significativos. Por isso, foi feita uma caracterização genotípica utilizando *primers* HO-EGFP F em par com o *primer* TEFp5' ou TEFp 3'. Dessa forma, caso o P_{TEF1} do gene alvo estivesse em sua conformação inativa, a PCR utilizando dois *primers* HO-EGFP F e o TEFp5' seria capaz de amplificar o promotor (cerca de 600 pb) (Figura 17F), e caso as integrases fossem capazes de realizar a inversão do promotor, a amplificação do promotor ocorreria utilizando os *primers* HO-EGFP F e o TEFp3' (Figura 17E).

Com amostras da linhagem DV01 (controle negativo), a PCR utilizando os *primers* HO-EGFP F e TEFp3', não gerou o amplicon de 600 pb (Figura 17A), entretanto com o par de *primer* HO-EGFP F e TEFp5' pode-se observar o amplicon de 600 pb na maioria dos clones analisados (Figura 17 B). O resultado é condizente com o esperado, pois a linhagem DV01 não possui integrase, demonstrando que esta proteína é essencial na inversão da sequência do promotor. A PCR com a linhagem parental (CENPK 111-32D) não apresentou amplicon com nenhum par de *primer*, visto que não possui o cassete do gene repórter (Figura 17A e B).

Por outro lado, com amostras da linhagem DV28 utilizando o par de *primers* HO-EGFP F e TEFp3' pode-se observar bandas fracas sem indução por cobre. Após indução com cobre observa-se banda forte no tempo de 14 h para as concentrações de 50 mM e 200 mM de cobre e em 17 horas nas concentrações de 100 mM e 200 mM de cobre. A presença desses amplicons indica que houve inversão da sequência do promotor. O fato de não apresentar bandas nas concentrações de 100 mM (14 h) e 50 mM (17 h) pode ter sido uma falha da PCR. As bandas observadas sem indução indicam que está havendo um vazamento do promotor, ou seja, ele é capaz de ativar o circuito mesmo com sua mínima expressão basal. Estudos anteriores mostraram que o promotor P_{CUP1} apresenta um nível de expressão mesmo na ausência do indutor, podendo ser devido a traços de cobre presentes no meio (Butt *et al.*, 1984). A PCR das mesmas amostras com o par de *primers* HO-EGFP F e TEFp3' gerou amplificação sem indução com cobre e após 14h com 200 mM e

após 17 h com 50 e 200 mM de cobre. Era esperada apenas amplificação sem indução com cobre indicando que o promotor está transcricionalmente inativo. A presença de amplicon após indução com cobre em ambas as PCR indica que há uma população heterogênea onde algumas células apresentam o promotor invertido e outras não. Em estudos anteriores, foi relatado após a indução para a ativação de um circuito genético composto por invertases, a presença de plasmídeos que estavam em diferentes estados de indução (Moon *et al.*, 2011; Brophy e Voigt, 2014). Em casos onde não há amplicon (Figura 17C e D), pode-se especular que houve um problema na amplificação do DNA, não sendo possível tirar conclusões sobre a orientação do P_{TEF1} .

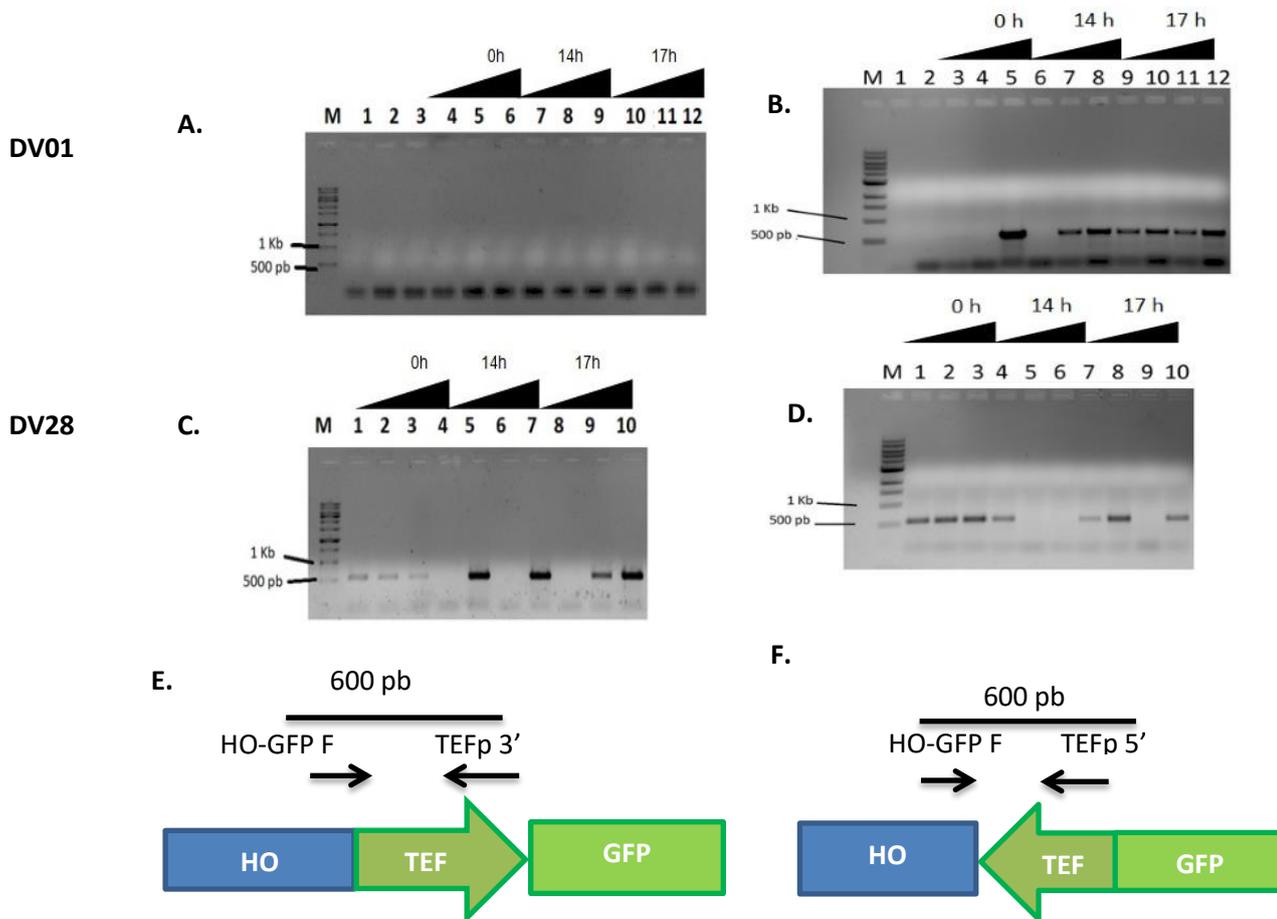


Figura 17- Caracterização genotípica DV01 e DV28 após indução em diferentes concentrações e tempos com cobre. Eletroforese em gel de agarose 1% das reações de PCR das linhagens DV01 (A e B) e DV28 (C e D) com 2 combinações de *primers* (E e F). **A.** Poço 1: Controle negativo da reação de PCR. Poço 2: Reação com linhagem selvagem. Reação de PCR conforme esquema E da linhagem DV01 com diferentes concentrações de cobre (0,50, 100 e 200 μ M) nos tempos de 0 h, 14 h e 17 h de indução. **B.** Poço 1: controle negativo da reação de PCR. Poço 2: Reação com linhagem selvagem. Reação de PCR conforme esquema F da linhagem DV01 com diferentes concentrações de cobre (0,50, 100 e 200 μ M) nos tempos de 0 h, 14 h e 17 h de indução. **C.** Reação de PCR conforme esquema E da linhagem DV28 com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 200 μ M) nos tempos 0 h, 14 h e 17 h de indução. **D.** Reação de PCR conforme esquema F da linhagem DV28 com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100 e 200 μ M) nos tempos 0 h, 14 h e 17 h de indução. **E.** Esquema representando o produto de PCR obtido com os *primers* HO-GFP F e TEFp3'. **F.** Esquema representando o produto de PCR obtido com os *primers* HO-GFP F e TEFp5'.

Para garantir que o sistema inteiro é funcional, também testamos o P_{GAL1} e a integrase 4. Foram feitas induções com 2% de galactose com tempos variando de 6, 9 a 16 horas e realizadas as PCRs utilizando os mesmos pares de *primers* HO-EGFP F/TEFp5' e HO-EGFP F/TEFp3', gerando um amplicon de 600 pb (Figura 18).

É possível observar que após 9 horas de indução, não houve a inversão do promotor, pois obtivemos um produto de PCR utilizando o par de *primer* HO-EGFP F/TEFp5' (Figura 18A). Porém, em outro ensaio realizado com maior tempo de indução (após 16 horas), obtivemos produtos de PCR com ambas as combinações de *primers*, indicando que mesmo após 16 horas de indução, as células formam uma população heterogênea na expressão das integrases (Figura 18B). Além disso, já foi relatado que circuitos formados por integrases podem ser lentos para serem ativados (Moon *et al.*, 2011; Brophy e Voigt, 2014).

