



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Produção Heteróloga de Ácido Hialurônico em *Klyuveromyces lactis*

Antonio Milton Vieira Gomes

Orientadora: Prof^a Dr^a Nádia Skorupa Parachin

Brasília, 2016

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Produção Heteróloga de Ácido Hialurônico em *Klyuveromyces lactis*

Antonio Milton Vieira Gomes

Orientadora: Prof^a Dr^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, 2016.

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. Talita Souza Carmo

Universidade de Brasília

Membro Efetivo

Professor Dr. Elibio Leopoldo Rech Filho

Embrapa

Membro Efetivo

Professora Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

Universidade de Brasília

Membro Suplente

Dedico este trabalho a todos que estiveram junto comigo e
me ajudaram a chegar até aqui.
Em especial à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força e por nunca ter me deixado desistir nos momentos de angústia.

À minha mãe Clarice e ao meu pai Miguel que sempre deram o maior apoio a este caminho que decidi seguir e mesmo morando tão longe em distância sempre estão do meu lado.

À minhas tias Eridan, Gleide, Eulina e Luzia que sempre me apoiaram e me ajudaram e principalmente tia Áurea que me acolheu e cuidou de mim em Brasília em todos os anos que estive estudando aqui.

À minha orientadora Prof^a Nádia Skorupa, que nunca hesitou em me auxiliar nos momentos de dúvidas e conversas, além de todos os ensinamentos.

À Prof^a Talita que sempre ajudou em tudo o que necessitei em Laboratório.

A todos os professores da BioMol, que contribuem com nosso trabalho em laboratório.

Agradeço a todos os meus amigos de laboratório principalmente Lucas que me ensinou no início o básico do funcionamento de um laboratório. Também agradeço a Jéssica e Nadiele que me ajudaram muito nos experimentos em Laboratório.

Agradeço a todos os amigos do Grupo Engenharia de Biocatalisadores por todos os momentos de convívio, conversas e risadas.

Agradeço ao grupo de pesquisa da Professora Ildinete e da Professora Andrea, que sempre nos emprestaram reagentes e equipamentos quando preciso foi. Ao grupo de pesquisa da Enzimologia pelo auxílio com as máquinas de rt-qPCR. Ao professor Correa pelo auxílio com a microscopia eletrônica.

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma maneira me ajudaram a realizar este trabalho, que Deus abençoe a todos.

*A ciência sem religião é manca;
A religião sem ciência é cega.*

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	IV
RESUMO	7
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 ÁCIDO HIALURÔNICO	4
1.2 OBTENÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	5
1.3 BIOSÍNTESE DE ÁCIDO HIALURÔNICO	6
1.4 VIA METABÓLICA DA SÍNTESE DE UDP-GlcUA E UDP-GlcNAc.....	9
1.5 MICRORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE PARA A SÍNTESE DE AH.....	12
1.6 <i>Kluyveromyces lactis</i>	13
1.7 MERCADO DE ÁCIDO HIALURÔNICO	14
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 MATERIAL	18
4.1.1 Microrganismos.....	18
4.1.2 Meios de cultura	19
4.1.3 Tampões e soluções.....	21
4.1.4 Antibiótico.....	24
4.1.5 Kits	24
4.1.6 Enzimas	24
4.1.7 Vetores	25
4.1.8 Oligonucleotídeos iniciadores	26
4.1.9 Equipamentos	27
4.2 MÉTODOS	27
4.2.1 Preparação de células bacterianas competentes	27
4.2.2 Transformação bacteriana em células de <i>E. coli</i>	28
4.2.3 Reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR).....	29

