



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Avaliação de duas ORFs pertencentes ao cluster de produção de lovastatina em  
*Aspergillus terreus***

**Aluna: Kelly Assis Rodrigues**

**Orientador (a): Profa. Dra. Nádia Skorupa Parachin**

**Brasília, 2018**

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular

**Avaliação de duas ORFs pertencentes ao cluster de produção de lovastatina em  
*Aspergillus terreus***

**Kelly Assis Rodrigues**

Orientador (a): Nádia Skorupa Parachin

*Dissertação de mestrado  
apresentada ao programa de Pós-  
Graduação em Biologia Molecular  
da Universidade de Brasília como  
requisito parcial para obtenção do  
título de mestre.*

Brasília, 2018.

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação da professora Nádia Skorupa Parachin e com apoio financeiro do CNPq.

### **Banca Examinadora**

Professora Dra. Nádia Skorupa Parachin

Universidade de Brasília

Presidente da Banca

Professora Dra. Eliane Ferreira Noronha

Universidade de Brasília

Membro Efetivo

Professor Dr. Patrícia Albuquerque de Andrade

Universidade de Brasília

Membro Efetivo

Dra. Juliana Davies de Oliveira

Universidade Católica de Brasília

Membro Suplente

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a minha orientadora Nádia por toda a paciência, carinho, dedicação e ajuda que demonstrou todo esse tempo em que trabalhamos juntas, não só nesses dois anos de mestrado. Obrigada por sempre acreditar em mim e sempre me incentivar a não desistir.

Agradeço ao meu colega Guilherme por toda ajuda com experimentos, todas as conversas, choradeiras, chocolates e almoços no RU. Ao Helder por toda ajuda com reagentes, palavras de incentivo e chocolates nas horas difíceis, você foi uma das melhores pessoas que conheci nessa UnB. A minha linda, Taís Duarte, por todo o apoio, todas as palavras de conforto, todos os sorrisos, todas as lágrimas, você foi um anjo na minha vida esses dois anos.

Agradeço imensamente aos professores Edivaldo Ximenes, Eliane Noronha e Larissa Matos, por todo o apoio com espaço físico, equipamentos reagentes e ensinamentos. Sem vocês teria sido infinitamente mais difícil conseguir esses resultados.

Aos meus colegas de grupo, Nadielle, Fábio, Priscila, Lucas, João e Milton, por todo apoio e risadas no laboratório. Com certeza somos o grupo mais lindo da BioMol.

Ao meu “namorado”, Velozo, por toda paciência, carinho, incentivo e amor. Por não me deixar desistir dos meus sonhos, por sonhá-los comigo. Obrigada não me deixar cair. Aos meus pais e meu irmão que sempre estiveram ao meu lado e acreditaram em mim. Ao meu cachorrinho mais gostoso, Téo, que foi minha luz quando me deixa cair na escuridão.

E principalmente a Deus, que por me amar tanto vem me dando forças e me guiando para que eu alcance todos os meus sonhos.

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. FUNGOS FILAMENTOSOS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS 13	
1.2. <i>ASPERGILLUS TERRUS</i> E ESTATINAS .....	14
1.3. BIOSÍNTESE DE LOVASTATINA.....	16
1.4. ORF8.....	21
1.5. ORF10.....	24
2. OBJETIVO.....	24
2.1. OBJETIVO GERAL .....	24
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO .....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
3.1. MATERIAIS.....	25
3.1.1. Cepas utilizadas .....	25
3.1.2. Meios de Cultivo .....	26
3.1.3. Soluções Para Extração de DNA .....	27
3.1.4. Soluções para SDS-PAGE.....	27
3.1.5. Soluções para transformação de fungo filamentoso utilizando PEG .....	29
3.1.6. Soluções para transformação por biobalística .....	29
3.1.7. Outras soluções e tampões.....	30
3.1.8. Kits .....	31
3.1.9. Enzimas Utilizadas .....	31
3.1.10. Vetores .....	31
3.1.11. Oligonucleotídeos Iniciadores .....	32
3.2. METODOLOGIA .....	33
3.2.1. Clonagem e Expressão da ORF8 em <i>Escherichia coli</i> .....	33
3.2.1. Construção do Cassete de Deleção da ORF10 .....	36
3.2.2. Transformação de <i>Aspergillus terreus</i> por biobalística.....	38
3.2.3. Transformação de fungo filamentoso utilizando PEG .....	40
3.2.4. Extração de DNA genômico de fungo filamentoso.....	40

3.2.5.	Confirmação genômica da deleção da ORF10 .....	41
3.2.6.	Avaliação de clones resistentes à higromicina .....	42
4.	RESULTADOS .....	44
4.1.	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ORF8 .....	44
4.2.	CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE DELEÇÃO DA OFR10.....	47
4.3.	SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES RESISTENTES A HIGROMICINA E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LOVASTATINA .....	48
4.4.	CONFIRMAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE DELEÇÃO DA ORF10 NO GENOMA DA CEPA ATCC20542.....	50
5.	DISCUSÃO.....	51
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	54
7.	BIBLIOGRAFIA.....	55
8.	ANEXO I.....	63

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfologia de *A. terreus*. Colônias cultivadas em meio BDA (A) e morfologia de conidióforo em microscopia como conídios. Fonte: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Aspergillus/terreus.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/terreus.html) ..... 14
- Figura 2.** Representação molecular de algumas estatinas evidenciando como são similares estruturalmente. (A) Estrutura básica das estatinas; (B) Sinvastatina representando uma estatina semissintética; (C) Lovastatina representando uma estatina natural; (D) Atorvastatina representando uma estatina sintética ..... 15
- Figura 3.** Via de biossíntese de lovastatina evidenciando o gene envolvido em cada reação ..... 17
- Figura 4.** Cluster gênico de produção de lovastatina. Em cinza estão os genes que codificam possivelmente proteínas envolvidas com o mecanismo de resistência e transporte de lovastatina, em laranja genes com função ainda desconhecida, em azul, genes que codificam enzimas que atuam diretamente na via, em verde genes que codificam fatores de regulação ..... 18
- Figura 5.** Via de biossíntese de Ergosterol em fungo filamentoso ..... 22
- Figura 6.** Ilustração esquemática da construção do cassete de deleção baseada em PCR. As regiões flanqueantes 5' e 3' foram amplificadas com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a sequência de interesse (Frag\_5'\_F; Frag\_5'\_R, Frag\_3'\_F e Frag\_3'\_R). Os oligonucleotídeos iniciadores da marca de seleção são complementares aos iniciadores Frag\_5'\_R e Frag\_3'\_F. As regiões de flanco 5' e 3' foram unidas ao cassete de resistência, formando o cassete de deleção, que é amplificado ao final pelos iniciadores mais externos (Frag\_5'\_F e Frag\_3'\_R) ..... 37
- Figura 7.** Ilustração esquemática da estratégia de confirmação da deleção da ORF10. Os oligonucleotídeos iniciadores (Conf\_F e Conf\_R) foram desenhados para anelarem no genoma do *A. terreus* em uma região antes e depois de onde o cassete de deleção deveria integrar. Caso não houvesse integração do cassete de deleção, o tamanho do fragmento esperado seria de 3652 pb. No caso da integração correta do cassete de deleção, o fragmento esperado seria de 4846 pb ..... 42
- Figura 8.** Avaliação do crescimento celular de *E. coli*. BL21DE3 (A); BL21DE3 plsE (B) e BL21DE3 plsS (C). Em azul são os controles, a cepa com o plasmídeo de expressão, mas sem indução e em laranja são a cepa com o plasmídeo, induzidas com 1 mM de IPTG ..... 45
- Figura 9.** Análise da expressão da HMG-CoA redutase, codificada pela ORF8, nas diferentes linhagens de *E. coli*, transformadas como o plasmídeo GS57875 pET28a-HMG\_ORF8, onde o controle foi sem indução por IPTG e o Induzido foi induzido com 1mM de IPTG, em gel de poliacrilamida 8% ..... 46
- Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de amplificação da ORF8 (A) e da digestão do vetor p416TEF (B). M é marcador e B é o branco; 1 é o plasmídeo intacto e 2 é o plasmídeo digerido ..... 47
- Figura 11.** Eletroforese em gel de Agarose 1% da PCR para amplificação dos fragmentos que compõem o cassete de deleção (A) e do cassete de deleção montado (B). M é o marcador, 1 é o fragmento que flanqueia a região 5'; 2 é o fragmento que flanqueia a região 3' e 3 é o cassete de resistência a Higromicina ..... 48

<b>Figura 12.</b> Seleção dos clones após a transformação em placas com Higromicina 700µg/mL com 0h de crescimento (A); placas sem Higromicina com 0h de crescimento (B); placas com Higromicina 700µg/mL com 7 dias de crescimento (C); placas sem Higromicina com 48h de crescimento (D). No quadrado de número 1 está a ATCC20542 e nos demais estão os clones obtidos. ....	48
<b>Figura 13.</b> Quantificação de lovastatina total (nas formas ácida e lactona) em micélio (Cinza claro) e em sobrenadante (cinza escuro), nos 17 clones obtidos. ** Foi aplicado ANOVA (p < 0,01). Os cultivos foram realizados em quadruplicatas biológicas e quantificações foram realizadas em duplicatas. ....	49
<b>Figura 14.</b> Quantificação de biomassa após 120 horas de cultivo. A quantificação foi realizada em duplicatas, (**) p<0,01. ....	50
<b>Figura 15.</b> Eletroforese em gel de agarose 0,7% da PCR de confirmação da deleção da ORF10 na cepa de <i>A. terreus</i> ATCC20542 (C) e nos clones que apresentaram alteração ou ausência da secreção de lovastatina (C1-C5). O marcador utilizado foi o Ladder 1kb plus da marca Invitrogen onde as bandas de 3 e 4kb estão indicadas na figura. ....	51
<b>Figura 16</b> Mapa do plasmídeo pSilent_1, destacando os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores HGR_Frag5' e HGR_Frag3', utilizados para amplificação do cassete de resistência a Higromicina. ....	63
<b>Figura 17</b> Mapa do plasmídeo p416TEF que seria utilizado para expressão da ORF8 de <i>S. cerevisiae</i> . ....	64
<b>Figura 18</b> Mapa do plasmídeo sintetizado quimicamente para expressão da ORF8 em <i>E. coli</i> . ....	65



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Relação de metabólitos e as espécies fúngicas que os produzem e em qual indústria são aplicadas (BENNETT, 1998; JIANG; AN, 2000; MEYER, 2008). .....	13
<b>Tabela 2</b> Genes que compõem o cluster envolvido na produção de lovastatina e suas funções.....	19
<b>Tabela 3</b> Relação de microrganismos e cepas utilizados.....	25
<b>Tabela 4</b> Enzimas de restrição utilizadas nesse trabalho .....	31
<b>Tabela 5</b> Vetores utilizados nesse trabalho.....	32
<b>Tabela 6</b> Relação de oligonucleotídeos utilizados, com suas respectivas temperaturas de anelamento e sítios de restrição inseridos. ....	32
<b>Tabela 7</b> Composição do gel separador 8% para o volume final de 5 mL de gel .....	35
<b>Tabela 8</b> Composição do gel concentrador 5%, para um volume final de 1 mL.....	35
<b>Tabela 9.</b> Gradiente binário utilizado para detecção e quantificação de lovastatina. ....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

HMG-CoA	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-Coenzima A
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
PKS	Policetídeos Sintases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
BSA	Albumina Bovina Sérica
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LNKS	Lovastatina Nanocetídeo Sintase
LDKS	Lovastatina Dicitédeo Sintase
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PEG	Polietileno Glicol
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
DTT	Ditiotreitol
ATP	Trifosfato de Adenosina
OD	Densidade ótica
ORF	Open Reading Frame
ABC	<i>ATP-binding cassette transportes</i>
MSF	<i>Major Facilitator Superfamily</i>

## RESUMO

*Aspergillus terreus* é um fungo filamentososo de importância biotecnológica por ser produtor de enzimas de interesse comercial, além de metabolitos secundários como a lovastatina. Esta é utilizada no tratamento de pessoas com hipercolesterolemia uma vez que é um inibidor competitivo da HMG-CoA redutase, enzima responsável pela conversão de HMG-CoA em Mevalonato, diminuindo assim a síntese de colesterol endógeno. Os 18 genes codificadores de enzimas envolvidas na via biosintética de lovastatina estão organizados em um agrupamento gênico de 65 kb no genoma de *A. terreus*. Dentre esses, genes essenciais já foram identificados, como os genes *lovB* e *lovF*, que codificam as principais enzimas da via. Apesar de vários estudos a respeito da via biosintética de lovastatina, ainda existem 10 genes do cluster com a função desconhecida ou predita. Dentre eles a ORF8 (*open Reading frame*), anotada como um possível gene de resistência. Análises de similaridades mostraram que esta ORF codifica para uma HMG-CoA redutase, sendo que o fungo ainda tem outras duas regiões fora do cluster de lovastatina que também codificam HMG-CoA redutase. Alinhando as três sequências, a ORF8 e as duas enzimas de fora do cluster, foi possível observar que a HMG-CoA redutase, codificada pela ORF8, possui duas mutações no sítio de ligação. Assim, para a caracterização da HMG-CoA redutase, que a ORF8 codifica, foi clonada a sequência no plasmídeo pET28a para expressá-la em *Escherichia coli*. O plasmídeo foi inserido em quatro linhagens de *E. coli*, nas quais não foi observada a expressão da proteína. Assim foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para que a ORF8 fosse clonada no vetor p416TEF, que possui a marca de seleção auxotrófica URA3 para inserção na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto foi possível detectar a produção da enzima em *S. cerevisiae* pois a ligação do vetor e o inserto não foi alcançada. Outra ORF com função predita é a ORF10, anotada como um possível transportador de lovastatina. Dessa forma, para confirmar sua função biológica, foi realizada sua deleção na cepa ATCC20542, usada como referência para produção de lovastatina. A montagem do cassete de deleção foi realizada em 2 partes, sendo a primeira a amplificação por PCR do cassete de resistência a Higromicina B e dos fragmentos que flanqueiam o gene; e a segunda a fusão dos três fragmentos utilizando a técnica de PCR. O cassete de deleção foi utilizado na transformação da cepa de *A. terreus* ATCC20542, usada como referência para produção de lovastatina. Após os experimentos de transformação, os 17 clones obtidos foram cultivados em meio definido para quantificação da produção de lovastatina, tanto em sobrenadante quanto em micélio. Dentre os clones avaliados, em 4 clones não foi possível detectar lovastatina no sobrenadante, já em micélio foi observada uma redução de aproximadamente 60% de lovastatina produzida. Estes 4 clones tiveram então seu DNA genômico extraído e usado como molde em reações de PCR. Dessa forma foi possível confirmar que a ORF10 estava realmente deletada nas cepas cuja produção de lovastatina no sobrenadante foi eliminada evidenciando experimentalmente que essa ORF está, de fato, relacionada ao transporte de lovastatina.

## ABSTRACT

*Aspergillus terreus* is a filamentous fungus of biotechnological importance because it produces enzymes of commercial interest, as well as secondary metabolites like lovastatin. It is used without treatment of people with hypercholesterolemia since it is a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase, enzyme responsible for the conversion of HMG-CoA to Mevalonate, thus decreasing as endogenous cholesterol synthesis. The 18 genes encoding enveloping enzymes in the lovastatin biosynthetic pathway are organized into a 65 kb gene cluster in the *A. terreus* genome. Among these, essential genes have already been identified, as the genes are *lovB* and *lovF*, which code as major pathway enzymes. In spite of several genes of the cluster with an unknown or predicted function. There are still 10 cluster genes with an unknown or predicted function. Among them, an ORF8 (open reading frame), annotated as a possible resistance gene. Analyzes of analyzes similar to this ORF code for an HMG-CoA reductase, and the fungus still has other regions for the lovastatin cluster that also encode HMG-CoA reductase. Aligning as three sequences, one ORF8 and two enzymes from outside the cluster, and just like an HFG-CoA reductase encoded by ORF8 does not have two bonds. Thus, for a characterization of HMG-CoA reductase, which is an ORF8 coding, the sequence in plasmid pET28a was cloned to express in *Escherichia coli*. The plasmid was inserted into four *E. coli* lines, in which no expression of the protein was observed. Thus, oligonucleotide primers were designed so that the ORF8 was cloned into the p416TEF vector, which has an auxotrophic selection tag URA3 for insertion into the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. However, the possibility of detecting the production of the enzyme in *S. cerevisiae* at a link of the vector and the insertion was not achieved. Another ORF with predicted function is an ORF10, annotated as a possible lovastatin transporter. Thus, to confirm its biological function, its deletion was carried out in strain ATCC20542, used as reference for lovastatin production. One assembly of a deletion was performed in 2 parts, a first PCR amplification of hygromycin B resistance cassette and fragments flanking the gene; and the second a fusion of the three fragments using a PCR technique. The deletion cassette was used in the transformation of *A. terreus* strain ATCC20542, used as a reference for lovastatin production. After the transformation experiments, the 17 clones obtained were cultured in defined medium for quantification of lovastatin production, both in supernatant and in mycelium. Among the clones, in 4 clones, it was not possible to detect lovastatin in the supernatant, while in the mycelium a reduction of approximately 60% of lovastatin produced was observed. These 4 clones had their genomic DNA extracted and used as template in PCR reactions. From this it was possible to confirm that ORF10 was indeed deleted in strains whose production of lovastatin in the supernatant was eliminated experimentally evidencing that this ORF is, in fact, related to the transport of lovastatin.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. FUNGOS FILAMENTOSOS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Fungos filamentosos apresentam grande interesse biotecnológico por possuir características como a capacidade de crescer em meios simples e de baixo custo, de hidrolisar uma variedade de substratos lignocelulósicos e pela sua alta capacidade de secreção de enzimas e produção de grande variedade de metabólitos secundários e pigmentos de interesse biotecnológico (MUELLER; SCHMIT, 2007). A Tabela 1 lista os diferentes metabólitos que já são produzidos em escala industrial utilizando fungos filamentosos.