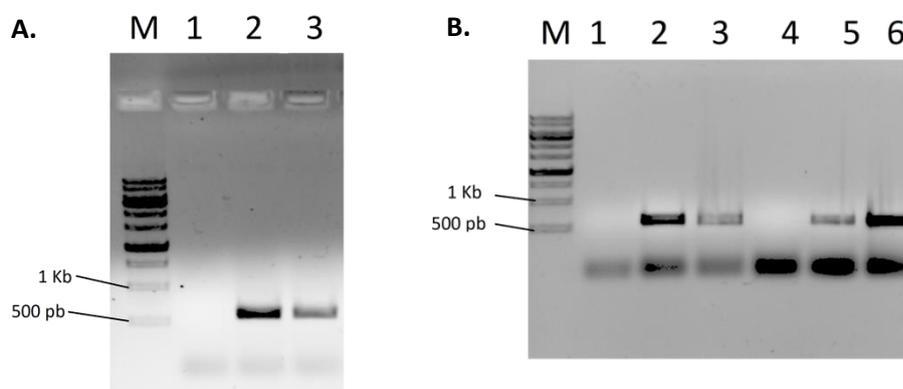


Figura 18- Caracterização genotípica DV01 e DV28 após indução com galactose.

Gel agarose 1%. M: Marcador 1 kb DNA Ladder Sinapse. **A.** PCR após 9 h de indução Poço 1: Controle da reação de PCR, sem DNA. Poço 2: DV01 com *primers* HO-EGFP F e TEFp5'. Poço 3: DV28 após indução com *primers* HO-EGFP F e TEFp5'. **B.** PCR após 16 h de indução Poço 1: Controle da reação, sem DNA com os *primers* HO-EGFP F e TEFp5' poço 2: DV01 com os *primers* HO-EGFP F e TEFp5' poço 3: DV28 após indução com os *primers* HO-EGFP F e TEFp5' Poço 4: Controle da reação, sem DNA com os *primers* HO-EGFP F e TEFp3' poço 5: DV28 induzido com 200 μ M de cobre (controle positivo), poço 6: Amostra DV28 após indução com galactose.

4.4 Gel de proteína não desnaturante

Foi utilizada a metodologia de gel de poliacrilamida não desnaturante e desnaturante com o objetivo de observar a atividade da *EGFP* e visualizar a quantidade de proteína utilizada em ambos os géis, respectivamente. O gel desnaturante foi utilizado para mostrar que a quantidade utilizada de proteína foi semelhante em todos os tempos (5 µg de proteína total) (Figura 19A). Pode-se observar no gel não desnaturante que exceto a linhagem parental que não possui o cassete de expressão do gene repórter *EGFP*, todas as outras amostras apresentaram fluorescência. As linhagens DV01 (controle negativo) e DV28 sem indução apresentaram a mesma intensidade de fluorescência que a linhagem DV28 induzida com diferentes concentrações de cobre após 14 h. Além disso a quantidade de cobre (50, 100 ou 200 µM) não afetou a intensidade da fluorescência. Diante desses estes dois fatos, ou seja, de todas as linhagens apresentarem fluorescência e da falta do aumento da intensidade de fluorescência, é possível especular que talvez o P_{CUP1} ou a integrase 5 não esteja funcionando, e que os sinais detectados mesmo sem a presença das integrases sejam devido ao local de integração do gene *EGFP* no *locus* HO. Provavelmente, o promotor do gene HO está ativando a transcrição da *EGFP* (Siddiqui *et al.*, 2012).

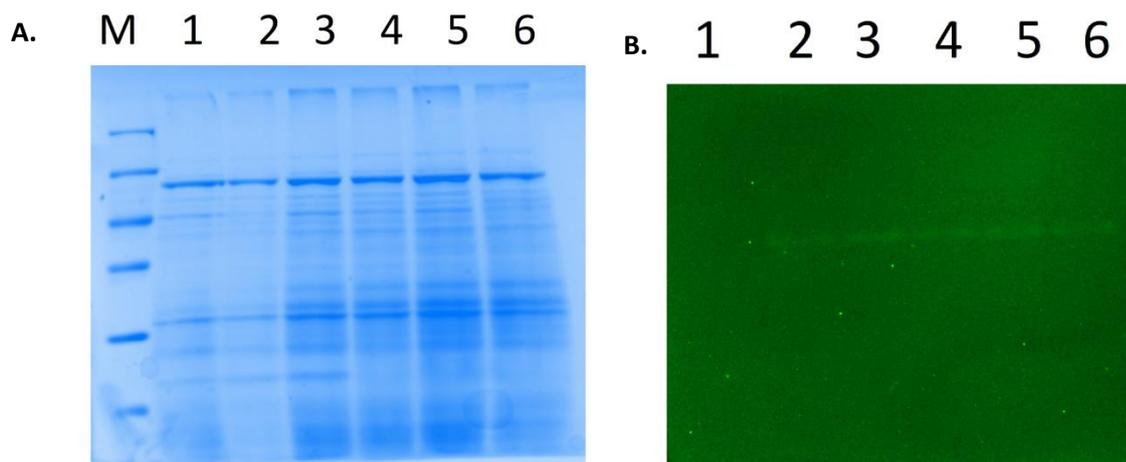


Figura 19- Detecção da atividade da *EGFP* em DV01 e DV28 após 14 horas com diferentes concentrações de cobre. **A.** Gel de poliacrilamida 12%. M: Pierce Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific). Poço 1: Linhagem selvagem. Poço 2: DV01 induzido 200 μ M. Poço 3: DV28 sem indução. Poços 4, 5 e 6: DV28 induzido com 50, 100 e 200 μ M de cobre, respectivamente. **B.** Gel de poliacrilamida 12% não desnaturante. Poço 1: Linhagem parental. Poço 2: DV01 induzido 200 μ M. Poço 3: DV28 sem indução. Poços 4, 5 e 6: DV28 induzido com 50, 100 e 200 μ M de cobre, respectivamente. Visualizado com o equipamento Gel DocTM EZ Gel Documentation System (Bio-Rad), nos comprimentos de onda entre 430-460 nm.

Para verificarmos se a dificuldade de detecção do gene repórter *EGFP*, era um problema da atividade da proteína ou um problema na construção, foi feito um controle positivo onde este gene foi expresso sob o controle do P_{TEF1} no vetor centromérico YCplac33, resultando no vetor YCEGFP, um vetor com baixo número de cópias. A construção foi confirmada utilizando a análise de restrição com as enzimas BamHI, PvuII e a combinação de HindIII e EcoRI. O perfil esperado para BamHI é de 7.103 pb, com PvuII duas bandas de 5.600 e 1.500 e com a dupla digestão HindIII e EcoRI duas bandas de 5.281 e 1.822 pb (Figura 20). A linhagem RE1006 foi transformada com o vetor YCEGFP resultando na linhagem DVGFP

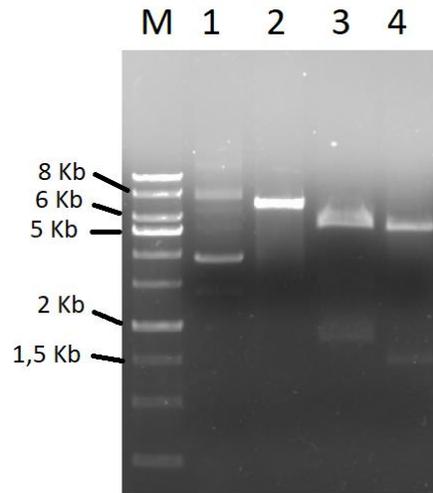


Figura 20- Perfil de restrição do plasmídeo YCEGFP. Gel de agarose 1%. Marcador: 1 kb DNA Ladder Sinapse. Poço 1: YCEGFP intacto. Poço 2: YCEGFP digerido com PvuII. Poço 3: YCEGFP digerido com BamHI. Poço 4: YCEGFP digerido com HindIII e EcoRI.

Para verificar a fluorescência, foi feito o cultivo em meio mínimo com glicose das linhagens DVGFP e da linhagem parental RE1006. Após 18 horas foi medida a fluorescência por citometria de fluxo (Figura 21). Quando se compara o gráfico do controle negativo com o positivo, é perceptível a sobreposição dos gráficos, demonstrando que realmente o sinal de detecção da fluorescência é fraco. Estudos mostraram que este gene possui uma fluorescência muito fraca quando expresso em *S. cerevisiae*, mesmo com códon otimizado para esta levedura (Kaishima et al., 2016). O EGFP usado neste trabalho, obtido a partir do vetor pEGFP-n3 (Clontech, USA) possui os códons otimizados para células de mamífero.