4.2.4 Restrições com endonucleases e desfosforilações dos plasmídeos contendo os genes de interesse	29
4.2.5 Purificação do DNA plasmidial e genômico	30
4.2.6 Ligação dos genes de interesse com seus respectivos vetores	30
4.2.7 Extração de DNA plasmidial de células de <i>E. coli</i>	30
4.2.8 Transformação em levedura <i>K. lactis</i>	31
4.2.9 Seleção e armazenamento das leveduras contendo os genes integrados com sucesso (PCR de colônia).....	32
4.2.10 Análise dos genes, RNAs, plasmídeos e cassetes.....	32
4.2.11 Realização de PCR para análise dos transcritos gênicos.....	33
4.2.12 Caracterização fisiológica das cepas geneticamente modificadas de <i>K.lactis</i>	33
4.2.13 Purificação do ácido hialurônico do meio de cultura	34
4.2.14 Análise e quantificação da produção de ácido hialurônico em cepas de <i>K. lactis</i>	34
5. RESULTADOS	35
5.1 ANÁLISE DO METABOLISMO DE <i>Kluyveromyces lactis</i> PARA A SÍNTESE DE ÁCIDO HIALURÔNICO	35
5.2 CONSTRUÇÕES DE PLASMÍDEOS PARA TRANSFORMAÇÃO EM <i>Kluyveromyces lactis</i>	37
5.3 TRANSFORMAÇÃO DE <i>Kluyveromyces lactis</i> GG799	45
5.4 ANÁLISE DE FENÓTIPO CELULAR.....	49
5.5 PCR DE COLÔNIA PARA CONFIRMAÇÃO DA INTEGRAÇÃO GENÔMICA DE <i>hasA</i> E <i>hasB</i>	50
5.6 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS TRANSFORMANTES	52
5.7 QUANTIFICAÇÃO DE AH EM MEIO YPD.....	54
5.8 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS TRANSFORMANTES EM MEIO YPD OTIMIZADO	56
5.9 QUANTIFICAÇÃO DO AH EM MEIO YPD OTIMIZADO.....	58
5.10 ANÁLISE DOS TRANSCRITOS DAS CEPAS	58
5.11 ANÁLISE DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	60
5.11.1 Galactose	60
5.11.2 Lactose	62
5.11.3 Sacarose.....	64
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	75
8. PRODUÇÕES RELEVANTES	76
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
10. ANEXOS.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular de uma unidade dissacarídea de Ácido Hialurônico contendo N-Acetil Glucosamina e Ácido Glucurônico.	4
Figura 2. Topologia das enzimas transmembrânicas Hyaluronan Synthases..	8
Figura 3. Via metabólica da síntese de Ácido Hialurônico em bactérias com destaque para a enzima HAS acoplada à membrada do microrganismo.	11
Figura 4. (a) Número de patentes envolvendo Ácido Hialurônico desde 1975 e (b) áreas chaves envolvendo o desenvolvimento das patentes que usam Ácido Hialurônico.	16
Figura 5. Fluxograma para a construção de cepa de <i>K. lactis</i> produtora de Ácido Hialurônico.	18
Figura 6. Metabolismo de Ácido Hialurônico de <i>K. lactis</i> originado neste estudo.	36
Figura 7. Integração genômica do cassete de expressão contendo o gene <i>hasA</i> no cromossomo de <i>K. lactis</i> através da utilização do plasmídeo pKlac2.	38
Figura 8. Mapa físico do plasmídeo pKlac2 utilizado para expressão em células de <i>Kluyveromyces lactis</i>	38
Figura 9. Mapa físico do plasmídeo p424-GPD B.	39
Figura 10. Análise de restrição para confirmação da montagem do plasmídeo p424-GPD B.	40
Figura 11. Mapa físico do plasmídeo pKlac B.	41
Figura 12. Mapa físico do plasmídeo pKlac BA1.	43
Figura 13. Mapa físico do plasmídeo pKlac BA2.	43
Figura 14. Mapa físico do plasmídeo pKlac BA3.	44
Figura 15. Mapa físico do plasmídeo pKlac BAP.	44
Figura 16. Análise de restrição para confirmação da montagem das isoformas do gene <i>hasA</i> e do gene <i>hasB</i> nos plasmídeos pKlac BAP, pKlac BA1, pKlac BA2 e pKlac BA3.	45
Figura 17. Placas de YCB Ágar + Acetamida com os resultados da transformação das células de <i>K. lactis</i> com o plasmídeo pKlac BAP utilizando a metodologia de transformação 9.	48
Figura 18. Seleção das colônias de <i>K. lactis</i> após transformação em placa numerada. À esquerda, placa A contém YCB Ágar – acetamida; à direita placa B contém YCB Ágar + acetamida.	49
Figura 19. Análise de PCR de colônia da integração do gene <i>hasB</i> (1507 pb) nas cepas transformadas neste estudo.	51
Figura 20. Cinética de crescimento das células de <i>K. lactis</i> construídas neste estudo em meio YPD.	52
Figura 21. Cinética de crescimento exponencial (ln) das células de <i>K. lactis</i> construídas neste estudo em meio YPD.	53
Figura 22. Curva padrão da relação entre AH e o complexo AH-CTAB. $R^2=0.99012$	55
Figura 23. Cinética de crescimento das células de <i>K. lactis</i> construídas neste estudo em meio YPD otimizado.	57
Figura 24. Cinética de crescimento exponencial (ln) das células de <i>K. lactis</i> construídas neste estudo em meio YPD otimizado.	57
Figura 25. PCR de cDNA para análise dos transcritos dos genes inseridos em <i>K. lactis</i>	59
Figura 26. Cinética de crescimento das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes <i>hasAP</i> e <i>hasB</i>) em meio YPGal otimizado.	61
Figura 27. Cinética de crescimento exponencial com valores em ln das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes <i>hasAP</i> e <i>hasB</i>) em meio YPGal otimizado.	62
Figura 28. Cinética de crescimento das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes <i>hasAP</i> e <i>hasB</i>) em meio YPLac otimizado.	63