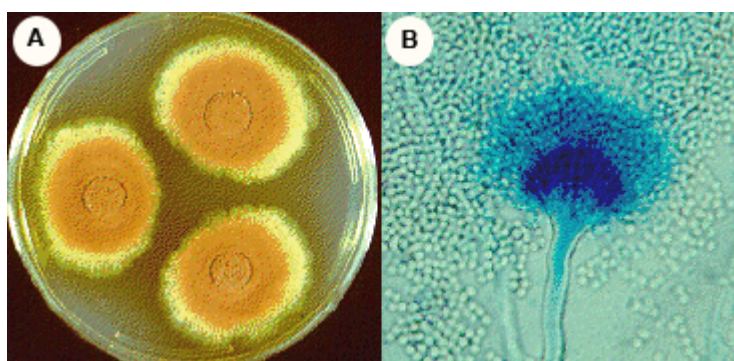
**Tabela 1** Relação de metabólitos e as espécies fúngicas que os produzem e em qual indústria são aplicadas (BENNETT, 1998; JIANG; AN, 2000; MEYER, 2008).

<b>Metabólito</b>	<b>Espécie</b>	<b>Indústria de Aplicação</b>
Ácido Cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Indústria alimentícia e de bebidas
Ácido Itacônico	<i>Aspergillus terreus</i>	Indústria de polímeros
Alfa-Amilase	<i>Aspergillus niger e Aspergillus oryzae</i>	Processamento de amido e indústria de alimentos
Quimosina	<i>Aspergillus niger</i>	Indústria de alimentos
Celulase	<i>Trichoderma viride, Trichoderma reesei, Humicola insolens, Penicillium funiculosum</i>	Indústria têxtil e produção de papel
Lipase	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>	Indústria de alimentos e produção de detergentes
Protease	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus melleus, Rhizopus delemar</i>	Indústria de alimentos e produção de detergentes
Renina	<i>Mucor miehei, Mucor pusillum</i>	Indústria de alimentos
Alcalóides do Ergot	<i>Claviceps purpurea</i>	Indústria farmacêutica
Cefalosporina	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Indústria farmacêutica
Ciclosporina	<i>Talypocladium nivenum</i>	Indústria farmacêutica
Giberelina	<i>Fusarium moniliforme</i>	Agronomia
Griseoflavinina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Indústria farmacêutica
Lovastatina	<i>Monascus ruber, Aspergillus terreus</i>	Indústria farmacêutica
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Indústria farmacêutica
Glicoamilase	<i>Aspergillus phoenicis, Rhizopus delemar, Rhizopus niveus</i>	Indústria alimentícia
Glicooxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Indústria alimentícia
Pectinase	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Humicola insolens</i>	Indústria alimentícia

Dentre os diferentes gêneros de fungos filamentosos, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* se destacam dos demais por serem frequentemente estudados na tentativa de se isolar novos compostos. Assim, esses dois gêneros reúnem atualmente mais de 30% dos metabólitos bioativos utilizados na indústria farmacêutica como antifúngicos e outros metabolitos com atividade antitumoral (SURYANARAYANAN et al., 2009; TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Como pode ser observado na Tabela 1, fungos do gênero *Aspergillus* vêm sendo muito utilizados industrialmente, tanto na indústria alimentícia quanto na indústria farmacêutica, principalmente após o advento de técnicas de biologia molecular, pois espécies desse gênero vêm sendo utilizadas para a produção de proteínas recombinantes, por conta de sua alta capacidade de secreção (SHARMA et al., 2009; WANG et al., 2005). Além disso, algumas espécies se destacam também na produção de metabólitos secundários, sendo que a espécie *A. terreus* é a utilizada para produção industrial de lovastatina, uma estatina natural.

## 1.2.ASPERGILLUS TERRUS E ESTATINAS

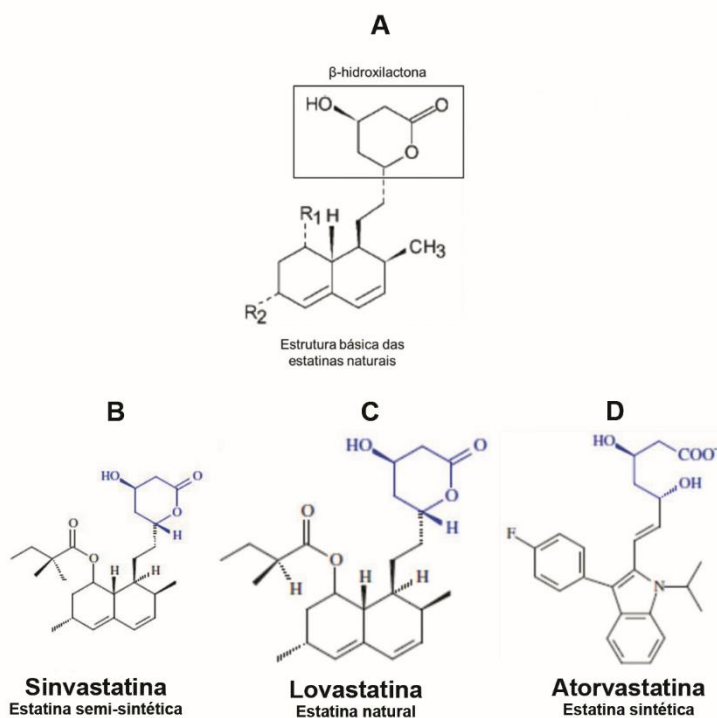
O gênero *Aspergillus* pertence ao filo Ascomycota, sendo que o primeiro registro do gênero foi catalogado em 1729 pelo biólogo Pier Antonio Micheli (AINSWORTH, 1976). A espécie *A. terreus* é de grande importância biotecnológica e já foi isolada de diversos ambientes, desde ambientes desérticos a ambientes marinhos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Morfologicamente esse fungo é caracterizado pela formação de cadeias de conídios longas, com cabeça compacta e apresenta reprodução assexuada (SAMSON et al., 2011) (Figura 1).



**Figura 1.** Morfologia de *A. terreus*. Colônias cultivadas em meio BDA (A) e morfologia de conidióforo em microscopia como conídios.

Fonte:[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Aspergillus/terreus.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/terreus.html)

Dentre os diversos metabólitos biologicamente ativos produzidos por *A. terreus*, destaca-se a lovastatina, pertencente ao grupo das estatinas (ALBERTS, 1988; MANZONI & ROLLINI, 2002). As estatinas são fármacos utilizados no tratamento da hipercolesterolemia por se tratar de um inibidor competitivo da enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-methyl-glutaril-Coenzima A) redutase, que realiza a conversão de HMG-CoA em Mevalonato, sendo esse um dos principais pontos de regulação da via de produção de colesterol (BARRIOS-GONZÁLEZ; MIRANDA, 2010). As estatinas são divididas em naturais, semissintéticas e sintéticas. As estatinas naturais (lovastatina e mevastatina) são metabólitos secundários cuja produção ocorre por meio da fermentação de microrganismos; a semissintéticas (sinvastatina) é produzida através de reações químicas a partir da lovastatina e as sintéticas (atorvastatina, fluvastatina e rosuvastatina), cuja produção ocorre por meio de síntese química (Figura 2) (MANZONI; ROLLINI, 2002).



Fonte: Adaptado de MANZONI e ROLLINI, 2002

**Figura 2.** Representação molecular de algumas estatinas evidenciando como são similares estruturalmente. (A) Estrutura básica das estatinas; (B) Simvastatina representando uma estatina semissintética; (C) Lovastatina representando uma estatina natural; (D) Atorvastatina representando uma estatina sintética

A primeira estatina descoberta foi a mevastatina, em 1976, isolada como produto metabólico de culturas de *Penicillium citrinium* (ENDO; KURODA; TSUJITA, 1976). Posteriormente, com o aumento do interesse industrial, a indústria farmacêutica Merck da Alemanha, isolou uma cepa de *A. terreus* em Madri (Espanha) que produzia uma estatina com estrutura semelhante à mevastatina e com eficácia mais elevada (ALBERTS et al., 1980). A lovastatina produzida pela cepa ATCC 20542 foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1987 para uso terapêutico em pacientes portadores de hipercolesterolemias, sendo também a primeira estatina a entrar no mercado brasileiro no ano de 1988 (LAUFS; BÖHM, 2005; MAHLEY et al., 2001).

### 1.3. BIOSÍNTESE DE LOVASTATINA

A via de biossíntese de lovastatina foi elucidada a partir de vários estudos que visavam a identificação de seus metabólitos intermediários conforme revisto recentemente (MULDER et al., 2015). Endo (1985), utilizando uma cepa de *Monascus ruber* cultivada com carbono marcado, identificou dois intermediários, monacolina L e monacolina J, e, mais tarde, Komagata e colaboradores (1989) demonstraram, por meio ressonância magnética utilizando Oxigênio marcado, que monacolina L é na verdade o precursor de monacolina J, resultando de uma reação envolvendo uma monooxigenase dependente de NADPH (Figura 3).

Em 1983, Chan e colaboradores mostraram que a porção principal de mevinolina consistia em uma cadeia de policetídeos, formada por nove unidades intactas de acetato e um grupo metil. Em outro estudo realizado por Moore e colaboradores (1985), mostrou que a mevinolina é formada por duas cadeias de policetídeos, sendo que cada cadeia possui uma metionina proveniente de um grupo metil.

Também foram realizados estudos para avaliar a cinética das enzimas pertencentes a via, bem como estudos de expressão dos genes envolvidos na via de síntese de lovastatina em *A. terreus*, mostrando que a lovastatina é sintetizada a partir de duas cadeias de reações em que são utilizados acetato e Malonil-CoA como substratos (HENDRICKSON et al., 1999; KENNEDY et al., 1999; VINCI et al., 1991). Outro ponto importante sobre a via de síntese de lovastatina evidenciado nesses estudos foi a participação de policetídeos sintases (PKS) envolvidas na via (HENDRICKSON et al., 1999; KENNEDY et al., 1999; VINCI et al., 1991).

As PKSs representam um grupo diversificado de enzimas tanto estrutural, quanto funcionalmente, sendo abundante no metabolismo secundário de fungos



(SCHÜMANN; HERTWECK, 2006). São enzimas com múltiplos domínios catalíticos como característica comum, que são divididas em quatro grupos: PKS do tipo I modular e interativa, PKS do tipo II e PKS do tipo III; de acordo com o microrganismo que a produz e o mecanismo utilizado para a síntese do metabolito secundário (HERTWECK, 2009).

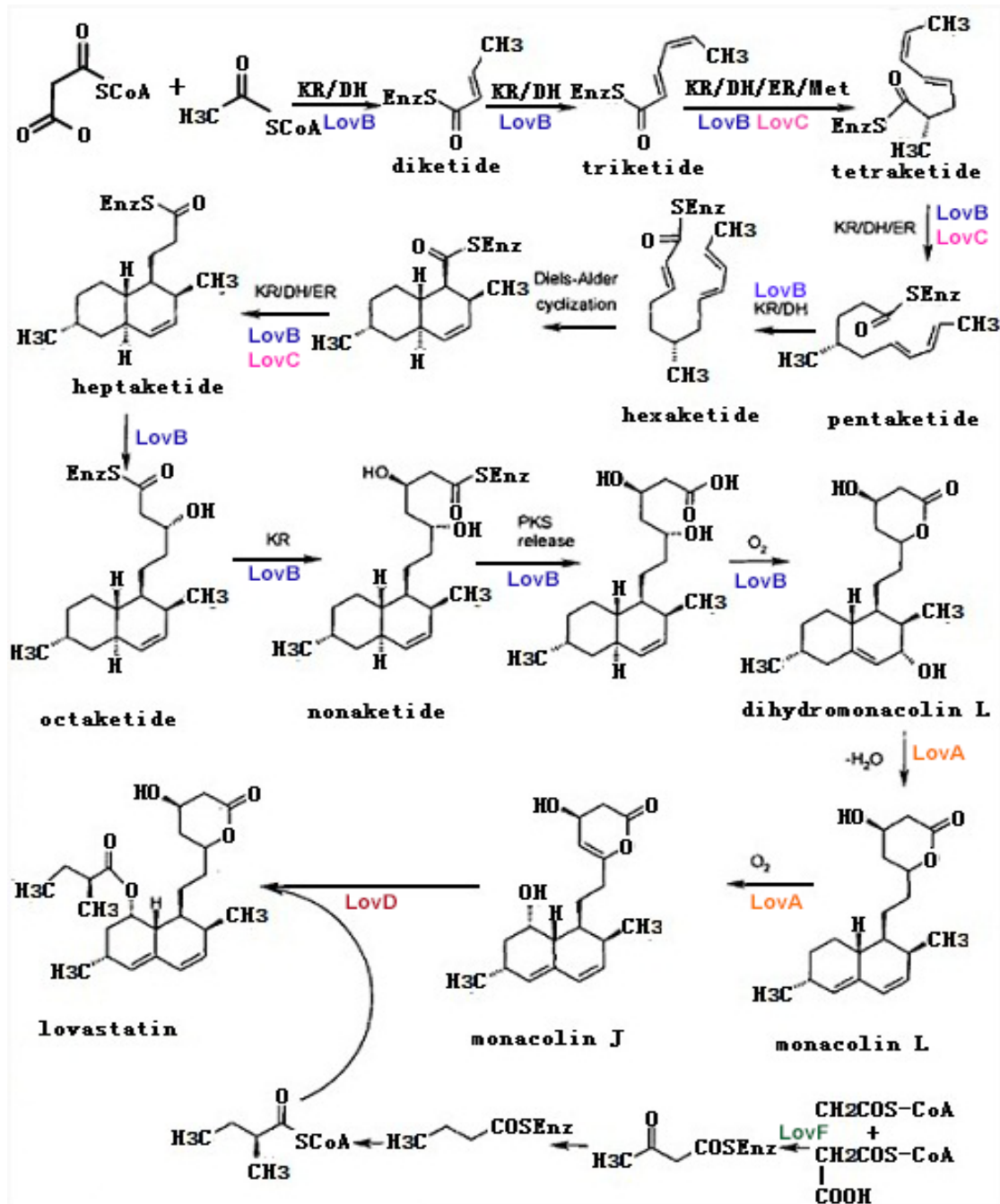
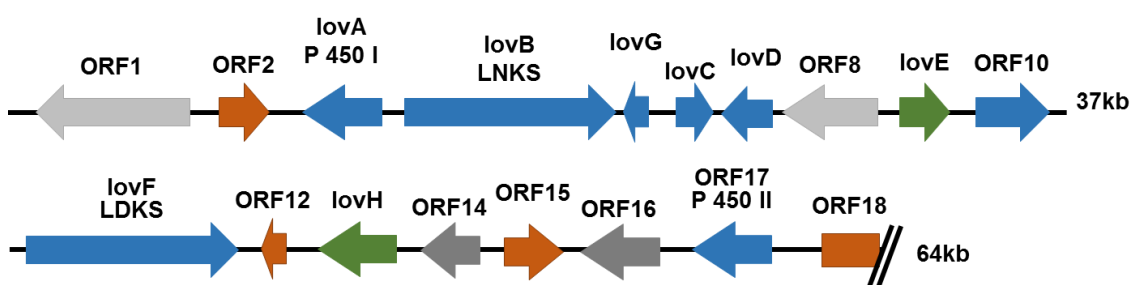


Figura 3. Via de biossíntese de lovastatina evidenciando o gene envolvido em cada reação.

Ao longo dos anos foram realizados vários estudos genômicos para tentar descobrir quais genes codificam proteínas envolvidas na via metabólica de produção de lovastatina. O primeiro gene da via a ser descoberto foi o gene *lovB*, que codificava uma tiol policetídeo sintase e que posteriormente foi denominada como Lovastatina Nanocetídeo Sintase (LDKS) (KENNEDY et al., 1999; VINCI et al., 1991). Após a identificação da LDKS, ela foi utilizada como sonda gênica para o isolamento de outros fragmentos de DNA de *A. terreus* na cepa ATCC20542, e comparando as sequências com o genoma de mutantes, foi possível identificar 18 genes organizados em um cluster gênico totalizando 65 kb (KENNEDY et al., 1999) (Figura 4).



Fonte: Mulder et al., 2015

**Figura 4.** Cluster gênico de produção de lovastatina. Em cinza estão os genes que codificam possivelmente proteínas envolvidas com o mecanismo de resistência e transporte de lovastatina, em laranja genes com função ainda desconhecida, em azul, genes que codificam enzimas que atuam diretamente na via, em verde genes que codificam fatores de regulação.

Outros estudos também contribuíram para a identificação da função dos genes do cluster de lovastatina (Hendrickson e colaboradores 1999). Nesse estudo, mutações randômicas na cepa de *A. terreus* ATCC20542, resultaram no isolamento de mutantes com alterações na sequência de genes envolvidos na via de biossíntese de lovastatina. Dentre os mutantes foi identificado o mutante BX102 que não apresentou produção de lovastatina, bem como nenhum intermediário. Entretanto, quando se adicionava monacolina J ao meio de cultura contendo o mutante BX102, a produção de lovastatina era reestabelecida, indicando que a partir do ponto de produção de monacolina J, o restante da via estava intacta. Dessa forma foi concluído que o mutante BX102 possuía mutação no gene responsável pela parte responsável pela síntese do nanocetídeo ou dicetídeo, permitindo assim a identificação de mais uma PKS participante dessa via: a Lovastatina Nonacetídeo Sintase (LNKS), que junto com a Lovastatina Dicitídeo Sintase (LDKS) são essenciais na síntese de lovastatina (HENDRICKSON et al., 1999).