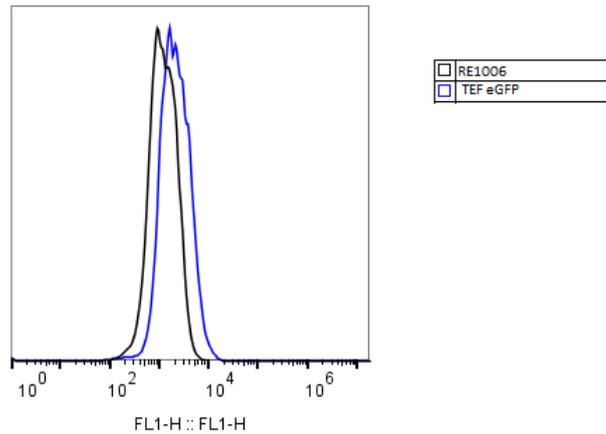


Figura 21- Avaliação da fluorescência da proteína *EGFP*. A intensidade de fluorescência foi medida utilizando citometria de fluxo das linhagens parental RE1006 e DVGFP (TEF *EGFP*). O eixo horizontal indica a intensidade média de fluorescência.

Após a análise dos resultados obtidos com o circuito sintético lógico XOR, pudemos levantar algumas hipóteses das possíveis causas do funcionamento insuficiente do circuito sintético lógico. Primeiro, foi detectado o vazamento da expressão do gene *EGFP* (Figura 17 D). Isso pode ter ocorrido pela ativação da GFP pelo promotor do gene HO, ou a expressão basal do P_{CUP1} é suficiente para ativar o circuito. Outro resultado relacionado ao P_{CUP1} foi que mesmo após a variação nas concentrações dos íons de cobre a intensidade de fluorescência se manteve a mesma do controle sem indução e da linhagem DV01 (Figura 19), indicando que ou P_{CUP1} ou a integrase 5 não estivesse funcionando adequadamente, portanto a integrase 5 será substituída pela integrase 13 nas próximas etapas. Como a fluorescência com *EGFP* foi fraca, o gene repórter será substituído por outro que apresente melhor nível de fluorescência. Estudo com várias proteínas fluorescentes em *S. cerevisiae* mostrou que a proteína Ukg1 do coral Umi-Kinoko (*Sarcophyton* sp.) com códon otimizado para *S. cerevisiae* apresentou o melhor nível de fluorescência comparada as outras proteínas fluorescentes (Kaishima *et al.*, 2016). Além disso, para evitar que o *locus* genômico interfira na expressão do gene repórter, este será inserido num vetor centromérico.

Para verificar a funcionalidade de todas as integrases, estas serão analisadas individualmente sob o controle do promotor bidirecional GAL1/GAL10. No circuito sintético lógico foi usada a sequência do P_{GAL1} para detectar um dos sinais de entrada, a galactose. Não houve vazamento da expressão da *EGFP* com este indutor, entretanto o tempo de indução foi longo (Figura 16) por isso usaremos o $P_{GAL1/GAL10}$, a construção bem caracterizada e mais para expressão induzida, para verificar se o tempo de indução diminui (West *et al.*, 1987).

4.5 Caracterização dos dispositivos genéticos

A estratégia para o estudo dos dispositivos genéticos está descrita no fluxograma a seguir

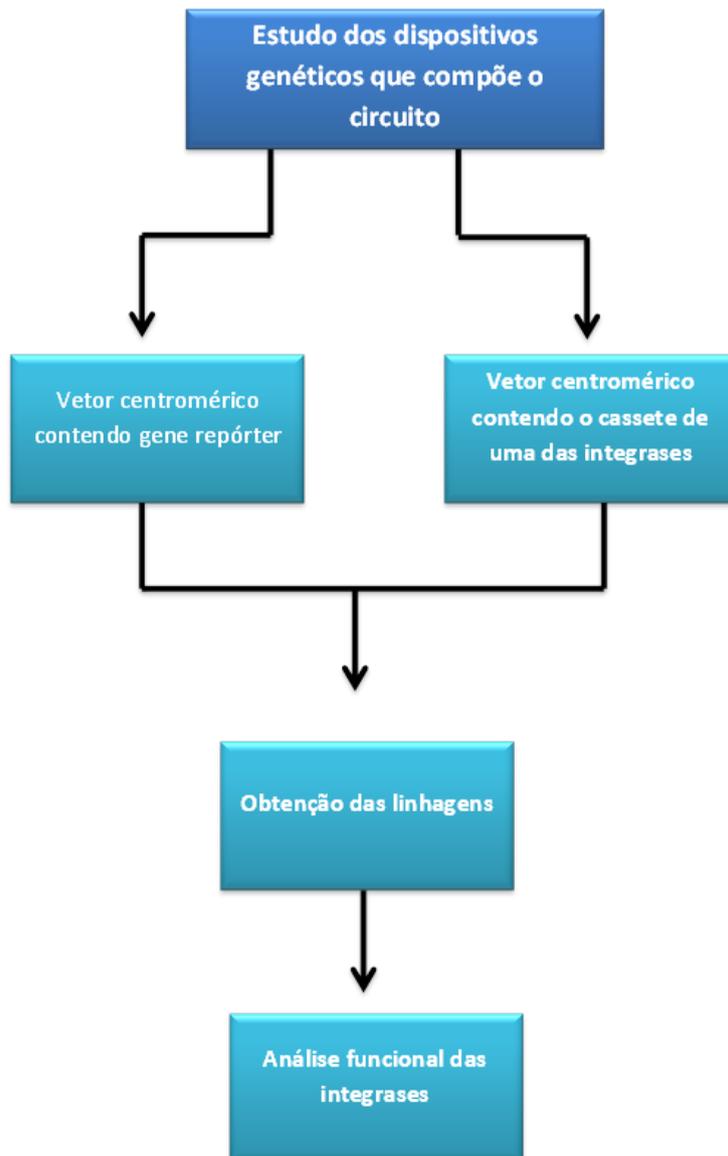


Figura 22- Estratégia para caracterização dos dispositivos genéticos que compõem o circuito.

4.5.1 Construção dos vetores centroméricos contendo *UkG1*

Foram sintetizados 4 cassetes de expressão contendo o gene *UKG1* de coral Umi-Kinoko, com códons otimizados para *S. cerevisiae*, todos sob o controle do P_{TEF1} . Os quatro cassetes foram clonados no vetor YCplac33 e entregues pela empresa *Epoch Life Science*. Um cassete será o controle positivo que contém o gene repórter sob controle do P_{TEF1} , os outros três cassetes de expressão contem a sequência dos genes invertido em relação ao sentido da transcrição. Nos vetores que contêm a *UkG1* invertida, o gene está flanqueado pelas sequências de reconhecimento das integrases a serem testadas, Int4, Int13 e o último cassete por 2 sítios contíguos Int8 e Int4 (Figura 23A).

Com a finalidade de se conseguir o cassete de expressão da *UkG* com os sítios de reconhecimento apenas da integrase 8, o vetor YCUKGyIN84 foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e NotI. O vetor YCUKGyIN4 foi digerido com as mesmas enzimas de restrição. Tanto o fragmento contendo o cassete de expressão como o vetor foi purificado do gel de agarose. Foi feita a ligação do inserto ao vetor resultando no vetor YCUKGyIN8 (Figura 21A). A construção foi confirmada por análise de restrição com as enzimas BamHI, PvuII e uma reação com duas enzimas, BamHI e NotI. Para a reação com BamHI o perfil esperado é 7.242 pb, com PvuII é esperado duas bandas, uma de 5.281 e outra de 1.961 pb e a dupla reação é esperado 6.276 e 823pb (Figura 23B).