Figura 29. Cinética de crescimento exponencial com valores em ln das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes <i>hasAP</i> e <i>hasB</i>) em meio YPLac otimizado.....	64
Figura 30. Cinética de crescimento das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes <i>hasAP</i> e <i>hasB</i>) em meio YPSuc otimizado.	65
Figura 31. Cinética de crescimento exponencial com valores em ln das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes <i>hasAP</i> e <i>hasB</i>) em meio YPSuc otimizado.	66
Figura 32. Metabolismo de Ácido Hialurônico a partir da Glicólise construído neste estudo....	73
Figura 33. Mapa físico do plasmídeo sintético pBSK-HASA1 que contém o gene <i>hasA1</i> (Hialuronan Sintase isoforma 1) vindo de <i>Homo sapiens</i> e otimizado para a levedura <i>K. lactis</i> ..	83
Figura 34. Mapa físico do plasmídeo sintético pBSK-HASA2 que contém o gene <i>hasA2</i> (Hialuronan Sintase isoforma 2) vindo de <i>Homo sapiens</i> e otimizado para a levedura <i>K. lactis</i> ..	83
Figura 35. Mapa físico do plasmídeo sintético pBSK-HASA3 que contém o gene <i>hasA3</i> (Hialuronan Sintase isoforma 3) vindo de <i>Homo sapiens</i> e otimizado para a levedura <i>K. lactis</i> ..	84
Figura 36. Mapa físico do plasmídeo sintético pBSK-HASAP que contém o gene <i>hasAP</i> (Hialuronan Sintase) vindo de <i>Pasteurella multocida</i> e otimizado para a levedura <i>K. lactis</i>	84
Figura 37. Mapa físico do plasmídeo sintético pBSK-HASB que contém o gene <i>hasB</i> (UDP-Glucose Desidrogenase) vindo de <i>Xenopus laevis</i> e otimizado para a levedura <i>K. lactis</i>	85
Figura 38. Mapa físico do plasmídeo p424-GPD utilizado neste estudo para construção do sistema de expressão do gene <i>hasB</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constantes de Michaelis-Menten para as enzimas HASA1, HASA2 e HASA3 segundo Itano et al.	9
Tabela 2. Cepas microbianas utilizadas neste estudo.....	18
Tabela 3. Nome das cepas originadas neste estudo.....	19
Tabela 4. Enzimas de restrição utilizadas neste estudo.....	25
Tabela 5. Vetores utilizados neste estudo.	25
Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.....	26
Tabela 7. Metodologias de transformação de <i>K. lactis</i> utilizadas neste estudo.	46
Tabela 8. Número de colônias transformantes em placa e eficiência de transformação de acordo com as metodologias de transformação de <i>K. lactis</i> utilizadas neste estudo.....	47
Tabela 9. Taxa de crescimento e OD600 final após 24 h de crescimento das cepas construídas neste estudo em YPD para produção de AH.	53
Tabela 10. Quantidade de AH produzida pelas cepas construídas neste estudo em YPD-Glicose.	55
Tabela 11. Composição do meio YPD otimizado para a produção de AH com breve resumo de suas funções.	56
Tabela 12. Taxa de crescimento das cepas construídas neste estudo em YPD-Glicose otimizado para produção de AH.	58
Tabela 13. Quantidade de AH produzida pelas cepas construídas neste estudo em YPD otimizado.....	58
Tabela 14. Taxa de crescimento e produção de AH das cepas GG799 e BAP em meio YPGal Otimizado.	62
Tabela 15. Taxa de crescimento e produção de AH das cepas GG799 e BAP em meio YPLac Otimizado.	64
Tabela 16. Taxa de crescimento e produção de AH das cepas GG799 e BAP em meio YPSuc Otimizado.	66
Tabela 17. Taxas de crescimento e produção de AH das cepas construídas em todos os meios de cultura testados neste estudo para a produção de Ácido Hialurônico.....	67
Tabela 18. Características chaves de <i>K. lactis</i> comparadas à <i>S. cerevisiae</i>	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μF	Microfaraday
AH	Ácido Hialurônico
<i>amdS</i>	Gene da enzima acetamidase responsável por hidrolisar acetamida
AMP	Monofosfato de Adenosina
AMPK	AMP ativado por proteína quinase
AmpR	Gene que confere resistência a ampicilina
ATP	Trifosfato de Adenosina
cDNA	DNA complementar
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amônio
Da	Dalton
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de etídio
FDA	Food and Drug Administration
g	Aceleração da gravidade
GAG	Glicosaminoglicanos
HAS	Enzimas Hyaluronic Acid Synthases
HASA1	Isoforma 1 da enzima HAS de humanos
HASA2	Isoforma 2 da enzima HAS de humanos
HASA3	Isoforma 3 da enzima HAS de humanos

HASAP	Enzima HAS da bactéria <i>P. multocida</i>
kb	Quilobase
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kV	Quilovolts
LB	Meio Luria-Bertani
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina forma oxidada
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
°C	Grau Celsius
OD ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
p/v	Peso por volume
pADH	Promotor Álcool Desidrogenase de <i>S. cerevisiae</i>
pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG 4000	Polietileno Glicol 4000
pGPD	Promotor Gliceraldeido-3-Fosfato Desidrogenase de <i>S. cerevisiae</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pLAC4	Promotor LAC4 de <i>K. lactis</i>
pmHAS	Enzima HAS da bactéria <i>P. multocida</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNase A	Ribonuclease A
RPM	rotações por minuto
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de PCR s
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOB	Meio Super Optimal Broth