Além das PKSs identificadas, foi comprovado que os genes *lovC*, que codifica uma enoil redutase (KENNEDY et al., 1999) e *lovG*, que codifica uma esterase multifuncional (XU et al., 2013) também estão envolvidas na síntese de Dihidromonacolina J. A LDKS, codificada pelo gene *lovF*, é responsável pela síntese de 2-metilbutiril-CoA redutase (Figura 3) (HENDRICKSON et al., 1999; KENNEDY et al., 1999). A última reação da via é catalisada por uma transesterase, codificada pelo gene *lovD*, responsável pela ligação de monacolina J e 2 metilbutiril-CoA, resultando na lovastatina (Figura 3) (HENDRICKSON et al., 1999; KENNEDY et al., 1999).

Outros estudos tiveram como objetivo elucidar a função dos demais genes presentes no cluster de 65 kb (HENDRICKSON et al., 1999; KENNEDY et al., 1999; SORENSEN et al., 2003). A Tabela 2 lista todas as ORFs que compõem o cluster de produção de lovastatina bem como sua função descrita ou predita.

**Tabela 2** Genes que compõem o cluster envolvido na produção de lovastatina e suas funções.

<b>Gene</b>	<b>Função</b>	<b>Referências</b>
<b>ORF1</b>	Esterase que atua na ligação de éster com atividade carboxilesterase	Kennedy et al., 1999 Subazini e Kumar (2011)
<b>ORF2</b>	Proteína de membrana ligada ao mecanismo de glicosilação	Kennedy et al., 1999 Subazini e Kumar (2011)
<b>lovA</b>	Genes do CYP-P450	Sorensen et al., 2003
<b>lovB</b>	Lovastatina Nonacetídeo Sintase (LNKS)	Vinci et al., 1998 Kennedy et al., 1999 Hendrickson et al., 1999
<b>lovG</b>	Esterase Multifuncional	Xu et al., 2013
<b>lovC</b>	Enoil redutase	Kennedy et al., 1999 Burr et al., 2007
<b>lovD</b>	Transesterase	Xie et al., 2006
<b>ORF8</b>	Gene de Resistência	Kennedy et al., 1999 Subazini e Kumar (2011)
<b>lovE</b>	Fator de Transcrição (Genes regulatórios)	Kennedy et al., 1999
<b>ORF10</b>	Gene Transportador	Kennedy et al., 1999

		Subazini e Kumar (2011)
		Xie et al., 2006
<i>lovF</i>	Lovastatina Dicitídeo Sintase (LDKS)	Kennedy et al., 1999 Hendrickson et al., 1999
<b>ORF12</b>	Enzima envolvida na atividade de tiolase	Subazini e Kumar (2011)
<i>lovH</i>	Fator de Transcrição (Genes regulatórios)	Kennedy et al., 1999
<b>ORF14</b>	Envolvido na troca citrato-H + / malato. Fornece uma fonte de carbono para biossíntese de ácidos graxos e esteróis e NAD + para a via glicolítica.	Kennedy et al., 1999 Subazini e Kumar (2011)
<b>ORF15</b>	Cis-aconitato Descarboxilase	Kennedy et al., 1999 Subazini e Kumar (2011)
<b>ORF16</b>	Genes Transportadores	Kennedy et al., 1999 Subazini e Kumar (2011)
<b>ORF17</b>	CYP-P450	Kennedy et al., 1999 Subazini e Kumar (2011)
<b>ORF18</b>	Glicosidase da família 67 n-terminal	Kennedy et al., 1999 Subazini e Kumar (2011)

Sendo assim, foram identificados genes essenciais para a produção de lovastatina: *lovB*, *lovA*, *lovC*, *lovD*, *lovF* e *lovG* confirmadas por experimento de desrupção gênica (HUTCHINSON et al., 2000). Outros genes do cluster tiveram sua função descrita, como *lovE* e *lovH*, que codificam proteínas com o motivo *Zinc finger* (Dedos de Zinco), conhecido por ser característico de fator de transcrição em eucariotos (KENNEDY et al., 1999). Foi evidenciado que em clones mutantes para o gene *lovE* e *lovH* não havia produção de nenhum intermediário da via biossintética de lovastatina, mas quando se adicionava cópias do gene *lovE* em uma cepa selvagem produtora de lovastatina, a produção de lovastatina aumentava entre sete e dez vezes, entretanto ainda não se está claro o porquê de haver dois genes que codifiquem para um fator de

transcrição, sendo que normalmente os clusters utilizam somente um (KELLER; HOHN, 1997; KENNEDY et al., 1999).

As demais ORFs, tiveram suas funções supostas a partir de análises de sequência, comparando com bancos de dados e realizando predição de estrutura funcional das proteínas codificadas pela sequência de nucleotídeos *in silico* (SUBAZINI E KUMAR, 2011). Como a ORF15, que segundo a análise de sua sequência, codifica a ácido cis-aconítico descarboxilase, enzima envolvida na produção de ácido itacônico, indicando que a produção desses dois metabólitos pode estar relacionada (SUBAZINI; KUMAR, 2011).

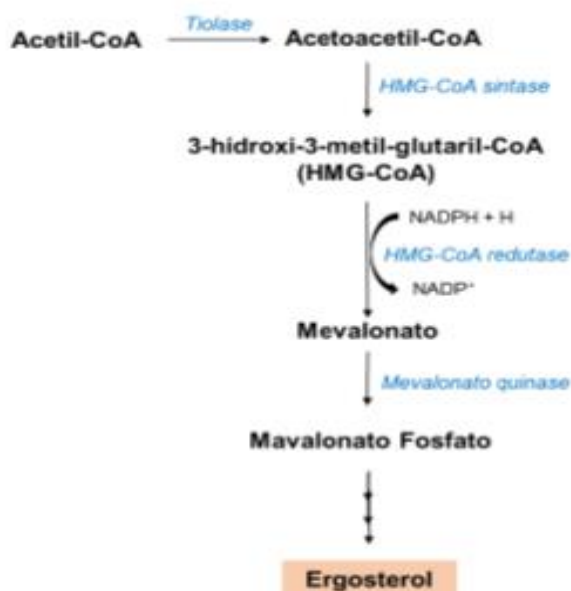
Um trabalho realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa da Universidade de Brasília, tendo como objetivo a prospecção de novas cepas produtoras de lovastatina e a comparação genômica entre elas, analisou 35 isolados brasileiros quanto a produção de lovastatina, encontrando uma cepa, isolada no Brasil, com produção considerável de lovastatina (MULINARI, 2016). Foram selecionadas 7 cepas, das 35 cepas analisadas, para terem seus genomas sequenciados e comparados com a cepa referência de *A. terreus* ATCC20542. Foi observado que as diferenças nos níveis de produção de lovastatina observadas estão relacionadas diretamente com a organização do cluster de produção de lovastatina das cepas (MULINARI, 2016). Comparando esses genomas foi possível identificar dois possíveis alvos para estudo, afim de melhorar a produção de lovastatina, a ORF8 e a ORF10, cujas funções ainda não foram confirmadas experimentalmente (MULINARI, 2016).

#### 1.4. ORF8

A ORF8 foi descrita primeiramente como um gene de resistência à lovastatina quando o cluster de produção de lovastatina foi descrito (KENNEDY et al., 1999). Posteriormente, novas análises genômicas comparando a sequência da ORF8 com bancos de dados mostraram que se trata de uma HMG-CoA redutase (SUBAZINI; KUMAR, 2011). A HMG-CoA redutase é uma enzima que catalisa a reação onde a molécula de HMG-CoA é reduzida a mevalonato, sendo um dos principais passos de regulação da síntese de colesterol e animais e ergosterol em fungos (Figura 5) (FRIESEN; RODWELL, 2004; YASMIN et al., 2012). Em fungos, o ergosterol está envolvido em diversas funções biológicas como regulação da fluidez da membrana

plasmática, distribuição de proteínas pela membrana e também no controle do ciclo celular (SONG et al., 2016).

Pela importância do ergosterol e pelo fato da HMG-CoA redutase ser o um dos principais pontos de regulação da via, sendo inibido por estatinas, a atividade antifúngica desempenhada pela lovastatina vem sendo estudada. Esses estudos vêm demonstrando a redução do crescimento em leveduras como *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae* (LORENZ; PARKS, 1990; NYILASI et al., 2010). Diferentemente de algumas espécies de fungo filamentosos, como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger* apresentam resistência às estatinas (QIAO et al., 2007).



Fonte: Adaptado de (Yasmin et al., 2012)

**Figura 5.** Via de biossíntese de Ergosterol em fungo filamentosos.

Análises genômicas da cepa *A. terreus* ATCC20542, tendo como base o genoma depositado da cepa NHI2624, indicam que ela possui duas cópias gênicas de HMG-CoA redutase em seu genoma localizada fora do cluster de produção de lovastatina e uma dentro do cluster de lovastatina, a ORF8 (MULINARI, 2016). A partir do alinhamento entre as sequências da porção ligante das duas enzimas que estão fora do cluster de produção de lovastatina (ATEG\_02145 e ATEG\_09520); a ORF8 e a HMG-CoA redutase humana (ATEG\_09965), mostrou que a similaridade entre a ORF 8 e as enzimas de fora do cluster é de 69% para a ATEG\_02145 e 57% para a ATEG\_09520 e

para a HMG-CoA redutase humana a similaridade é de 62% (MULINARI, 2016). Esse alinhamento mostrou duas alterações de resíduos de aminoácido, a primeira na posição 683, onde a alteração de uma valina por uma leucina e na posição 853, onde foi substituído uma leucina por uma treonina. Essas alterações podem alterar as características do sítio de ligação da lovastatina na porção catalítica da HMG-CoA redutase, podendo significar que a enzima codificada pela ORF8 poderia apresentar a falta de inibição pela lovastatina (MULINARI, 2016). O que leva a questionar o motivo de haver uma cópia da HMG-CoA redutase dentro do cluster lovastatina, sendo essa enzima inibida por esse metabólito.

As HMG-CoA redutase são divididas em duas classes de enzima. As de classe I estão presentes em eucariotos e em algumas Archeas, já as de classe II estão presentes em eubactérias como *Pseudomonas mevalinii* e outras Archeas (FRIESEN; RODWELL, 2004). Estruturalmente as enzimas de classe I se diferenciam das de classe II por apresentarem três domínios, um catalítico, um ligante e um de ancoragem; sendo que as enzimas de classe II possuem apenas o domínio catalítico (ISTVAN et al., 2000).

A HMG-CoA redutase é uma enzima de grande importância clínica por ser o principal ponto de controle de colesterol em humanos e um dos principais alvos para o desenvolvimento de antibióticos que inibam o crescimento de leveduras como *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Por essa razão, as enzimas humana e de alguns microrganismos são bem caracterizadas. Em um estudo para a elucidação da estrutura tridimensional da porção catalítica foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , no qual a proteína tinha 50 kDa (ISTVAN et al., 2000). Outro trabalho, só que dessa vez visando a avaliação da porção catalítica da HMG-CoA redutase de hamster como mutações pontuais também utilizou *E. coli* para expressar a enzima e caracterizar cada mutante quanto aos seus parâmetros cinéticos (FRIMPONG; RODWELL, 1994). Outro estudo avaliando a HMG-CoA redutase de *Haloferax volcanii* também utilizou uma cepa de *E. coli* para expressar, purificar e caracterizar a enzima (BISCHOFF; RODWELL, 1996). Em um estudo com HMG-CoA redutase de classe II proveniente de *Pseudomonas mevalonii* teve como objetivo determinar a estrutura, por cristalização. Com isso, poderiam entender como se dá a interação da lovastatina com o sítio ativo da enzima. A partir desses dados, poderiam ser desenhados novos inibidores específicos para HMG-CoA redutase de classe II, para serem utilizados como antibióticos (TABERNERO; RODWELL; STAUFFACHER, 2003).

## 1.5. ORF10

Uma outra ORF sem função elucidada até o presente momento é a ORF10. Análises de sequência mostraram que essa possui 70% de similaridade com transportador de compactina (ABE et al., 2002a). A sequência gênica da ORF10 prediz uma proteína com domínios transmembrânicos, o que reforça a hipótese dessa se tratar de um transportador (SUBAZINI E KUMAR, 2011). Em fungos, quase metades dos genes que codificam transportadores estão agrupados em duas superfamílias: a ABC (*ATP-binding cassette transportes*), transportadores, que necessitam da ligação de ATP, e a MSF (*Major Facilitator Superfamily*), que são associadas ao transporte de metabólitos secundários, à resistência a compostos tóxicos naturais e a antifúngicos (COLEMAN; MYLONAKIS, 2009).

Em clusters de produção de metabólitos secundários ainda é pouco compreendido como os transportadores MSF são transcritos. Aparentemente, esses transportadores não são regulados pelo mesmo fatores de transcrição que regulam a transcrição do cluster de produção do metabólito, sendo a transcrição desses transportadores induzida pelo acúmulo do metabólito produzido pelo cluster (COLEMAN; MYLONAKIS, 2009). A sequência de aminoácidos do transportador de aflatoxina, AFLT, caracterizado em *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, mostrou ter similaridade de 41% com a ORF10 pertencente ao cluster de produção de lovastatina. A ORF10 também é similar a outros transportadores da família MSF, como o MlcE do cluster de produção de compactina de *Penicillium citrinum*, apresentando a mesma similaridade de 41% (CHANG; YU; YU, 2004). Adicionalmente, a lovastatina pode ser prejudicial ao fungo, quando em grande quantidade no micélio, podendo inibir a síntese de ergosterol e por conta de características da sequência da ORF10 serem semelhante a transportadores. Assim, esse trabalho se propôs a testar a hipótese de que essa ORF10 codifique um transportador de lovastatina

## 2. OBJETIVO

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcionalmente a ORF8, avaliando a cinética da enzima que ela codifica e a ORF10, avaliando o impacto de sua deleção na produção de lovastatina de *A. terreus*.



## 2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Expressar a ORF8 em cepas de *Escherichia coli* utilizando o plasmídeo sintetizado quimicamente, tendo como vetor de expressão o pET28a;
- Construir um plasmídeo para expressão heteróloga da ORF8 em *Saccharomyces cerevisiae*;
- Transformar e expressar esse plasmídeo em *Saccharomyces cerevisiae*;
- Analisar a cinética da enzima codificada pela ORF8, tanto na presença do seu substrato como também na presença de lovastatina como inibidor para determinar  $K_m$ ,  $V_{max}$  e  $K_i$ ;
- Deletar a ORF10 na cepa de *Aspergillus terreus* ATCC20542 utilizando o cassete de deleção construído, tendo como marca de seleção o gene de resistência à higromicina;
- Realizar a avaliação de transformantes resistentes à higromicina quanto a deleção gênica, produção e secreção de lovastatina.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. MATERIAIS

#### 3.1.1. Cepas utilizadas

A Tabela 3 lista os principais microrganismos utilizados nesse trabalho.

**Tabela 3** Relação de microrganismos e cepas utilizados

Microrganismo	Cepa	Genótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i>	XL10-Gold	Tetr $\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrCB-hsdSMRmrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Sigma
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1	MCLAB Molecular Cloning Laboratories
<i>Escherichia coli</i>	BL21DE3	F- ompT hsdSB (rBmB-) gal dcm (DE3)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	BL21DE3 pLysS	F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, $\lambda$ (DE3), pLysS, Cmr	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	BL21DE3	F - ompT hsdSB(rB - mB - )	Invetrigen

	pLysE	gal dcm (DE3) pLysE (CmR )	
<i>Aspergillus terreus</i>	ATCC20542		American Type Culture Collection

### 3.1.2. Meios de Cultivo

- **BDA (Batata Dextrose Ágar)**

BDA (Dinâmica) 39 g/L

- **Meio Definido para produção de Lovastatina**

O meio definido foi descrito por Pecyna e Bizukojc (2011).

#### Fontes de Nitrogênio

Extrato de Levedura	4 g
Dihidrofosfato de Potássio	1,51 g
Sulfato de Magnásio	0,52 g
Cloreto de Sódio	0,4 mL
Sulfato de Zinco	1 mg
Cloreto Férrico	2 mg
Elementos Traços	1 mL

Todos os elementos foram dissolvidos em água destilada e o volume ajustado para 800 mL.

#### Fonte de Carbono

Lactose 20 g

A lactose foi diluída em água destilada e o volume ajustado para 200 mL. Depois de estéreis, a fonte de carbono foi adicionada à fonte de nitrogênio, totalizando 1 L de meio.

- **Elementos Traço**

Biotina	4 mg
Borato de sódio	10 mg
Cloreto de Manganês	5 mg
Molibdato de Sódio	5 mg
Sulfato de Cobre	25 mg

Os elementos traços foram diluídos em água destilada em o volume ajustado para 100 mL, para ser uma solução estoque utilizado nos meios de cultivo em que for necessário.

- **YG**

Extrato de Levedura	5 g
Glicose	20 g
Elementos Traços	1 mL

Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada e o volume ajustado para 1 L. Para o meio sólido foi adicionado 17 g/L de ágar bacteriológico. No caso do meio de recuperação após a transformação, foi adicionado 44 g de cloreto de potássio como estabilizador osmótico.