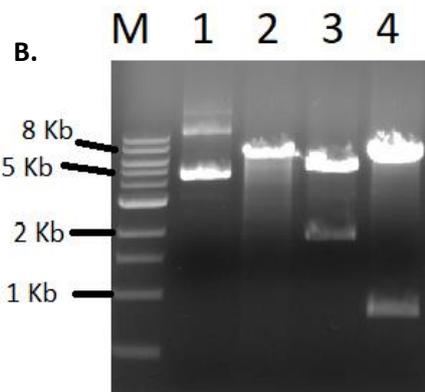
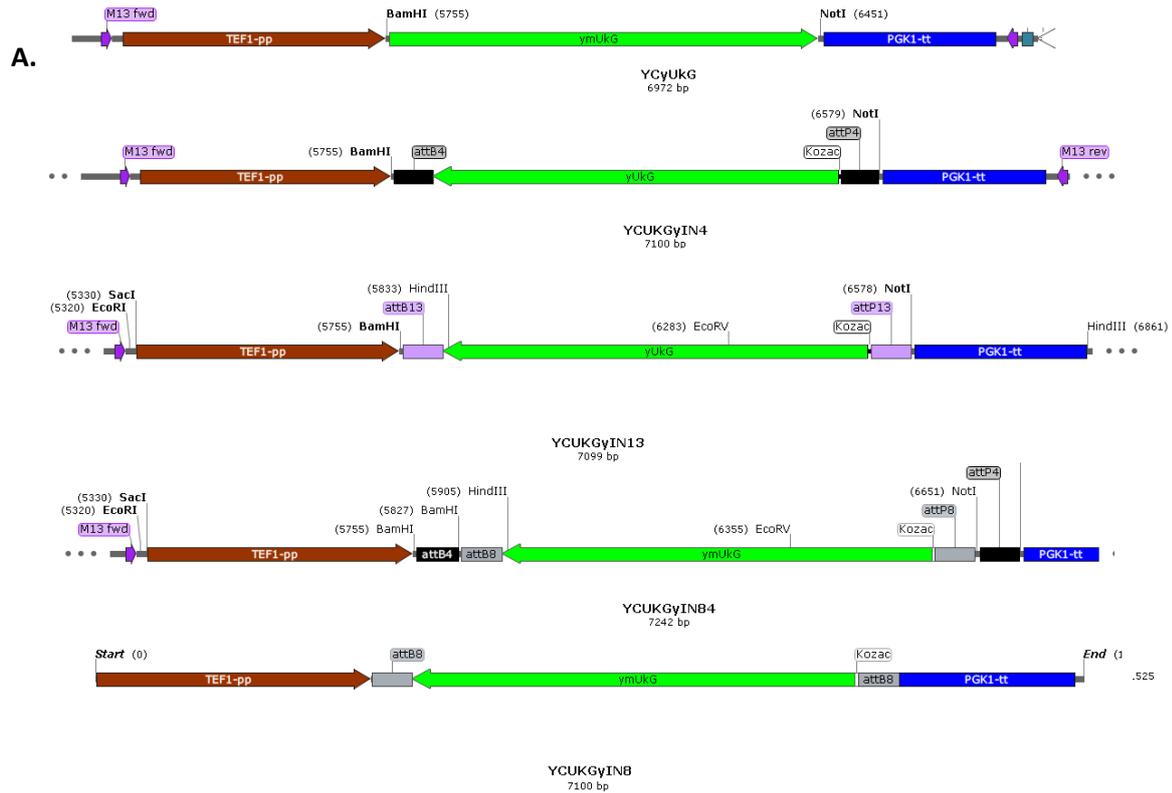


Figura 23- Cassete de expressão do gene repórter UKG1. A. Esquema contendo os cassetes de expressão do gene repórter. **B.** Perfil de restrição para o vetor YCUKGyIN8. Gel de agarose 1%. Marcador: 1 kb DNA Ladder Sinapse. Poço 1: YCUKGyIN8 intacto. Poço 2: YCUKGyIN8 digerido com BamHI. Poço 3: YCUKGyIN8 digerido com PvuII. Poço 4: YCUKGyIN8 digerido com BamHI e NotI.

A linhagem RE1006 de *S. cerevisiae* foi transformada com os 4 vetores contendo sítios únicos para integrase e o vetor sem sítio para integrase. Para confirmar a presença dos plasmídeos nos clones obtidos, além da capacidade de se desenvolver em meio mínimo sem adição de uracila foi feita uma PCR

com os *primers* HO-UkG F e HO-UkG R e o DNA total dos clones, gerando um amplicon de 1530 pb. Na Figura 24A é possível observar que apenas o clone 3 (poço 4) da linhagem DVU (controle positivo) apresentou banda. Na Figura 24B, houve amplificação nos clones 1 e 2, porém o clone 2 (poço 3) foi selecionado e denominado DVU4 (com o vetor YCUKGyIN4). Na Figura 24C, o clone 1 (poço 2) apresentou banda, sendo denominado DVU8 (com o vetor YCUKGyIN8). Na Figura 24D, o clone 1 apresentou banda, sendo denominado DVU13 (com o vetor YCUKGyIN13).

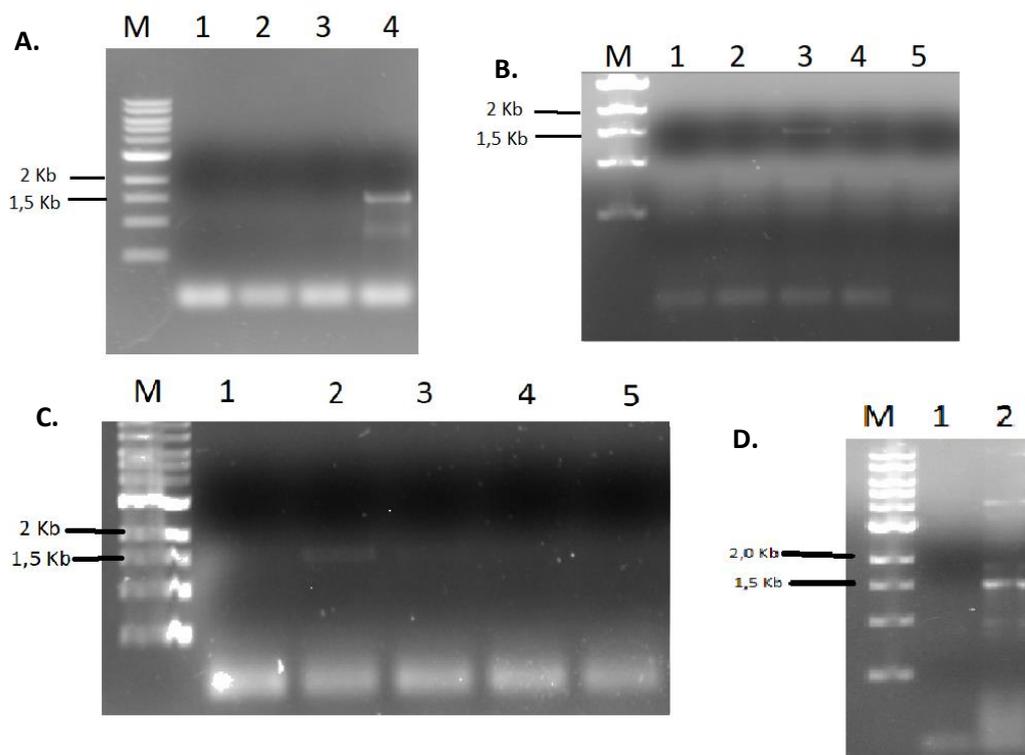


Figura 24 – Confirmação linhagens de *S. cerevisiae* contendo as *UKG1*. Gel agarose 1%. M: Marcador 1 kb DNA Ladder Sinapse. PCR utilizando os *primers* HO-UkG F e R. **A.** Linhagem DVU Poço 1: Controle sem DNA da reação. Poços 2 a 4: transformantes para DVU. **B.** Linhagem DVU8 Poço 1: Controle sem DNA da reação. Poços 2 a 5: transformantes para DVU8. **C.** Linhagem DVU4 Poço 1: Controle sem DNA da reação. Poços 2 a 5 transformantes para DVU4. **D.** Linhagem DVU13 Poço 1: Controle sem DNA da reação. Poço 2: transformantes para DVU 13.

4.5.2 Construção dos vetores centroméricos contendo as integrases

Como foi especulado anteriormente, talvez a integrase 5 não estivesse funcionando corretamente, e após as análises dos sítios *attL* e *attR*, verificou-se que esta integrase não prejudica a expressão do gene, tirando ele de fase ou gerando um códon de parada prematuro. Outras análises indicaram que a integrase 13 também possui ortogonalidade com as integrases 4 e 8, de forma que poderia substituir a integrase 5 em um novo circuito (Yang *et al.*, 2014).

Como foi dito anteriormente, para que haja uma maior previsibilidade do funcionamento do circuito, é necessário testar as integrases de forma individual. Portanto, após o teste do gene repórter, o próximo passo será o teste das integrases com um dos sinais de entrada. Para isso, foi escolhido o promotor bidirecional $P_{GAL1/GAL10}$ por ser um promotor bem estabelecido para que seja feita a indução com as integrases 4, 8 e 13 de forma individual (West *et al.*, 1987). A integrase 13 (*Bacillus cytotoxicus* NVH 391-98) foi sintetizada (Epoch Life Science) em substituição a integrase 5 no vetor pYES2, que contém o $P_{GAL1/GAL10}$. No futuro esse cassete será transferido para o vetor centromérico.

Os genes referentes às integrases 4 e 8 foram amplificados por PCR a partir dos vetores pBluescriptSKInt4 e pBluescriptSKInt8 com os pares de *primers* Int 4 N F / Int 4 R e Int 8 N F / Int 8 N R respectivamente. Após a purificação os fragmentos foram inseridos no vetor pYES2 (Thermo Fisher Scientific) utilizando as enzimas HindIII e SphI para a recombinação *in vitro* (Figura 25 A), para a adição do promotor responsivo a galactose.