SOC	Meio Super Optimal Broth com Glicose
Status GRAS	“Generally Recognized as Safe”; algo seguro aos seres humanos
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBE	Tampão tris-acetato-EDTA-Ácido Bórico
TFB	Tampão de transformação bacteriano
UDP	Difosfato de Uridina
UDP-GlcNAc	UDP-N-Acetil Glucosamina
UDP-GlcUA	UDP-Ácido Glucurônico
UTP	Trifosfato de Uridina
VPP	Via das Pentoses Fosfato
v/v	Volume por volume
YCB	Meio Yeast Carbon Base
YNB	Yeast nitrogen base
YPD	Meio Yeast Peptone Dextrose
Ω	Ohm

RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero composto de repetições alternadas dos monossacarídeos Ácido Glucurônico e N-Acetil glucosamina, sendo presente em todos os vertebrados e em humanos principalmente na pele. O AH possui aspecto viscoso, ajuda no rejuvenescimento da pele quando aplicado em humanos e é uma molécula considerada segura na utilização em animais em geral, por estes motivos o AH é muito utilizado na indústria farmacêutica e médica. Atualmente o AH é produzido por bactérias, que em diferentes níveis, são patogênicas aos animais, o que dificulta o escalonamento desta tecnologia e eleva os custos de purificação o que torna o AH uma molécula de alto custo financeiro. Leveduras não são capazes de sintetizar AH, mas são fábricas perfeitas para a sua produção, uma vez que são consideradas seguras, mais adaptadas às condições industriais quando comparado a bactérias e possuem parcialmente a via da síntese do ácido AH, sendo capazes de sintetizar um de seus precursores, o açúcar N-Acetil Glucosamina. As enzimas HAS (Hyaluronic Acid Synthases) que sintetizam AH são proteínas que se acoplam à membrana das células formando novas cadeias de AH pela junção dos dois açúcares precursores. Todos os vertebrados possuem HAS semelhantes e classificadas como Classe I, enquanto que a bactéria patogênica *Pasteurella multocida*, possui uma HAS diferente classificada como classe II. A fim de observar o possível impacto na síntese de AH devido às diferenças entre HAS de classe I de classe II, estes foram inseridos na levedura *Kluyveromyces lactis* concomitante com o gene *hasB* (*UDP-Glicose Desidrogenase*). Com o auxílio de um estudo que testou a eficiência de transformação de *K. lactis* por metodologias de choque térmico e de eletroporação, foram construídas 4 cepas recombinantes de *K. lactis* contendo as diferentes formas de HAS de modo a aumentar a produção de AH pela levedura. Após a construção das cepas recombinantes, um meio otimizado baseado nas necessidades de co-fatores e metabólitos principais utilizados na via de síntese de AH foi desenvolvido e utilizado nas cinéticas de crescimento de *K. lactis*. Também testada, a influência das fontes de carbono glicose, sacarose, lactose e galactose foram visualizadas durante o crescimento nas cepas produtoras de AH, uma vez que diferentes fontes de carbono afetam de maneira diferente

a glicólise e conseqüentemente o metabolismo de AH na célula. Lactose e sacarose aumentaram a produção de AH nas células em relação a galactose e glicose devido a um abastecimento mútuo da via de síntese dos dois precursores do AH. Utilizando lactose como fonte de carbono, foi alcançada uma melhor produção de 0,39 g/L de AH, valor competitivo com os alcançados por outra única levedura produtora de AH, o que prova pela primeira vez que *K. lactis* é uma potencial candidata para otimização da produção deste biopolímero.

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a biopolymer composed of alternating repeats of monosaccharides Glucuronic Acid and N-Acetyl glucosamine, being present in all vertebrates and humans mainly in the skin. The HA has a viscous appearance, is used in skin rejuvenation when applied in humans and is a safe molecule for application in animals in general, for these reasons HA is widely used in the pharmaceutical and medical industry. Currently, HA is produced by bacteria pathogenic to humans, and are difficult to scale due to technology and purification costs. Yeasts are perfect factories for HA production, since they are considered safe, more adapted to industrial conditions when compared to bacteria and have partially complete the synthesis route of HA, being able to synthesize one precursor, the UDP-N-Acetyl Glucosamine. HA is produced by HAS (Hyaluronic Acid Synthase) enzymes. HAS enzymes have transmembrane domains that couple to the membrane of the cells forming new chains of HA by the junction of the two precursor sugars located in the cytoplasm. All vertebrates have HAS classified as Class I, whereas the pathogenic bacterium *Pasteurella multocida* have a different HAS (*pmHAS*) classified as Class II. To observe the impact on HA synthesis due to the differences between Class I and Class II HAS, in this study the *hasA* genes were inserted into yeast *Klyveromyces lactis* concomitant with the *hasB* gene (UDP-Glucose Dehydrogenase). A total of 4 recombinant strains of *K. lactis* containing different isoforms of HAS were constructed to increase a production of HA by yeast. After the construction of the recombinant strains, an optimized medium to auxiliary the needs of cofactors and metabolites was used in the synthesis pathway of HA for the development and use of *K. lactis* in fermentations. Also tested, the influence of the sources of carbon glucose, sucrose, lactose and galactose were visualized in fermentation in the HA producing strains, since different carbon sources affect glycolysis differently and consequently the metabolism of HA in the cell. Lactose and sucrose increased HA production in cells relative to galactose and glucose due to a mutual supply of the synthesis pathway of the two HA precursors. Using lactose as a carbon source, it obtained a better yield of 0.39 g / L of HA, a competitive value with the finished results of another