- **Meio LB (Lúria Bertani)**

Peptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
Cloreto de Sódio	5 g

Forma diluídos em água destilada e o pH ajustado para 7,0, então o volume ajustado para 1 L. Em caso de meio sólido foi adicionado 15 g de Ágar bacteriológico.

### 3.1.3. Soluções Para Extração de DNA

- **Tampão de Extração**

Tris 100 mM, pH 8,0  
 Cloreto de Sódio 1,4 M  
 EDTA 20 mM, pH 8,0  
 0,2 (v/v) β-Mercaptoetanol

Após esterilização foi adicionado imediatamente 2% de PVP (Polivinil-pirrolidona) e 2% de CTAB.

- **Solução de Lavagem**

Acetato de Amônio 10mM  
 Etanol 70%

- **Tampão TE**

Tris 10 mM, pH 8,0  
 EDTA 1 mM

### 3.1.4. Soluções para SDS-PAGE

- **Tris-HCl 1M, pH 6,8**

Tris-base 1 M  
SDS 0,4%

Ajustou-se o pH para 8,8 utilizando HCl e completou o volume para 400 mL.

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

Tris-base 1,5 M  
SDS 0,4%

Ajustou-se o pH para 8,8 utilizando HCl e completou o volume para 400 mL.

- **Persulfato de Amônio 10%**

Persulfato de Amônia	0,1 g
Água destilada	1 mL

- **Tampão de Corrida 10x**

Tris-base	30,2 g
Glicerol	144,2 g
SDS	10 g

Os reagentes foram dissolvidos em água deionizada e o pH foi ajustado para 8,3; depois o volume foi ajustado para 1 L

- **Solução de Bis-acrilamida/Acrilamida 30%**

Acrilamida	29 g
Bis-acrilamida	1 g
Água destilada	100 mL

- **Solução Corante**

Azul de Coomassie	3 g
Ácido Acético	100 mL
Metanol	500 mL
Água destilada	Completar o volume para 1L

- **Solução Descorante**

Ácido Acético	72,68 g
Metanol	1,6 g
Água destilada	Completar o volume para 1L

- **Tampão de carregamento de proteína**

Tris-HCl 1M, pH 6,8	2 mL
SDS 10%	4 mL
B-Mercaptoetanol	2 mL
Glicerol	2 mL
Azul de Bromofenol	0,01 g

- **Tampão de lise**

Tris 50 mM  
EDTA 1 mM  
PMSF 1 mM

### **3.1.5. Soluções para transformação de fungo filamentoso utilizando PEG**

- **Solução A**

Sulfato de Amônio 0,8 M  
Ácido Cítrico 100 mM pH 6,0

- **Solução B**

Extrato de Levedura 1%  
Sacarose 2%

- **Solução C**

Sulfato de Amônio 0,4 M  
Sacarose 1%  
Ácido Cítrico 50 mM

- **Solução D**

PEG 6000 25%  
KCl 0,6 M  
CaCl<sub>2</sub> 100 mM  
Tris-HCl 10 mM pH 7,5

- **Solução E**

KCl 06 M  
CaCl<sub>2</sub> 50 mM  
MES 10 mM pH 6,0

### **3.1.6. Soluções para transformação por biobalística**

- **Solução salina 0,9%**

NaCl 0,9 % (p/v)

Esterilizada em autoclave.

- **Etanol 70%**

Etanol 70 % (v/v)

- **Glicerol 50%**

Glicerol 50 % (v/v)

- **CaCl<sub>2</sub> 2,5M**

CaCl<sub>2</sub> 27,74% (p/v)

### 3.1.7. Outras soluções e tampões

- **TBE 10X**

Tris Base	10,78% (p/v)
EDTA	0,58% (p/v)
Ácido Bórico	0,55% (p/v)

- **Brometo de Etídeo**

Brometo de Etídeo 10 mg/mL

- **Antibióticos**

Hgromicina	50 mg/mL
Ampicilina	100 mg/mL
Kanamicina	50 mg/mL

- **Tampão de PCR IB (Phoneutria) 10 X**

Cloreto de Potássio	500 mM
Tris-HCl pH 8,4	100 mM
Triton X-100	1% (v/v)

- **Tampão de Ligação (Thermo Fisher Scientific ®) 10X**

Tris-HCl	400 mM
Cloreto de Magnésio	100 mM
DTT	100 mM
ATP	5 mM
pH 7,8	

- **Tampão de PCR para Taq Platinum (Thermo Fisher Scientific ®)**

Tris-HCL 200 mM, pH 8,4

KCl 500 mM

- **Cloreto de Magnésio (Thermo Fisher Scientific ®)**

Cloreto de Magnésio      50 mM

- **Marcador Molecular para DNA**

Marcador molecular para DNA Ladder 1Kb Plus da Invitrogen.

- **Marcador Molecular para Proteína**

Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Xtra Standards da Bio Rad.

### 3.1.8. Kits

- Purificação de produto de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) - GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific).
- Extração de DNA plasmidial de bactérias - GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific).
- Purificação de DNA a partir de gel de agarose - GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific).

### 3.1.9. Enzimas Utilizadas

Foram utilizadas as seguintes enzimas:

- T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific)
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific)
- Taq DNA Polimerase pht (Phoneutria)
- Platinum® Taq DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific)

Também foram utilizadas as seguintes enzimas de restrição dispostas na tabela

3.

**Tabela 4** Enzimas de restrição utilizadas nesse trabalho

<b>Enzima</b>	<b>Tampão</b>	<b>Sítio de Restrição</b>	<b>Temperatura</b>
Hind III	Fast Digest Green	A↓AGCTT	37 °C
Xba I	Fast Digest Green	T↓CTAGA	37 °C

### 3.1.10. Vetores

Os vetores utilizados nesse trabalho encontram-se dispostos na Tabela 5 e seus respectivos mapas encontram-se no ANEXO I.

**Tabela 5** Vetores utilizados nesse trabalho.

<b>Vetor</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
<b>p_Silent</b>	Plasmídeo utilizado para silenciamento gênico em fungos, possuindo o promotor <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> .	(NAKAYASHIKI et al., 2005)
<b>p416 TEF</b>	Plasmídeo para expressão heteróloga em <i>S. cerevisiae</i> , possui o promotor TEF e marca de seleção auxotrófica URA3.	(MUMBERG; MÜLLER; FUNK, 1995)
<b>GS57875 pET28a-HMG_ORF8</b>	Plasmídeo artificialmente sintetizado para expressão da ORF8, utilizando o vetor pET28a para expressão em <i>E. coli</i> .	Este trabalho.

### 3.1.11. Oligonucleotídeos Iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse trabalho estão dispostos na tabela 6.

**Tabela 6** Relação de oligonucleotídeos utilizados, com suas respectivas temperaturas de anelamento e sítios de restrição inseridos.

	<b>Sequência</b>	<b>Temperatura de Anelamento</b>	<b>Sítio de ligação da enzima de restrição</b>
<b>Frag_5'_F</b>	CGGTACCACAGACA GCTTAGGCGC	64-66 °C	
<b>Frag_5'_R</b>	CGCGGTGGAGCTCC ATACAATGGCGATT TGGCTTA	64 °C	
<b>Frag_3'_F</b>	ATCCCCCGGGCTGCA CGTAAAACAGGCTA TTACGT	64 °C	
<b>Frag_3'_R</b>	CCCACTACCAAGA CGGGCTGCTTCAT	64-66 °C	
<b>HGR_Frag5'</b>	TAAGCCAAATCGCC ATTGTATGGAGCTC CACCGCG	68,6 °C	



<b>HGR_Frag3'</b>	<b>ACGTAATAGCCTGT</b> <b>TTTACGTGCAGCCC</b> <b>GGGGGAT</b>	68,6 °C	
<b>Conf_F</b>	<b>GGGGTCGGGTGGTCT</b> <b>ACT</b>	58,8 °C	
<b>Conf_R</b>	<b>GAGTATGACGGACG</b> <b>CGGG</b>	58 °C	
<b>HGR_3'-5'</b>	<b>GCCGATGCAAAGTG</b> <b>CCG</b>	58 °C	
<b>HGR_5'-3'</b>	<b>CGGGCGTATATGCTC</b> <b>CGC</b>	58,8 °C	
<b>ORF8_Foward</b>	<b>AAAGCTTATCTCAGT</b> <b>GGTG</b>	49 °C	HindIII
<b>ORF8_Reverse</b>	<b>CCTCTAGAAATAATT</b> <b>TTGTTTAACTTTA</b>	49 °C	XbaI

## 3.2.METODOLOGIA

### 3.2.1. Clonagem e Expressão da ORF8 em *Escherichia coli*

#### 3.2.1.1. Preparação de células termocompetentes

As células termocompetentes foram preparadas como descrito em Sambrook e colaboradores (2001). A partir de uma placa com colônias de *E. coli*, foi selecionada uma colônia isolada e inoculada em 5 mL de meio LB, que foi cultivado a 37 °C e 200 rpm por no máximo 16 horas.

A partir desse cultivo, foi inoculado 1mL pré-inóculo em 30 mL de meio LB, que foi novamente incubado a 37 °C e 200 rpm, até atingir uma OD (densidade ótica) de 0,3. Após isso, o inóculo foi resfriado (no gelo) por 15 minutos e em seguida centrifugado a 5000 xg por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi resuspendido em 10 mL de cloreto de cálcio 100 mM estéril e incubado no gelo por mais 15 minutos e centrifugado novamente por 10 minutos a 5000 xg a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de cloreto de cálcio 100 mM com 15% de glicerol estéril. Então as células foram

alíquotados em tubos contendo 100 µL de células e armazenadas em ultra freezer (-80 °C).

#### *3.2.1.2. Transformação de células termocompetentes*

O protocolo de transformação de células termocompetente utilizado foi o descrito por Sambrook e colaboradores (2001). As células competentes que estavam armazenadas em ultra freezer (-80 °C) foram descongeladas gradativamente (no gelo) e, em seguida, foi distribuído 50 µL de células em tubo estéril e adicionado 1 µg de DNA do plasmídeo GS57875 pET28a-HMG\_ORF8, foi utilizado como controle de seleção células sem adição do plasmídeo. Misturou-se lentamente utilizando-se a ponta da ponteira. As amostras foram, então, incubadas no gelo por 30 minutos. Em seguida foi dado um choque térmico, colocando primeiramente a 42 °C por 30 segundos e imediatamente depois incubadas no gelo novamente por 2 minutos. Foram adicionados 250 µL de meio LB líquido pré-aquecido a 37 °C e, em seguida, as amostras foram incubadas sob agitação de 200 rpm, por 1 hora a 37 °C para recuperação. As células foram então plaqueadas nos volumes de 20, 50 e 200 µL em placas de meio LB ágar com canamicina 50µg/mL e incubadas em estufa por 16 horas a 37° C.

#### *3.2.1.3. Teste de Expressão em E. coli*

Foi realizado um pré-inóculo com as colônias selecionadas em 5 mL de meio LB líquido com canamicina 50µg/mL e mantido sob agitação de 200 rpm. A partir desse pré-inóculo foi realizado um inóculo com OD de 0,05 a 600nm e incubadas a 37 °C com agitação de 200 rpm. A OD foi monitorada até atingir 0,7, quando foi induzido com 1mM de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside).

Após a indução, foi retirada 1 mL a cada hora e a OD foi registrada. As amostras foram centrifugadas a 13400 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi armazenado a -80° C para posterior análise da expressão da proteína.

#### *3.2.1.4. Preparação de amostras para análise SDS-PAGE*

As amostras foram descongeladas e foi adicionado um volume de tampão de lise proporcional a quantidade de células determinada pela equação  $OD_1.V_1 = OD_2.V_2$ , onde:  $OD_1$  é a OD obtida no momento em que a amostra foi coletada;  $V_1$  é o volume

que foi coletado; OD<sub>2</sub> é igual a 7 e V2 é o volume de tampão que deverá ser adicionado. As amostras foram então sonicadas com amplitude de 50, com pulsos de 10 segundos a intervalos de 1,5 minutos, por um tempo total de 6 minutos.

Após sonicação para lise celular, as amostras foram centrifugadas a 4500 xg e o sobrenadante separado do precipitado. Esse procedimento foi utilizado para avaliar se a proteína não estaria sendo expressa em corpo de inclusão pela bactéria. Foi utilizado 20 µL do sobrenadante, e acrescido 20 µL de tampão de amostra, já as amostras precipitadas foram ressuspendidas em 20 µL de tampão de amostra. Todos os tubos foram fervidos a 100° C por 5 minutos, então foi aplicado 15 µL de cada amostra no gel de poliacrilamida 8% corado com azul de *Coomassie*.

As análises em gel de poliacrilamida foram realizadas como descrito em Sambrook e colaboradores (2001). Primeiramente foi preparado o gel separador 8% (Tabela 7) e vertido no conjunto de placas montados no suporte, segundo as instruções do fabricante (Bio-RAD), adicionando etanol 70% para facilitar a polimerização do gel. Após a polimerização do gel separador, o etanol 70% foi removido, em seguida foi preparado o gel concentrador 5% (Tabela 8), foi vertido no conjunto de placas sobre o gel separador. Os géis foram colocados na cuba de eletroforese e adicionado o tampão de corrida na concentração 1X. Após a aplicação das amostras, foi aplicada uma corrente de 100 V. Para a preparação das amostras para aplicação em gel foi separando 20 µL das amostras coletadas a cada momento do crescimento após a indução, acrescidas de mais 20 µL de tampão de carregamento de proteína, fervida por 5 minutos a 100 °C, depois aplicado 20 µL de cada amostra no gel.

**Tabela 7** Composição do gel separador 8% para o volume final de 5 mL de gel

<b>Água Destilada</b>	2,3 mL
<b>Tris-HCl 1,5 M pH 8,8</b>	1,4 mL
<b>Bis-acrilamida/Acrilamida 30%</b>	1,3 mL
<b>Persulfato de Amônio 10%</b>	0,05 mL
<b>TMED</b>	0,008 mL

**Tabela 8** Composição do gel concentrador 5%, para um volume final de 1 mL.

<b>Água Destilada</b>	2,3 mL
<b>Tris-HCl 1 M pH 6,8</b>	1,4 mL

<b>Bis-acrilamida/Acrilamida 30%</b>	1,3 mL
<b>Persulfato de Amônio 10%</b>	0,05 mL
<b>TMED</b>	0,008 mL

### 3.2.1.5. Clonagem da ORF8 no vetor de expressão em *Saccharomyces cerevisiae*

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da ORF8 a partir do plasmídeo GS57875 pET28a-HMG\_ORF8, sendo que o oligonucleotídeo iniciador ORF8\_Foward foi desenhado para adicionar o sítio para enzima de restrição HindIII, já o oligonucleotídeo iniciador ORF8\_Reverse foi desenhado para adicionar o sítio para enzima de restrição XbaI (Tabela 6)

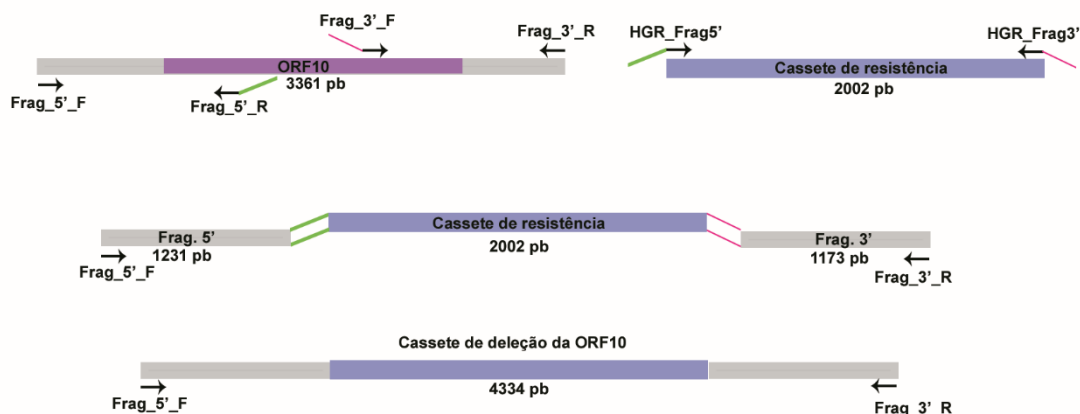
A reação de PCR continha tampão para PCR IB na concentração 1X; 0,2 mM de dNTP; 0,05 mM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1U de Taq Polimerase e 20 ng de DNA molde. O programa consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclo com desnaturação a 94 °C por 30 segundos; anelamento a 49 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos; com extensão final a 72 °C por mais 4 minutos. A amplificação foi analisada

Após a amplificação, o inserto e o vetor p416TEF foram tratados com as enzimas de restrição (Tabela 4) na concentração de 1U de enzima para 1 µg de DNA, seguindo as especificações do fabricante. Após o tratamento com enzimas de restrição, o vetor e o inserto foram purificados utilizando o kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), quantificados utilizando Qubit da Invitrogen e então ligados. A reação de ligação consistiu em três sistemas: 1:1, 1:2 e 1:3 (inserto:vetor), utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific) seguindo as especificações do fabricante. Do volume da reação de ligação, 5 µL foi utilizado para transformar a cepa de *E. coli* XL10 Gold, como descrito anteriormente.