A confirmação da clonagem foi feita por análise de restrição com as enzimas PvuI e PvuII. O perfil esperado para a enzima PvuI são duas bandas de 5.312 pb e 1901 pb e para a enzima PvuII uma banda de 7213 pb. Como demonstrado (Figura 25 B e 25C). Os vetores resultantes foram denominados pYESInt4 e pYESInt8.

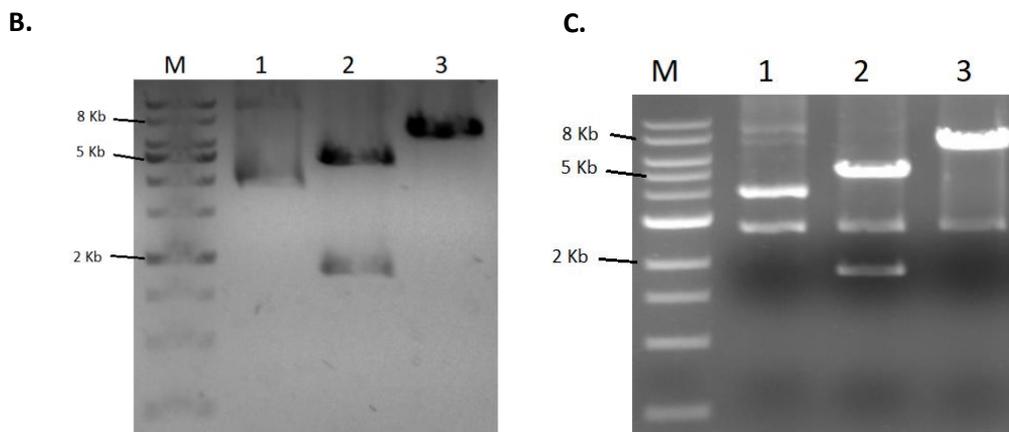
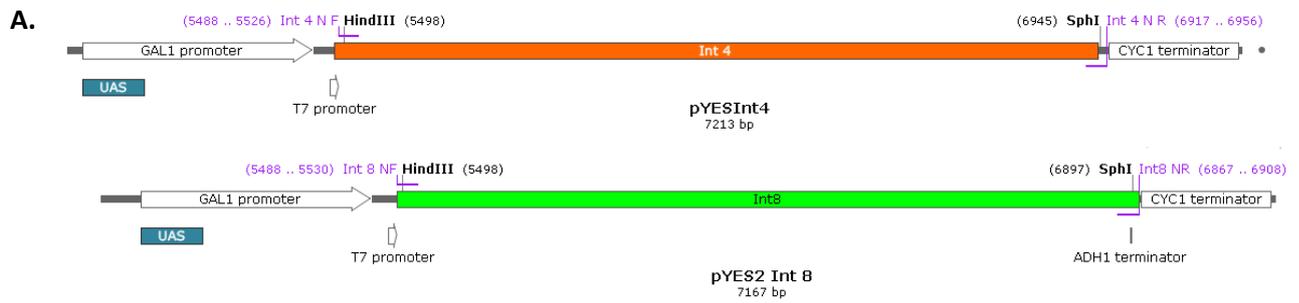


Figura 25- Construção dos vetores pYESInt4 e pYESInt8. **A.** Esquema com os cassetes e os *primers* utilizados para a clonagem. **B.** Perfil de restrição do vetor pYESInt 4 em gel de agarose 1%. Poço 1: pYESInt 4 intacto. Poço 2: pYESInt 4 digerido com PvuI. Poço 3: pYESInt 4 digerido com PvuII. **C.** Perfil de restrição do vetor pYESInt 8 em gel de agarose 1%. Poço 1: pYESInt 8 intacto. Poço 2: pYESInt 8 digerido com PvuI. Poço 3: pYESInt 8 digerido com PvuII. Marcador: 1 kb DNA Ladder.

Em seguida, fez-se uma PCR dos vetores pYESInt 4 e pYESInt8 com os *primers* GALIN e CYCIN para amplificar todo cassete de expressão (contendo o $P_{Gal1/Gal10}$, a integrase e o terminador CYC1). O vetor YCplac111 foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e PstI. Tanto os fragmentos como o vetor YCplac111 foram purificados para posterior recombinação *in vitro*, resultando nos vetores YCInt 4 e YCInt 8. Para a confirmação do vetor YCInt 4 foi feita a PCR utilizando os *primers* GALIN e CYCIN resultando em um produto com 2.219 pb (Figura 26 A poço 1 e 2) e a análise de restrição com as enzimas de restrição SpeI cujo produto seria de 8.315 pb, HindIII que apresenta duas

bandas, uma de 6.589 e outra de 1.726 pb e uma reação dupla contendo BamHI e PstI que apresentam duas bandas, uma de 6.112 pb e outra de 2.219 pb (Figura 26A). Para a confirmação do vetor YCInt 8 foi realizada uma análise de restrição, utilizando a enzima SpeI que apresenta uma banda de 8.267 pb e HindIII que apresenta duas bandas 6.589 e outra de 1.678 pb (Figura 26B). A banda de 1.678 pb só é visível no clone 2 devido a quantidade de DNA aplicada no gel (Figura 26B). Portanto, foram selecionados dois vetores centroméricos, um contendo a integrase 4 (YCInt 4) e outro contendo a integrase 8 (YCInt 8).

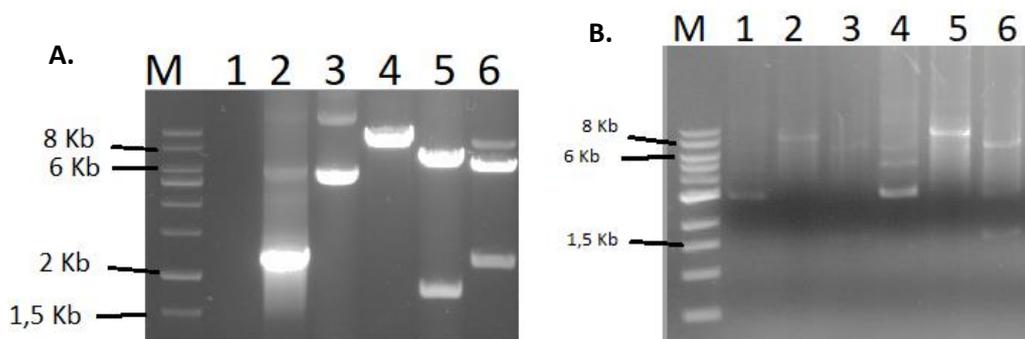


Figura 26- Confirmação da construção dos vetores centroméricos contendo o cassete de expressão das integrases. Géis de agarose 1%. M: Marcador 1 kb DNA Ladder. **A.** vetor YCInt 4. Poço 1: Controle da reação sem DNA. Poço 2: PCR do YCInt 4 com *primers* GALIN e CYCIN. Poço 3: YCInt 4 intacto. Poço 4: YCInt 4 digerido com SpeI. Poço 5: YCInt 4 digerido com HindIII. Poço 6: YCInt 4 digerido com BamHI e PstI. **B.** Perfil de restrição da construção YCInt 8. Poços 1 e 4: YCInt 8 intacto. Poços 2 e 5: YCInt 8 digerido com SpeI. Poços 3 e 6: YCInt 8 digerido com HindIII.

As linhagens DVU4 e DVU8 de *S. cerevisiae* foram transformadas respectivamente com os vetores YCInt 4 e YCInt 8, gerando as novas linhagens DVInt4 e DVInt8. Ambas as linhagens tiveram o DNA total extraído e foram feitas PCRs com diferentes combinações de *primers* para confirmar a presença do vetor, além de observar o fenótipo da complementação da auxotrofia a leucina. Para a linhagem DVInt 4 foram utilizados os *primers* GALIN e CYCIN, gerando um produto de 2.219 pb (Figura 27 A). Para a linhagem DVInt 8, foram utilizados os *primers* Int8 N F e R, gerando um produto de 1.422 pb (Figura 27 B).

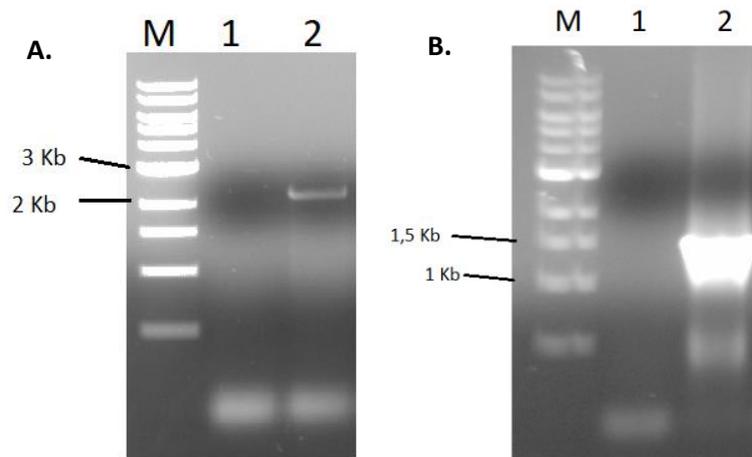


Figura 27- Confirmação dos clones DVInt 4 e DVInt 8. Géis de agarose 1%. M: Marcador 1 kb DNA Ladder. **A.** Reação de PCR com *primers* GALIN e CYCIN. Poço 1: Controle da reação sem DNA. Poço 2: DNA total da linhagem DVInt 4. **B.** Reação de PCR com *primers* Int8 N F e R. Poço 1: Controle da reação sem DNA. Poço 2: DNA total da linhagem DVInt 8.