single HA -producing yeast, which proves for the first time that *K. lactis* is a potential candidate for optimization of the production of this biopolymer.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDO HIALURÔNICO

Pertencente à família dos glicosaminoglicanos (GAGs), o Ácido Hialurônico (AH) é um biopolímero composto de repetições alternadas de 2 distintos monossacarídeos, o ácido glucurônico e a N-acetil-glucosamina (Figura 1). Este está presente em abundância em todos os animais [1,2], especialmente na pele dos mamíferos sendo encontrado também em algas, moluscos, algumas linhagens de células eucarióticas e alguns chlorovirus, porém ausente em fungos, plantas e insetos [2].

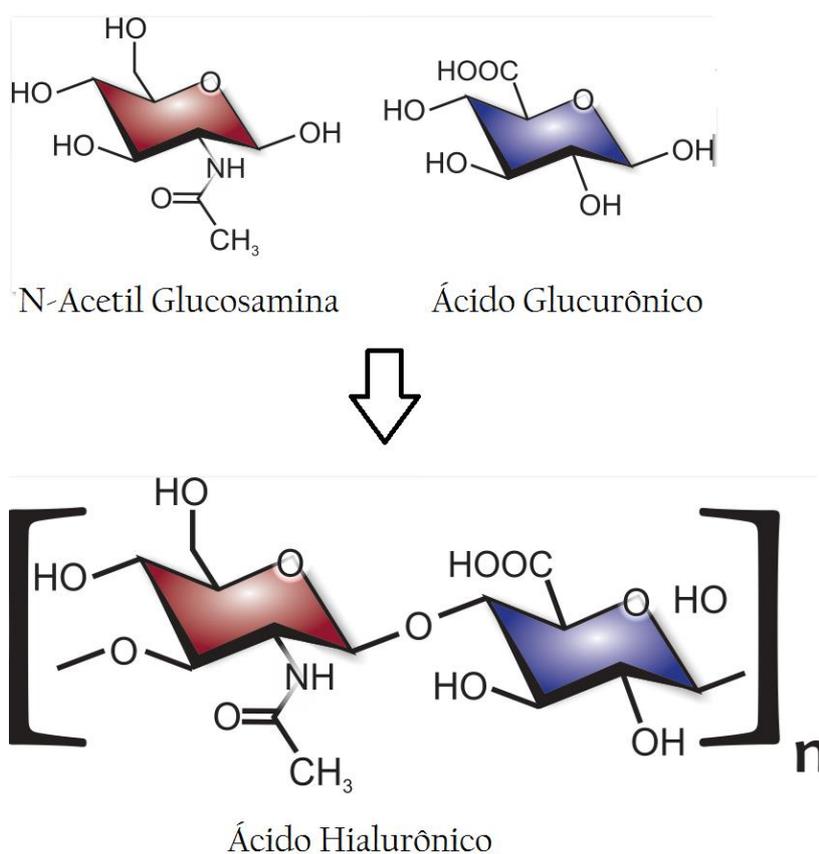


Figura 1. Estrutura molecular de uma unidade dissacarídica de Ácido Hialurônico contendo N-Acetil Glucosamina e Ácido Glucurônico.

O AH possui alta afinidade por água, tendo portanto alta capacidade lubrificante além de uma característica altamente viscosa, o que lhe confere funções na comunicação,

crescimento, adesão e diferenciação celular, no reparo de tecidos, migração celular, regulação de processos de matriz extracelular, câncer e angiogênese [3,4].

O AH é também encontrado em abundância no globo ocular e nas articulações dos animais vertebrados, onde fornece um ambiente fluído e lubrificado, além de proteger células e ossos vizinhos contra os choques que ocorrem com frequência nas articulações.

As moléculas de AH podem atingir até 6 milhões de Daltons (Da) [5,6] na qual cada unidade dissacarídea contém 397 Da [4], e embora o AH seja sintetizado pelos organismos em diferentes variações de tamanho molecular, apenas as cadeias de alto peso molecular, são utilizadas pelas indústrias que a comercializam. Geralmente, uma cadeia de AH contendo entre 10^4 e 10^7 Da é considerada de ótima qualidade [7], no entanto, moléculas curtas de AH também desempenham funções importantes em alguns organismos, principalmente como moléculas de interação com receptores celulares *in vivo* [8].