#### 3.2.1. Construção do Cassete de Deleção da ORF10

O cassete de deleção foi montado como descrito em (KUWAYAMA, 2002; LEE, LEE, SHIN, & RYU, 2004) e ilustrado na figura 6. Primeiramente foram amplificados, por PCR, os fragmentos que seriam utilizados para recombinação homóloga do cassete, o fragmento 5' foi amplificada utilizando o OI Frag\_5'\_F e o Frag\_5'\_R (Tabela 6); o fragmento 3' foi amplificado por Frag\_3'\_F e Frag\_3'\_R (Tabela 6) e o cassete de resistência foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos HGR\_Frag5' e HGR\_Frag3' (Tabela 6), resultando em fragmentos com porções

complementares (Figura 6). Como a ORF10 possui 1626 pares de base, foram necessários utilizar 600 pares de base antes e depois da ORF10 para montar o cassete, uma vez que o evento de recombinação homóloga em fungos filamentosos só é eficiente com pelo menos um fragmento de 1Kb flanqueando o gene de resistência ao antibiótico (KUWAYAMA, 2002).



**Figura 6.** Ilustração esquemática da construção do cassete de deleção baseada em PCR. As regiões flanqueantes 5' e 3' foram amplificadas com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a sequência de interesse (Frag\_5'\_F; Frag\_5'\_R, Frag\_3'\_F e Frag\_3'\_R). Os oligonucleotídeos iniciadores da marca de seleção são complementares aos iniciadores Frag\_5'\_R e Frag\_3'\_F. As regiões de flanco 5' e 3' foram unidas ao cassete de resistência, formando o cassete de deleção, que é amplificado ao final pelos iniciadores mais externos (Frag\_5'\_F e Frag\_3'\_R).

As reações de PCR continham Tampão de PCR IB, na concentração 1X, 0,2 mM de dNTP, os oligonucleotídeos na concentração de 0,5 mM, 1U de Taq Polimerase e 20 ng de DNA. O programa utilizado no termociclador consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclo com desnaturação a 94 °C por 30 segundos; anelamento a 64 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos; com extensão final a 72 °C por mais 4 minutos. A amplificação dos fragmentos foi verificada por meio de gel de agarose 1%, com as bandas dos fragmentos 5', fragmento 3' e do cassete de resistência nos respectivos tamanhos: 1231pb, 1173pb e 1961pb.

Após a amplificação, os fragmentos do cassete foram purificados utilizando o kit de purificação de produtos de PCR, GeneJET PCR Purification Kit. Os fragmentos purificados foram utilizados em outra PCR para que fossem ligados e o cassete de deleção montado. A reação continha Tampão de PCR para Taq Platinum na concentração 1X; 0,2 mM de dNTP; 0,01 mM do oligonucleotídeo Frag\_5'\_F e 0,01 mM do oligonucleotídeo Frag\_3'\_R; 1U de Taq Platinum da Thermo Fisher Scientific

®; 1,5 mM de Cloreto de Magnésio e 20 ng do fragmento 5'; 20 ng do fragmento 3' e 20 ng do cassete de resistência. O programa consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclo com desnaturação a 94° C por 30 segundos; anelamento a 66 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos; com extensão final a 72 °C por mais 4 minutos. A ligação dos fragmentos foi verificada em gel de agarose 1%, com a banda de 4334 pb. Após a montagem, o cassete de deleção da ORF10 foi utilizado para transformar a cepa ATCC20542 de *A. terreus*.

### **3.2.2. Transformação de *Aspergillus terreus* por biobalística**

O protocolo de transformação de *A. terreus* foi realizado como descrito em Florencio e colaboradores (2018), com adaptações descritas a seguir.

#### *3.2.2.1. Preparação das placas*

Primeiramente foram preparadas placas contendo meio YAG com KCl, utilizado aqui como estabilizador osmótico, cobertas por uma membrana de celofane estéril para cada tiro a ser realizado. Foram preparadas placas com 6 µg/mL do antagonista da calmodulina *N*- (6-aminohexil) -5-cloro-1- naftalenossulfonamida (W7) pois esse inibe a recombinação não-homóloga, favorecendo assim a inserção do cassete de deleção no local correto. Também foram preparadas placas com meio YAG contendo higromicina na concentração de 700 µg/mL, sendo duas placas com antibiótico para cada tiro.

#### *3.2.2.2. Obtenção de conídios*

A cepa de *A. terreus* ATCC20542 foi cultivada em placas de petri contendo meio YAG por sete dias a 28° C. Após esse tempo as placas foram lavadas com água destilada com *Tween* 20 0,01% para coleta conídios e armazenados em tubos de microcentrífuga de 2 mL. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos. Em seguida os conídios foram lavados com 1 mL de solução salina, duas vezes.

Foi realizada a contagem dos conídios, que foram então ressuspensos em solução salina em uma concentração de  $2,5 \times 10^7 / \mu\text{L}$ . Em cada placa de YAG com KCl foram plaqueados 200 µL da solução de conídios exatamente no centro da placa, tomando o devido cuidado para que a solução não se espalhasse por toda a placa. Esperou-se, então, o tempo necessário para que a solução secasse.

### *3.2.2.3. Preparação das partículas de tungstênio com DNA precipitado*

Foram pesados 30 mg de partículas de tungstênio em um tubo de microcentrífuga e foi adicionado 1 mL de etanol 70%, misturado em vórtex por 20 minutos na velocidade 3 e, em seguida, centrifugado na velocidade máxima por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e depois adicionado 1 mL de água ultrapura e novamente misturado e centrifugado na velocidade máxima por mais 10 minutos. A lavagem foi efetuada mais duas vezes. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as partículas de tungstênio foram ressuspensas em 500 µL de glicerol 50% estéril para armazenagem em ultra freezer (-20 °C).

O tubo com as partículas de tungstênio foi colocado em banho sonicador para desfazer os grumos, por 7 minutos e em seguida misturado em vórtex em velocidade máxima por 2 minutos. Em um tubo estéril foram adicionados 50 µL de partículas estéreis, 5 µL de DNA (4 µg por placa), 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M e 20 µL de espermidina 0,1 M, exatamente nessa ordem e em seguida misturado em vórtex na velocidade 3 por 10 minutos e centrifugado na velocidade máxima por 10 segundos. O sobrenadante foi descartado e depois adicionado ao precipitado 150 µL de etanol absoluto e centrifugado novamente por 10 segundos na velocidade máxima da centrífuga, essa lavagem com etanol foi repetida mais duas vezes. Ao final da última lavagem, foi adicionado etanol absoluto em um volume múltiplo de 4 para cada tiro, depois o tubo foi passado três vezes pelo banho sonicador, para desfazer possíveis grumos, e imediatamente em seguida foi distribuído 4 µL da solução em cada disco com a membrana carreadora estéril. Em seguida os discos foram colocados em recipiente de transporte contendo sílica previamente fornada durante a noite, por 30 minutos.

### *3.2.2.4. Bombardeamento das placas*

As placas preparadas anteriormente com meio YAG e KCl com a membrana de celofane e os conídios foram utilizadas para o bombardeamento, onde foram testadas as distâncias de 6 mm e 9 mm do alvo, com pressão de gás Hélio de 1250 psi e pressão de vácuo de 27 mmHg. Após o bombardeamento, as placas foram incubadas a 28 °C por, no mínimo, 16 horas para recuperação. As placas contendo W7 foram primeiramente incubadas a 28° C por no máximo 4 horas, depois os conídios foram transferidos para placas contendo YAG suplementado com KCl para recuperação. Após o período de

recuperação, as placas foram lavadas com 1 mL de solução salina e os conídios obtidos foram semeados em placas com YAG e antibiótico de seleção (700µg/mL) e incubadas novamente por 15 dias em estufa a 28° C.

### **3.2.3. Transformação de fungo filamentoso utilizando PEG**

O protocolo de transformação foi como descrito por Tilburn e colaboradores (1983), com adaptações. Foi realizado um inóculo de  $10^7$  esporos em 50 mL de meio YA mais solução traço, incubados por 48 horas a 28 °C. Após esse tempo, os tubos germinativos foram coletados por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os tubos germinativos foram ressuspensos em 20 mL de Solução A, 20 mL de Solução B, 6,5 mL de Sulfato de Magnésio 1 M, 600 mg de Lallzyme MMX e 400 mg de BSA (Albumina Bovina Sérica) e incubados por 5 horas a 30° C, mantidos sob agitação a 120 rpm, para obtenção dos protoplastos.

Após o tempo de incubação, os protoplastos foram separados por centrifugação a 2000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante onde estavam os protoplastos foi transferido para um tubo de centrífuga de 50 mL novo e centrifugado novamente a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com Solução C gelada e centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm.

Depois da última lavagem o precipitado foi ressuspensado em 1 mL de Solução E, e incubadas no gelo por 10 minutos. Foi retirado 100 µL da solução de protoplastos e transferidos para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL novo e adicionou-se 10 µg de DNA, que foi misturado gentilmente e em seguida, adicionado 50 µL de Solução D, incubado no gelo por 20 minutos. Após esse tempo, foi adicionado mais 1 mL de Solução D e incubado em temperatura ambiente por mais 20 minutos. Em seguida toda a suspensão de protoplastos foi adicionada à 30 mL de meio YAG com KCl (44 g/L) e antibiótico de seleção, suplementado com solução traço a 40° C que foi plaqueado em placas contendo YAG com KCl (44 g/L) e antibiótico, suplementado com solução traço. As placas foram incubadas a 28° C por 15 dias.

### **3.2.4. Extração de DNA genômico de fungo filamentoso**

A extração de DNA genômico foi realizada como descrito por Michiels e colaboradores (2003). Primeiro as amostras foram cultivadas por 96 horas em meio líquido, após esse tempo, o micélio foi separado e macerado em almofariz de porcelana



com nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para tubos de centrifuga de 50 mL e adicionado 15 mL de Tampão de Extração, pré-aquecido, e incubados a 60° C por 1 hora.

Foram adicionados 15 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24/1), em seguida as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas por 5 minutos a 5000 xg a 20° C. A fase superior foi transferida para um tubo de centrífuga de 50 mL novo e foi repetida a extração com clorofórmio: álcool isoamílico mais duas vezes. Após a última extração, a fase superior foi transferida para um tubo novo e foi adicionado 2/3 do volume de isopropanol, então as amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante a noite para precipitação dos ácidos nucleicos. Após a precipitação as amostras foram centrifugadas a 4500 xg por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 15 mL de Solução de Lavagem e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente, então as amostras foram novamente centrifugadas a 3000 xg por 6 minutos e a lavagem foi repetida mais uma vez.

O precipitado foi ressuscitado em 1 mL de Tampão TE e adicionado RNase, incubando a 37° C por 30 minutos. Foi adicionado 1 mL de Fenol as amostras e depois agitadas vigorosamente, até formar uma emulsão, então foram centrifugadas por 5 minutos na velocidade máxima. A fase superior foi coletada e repetida a extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25/24/1) e com clorofórmio: álcool isoamílico (24/1).

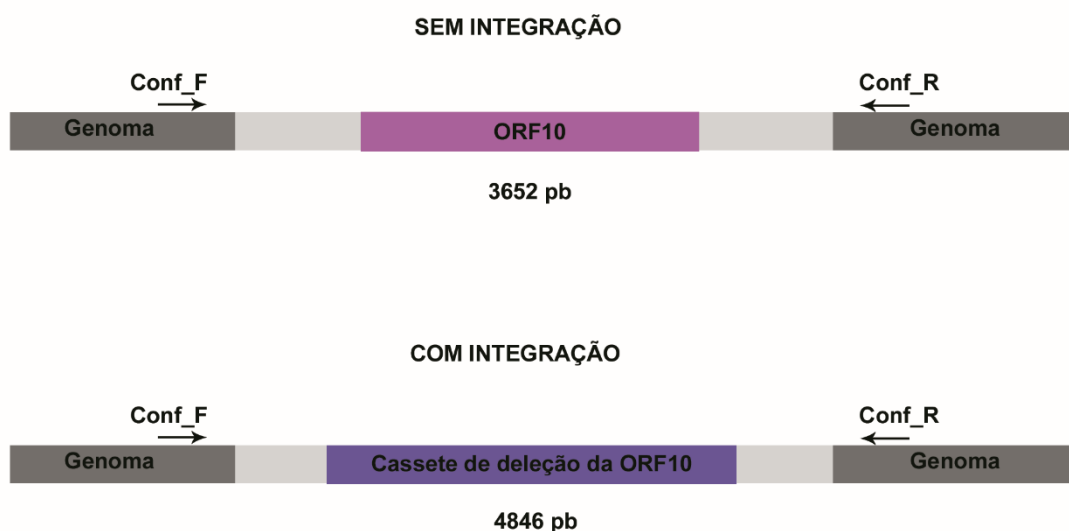
A fase superior foi novamente coletada e a ela adicionado acetato de amônio, pH 7,7 para uma concentração final de 2,5 M e dois volumes de Etanol gelado. As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas no gelo por pelo menos 15 minutos, em seguida foram centrifugadas em velocidade máxima, por 15 minutos a 4° C. Então o sobrenadante foi descartado e o DNA lavado duas vezes com Etanol 70%.

Após secas, as amostras foram ressuscitadas em 50 µL de água ultrapura DNase *free*, então foram analisadas em gel de agarose 1% para verificar se não houve degradação e foram quantificadas em Qubit (Invitrogen).

### **3.2.5. Confirmação genômica da deleção da ORF10**

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para a confirmação da deleção (Tabela 6). Esses oligonucleotídeos (Conf\_F e Conf\_R) deveriam anelar em uma região genômica um pouco antes e depois da região em que o cassete deveria integrar (Figura

7). Assim, com a integração correta do cassete de deleção seria observada uma banda no tamanho de 4846 pb, já em caso de não haver integração a banda observada estaria na altura de 3652 pb, como ilustrado na figura 6.



**Figura 7.** Ilustração esquemática da estratégia de confirmação da deleção da ORF10. Os oligonucleotídeos iniciadores (Conf\_F e Conf\_R) foram desenhados para anelarem no genoma do *A. terreus* em uma região antes e depois de onde o cassete de deleção deveria integrar. Caso não houvesse integração do cassete de deleção, o tamanho do fragmento esperado seria de 3652 pb. No caso da integração correta do cassete de deleção, o fragmento esperado seria de 4846 pb.

### 3.2.6. Avaliação de clones resistentes à higromicina

#### 3.2.6.1. Crescimento

Primeiramente os clones de *A. terreus* obtidos foram cultivados em 50 mL de meio definido para produção de lovastatina por 48 horas a 28° C com agitação de 180 rpm, a partir desse cultivo, foi realizado o inóculo em 50 mL do mesmo meio de cultivo, com 0,05 g/L de células e então incubados a 28° C por 120 horas com agitação constante de 180 rpm. Para a cepa selvagem o antibiótico utilizado no cultivo foi a Ampicilina (100 µg/mL) e para os clones foi usada Higromicina (700 µg/mL). O cultivo foi realizado em replicatas biológicas.

#### 3.2.6.2. Determinação de biomassa

Primeiro, membranas de nitrocelulose foram secas no micro-ondas por aproximadamente 5 minutos e em seguida foram pesadas para obtenção da massa inicial ( $M_i$ ). Foi coletado 5 mL do caldo de cultivo de cada crescimento, que foi filtrado por

meio de um sistema a vácuo, então as membras foram novamente secas e pesadas para obtenção da massa final ( $M_f$ ).

O peso seco ( $P_s$ ) foi determinado pela fórmula  $P_s = M_f - M_i$ . A concentração do inoculo é dada pela multiplicação de  $P_s$  por 200 ( $C = P_s * 200$ ). A partir da concentração obtida, foi possível determinar o volume de inoculo a partir da fórmula:  $v = 2,5 / (C - 0,05)$ , onde  $v$  = volume (mL).

### 3.2.6.3. *Extração e quantificação de lovastatina*

- Extração de lovastatina a partir do sobrenadante

Em tubos de microcentrifuga de 2 mL, foi coletado 1 mL de sobrenadante do inoculo e então foi adicionado 500  $\mu$ L de acetato de etila, agitado em vórtex e então centrifugados em 13000 rpm por 2 minutos. A fase superior foi transferida para um tubo de 1,5 mL, à fase inferior foi novamente adicionado 500  $\mu$ L de acetato de etila e repetida a extração. Então as amostras foram secas em *Speed Vacum* e ressuspensas em 200  $\mu$ L de acetonitrila.

- Extração de lovastatina a partir de micélio

Em tubos de 2 mL foram pesados aproximadamente 0,5 g de micélio e adicionado 1 mL de acetato de etila, então as amostras foram misturadas em vórtex por 30 segundos e incubados por 1 hora a 40 °C com agitação. Após as amostras terem sido centrifugadas por 2 minutos em velocidade máxima, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e secos em *Speed Vacum* e então ressuspensas em 200  $\mu$ L de acetonitrila.

- Deteção e quantificação em HPLC

As amostras foram analisadas por meio de cromatografia líquida de fase reversa utilizando o equipamento HPLC (High-performance Liquid Chromatography), da Shimadzu (Prominence UFLC). Foi utilizada a coluna Waters Symmetry C18 (4.6mm  $\times$  250mm  $\times$  5 $\mu$ m), os eluentes utilizados foram água com 0,1% de ácido trifluoroacético (Bomba A) e Acetonitrila com 0,1% ácido trifluoroacético (Bomba B). O método foi elaborado como sugerido por Li e colaboradores (2004), disposto na Tabela 9.