4.5.3 Análise funcional das integrases 4 e 8

Com o objetivo de analisar o funcionamento individual das integrases foi feito um experimento de citometria de fluxo. Como as análises anteriores apontaram a expressão do gene repórter tanto na ausência do indutor como na linhagem que não continha a integrase, foi feita uma citometria para avaliar a existência de um vazamento no sistema. Para isso as linhagens DVU4, DVU8 e DVU13 que não possuem o vetor com integrase, o controle positivo DVU e o controle negativo, a linhagem parental RE1006 foram cultivadas meio MGal durante 9 horas.

Ao se comparar as linhagens DVU4, DVU8 e DVU13 com o controle negativo e positivo, pode-se observar a ausência de fluorescência (Figura 28). Nessa construção do cassete de expressão contendo o gene repórter, a sequência do gene repórter que foi invertido, ao invés do promotor, além do cassete de expressão estar em vetor centromérico e não integrada no genoma, o que impossibilita interferências do contexto genômico na expressão do gene.

Outro fato importante é o sinal de fluorescência emitido pelo novo gene repórter *UkG1*. Mesmo sendo expresso em uma cópia no vetor centromérico a intensidade de fluorescência pôde ser captada e diferenciada do controle negativo de forma clara, o que nos permite analisar quantitativamente o futuro circuito por citometria de fluxo.

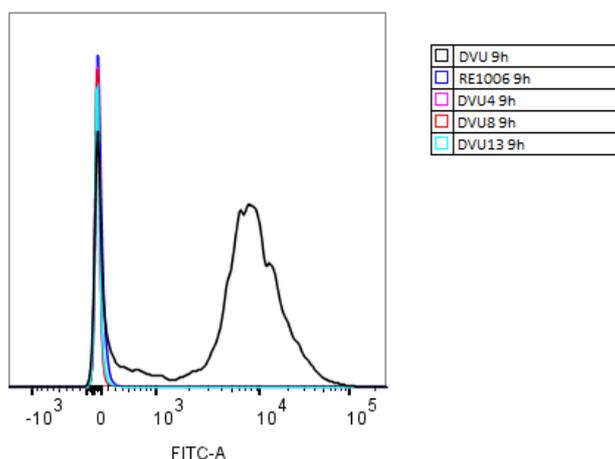


Figura 28- Avaliação das linhagens contendo o cassete do gene repórter. As amostras foram crescidas durante 9 horas em meio MGal e sua fluorescência detectada através da citometria de fluxo. O eixo horizontal indica a intensidade média de fluorescência.

Para observar a expressão das integrases foi feito a citometria de fluxo com as linhagens DVInt 4 e DVInt 8, além da DVU (controle positivo) após cultivo em meio MGal com diferentes tempos de indução, variando de 0 hora até 17 horas (0, 3, 6 9, 14 e 17 h). No caso da DVInt 4, foi possível observar que com o passar do tempo foi aumentando a fluorescência, e após 17 horas houve a fluorescência da maior parte da população, mas continua uma população heterogênea (Figura 29). Isto acontece devido à expressão das integrases que estão sob o controle do promotor responsivo a galactose, então o tempo de indução leva em conta a síntese da integrase que irá atuar no gene repórter permitindo que haja a expressão deste último.

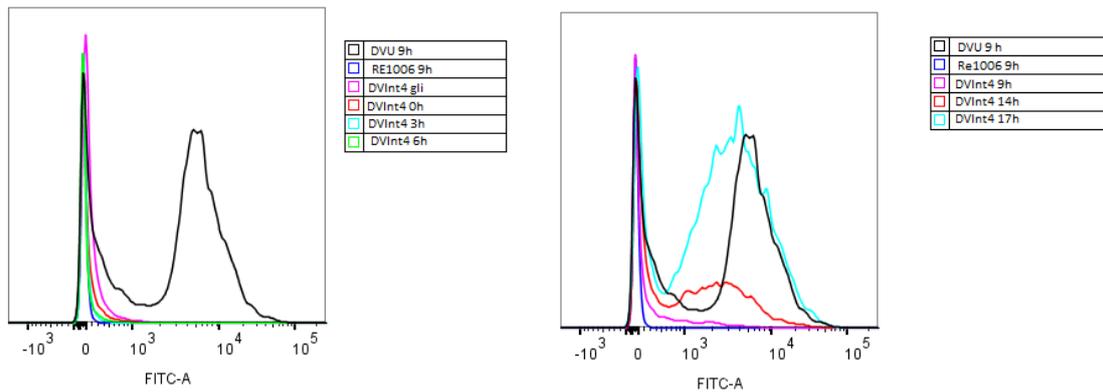


Figura 29- Análise funcional da integrase 4. A linhagem DVInt4 foi induzida com 2% de galactose por diferentes tempos (0, 3, 6 9, 14 e 17 h). A intensidade de fluorescência foi medida através de citometria de fluxo. O eixo horizontal indica a intensidade média de fluorescência.

Já em relação a DVInt 8, mesmo após 17 horas não foi possível observar uma mudança relevante em relação a linhagem DVU (Figura 30). Em ambos as linhagens, DVInt 4 e DVInt 8 foi feito um controle de cultivo apenas em glicose, e em ambos os casos não houve fluorescência mesmo após 17 horas de indução, mostrando que o promotor que é reprimido por glicose está funcional (West *et al.*, 1987). Como pode se observar a mudança de P_{GAL1} para o $P_{GAL1/GAL10}$ não reduziu o tempo de indução.

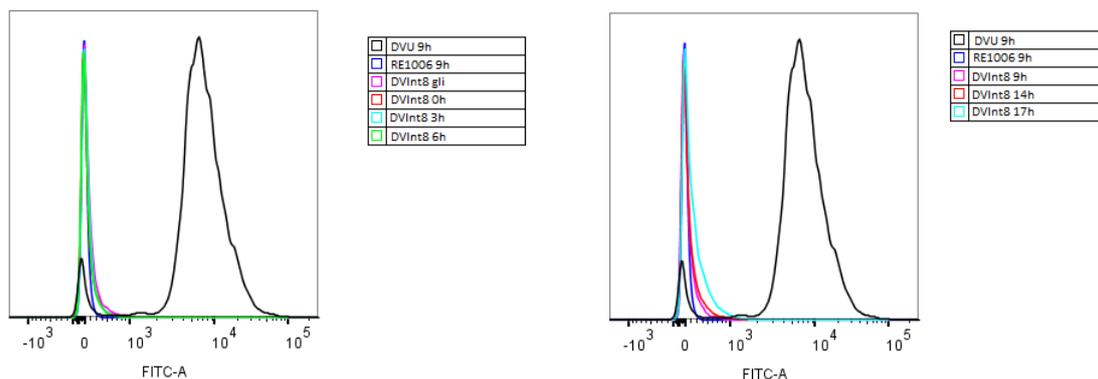


Figura 30- Análise funcional da integrase 8. A linhagem DVInt8 foi induzida com 2% de galactose por diferentes tempos (0, 3, 6 9, 14 e 17 h). A intensidade de fluorescência foi medida através da citometria de fluxo. O eixo horizontal indica a intensidade média de fluorescência.

Em relação à integrase 8, já foi reportado na literatura que as integrases podem diminuir sua eficiência quando são expressas em organismos que não correspondem ao nativo, além de serem mais propensas a causar mutações nos sítios de reconhecimento podendo haver deleções de alguns pares de base fazendo com que o gene fique fora de fase (Stark, 2017). Para testar essa hipótese, seria necessária a realização do sequenciamento do vetor após a indução para verificar que a construção foi feita de forma correta e para verificar a sequência dos sítios de reconhecimento *attL8* e *attR8* que foram formados, de forma a detectar possíveis alterações como mutações ou deleções.

5 Conclusão

Neste trabalho foi construído e testado um circuito sintético lógico XOR composto por 3 integrases, dois sinais de entrada diferentes (Cobre e Galactose) para testar a funcionalidade destas integrases. Por meio da análise genotípica foi possível constatar a funcionalidade parcial do circuito, apesar de serem detectados vários pontos que necessitam ser reparados. Este trabalho foi o primeiro a testar as integrases Int 4 (*Streptococcus equi subsp equi* 4047); Int 5 (*Streptomyces phage PhiK38-*) e Int 8 (*Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435) em *Saccharomyces cerevisiae* e a mostrar o funcionamento da Integrase 4 nesta levedura, confirmado pela análise individual desta integrase. Por outro lado, a integrase 8, também avaliada individualmente, não se mostrou funcional nas condições analisadas.