1.2 OBTENÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO

Nas primeiras utilizações, o AH era tradicionalmente extraído de fontes animais, principalmente da crista de galo, que chega a conter 7,5 mg/ml [9] deste polímero. No entanto, o AH de crista de galo, além de conter impurezas e toxinas animais que exigem um laborioso e dispendioso processo de purificação, é caracteristicamente de baixa qualidade, ou seja, contém poucas repetições dissacarídeas, o que causa desinteresse na indústria que utiliza este polímero. O humor vítreo do globo ocular de gados e o fluído sinovial bovino, que também são fontes animais que contém grandes quantidade de AH apresentam as mesmas desvantagens [10,11].

Dentro deste contexto, estudos visando obter AH a partir de fontes não animais levou ao estabelecimento da produção de AH via microrganismos. Dentre os microrganismos que melhor produzem AH estão as bactérias pertencentes à família *Streptococcus* do grupo A e C que possuem um operon contendo entre 3 e 5 genes (dependendo da espécie) dedicado exclusivamente à biossíntese desta molécula [12]. A grande maioria dos microrganismos que sintetizam AH, especialmente as bactérias, possuem como característica principal a formação de uma cápsula ao redor de sua superfície quando vista ao microscópio, cápsula esta composta de Ácido Hialurônico e relatada primeiramente em 1937 [13]. Estudos posteriores comprovaram que as bactérias

utilizam as cápsulas de AH para se camuflar do sistema imunológico de um hospedeiro animal e causar uma infecção, desta forma, todas as bactérias que sintetizam AH naturalmente são patogênicas aos humanos ou animais. Este é o principal problema da obtenção de AH via fermentação utilizando estes microrganismos devido aos altos custos de biossegurança e purificação envolvidos no processo.

Além dos riscos biológicos envolvendo a produção de AH por bactérias, qualquer microrganismo conhecido produtor de AH possui os seguintes desafios tecnológicos para sua produção: (1) a competição pelos substratos entre a via de síntese de AH e outras vias de função vital para a célula como a via da síntese de parede celular; (2) a limitação causada em fermentações que ultrapassam concentrações acima de 5 g/L de AH, já que por ser uma molécula muito viscosa o AH causa a privação de oxigênio e dificuldade na agitação do meio; (3) o acúmulo indesejável de outros produtos de metabolismo como o ácido láctico em bactérias, que inibem o crescimento microbiano [14,15] e (4) uma falta de controle no nível de transcrição dos genes *hasA* que poderia resultar em um controle da quantidade e qualidade das cadeias de AH.

Ainda hoje, o AH é obtido por crescimento de bactérias nocivas à saúde animal, embora existam cepas de microrganismos com status GRAS modificadas geneticamente para produção desta molécula como a bactéria *Bacillus subtilis* com melhor produção de 6,8 g/L [16] de AH e a levedura *Pichia pastoris* com melhor produção de 1,7 g/L de AH [17,18], ambos os microrganismos já utilizados em indústria. Entretanto, em comparação com os microrganismos produtores naturais, os microrganismos modificados geneticamente ainda são uma pequena parcela. Principalmente no caso de leveduras, apenas um estudo que utiliza *Pichia pastoris* existe e obteve rendimento de AH 40% menor que os rendimentos geralmente obtidos por bactérias. Estudos envolvendo a utilização de microrganismos eucariotos produtores de AH poderiam além de contribuir com o mercado de AH, elucidar mecanismos metabólicos ainda desconhecidos durante a síntese de AH.

1.3 BIOSÍNTESE DE ÁCIDO HIALURÔNICO

O AH é uma molécula com funções majoritariamente extracelulares, seja na proteção das células, camuflagem, ou interação com receptores celulares. As células que

sintetizam AH possuem um sistema de síntese na qual as cadeias desta biomolécula são concomitantemente sintetizadas e secretadas o que em teoria permite que cadeias de AH apresentem tamanho ilimitado. A biossíntese de AH é realizada por enzimas chamadas Hyaluronic Acid Synthases (HAS). Estas possuem domínios transmembrânicos, e, portanto, se acoplam à membrana celular (Figura 2). Uma vez disponíveis no citoplasma da célula, os 2 precursores do AH, UDP-Ácido Glucurônico (UDP-GlcUA) e UDP-N-Acetil-Glucosamina (UDP-GlcNAc) são utilizados como substratos pela enzima HAS presente na membrana celular, a qual catalisa a junção das duas moléculas concomitante com a secreção do biopolímero recém- sintetizado[19]. De uma forma geral, enzimas HAS são multiméricas possuindo 6 diferentes domínios protéicos de ligação ao substrato: 1 sítio para a ligação do substrato UDP-GlcUA, 1 sítio para a ligação do substrato UDP-GlcNAc, 1 domínio transferase GlcNAc β (1-4), 1 domínio transferase UDP-GlcUA β (1-3), 1 domínio responsável por receber as cadeias novas de AH que estão sendo formadas e 1 domínio responsável por excretar a cadeia para o espaço extracelular [18,20].