**Tabela 9.** Gradiente binário utilizado para deteção e quantificação de lovastatina.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Concentração da Bomba B (%)</b>
0,01	35
0,50	35

11,50	95
13,00	95
14,00	35
16,00	35
16,01	Parar

A curva de calibração foi obtida utilizando o padrão Mevinolin M2147 (Sigma®), diluído nas seguintes concentrações: 0,05 g.L<sup>-1</sup>; 0,075 g.L<sup>-1</sup>; 0,125 g.L<sup>-1</sup>; 0,250 g.L<sup>-1</sup>; 0,5 g.L<sup>-1</sup>; 0,75 g.L<sup>-1</sup>; 1,0 g.L<sup>-1</sup>; 1,5 g.L<sup>-1</sup> e 2,0 g.L<sup>-1</sup>. A lovastatina foi detectada a 238 nm pelo detector ultravioleta. O padrão utilizado foi solubilizado em acetonitrila e encontra-se na forma lactona. Por isso foi necessário realizar a protonação do padrão, adicionando 50% de NaOH 0,1 M (v/v) e incubado por 2 horas a 50° C, para que a quantificação da lovastatina fosse realizada com maior eficiência.

#### 3.2.6.4. Análise estatística

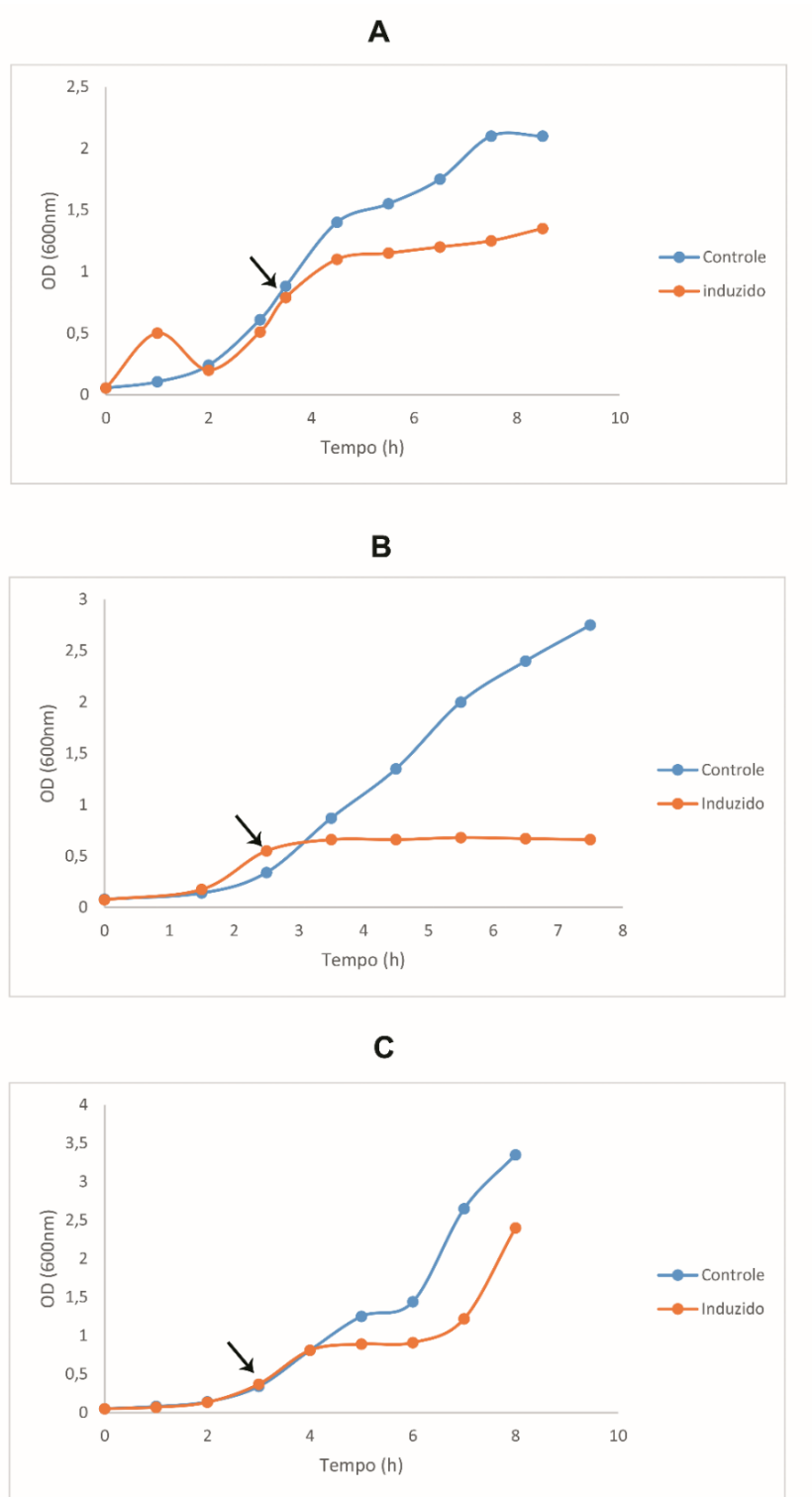
Foi realizada a análise estatística dos dados da quantificação de lovastatina e da quantificação da biomassa ao final do crescimento. Foi aplicado a análise de variância (ANOVA) utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Prisma Software versão 5.0, 2007). Foi utilizado o pós-teste de Dunnett, com intervalo de confiança 99% (p<0,01).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA ORF8

A Figura 8 mostra o crescimento das cepas transformadas antes e após a indução com IPTG. Conforme pode ser observado, quando as cepas BL21DE3 e BL21DE3 plsE foram utilizadas como hospedeiras, houve uma redução no perfil de crescimento sendo ela mais acentuada na cepa de *E. coli* BL21DE3 (Figura 8A) e *E. coli* BL21DE3 plsE (Figura 8B) fato que poderia indicar uma possível produção da proteína de interesse.

Entretanto, o perfil de proteínas totais observados em SDS-PAGE (Figura 9) não foi detectada nenhum padrão de alteração entre a amostra controle e a induzida na altura de 112 kDa, tamanho predito da proteína codificada pela ORF8.

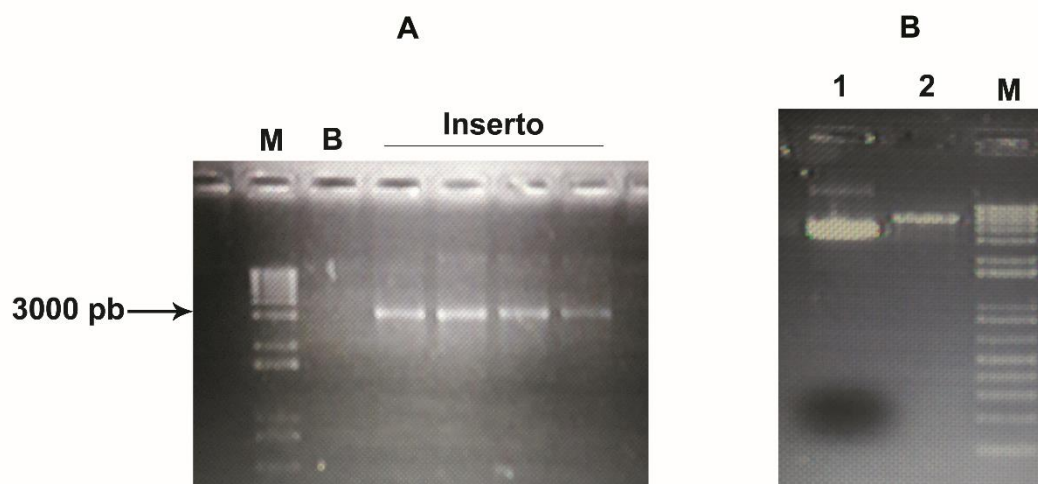


**Figura 8.** Avaliação do crescimento celular de *E. coli*. BL21DE3 (A); BL21DE3 *plsE* (B) e BL21DE3 *plsS* (C). Em azul são os controles, a cepa com o plasmídeo de expressão, mas sem indução e em laranja são a cepa com o plasmídeo, induzidas com 1 mM de IPTG.



bactéria. Por essa razão foi necessária a mudança de estratégia para tentar expressar a enzima para caracterização.

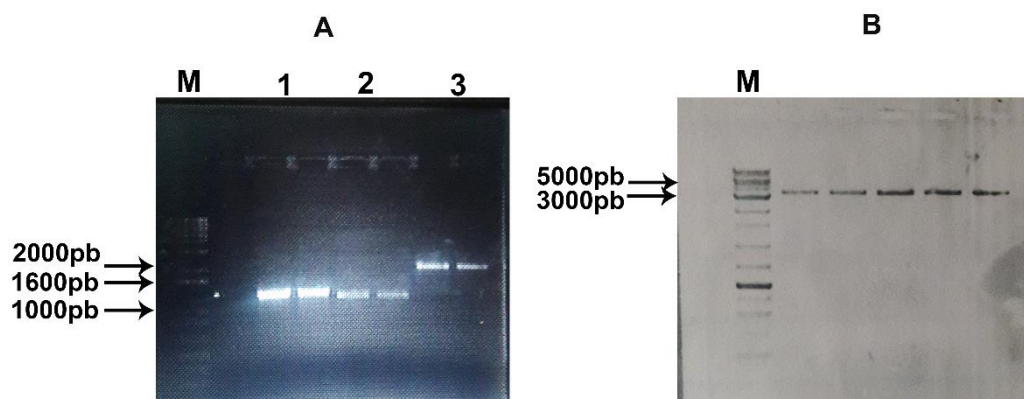
Para isso foi realizada a amplificação da ORF8 a partir do plasmídeo sintético, introduzindo sítios de restrição para as enzimas HindIII e XbaI (Figura 10A). Foi realizado a digestão do inserto e do vetor p416TEF com as enzimas HindIII e XbaI (Figura 10B), entretanto, após inúmeras tentativas de ligação, não foi obtido o plasmídeo resultante da ligação do vetor digerido com o inserto.



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de amplificação da ORF8 (A) e da digestão do vetor p416TEF (B). M é marcador e B é o branco; 1 é o plasmídeo intacto e 2 é o plasmídeo digerido.

#### 4.2.CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE DELEÇÃO DA OFR10

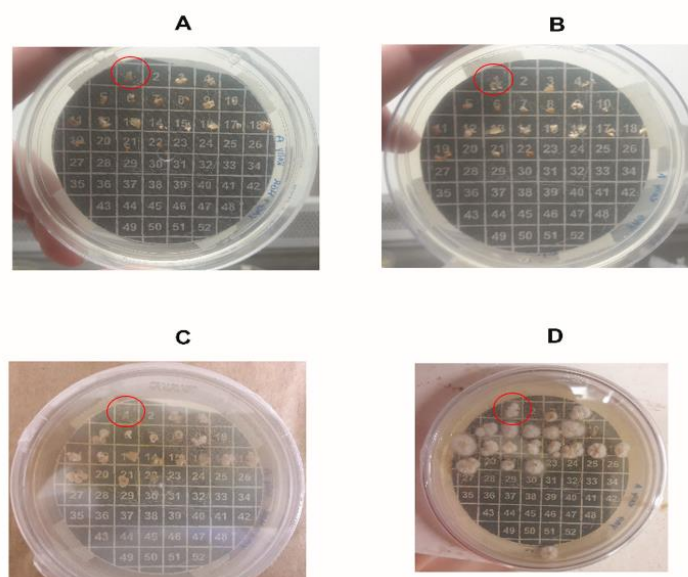
Conforme pode ser observado na Figura 11A, o tamanho amplificado de aproximadamente 1231pb, 1173 pb e 2002 pb para os fragmentos 5', 3' e cassete de resistência a Higromicina, respectivamente. Este resultado era o esperado de acordo com a estratégia mostrada na Figura 6. Após a purificação e quantificação dos fragmentos de tamanhos compatíveis com o esperado, foi realizada a ligação dos fragmentos ao cassete de resistência por reação de PCR, onde resultou no cassete de deleção com 4334 pares de base (Figura 11B), de acordo com o esperado pela estratégia de montagem do cassete (Figura 6).



**Figura 11.** Eletroforese em gel de Agarose 1% da PCR para amplificação dos fragmentos que compõem o cassete de deleção (A) e do cassete de deleção montado (B). M é o marcador, 1 é o fragmento que flanqueia a região 5'; 2 é o fragmento que flanqueia a região 3' e 3 é o cassete de resistência a Higromicina.

#### 4.3. SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES RESISTENTES A HIGROMICINA E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LOVASTATINA

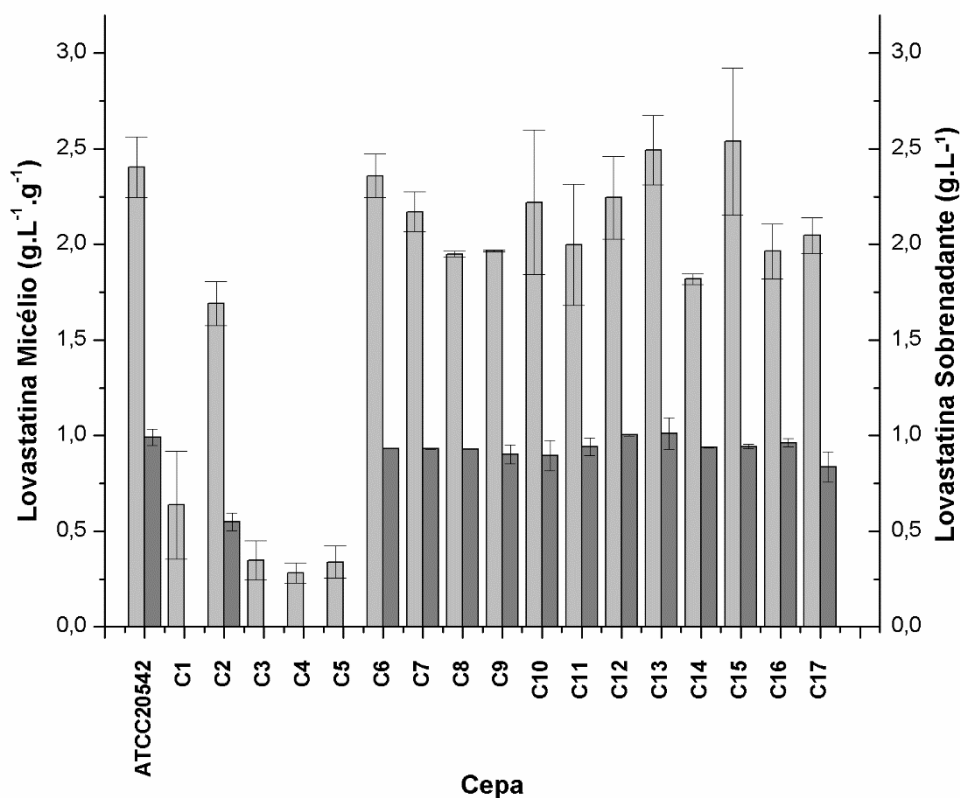
Após a montagem do cassete de deleção e a transformação da cepa ATCC20542 de *A. terreus* os clones foram selecionados em placas com meio YAG, contendo 700 µg/mL de higromicina B (Figura 12).



**Figura 12.** Seleção dos clones após a transformação em placas com Higromicina 700µg/mL com 0h de crescimento (A); placas sem Higromicina com 0h de crescimento (B); placas com Higromicina 700µg/mL com 7 dias de crescimento (C); placas sem Higromicina com 48h de crescimento (D). No quadrado de número 1 está a ATCC20542 e nos demais estão os clones obtidos.