Pode-se observar que o P_{GAL1} e $P_{GAL1/GAL10}$ foram funcionais na indução das integrase, não permitindo o vazamento por uma expressão basal. O longo tempo para detectar a atividade do gene repórter não se deve ao promotor, mas provavelmente a própria atividade da integrase.

Foi analisado o gene repórter *UkG1* de coral (Umi-Kinoko) com códons otimizados para levedura que apresentou resultados melhores que a *EGFP* quando expresso em baixo número de cópias.

6 Perspectivas

- Testar outras integrases de forma individual em *S. cerevisiae* (as integrases 5 e 13).
- Testar outros sinais de entrada (ausência de fosfato - P_{PHO5} e optogenética).
- Sequenciamento do vetor YCUKGyIN8 e dos sítios de reconhecimento attL8 e attR8
- Construção de outros circuitos sintéticos lógico com as modificações propostas neste trabalho
- Aplicação do circuito sintético lógico para a regulação da expressão de proteínas de interesse.

7 Referências

AJO-FRANKLIN, C. M.; DRUBIN, D. A.; ESKIN, J. A.; GEE, E. P.; LANDGRAF, D.; PHILIPS, I.; SILVER, P. A., 2007. Rational design of memory in eukaryotic cells. **Genes Dev**, v. 21, n. 18, p. 2271-6.

ANDO, D.; GARCÍA MARTÍN, H., 2019. Genome-Scale. **Methods Mol Biol**, v. 1859, p. 317-345, .

BASHOR, C. J.; HELMAN, N. C.; YAN, S.; LIM, W. A., 2008. Using engineered scaffold interactions to reshape MAP kinase pathway signaling dynamics. **Science**, v. 319, n. 5869, p. 1539-43.

BAYER, T. S.; SMOLKE, C. D., 2005. Programmable ligand-controlled riboregulators of eukaryotic gene expression. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 3, p. 337-43.

BECKER, D. M.; GUARENTE, L., 1991. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. **Methods Enzymol**, v. 194, p. 182-7, 1991.

BROWN, W. R.; LEE, N. C.; XU, Z.; SMITH, M. C., 2011. Serine recombinases as tools for genome engineering. **Methods**, v. 53, n. 4, p. 372-9.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**, v. 7, n. 6, p. 1513-23.

BONNET, J.; SUBSOONTORN, P.; ENDY, D., 2012. Rewritable digital data storage in live cells via engineered control of recombination directionality. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 23, p. 8884-9.

BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54.

BROPHY, J. A.; VOIGT, C. A., 2014. Principles of genetic circuit design. **Nat Methods**, v. 11, n. 5, p. 508-20.

BURKE, D.; DAWSON, D.; STEARNS, T., 2000. Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual. **Plainview, N.Y. :: Cold Spring Harbor Laboratory Press.**

BURRILL, D. R.; SILVER, P. A., 2011. Recording cellular experiences of DNA damage. **Cell Cycle**, v. 10, n. 15, p. 2410-1.

BUTT, T. R.; STERNBERG, E. J.; GORMAN, J. A.; CLARK, P.; HAMER, D.; ROSENBERG, M.; CROOKE, S. T., 1984. Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 11, p. 3332-6.

CHAE, T. U.; CHOI, S. Y.; KIM, J. W.; KO, Y. S.; LEE, S. Y., 2017. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. **Curr Opin Biotechnol**, v. 47, p. 67-82.

CHEN, B.; LEE, H. L.; HENG, Y. C.; CHUA, N.; TEO, W. S.; CHOI, W. J.; LEONG, S. S. J.; FOO, J., 2018. Synthetic biology toolkits and applications in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Adv**, v. 36, n. 7, p. 1870-1881.

CHEN, D. C.; YANG, B. C.; KUO, T. T., 1992. One-step transformation of yeast in stationary phase. **Curr Genet**, v. 21, n. 1, p. 83-4.

CHENG, J. K.; ALPER, H. S., 2014. The genome editing toolbox: a spectrum of approaches for targeted modification. **Curr Opin Biotechnol**, v. 30, p. 87-94, Dec 2014.

DIDERICH, J. A.; SCHUURMANS, J. M.; VAN GAALEN, M. C.; KRUCKEBERT, A. L.; VAN DAM, K., 2001. Functional analysis of the hexose transporter homologue HXT5 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 18, n. 16, p. 1515-24.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E., 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096.

DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W., 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 13, p. 6127-45.

DRUMONDE-NEVES, J.; VIEIRA, E.; LIMA, M. T.; ARAUJO, I.; CASAL, M.; SCHULLER, D., 2013. An easy, quick and cheap high-throughput method for yeast DNA extraction from microwell plates. **J Microbiol Methods**, v. 93, n. 3, p. 206-8.

DUNN, B.; WOBBE, C. R., 2001. Preparation of protein extracts from yeast. **Curr Protoc Mol Biol**, v. Chapter 13, p. Unit13.13.

ELOWITZ, M. B.; LEIBLER, S., 2000. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. **Nature**, v. 403, n. 6767, p. 335-8.

ETCHEVERRY, T., 1990. Induced expression using yeast copper metallothionein promoter. **Methods Enzymol**, v. 185, p. 319-29.

FOLLIARD, T.; STEEL, H.; PRESCOTT, T. P.; WADHAMS, G.; ROTHSCHILD, L. J.; PAPACHRISTODOULOU, A., 2017. A Synthetic Recombinase-Based Feedback Loop Results in Robust Expression. **ACS Synth Biol**, v. 6, n. 9, p. 1663-1671.

FRASCH, H. J.; MEDEMA, M. H.; TAKANO, E.; BREITLING, R., 2013. Design-based re-engineering of biosynthetic gene clusters: plug-and-play in practice. **Curr Opin Biotechnol**, v. 24, n. 6, p. 1144-50.

FRIEDLAND, A. E.; Lu, T. K.; Wang, X.; Shi, D.; Church, G.; Collins, J. J., 2009. Synthetic gene networks that count. **Science**, v. 324, n. 5931, p. 1199-202,.

GARDNER, T. S.; CANTOR, C. R.; COLLINS, J. J., 2000. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 403, n. 6767, p. 339-42.

GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H., 2007. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nat Protoc**, v. 2, n. 1, p. 38-41.

GIETZ, R. D.; SUGINO, A., 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. **Gene**, v. 74, n. 2, p. 527-34.

GOLDSTEIN, A. L.; MCCUSKER, J. H., 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 15, n. 14, p. 1541-53.

GRINDLEY, N. D.; WHITESON, K. L.; RICE, P. A., 2006. Mechanisms of site-specific recombination. **Annu Rev Biochem**, v. 75, p. 567-605.

GUIZIOU, S.; MAYONOVE, P.; BONNET, J., 2019. Hierarchical composition of reliable recombinase logic devices. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 456.

GUNTZEL,.; NASCIMENTO., 2001. Introdução aos sistemas digitais. Disponível em "<https://www.inf.ufsc.br/~j.guntzel/isd/isd.html>".

GUTHRIE, C. E.; FINK, G. R. E., 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. **Academic Press**.

HAM, T. S.; LEE, S. K.; KEASLING, J. D.; ARKIN, A. P., 2008. Design and construction of a double inversion recombination switch for heritable sequential genetic memory. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2815.

HANAHAN, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J Mol Biol**, v. 166, n. 4, p. 557-80.

HSIAO, V.; HORI, Y.; ROTHEMUND, P. W.; MURRAY, R. M., 2016. A population-based temporal logic gate for timing and recording chemical events. **Mol Syst Biol**, v. 12, n. 5, p. 869.

INNISS, M. C.; SILVER, P. A., 2013. Building synthetic memory. **Curr Biol**, v. 23, n. 17, p. R812-6.

JULLESSON, D.; DAVID, F.; PFLEGER, B.; NIELSEN, J., 2015. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. **Biotechnol Adv**, v. 33, n. 7, p. 1395-402.

KAISHIMA, M.; ISHII, J.; MATSUNO, T.; FUKUDA, N.; KONDO, A., 2016. Expression of varied GFPs in *Saccharomyces cerevisiae*: codon optimization yields stronger than expected expression and fluorescence intensity. **Sci Rep**, v. 6, p. 35932.

KAVŠČEK, M.; STRAZAR, M.; CURK, T.; NATTER, K.; PETROVIC, U., 2015. Yeast as a cell factory: current state and perspectives. **Microb Cell Fact**, v. 14, p. 94.

KOLLER, A.; VALESCO, J.; SUBRAMANI, S., 2000. The CUP1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by copper in *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 16, n. 7, p. 651-6.

LAEMMLI, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5.