Dentre os fatores que mais afetam a atividade das enzimas HAS está a concentração dos 2 precursores presentes no citoplasma da célula. Como a maioria das enzimas, as HAS possuem um mecanismo no qual as cadeias de ácido hialurônico são alongadas até que as fontes dos 2 substratos precursores se esgotem, no entanto, por mecanismos ainda não definidos, células bacterianas terminam o alongamento de cadeias de AH mesmo com altas concentrações de substratos no citoplasma [21] . Estudos sugerem que baixas concentrações (em torno de 0,05 mM de UDP-GlcNAc e 0,1 mM de UDP-GlcUA) de UDP-GlcNAc em relação à UDP-GlcUA ativam uma cascata de sinalização que leva a fosforilação de um receptor da enzima HAS que libera as cadeias de AH recém-sintetizadas[21]. Como a síntese de AH necessita de energia não apenas em termos de ATP, mas também de moléculas como acetil-CoA , glutamina, UTP e UDP, cascatas de sinalização principalmente relacionadas com AMPK (AMP ativada por proteína quinase) afetam as enzimas HAS devido à ativação do AMPK quando a taxa ATP:AMP abaixa [22]. Em outras palavras, a biossíntese de ácido hialurônico é falha quando algum dos precursores está em maior concentração que o outro, ou seja, fora da proporção 1:1 [22].

O estudo posterior da síntese de AH na bactéria patogênica *Pasteurella multocida* trouxe ainda novas descobertas sobre as enzimas HAS [23]. Todas as HAS descritas até

este momento possuíam grande homologia na sequência de aminoácidos além de uma topologia estrutural semelhante[24,25]. Entretanto, a HAS de *Pasteurella multocida* (pmHAS) apresenta diferenças em tamanho, topologia e mecanismo de ação. A partir daí as HASs foram divididas em 2 classes, a Classe I presente em algumas espécies de *Streptococcus*, vírus e vertebrados e a Classe II, que tem como única representante pmHAS[19,26]. As HAS de classe I contém múltiplos domínios transmembrânicos, enquanto que a HAS de classe II possui um único domínio perto do carboxi terminal e que ancora a enzima na membrana celular por um mecanismo ainda não descrito (Figura 2) [19]. Ainda, as HAS de classe I alongam as cadeias de AH pela extremidade redutora enquanto que a HAS de classe II alonga pela extremidade não redutora. Embora todas as HAS de classe I sejam semelhantes entre si, a descoberta de um gene *has* dentro de um plasmídeo de *Bacillus anthracis* confirma a teoria de que o gene *has* foi transferido de bactéria para vertebrados[2], o que explica porque HAS de Classe I, mesmo em organismos tão distintos, sejam tão semelhantes.

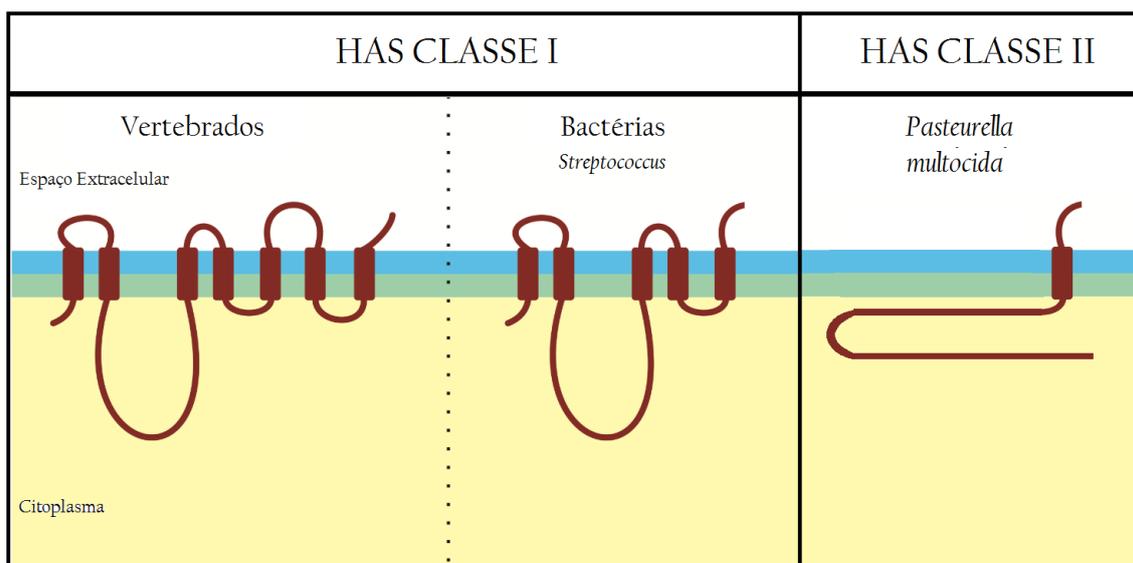


Figura 2. Topologia das enzimas transmembrânicas Hyaluronan Synthases. As HAS de classe I possuem dentro de 5 a 7 domínios transmembrânicos dependendo do organismo, enquanto que a única HAS de classe II da bactéria *P. multocida* possui apenas 1 domínio transmembrânico.