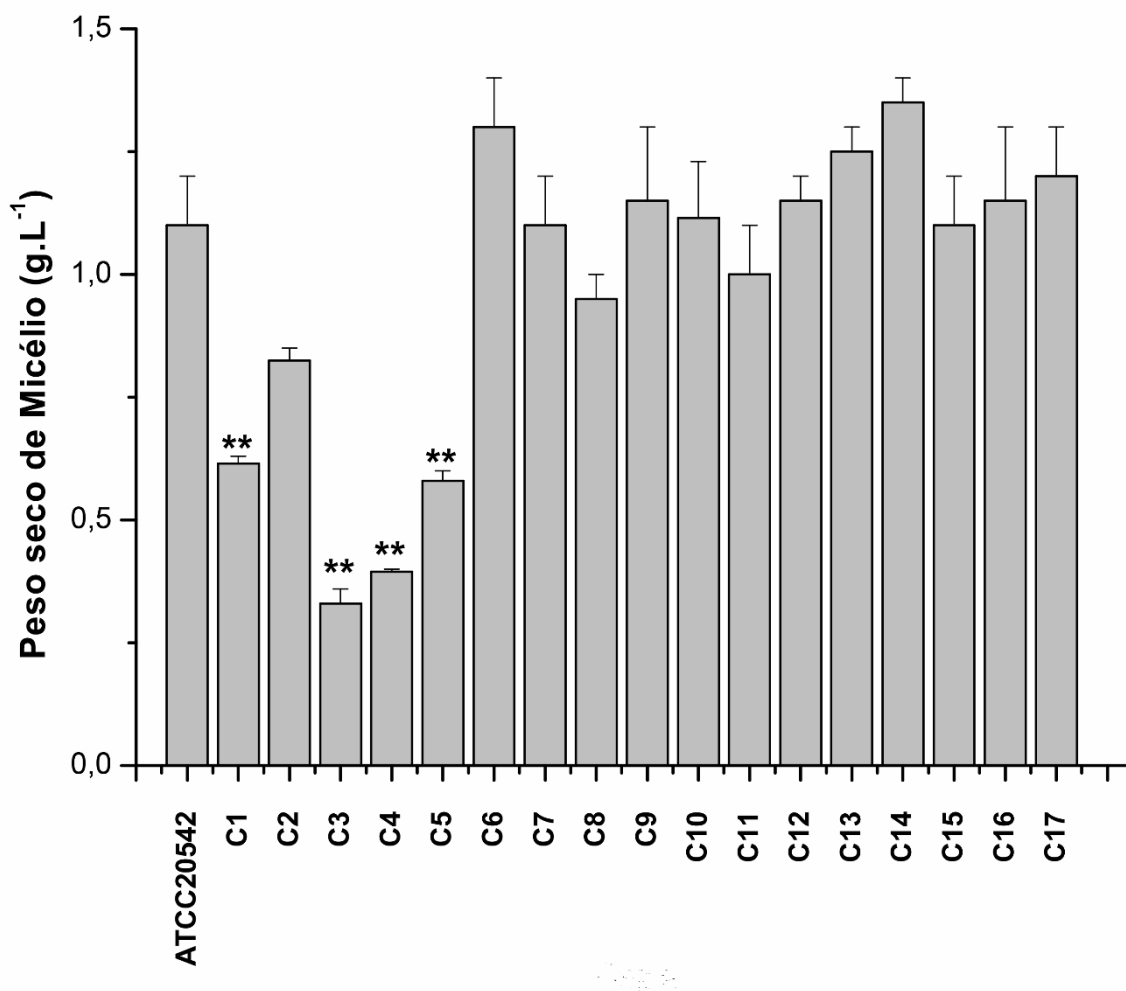


Foram obtidos cerca de 17 clones resistentes à higromicina B, que foram então cultivados em meio definido para quantificação da produção de lovastatina na presença de Higromicina 700 µg/mL. O resultado da quantificação de lovastatina tanto no sobrenadante quanto na fração micelial pode ser visto na figura 13. Conforme pode ser visto, os clones C2, C6-C17 apresentaram o mesmo perfil de secreção de lovastatina quando comparado com a cepa não transformada de ATCC20542. No entanto, nos clones C1, C3, C4 e C5 não foram detectados lovastatina no sobrenadante. Nesses mesmos clones houve redução da produção de lovastatina no micélio. A cepa controle ATCC20542 produziu em média 2,4 g.L<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>, já os clones C1, C3, C4 e C5 apresentaram respectivamente uma produção de 0,98; 0,47; 0,2 ; e 0,4 (g.L<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>), significando uma redução média de 70% da quantidade de lovastatina em micélio.



**Figura 13.** Quantificação de lovastatina total (nas formas ácida e lactona) em micélio (Cinza claro) e em sobrenadante (cinza escuro), nos 17 clones obtidos. \*\* Foi aplicado ANOVA ( $p < 0,01$ ). Os cultivos foram realizados em quadruplicatas biológicas e quantificações foram realizadas em duplicatas.

Para cada clone cultivado, foi realizada também a quantificação da biomassa ao final do cultivo (120 horas), onde os clones C1, C3, C4 e C5 apresentaram uma redução de aproximadamente 56% na sua biomassa ao final do cultivo se comparados a cepa controle ATCC20542 (Figura 14).

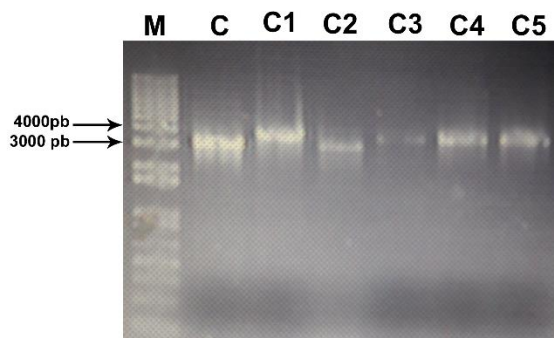


**Figura 14.** Quantificação de biomassa após 120 horas de cultivo. A quantificação foi realizada em duplicatas, (\*\*)  $p < 0,01$ .

#### 4.4. CONFIRMAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE DELEÇÃO DA ORF10 NO GENOMA DA CEPA ATCC20542.

Os clones C1, C2, C3, C4 e C5, nos quais foram observadas a redução ou a ausência total de lovastatina em sobrenadante, e a cepa ATCC20542, utilizada como controle, foram selecionados para extração de DNA genômico. Estes foram utilizados como molde em reações de PCR com os oligonucleotídeos Conf\_F e Conf\_R (Tabela 6), com o objetivo de confirmar que o cassete de resistência foi realmente inserido no locus esperado. A Figura 7 mostra que a ORF10 intacta resultaria em uma amplificação

de 3652 pb (Figura 7) sendo que a ORF deletada resultaria em uma amplificação de 4846 pb (Figura 7). Conforme pode ser observado na Figura 15, o poço controle cujo DNA molde foi da ATCC20542, apresentou uma amplificação por volta de 3000 pb. Da mesma forma, o clone C2 apresentou exatamente o mesmo tamanho da cepa controle indicando que neste clone a ORF10 não foi deletada. No entanto os clones C1, C3, C4 e C5 apresentaram um tamanho de amplificação de aproximadamente 4000 pb o que confirma a inserção do cassete de deleção no local correto.



**Figura 15.** Eletroforese em gel de agarose 0,7% da PCR de confirmação da deleção da ORF10 na cepa de *A. terreus* ATCC20542 (C) e nos clones que apresentaram alteração ou ausência da secreção de lovastatina (C1-C5). O marcador utilizado foi o Ladder 1kb plus da marca Invitrogen onde as bandas de 3 e 4kb estão indicadas na figura.

## 5. DISCUSÃO

Estudos sobre os genes codificadores de proteínas da via de biossíntese de lovastatina levaram a elucidar a função de enzimas essenciais bem como a identificação do cluster gênico com 18 genes e predição da função de algumas ORFs pertencentes ao cluster, (HUTCHINSON et al., 2000; KENNEDY et al., 1999). Além disso, elucidar as funções de cada uma das ORFs dentro do cluster gênico de síntese de lovastatina é o primeiro passo para desenvolver cepas superprodutoras deste metabólito. Ademais, até o presente momento, não é conhecido o papel ecológico da produção de lovastatina por fungos filamentosos. Estudos anteriores sugerem que a produção de lovastatina seria um mecanismo de defesa, atuando no controle populacional de bactérias no habitat em que o fungo esteja se desenvolvendo (ENDO, 1979), isso porque a HMG-CoA redutase produzidas por bactérias como *Staphylococcus aureus* possui um  $K_i$  até 4 vezes menor que o  $K_i$  de uma enzima de classe I, produzida por humanos, por exemplo (TABERNERO; RODWELL; STAUFFACHER, 2003; WILDING et al., 2000).

Na comparação das sequências de nucleotídeos das HMG-CoA de fora do cluster, ORF8 e a sequência da HMG-CoA proveniente de humanos foi observada uma alteração em dois aminoácidos do sítio catalítico da enzima codificada pela ORF8, na posição 683, substituindo uma Valina por uma Leucina e na posição 853, substituindo uma Leucina por uma Treonina (MULINARI, 2016). A expressão da ORF8, nesse trabalho, foi primeiramente testada em *E. coli*, por se tratar de um sistema de expressão já bem estabelecido e bastante utilizado para expressão e caracterização. O intuito foi de saber se as alterações de aminoácidos, observadas no alinhamento feito anteriormente, poderiam conferir alguma resistência a lovastatina.

Não foi observada a expressão da enzima em nenhuma das linhagens de *E. coli* utilizadas (Figura 9), mesmo quando as análises de crescimento sugerem a produção. No caso dos clones de BL21DE3 (Figura 8A) e BL21DE3 *plsE* (Figura 8B) tiveram uma desaceleração do crescimento quando induzido com IPTG, diferente do controle em ambos os casos; clones com o plasmídeo, mas sem indução por IPTG (Figura 8). Na caracterização da porção catalítica da HMG-CoA redutase humana, foi utilizada a cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  (ISTVAN et al., 2000), sendo que essa linhagem geralmente não é utilizada para expressão de proteínas. Em outro estudo, realizado para a caracterização de uma HMG-CoA redutase de *Haloferax volcanii*, também utilizou *E. coli* para expressão heteróloga da enzima, entretanto o autor não especifica qual linhagem foi utilizada (BISCHOFF; RODWELL, 1996). Na caracterização da HMG-CoA redutase de *Staphylococcus aureus* foi utilizada a cepa BL21DE3 de *E. coli*. A escolha de se expressar proteínas heteróloga em *E. coli* tem vantagem por se tratar de um sistema simples, que cresce em meio de cultura de baixo custo, entretanto suas desvantagens podem significar um gargalo para se alcançar o produto final, pois bactérias não fazem modificações pós traducionais e proteína muito grandes podem ser expressas em corpos de inclusão, o que torna o processo de purificação da proteína mais oneroso (DUILIO et al., 2004; VILLAVERDE E CARRIO, 2003).

A presença de códons raros, pouco utilizados por *E. coli* em proteínas, podem apresentar uma dificuldade a mais na para a expressão de proteínas nesse microrganismo (KIM et al., 1999). Isso ocorre com dois códons de Arginina (AGA e AGG), que, quando estão nos primeiros 20 códons da proteína, resulta na baixa expressão ou até mesmo na impossibilidade da expressão pela bactéria (KIM et al., 1999). Para solucionar esse problema, poderia ter sido realizada a troca desses códons

no momento de desenho da sequência para síntese do plasmídeo, ou ainda poderia ter sido realizada a coexpressão dos genes que codifica a HMG-CoA redutase, e *argU*, que codifica o tRNA<sup>AGA,AGG</sup>, como realizado por Kim e colaboradores (1999). A expressão de gene aumentou a disponibilidade desse tRNA<sup>AGA,AGG</sup>, pouco expresso por *E. coli*, resultando em um aumento na expressão da HMG-CoA redutase de 10 vezes. Na sequência da ORF8, há a presença do códon AGA logo no início da sequência, na posição 6.

Tendo em vista que o crescimento das cepas de *E. coli* BL21DE3 e BL21DE3 *plysE* sugerem que a expressão da proteína, outros experimentos deveriam ter sido realizados antes de partir para expressão da ORF8 em *S. cerevisiae*. Como por exemplo, a purificação da proteína utilizando uma coluna de níquel, já que ela possui uma calda de histidina, proveniente de um cultivo em volume maior. Com isso seria possível concentrar a possível enzima para teste rápido de atividade ou outros experimentos, como Western blot ou até mesmo refazer as análises de SDS-PAGE com um extrato de proteínas mais concentrado. Entretanto, segundo anotações de bancos de dados, a HMG-CoA codificada pela ORF8 possivelmente possui três pontos de glicosilação, por esse motivo então foi testada a expressão da ORF8 e *S. cerevisiae*, mesmo sem obter resultado nessa tentativa. *S. cerevisiae* já foi utilizada para expressar uma HMG-CoA redutase pertencente ao fungo *Ganoderma lucidum* (SHANG et al., 2008). Entretanto não foi possível a montagem do plasmídeo para expressão na levedura (Figura 10).

A ORF10, anotada como um transportador (KENNEDY et al., 1999), é semelhante a genes de transportadores de aflotoxina, produzida por *A. flavus* e de ML-236B (Compactina) produzida por *P. citrinum* (ABE et al., 2002a; LOFTUS et al., 2005). A deleção da ORF10 causou alterações visíveis no crescimento dos clones deletados C1, C3, C4 e C5 (Figura 14), onde os clones com a ORF10 deletada apresentou redução de crescimento de aproximadamente 56% ao final do cultivo (120 horas). Além disso, houve alterações na síntese de lovastatina também (Figura 13), apresentando redução de aproximadamente 60% de lovastatina em micélio e não apresentando secreção do metabólito para o meio extracelular.

Com a deleção da ORF10, deveria haver um acúmulo de lovastatina no micélio, entretanto, a quantidade de lovastatina em micélio também diminuiu. Segundo a literatura, pode ser que haja um mecanismo de feedback negativo, onde o acúmulo de

lovastatina leva a diminuição da atividade da via (CASAS LÓPEZ et al., 2004). Isso sugere que, mesmo a ORF10 não sendo diretamente envolvida na via de produção de lovastatina, ela é importante para a manutenção do metabolismo do micélio, evitando o acúmulo de lovastatina celular. A presença da ORF8, que codifica uma possível enzima resistente, sugere um mecanismo de resistência a produção de lovastatina (MULINARI, 2016).

Em um estudo realizado na caracterização de genes do cluster de produção de MBL-236B, o gene *mlcD* foi deletado, gerando o mutante T48.28. Nesse mutante foi realizado a quantificação de ergosterol, mostrando que após três dias, quando se inicia a produção de MBL-236B, há redução de cerca de 30% do ergosterol acumulado, significando que o gene *mlcD* está envolvido com a resistência a MBL-236B em *P. citrinum* (ABE et al., 2002b). Como o gene *mlcD* é semelhante a ORF8, explica o motivo do fungo continuar crescendo mesmo com o acúmulo de lovastatina intracelular, onde mesmo que a lovastatina comece a inibir as duas isoformas de fora do cluster, a enzima codificada pela ORF8 continua mantendo o fluxo da via de síntese de ergosterol.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Não é possível afirmar que a expressão da ORF8 não foi possível, tendo em vista que eram necessários mais experimentos que comprovassem que a proteína não estava sendo pouco expressa. Haja vista que o crescimento da *E. coli* BL21DE3 e BL21DE3 *plysE* sugerem que elas estão expressando a proteína.

A expressão da ORF8 teria sido possível, primeiro confirmar que está codificando realmente uma HMG-CoA redutase. Além disso, complementaria os dados obtidos com a deleção da ORF10. A deleção da ORF10 faz com que a secreção de lovastatina seja interrompida, o que levaria ao acúmulo da lovastatina intracelular, entretanto não é observado, sugerindo uma retroalimentação da via. Também foi observado redução do crescimento nos clones em que a ORF10 foi deletada.

Para melhor entendimento de como essas duas ORFs se relacionam, seria necessário além da expressão e caracterização da ORF8, também caracterizar as outras duas isoformas da enzima de fora do cluster. Outra forma é tentar aumentar o número de cópias da ORF10 para verificar se há o aumento da secreção de lovastatina. Além disso,

realizar duplas mutações nessas duas ORFs poderia esclarecer melhor o papel delas no mecanismo de resistência a lovastatina apresentado por *A. terreus*.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ABE, Y. et al. Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 267, n. 5, p. 636–646, 2002a.

ABE, Y. et al. Effect of increased dosage of the ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster on ML-236B production in *Penicillium citrinum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 268, n. 1, p. 130–137, 2002b.

AINSWORTH, G. C. **Introduction to the history of mycology**. [s.l.: s.n.].

ALBERTS, A. W. et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 7, p. 3957–3961, 1980.

ALBERTS, A. W. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. **The American Journal of Cardiology**, v. 62, n. 15, 1988.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 101–107, 1998.

BISCHOFF, K. M.; RODWELL, V. W. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Haloferax volcanii*: purification, characterization, and expression in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 19–23, 1996.

BURR, D. A.; CHEN, X. B.; VEDERAS, J. C. Synthese of Conjugated Pyrone for the Enzymatic Assay Lovastatin Nonaketide Synthase, an Iterative Polyketide Synthase. **Organic Letters**, v. 9, n. 1, p. 161–164, 2007.

CASAS LÓPEZ, J. L. et al. Lovastatin inhibits its own synthesis in *Aspergillus terreus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 48–50, 2004.

CHANG, P. K.; YU, J.; YU, J. H. aflT, a MFS transporter-encoding gene located in the aflatoxin gene cluster, does not have a significant role in aflatoxin secretion. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 10, p. 911–920, 2004.

COLEMAN, J. J.; MYLONAKIS, E. Efflux in fungi: La pièce de résistance. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 6, 2009.

ENDO, A. Monacolin K, new hypocholesteroleic agent produced by a *Monascus* species. **The Journal of Antibiotics**, v. 32, n. 8, p. 852–854, 1979.

ENDO, A. Compactin (ML-236B) and Related Compounds as Potential Cholesterol-Lowering Agents That Inhibit HMG-CoA Reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 401–405, 1985.

ENDO, A.; KURODA, M.; TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 12, p. 1346–1348, 1976.