LIU, C.; FU, X.; LIU, L.; REN, X.; CHAU, C. K.; LI, S.; XIANG, L.; ZENG, H.; CHEN, G.; TANG, L. H.; LENZ, P.; CUI, X.; HUANG, W.; HWA, T.; HUANG, J. D., 2011. Sequential establishment of stripe patterns in an expanding cell population. **Science**, v. 334, n. 6053, p. 238-41.

MATHIS, R.; ACKERMANN, M., 2016. Response of single bacterial cells to stress gives rise to complex history dependence at the population level. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 15, p. 4224-9.

MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L., 1995. Circuit simulation of genetic networks. **Science**, v. 269, n. 5224, p. 650-6.

MEDEMA, M. H.; BREITLING, R.; BOVENBERG, R.; TAKANO, E., 2011. Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 131-7.

MERRICK, C. A.; ZHAO, J.; ROSSER, S. J., 2018. Serine Integrases: Advancing Synthetic Biology. **ACS Synth Biol**, v. 7, n. 2, p. 299-310.

MERULLA, D.; VAN DER MEER, J. R., 2016. Regulatable and Modulable Background Expression Control in Prokaryotic Synthetic Circuits by Auxiliary Repressor Binding Sites. **ACS Synth Biol**, v. 5, n. 1, p. 36-45.

MOON, T. S.; CLARKE, E. J.; GROBAN, E. S.; TAMSIR, A.; CLARK, R. M.; EAMES, M.; KORTEEMME, T.; VOIGT, C. A., 2011. Construction of a genetic multiplexer to toggle between chemosensory pathways in *Escherichia coli*. **J Mol Biol**, v. 406, n. 2, p. 215-27.

MOON, T. S.; LOU, C.; TAMSIR, A.; STANTON, B. C.; VOIGT, C. A., 2012. Genetic programs constructed from layered logic gates in single cells. **Nature**, v. 491, n. 7423, p. 249-53.

NIELSEN, A. A.; Der, B. S.; Shin, J.; Vaidyanathan, P.; Paralanov, V.; Strychalski, E. A.; Ross, D.; Densmore, D.; Voigt, C. A., 2016. Genetic circuit design automation. **Science**, v. 352, n. 6281, p. aac7341.

NIELSEN, A. A.; SEGALL-SHAPIRO, T. H.; VOIGT, C. A., 2013. Advances in genetic circuit design: novel biochemistries, deep part mining, and precision gene expression. **Curr Opin Chem Biol**, v. 17, n. 6, p. 878-92.

NIELSEN, J.; JEWETT, M. C., 2008. Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, v. 8, n. 1, p. 122-31.

NIELSEN, J.; KEASLING, J. D., 2011. Synergies between synthetic biology and metabolic engineering. **Nat Biotechnol**, v. 29, n. 8, p. 693-5.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J., 2000. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 1, p. 34-50.

PENG, B.; WILLIAMS, T. C.; HENRY, M.; NIELSEN, L. K.; VICKERS, C. E., 2015. Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities. **Microb Cell Fact**, v. 14, p. 91.

PEÑA, M. M.; KOCH, K. A.; THIELE, D. J., 1998. Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 5, p. 2514-23.

PHAM, H. L.; WONG, A.; CHUA, N.; TEO, W. S.; YEW, W. S.; CHANG, M. W., 2017. Engineering a riboswitch-based genetic platform for the self-directed evolution of acid-tolerant phenotypes. **Nat Commun**, v. 8, n. 1, p. 411.

REGOT, S.; MARCIA, J.; CONDE, N.; FURUKAWA, K.; KJELLÉN, J.; PEETERS, T.; HOHMANN, S.; NADAL, E.; POSAS, F.; SOLÉ, R., 2010. Distributed biological computation with multicellular engineered networks. **Nature**, v. 469, p. 207.

ROQUET, N.; LU, T. K., 2014. Digital and analog gene circuits for biotechnology. **Biotechnol J**, v. 9, n. 5, p. 597-608.

ROSS, W.; LANDY, A., 1982. Bacteriophage lambda int protein recognizes two classes of sequence in the phage att site: characterization of arm-type sites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 24, p. 7724-8.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press**.

SHAO, Z.; RAO, G.; LI, C.; ABIL, Z.; LUO, Y.; ZHAO, H., 2013. Refactoring the silent spectinabilin gene cluster using a plug-and-play scaffold. **ACS Synth Biol**, v. 2, n. 11, p. 662-9.

SHERMAN, F., 2002. Getting started with yeast. **Methods Enzymol**, v. 350, p. 3-41.

SIDDIQUI, M. S.; THODEY, K.; TRENCHARD, I.; SMOLKE, C. D., 2012. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. **FEMS Yeast Res**, v. 12, n. 2, p. 144-70.

SIUTI, P.; YAZBEK, J.; LU, T. K., 2013. Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. **Nat Biotechnol**, v. 31, n. 5, p. 448-52.

SMITH, M. C.; THORPE, H. M., 2002. Diversity in the serine recombinases. **Mol Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 299-307.

SNOECK, N.; DE MOL, M. L.; VAN HERPE, D.; GOORMANS, A.; MARYNS, I.; COUSSEMENT, P.; PETERS, G.; BEAUPREZ, J.; DE MAESENEIRE, S. L.;

SOETAERT, W., 2019. Serine integrase recombinational engineering (SIRE): A versatile toolbox for genome editing. **Biotechnol Bioeng**, v. 116, n. 2, p. 364-374.

STARK, W. M., 2017. Making serine integrases work for us. **Curr Opin Microbiol**, v. 38, p. 130-136.

VOTH, W. P.; RICHARDS, J. D.; SHAW, J. M.; STILLMAN, D. J., 2001. Yeast vectors for integration at the HO locus. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 12, p. E59-9.

WAY, J. C.; COLLINS, J. J.; KEASLING, J. D.; SILVER, P. A., 2014. Integrating biological redesign: where synthetic biology came from and where it needs to go. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 151-61.

WEINBERG, B. H.; PHAM, N. T. H.; CARABALLO, L. D.; LOZANOSKI, T.; ENGEL, A.; BHATIA, S.; WONG, W. W., 2017. Large-scale design of robust genetic circuits with multiple inputs and outputs for mammalian cells. **Nat Biotechnol**, v. 35, n. 5, p. 453-462.

WEINHANDL, K.; WINKLER, M.; GLIEDER, A.; CAMATTARI, A., 2014. Carbon source dependent promoters in yeasts. **Microb Cell Fact**, v. 13, p. 5.

WEISS, R.; BASU, S., 2002. The device physics of cellular logic gates. First workshop on *non silicon* computing.

WEST, R. W.; CHEN, S. M.; PUTZ, H.; BUTLER, G.; BANERJEE, M, 1987. GAL1-GAL10 divergent promoter region of *Saccharomyces cerevisiae* contains negative control elements in addition to functionally separate and possibly overlapping upstream activating sequences. **Genes Dev**, v. 1, n. 10, p. 1118-31.

XU, Z.; BROWN, W. R. A., 2016. Comparison and optimization of ten phage encoded serine integrases for genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 13.

YANG, L.; NIELSEN, A. A.; FERNANDEZ-RODRIGUEZ, J.; MCCLUNE, C. J.; LAUB, M. T.; LU, T. K.; VOIGT, C. A., 2014. Permanent genetic memory with >1-byte capacity. **Nat Methods**, v. 11, n. 12, p. 1261-6.

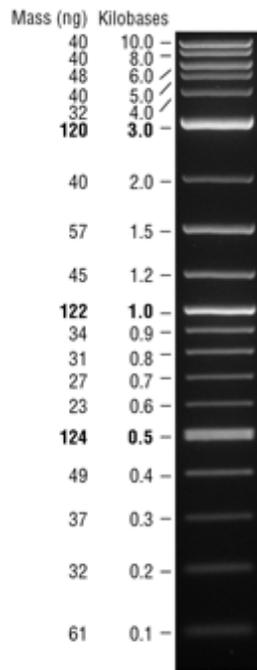
ZHU, B.; CAI, G.; HALL, E. O.; FREEMAN, G. J., 2007. In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. **Biotechniques**, v. 43, n. 3, p. 354-9.

8 Anexos

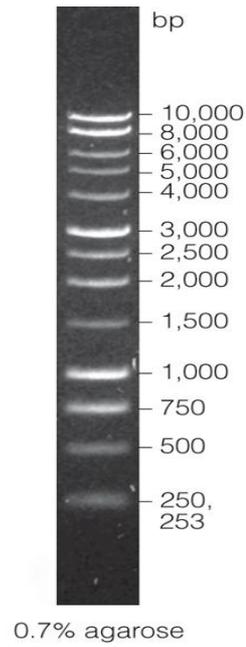
Anexo A

Lista de Marcadores moleculares utilizados

**2- Log DNA Ladder
(BioLabs)**



**1 kb DNA Ladder
(Promega)**



**1 kb DNA Ladder
(Sinapse)**