- FLORENCIO, C. S. et al. Genetic manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* using particles bombardment and *Agrobacterium* mediated transformation. **Microbiological Research**, v. 207, n. November 2017, p. 269–279, 2018.
- FRIESEN, J. A.; RODWELL, V. W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. **Genome Biology**, v. 5, n. 11, 2004.
- FRIMPONG, K.; RODWELL, V. W. The Active Site of Hamster 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA. **the Journal of Biological Chemistry**, v. 2, n. 14, p. 1217–1221, 1994.
- HENDRICKSON, L. et al. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. **Chemistry and Biology**, v. 6, n. 7, p. 429–439, 1999.
- HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 7, ABE, Y. et al. Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 267, n. 5, p. 636–646, 2002a.
- ABE, Y. et al. Effect of increased dosage of the ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster on ML-236B production in *Penicillium citrinum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 268, n. 1, p. 130–137, 2002b.
- AINSWORTH, G. C. **Introduction to the history of mycology**. [s.l.: s.n.].
- ALBERTS, A. W. et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 7, p. 3957–3961, 1980.
- ALBERTS, A. W. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. **The American Journal of Cardiology**, v. 62, n. 15, 1988.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; MIRANDA, R. U. Biotechnological production and applications of statins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 869–883, 2010.
- BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 101–107, 1998.
- BISCHOFF, K. M.; RODWELL, V. W. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Haloferax volcanii*: purification, characterization, and expression in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 19–23, 1996.
- BURR, D. A.; CHEN, X. B.; VEDERAS, J. C. Synthese of Conjugated Pyrone for the Enzymatic Assay Lovastatin Nonaketide Synthase, an Iterative Polyketide Synthase. **Organic Letters**, v. 9, n. 1, p. 161–164, 2007.
- CASAS LÓPEZ, J. L. et al. Lovastatin inhibits its own synthesis in *Aspergillus terreus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 48–50, 2004.
- CHAN, J. K. et al. Biosynthesis of Mevinolin. Spectral Assignment by Double-Quantum Coherence NMR after High Carbon-13 Incorporation. **American Chemical Society**, v. 105, n. 10, p. 3334–3336, 1983.
- CHANG, P. K.; YU, J.; YU, J. H. aflT, a MFS transporter-encoding gene located in the aflatoxin gene cluster, does not have a significant role in aflatoxin secretion. **Fungal**



- Genetics and Biology**, v. 41, n. 10, p. 911–920, 2004.
- COLEMAN, J. J.; MYLONAKIS, E. Efflux in fungi: La pièce de résistance. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 6, 2009.
- ENDO, A. Monacolin K, new hypocholesteroleic agent produced by a *Monascus* species. **The Journal of Antibiotics**, v. 32, n. 8, p. 852–854, 1979.
- ENDO, A. Compactin (ML-236B) and Related Compounds as Potential Cholesterol-Lowering Agents That Inhibit HMG-CoA Reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 401–405, 1985.
- ENDO, A.; KURODA, M.; TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 12, p. 1346–1348, 1976.
- FLORENCIO, C. S. et al. Genetic manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* using particles bombardment and *Agrobacterium* mediated transformation. **Microbiological Research**, v. 207, n. November 2017, p. 269–279, 2018.
- FRIESEN, J. A.; RODWELL, V. W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. **Genome Biology**, v. 5, n. 11, 2004.
- FRIMPONG, K.; RODWELL, V. W. The Active Site of Hamster 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA. **the Journal of Biological Chemistry**, v. 2, n. 14, p. 1217–1221, 1994.
- HENDRICKSON, L. et al. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. **Chemistry and Biology**, v. 6, n. 7, p. 429–439, 1999.
- HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 7, p. 450–452, 2009.
- HUTCHINSON, C. R. et al. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3–4, p. 287–295, 2000.
- ISTVAN, E. S. et al. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. **Embo J**, v. 19, n. 5, p. 819–830, 2000.
- JIANG, Z. D.; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, n. PART C, p. 245–272, 2000.
- KELLER, N. P.; HOHN, T. M. REVIEW Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, p. 17–29, 1997.
- KENNEDY, J. et al. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. **Am Assoc Adv Sci**, v. 284, n. 5418, p. 1368–72, 1999.
- KIM, D. Y. et al. Expression and characterization of the HMG-CoA reductase of the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **Protein expression and purification**, v. 17, n. 3, p. 435–442, 1999.

- KUWAYAMA, H. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 2, p. 2e–2, 2002.
- LAUFS, U.; BÖHM, M. Cardiac effects of statins - Advancements and open questions. **Cardiovascular Research**, v. 66, n. 3, p. 427–429, 2005.
- LEE, J. et al. Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis Jehan. **BioTechniques**, v. 36, n. 3, p. 398–400, 2004.
- LI, H. BIN; JIANG, Y.; CHEN, F. Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 812, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 277–290, 2004.
- LOFTUS, B. et al. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1321–1324, 2005.
- LORENZ, R. T.; PARKS, L. W. Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 9, p. 1660–1665, 1990.
- MAHLEY, R. W. et al. Plasma lipids in Turkish children: impact of puberty, socioeconomic status, and nutrition on plasma cholesterol and HDL. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 12, p. 1996–2006, 2001.
- MANZONI, M.; ROLLINI, M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 555–564, 2002.
- MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi - Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 2, p. 177–185, 2008.
- MICHIELS, A. et al. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. **Analytical Biochemistry**, v. 315, n. 1, p. 85–89, 2003.
- MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 1–5, 2007.
- MULDER, K. C. L. et al. Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 648–665, 2015.
- MULINARI, F. F. **PRODUÇÃO DE LOVASTATINA EM *Aspergillus sp* .: BIODIVERSIDADE BRASILEIRA**. [s.l.: s.n.].
- MUMBERG, D.; MÜLLER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v. 156, n. 1, p. 119–122, 1995.
- NAKAYASHIKI, H. et al. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 4, p. 275–283, 2005.
- NYILASI, I. et al. In vitro interactions between primycin and different statins in their effects against some clinically important fungi. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 200–205, 2010.
- PECYNA, M.; BIZUKOJC, M. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* with the simultaneous use of lactose and glycerol in a discontinuous fed-batch culture. **Journal**

- of **Biotechnology**, v. 151, n. 1, p. 77–86, 2011.
- QIAO, J. et al. Antifungal activity of statins against *Aspergillus* species. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, p. 589–593, 2007.
- SAMBROOK, JOSEPH; GREEN, M. R. **Molecular cloning: A laboratory Manual**. [s.l.: s.n.]. v. 33
- SAMSON, R. A. et al. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 39–55, 2011.
- SCHÜMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 4, p. 690–703, 2006.
- SHANG, C.-H. et al. Cloning and characterization of a gene encoding HMG-CoA reductase from *Ganoderma lucidum* and its functional identification in yeast. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 1333–1339, 2008.
- SHARMA, R. et al. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2083–2094, 2009.
- SONG, J. et al. The *Aspergillus fumigatus* damage resistance protein family coordinately regulates ergosterol biosynthesis and azole susceptibility. **mBio**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2016.
- SORENSEN, J. L. et al. Transformations of cyclic nonaketides by *Aspergillus terreus* mutants blocked for lovastatin biosynthesis at the *lovA* and *lovC* genes. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 1, n. 1, p. 50–59, 2003.
- SUBAZINI, T. K.; KUMAR, G. R. Characterization of Lovastatin biosynthetic cluster proteins in *Aspergillus terreus* strain ATCC 20542. **Bioinformatics**, v. 6, n. 7, p. 250–4, 2011.
- SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1–2, p. 9–19, 2009.
- TABERNERO, L.; RODWELL, V. W.; STAUFFACHER, C. V. Crystal structure of a statin bound to a class II hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 22, p. 19933–19938, 2003.
- TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807–1813, 2008.
- TILBURN, J. et al. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 26, p. 205–221, 1983.
- VINCI, V. A. et al. Mutants of a lovastatin-hyperproducing *Aspergillus terreus* deficient in the production of sulochrin. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 113–119, 1991.
- WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115–129, 2005.

- WILDING, E. I. et al. Essentiality, Expression, and Characterization of the Class II 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 18, p. 5147–5152, 2000.
- XIE, X. et al. Biosynthesis of Lovastatin Analogs with a Broadly Specific Acyltransferase. **Chemistry and Biology**, v. 13, n. 11, p. 1161–1169, 2006.
- XU, W. et al. LovG: The thioesterase required for dihydromonacolin L release and lovastatin nonaketide synthase turnover in lovastatin biosynthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 25, p. 6472–6475, 2013.
- YASMIN, S. et al. Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 8, p. E497–E504, 2012.  
p. 450–452, 2009.
- HUTCHINSON, C. R. et al. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3–4, p. 287–295, 2000.
- ISTVAN, E. S. et al. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. **Embo J**, v. 19, n. 5, p. 819–830, 2000.
- JIANG, Z. D.; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, n. PART C, p. 245–272, 2000.
- KELLER, N. P.; HOHN, T. M. REVIEW Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, p. 17–29, 1997.
- KENNEDY, J. et al. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. **Am Assoc Adv Sci**, v. 284, n. 5418, p. 1368–72, 1999.
- KIM, D. Y. et al. Expression and characterization of the HMG-CoA reductase of the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. **Protein expression and purification**, v. 17, n. 3, p. 435–442, 1999.
- KUWAYAMA, H. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 2, p. 2e–2, 2002.
- LAUFS, U.; BÖHM, M. Cardiac effects of statins - Advancements and open questions. **Cardiovascular Research**, v. 66, n. 3, p. 427–429, 2005.
- LEE, J. et al. Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. **BioTechniques**, v. 36, n. 3, p. 398–400, 2004.
- LI, H. BIN; JIANG, Y.; CHEN, F. Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 812, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 277–290, 2004.
- LOFTUS, B. et al. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1321–1324, 2005.

- LORENZ, R. T.; PARKS, L. W. Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 9, p. 1660–1665, 1990.
- MAHLEY, R. W. et al. Plasma lipids in Turkish children: impact of puberty, socioeconomic status, and nutrition on plasma cholesterol and HDL. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 12, p. 1996–2006, 2001.
- MANZONI, M.; ROLLINI, M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 555–564, 2002.
- MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi - Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 2, p. 177–185, 2008.
- MICHIELS, A. et al. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. **Analytical Biochemistry**, v. 315, n. 1, p. 85–89, 2003.
- MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 1–5, 2007.
- MULDER, K. C. L. et al. Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 648–665, 2015.
- MULINARI, F. F. **PRODUÇÃO DE LOVASTATINA EM *Aspergillus* sp .: BIODIVERSIDADE BRASILEIRA**. [s.l: s.n.].
- MUMBERG, D.; MÜLLER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v. 156, n. 1, p. 119–122, 1995.
- NAKAYASHIKI, H. et al. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 4, p. 275–283, 2005.
- NYILASI, I. et al. In vitro interactions between primycin and different statins in their effects against some clinically important fungi. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 200–205, 2010.
- PECYNA, M.; BIZUKOJC, M. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* with the simultaneous use of lactose and glycerol in a discontinuous fed-batch culture. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 1, p. 77–86, 2011.
- QIAO, J. et al. Antifungal activity of statins against *Aspergillus* species. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, p. 589–593, 2007.
- SAMBROOK, JOSEPH; GREEN, M. R. **Molecular cloning: A laboratory Manual**. [s.l: s.n.]. v. 33
- SAMSON, R. A. et al. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 39–55, 2011.
- SCHÜMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 4, p. 690–703, 2006.
- SHANG, C.-H. et al. Cloning and characterization of a gene encoding HMG-CoA reductase from *Ganoderma lucidum* and its functional identification in yeast.

**Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 1333–1339, 2008.

SHARMA, R. et al. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2083–2094, 2009.

SONG, J. et al. The *Aspergillus fumigatus* damage resistance protein family coordinately regulates ergosterol biosynthesis and azole susceptibility. **mBio**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2016.

SORENSEN, J. L. et al. Transformations of cyclic nonaketides by *Aspergillus terreus* mutants blocked for lovastatin biosynthesis at the *lovA* and *lovC* genes. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 1, n. 1, p. 50–59, 2003.

SUBAZINI, T. K.; KUMAR, G. R. Characterization of Lovastatin biosynthetic cluster proteins in *Aspergillus terreus* strain ATCC 20542. **Bioinformatics**, v. 6, n. 7, p. 250–4, 2011.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1–2, p. 9–19, 2009.

TABERNERO, L.; RODWELL, V. W.; STAUFFACHER, C. V. Crystal structure of a statin bound to a class II hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 22, p. 19933–19938, 2003.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807–1813, 2008.

TILBURN, J. et al. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 26, p. 205–221, 1983.

VINCI, V. A. et al. Mutants of a lovastatin-hyperproducing *Aspergillus terreus* deficient in the production of sulochrin. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 113–119, 1991.

WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115–129, 2005.

WILDING, E. I. et al. Essentiality, Expression, and Characterization of the Class II 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 18, p. 5147–5152, 2000.

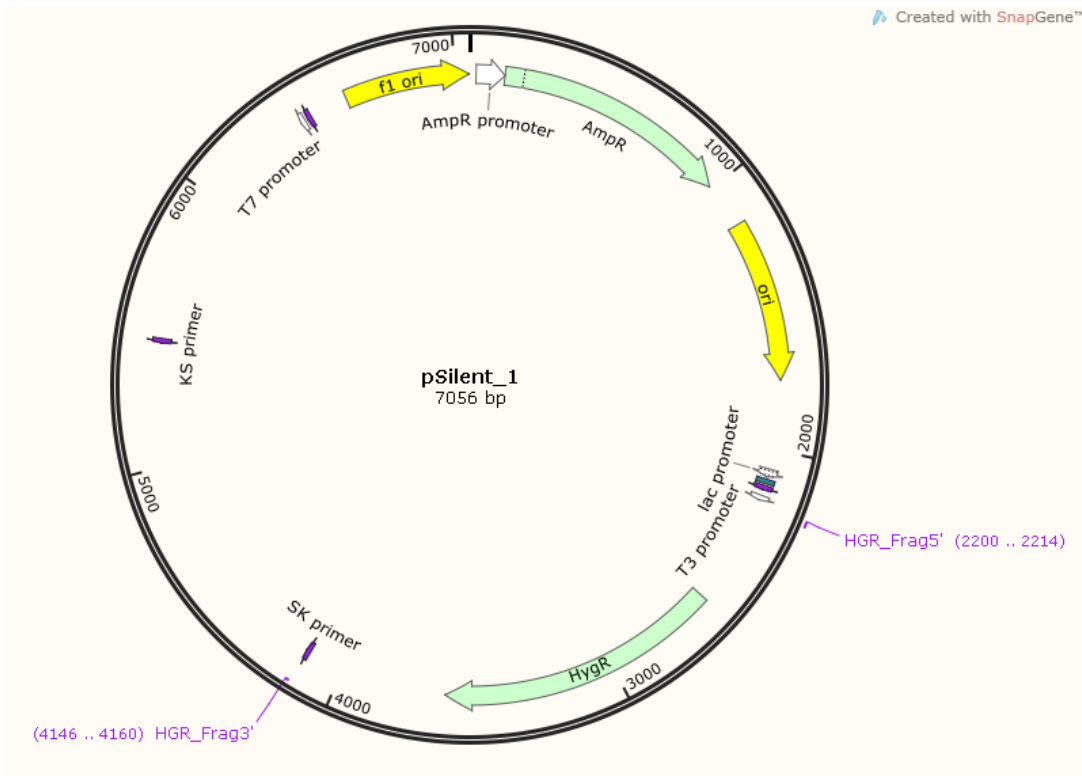
XIE, X. et al. Biosynthesis of Lovastatin Analogs with a Broadly Specific Acyltransferase. **Chemistry and Biology**, v. 13, n. 11, p. 1161–1169, 2006.

XU, W. et al. LovG: The thioesterase required for dihydromonacolin L release and lovastatin nonaketide synthase turnover in lovastatin biosynthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 25, p. 6472–6475, 2013.

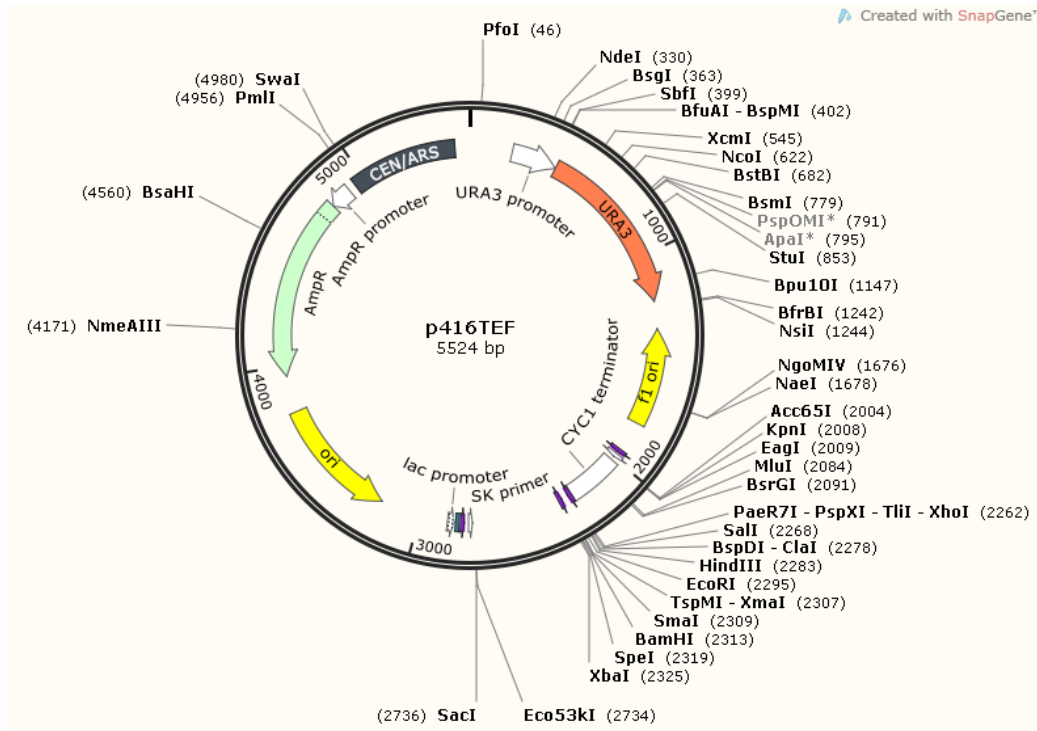
YASMIN, S. et al. Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 8, p. E497–E504, 2012.

## 8. ANEXO I

**Figura 16** Mapa do plasmídeo pSilent\_1, destacando os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores HGR\_Frag5' e HGR\_Frag3', utilizados para amplificação do cassete de resistência a Higomicina.



**Figura 17** Mapa do plasmídeo p416TEF que seria utilizado para expressão da ORF8 de *S. cerevisiae*.





**Figura 18** Mapa do plasmídeo sintetizado quimicamente para expressão da ORF8 em *E. coli*.