Dentro das HAS de classe I, existem 3 isoformas distintas descritas: HASA1, HASA2 e HASA3, codificada pelos genes *hasA1*, *hasA2* e *hasA3* [26]. Apenas o anfíbio *Xenopus laevis* é exceção contendo 4 isoformas de HAS e sendo capaz de sintetizar cadeias de AH de 20 MDa *in vitro*, enquanto que de uma forma geral animais produzem

em média cadeias de 3 MDa [17,27,28]. Naoki Itano *et al.* em 1999 desenvolveram um estudo a fim de elucidar as características cinéticas das 3 isoformas de HAS presentes em mamíferos, que embora extremamente similares em relação à sequência gênica possuem propriedades cinéticas e mecanismos de ação distintos [29]. Sob concentrações saturantes dos UDP-açúcares precursores do AH, as enzimas HAS foram analisadas quanto à massa molar das cadeias de AH geradas. HASA1 e HASA2 produziram cadeias de 2×10^5 a 2×10^6 Da, enquanto HASA3 gerou cadeias de 1×10^5 a 1×10^6 Da. No entanto, maiores tempos de incubação mudou consideravelmente o peso das cadeias; HASA2 polimerizou cadeias de AH de tamanhos cada vez maiores até 4 horas de reação chegando a 4×10^6 Da, HASA1 teve a síntese de AH quase completamente cessada em 1 hora de reação e HASA3 sintetizou cadeias de tamanho maiores até 8 horas de reação mas com média de tamanho de 2.5×10^6 Da, o que sugere que HASA3 sintetiza cadeias de maneira mais lenta que HASA1 e HASA2, pois demora mais tempo e produz cadeias menores[29]. De fato, em valores estimados o mesmo estudo mostrou que HASA1 sintetiza AH em taxa de 1256 ± 251 monossacarídeos/minuto; HASA2 sintetiza com 1014 ± 338 monossacarídeos/minuto e HASA3 sintetiza com 174 ± 42 monossacarídeos/minuto. A Tabela 1 mostra os valores cinéticos das enzimas HASA1, HASA2 e HASA3 obtidas no estudo de Itano et al [29].

Tabela 1. Constantes de Michaelis-Menten para as enzimas HASA1, HASA2 e HASA3 segundo Itano et al.

HAS	[UDP-substrato] <i>mM</i>	Km do UDP-substrato $\mu M \pm S.E.$	V _{max} <i>pmol/h/unidade</i>
UDP-GlcUA			
HASA1	1.0	1011,4 ± 37,6	330,5 ± 81
HASA2	1.0	348,2 ± 15,1	398,5 ± 50,6
HASA3	1.0	247,2 ± 12,8	340,6 ± 33,9
UDP-GlcNAc			
HASA1	2.0	72,9 ± 4,3	283,8 ± 18,2
HASA2	2.0	30 ± 3,4	336,9 ± 21,1
HASA3	2.0	34,6 ± 2	308,2 ± 12,4

1.4 VIA METABÓLICA DA SÍNTESE DE UDP-GlcUA E UDP-GlcNAc

Ambos os precursores do AH, UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc, são sintetizados a partir de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente (Figura 3). Desta maneira, a biossíntese de AH é um processo que compete diretamente com o crescimento do microrganismo ao desviar o fluxo de carbono da glicólise. Além disto, em bactérias, UDP-GlcNAc é utilizado como precursor de síntese de parede celular, enquanto que na via do UDP-GlcUA há metabólitos utilizados na síntese de ácidos tecóicos, que em combinação com os peptidoglicanos correspondem a 20% do peso seco de uma célula regular [15].

Embora não sejam enzimas que sintetizem diretamente cadeias de AH, parte das enzimas e seus respectivos genes codificadores presentes na via metabólica de AH são denominadas enzimas HAS. Enquanto que a própria Hyaluronic Acid Synthase é denominada HASA, as enzimas que geram os metabólitos UDP-Ácido Glucurônico e UDP-Glicose são denominadas respectivamente HASB e HASC, enquanto que a enzima que sintetiza o precursor UDP-N-Acetil-Glucosamina é denominada HASD (Figura 3). Tal denominação geral deve-se ao fato de que algumas bactérias do gênero *Streptococcus* possui um operon *has* dedicado à síntese de AH e contendo os genes codificadores das 4 enzimas citadas acima, sendo todas então chamadas de enzimas HAS.

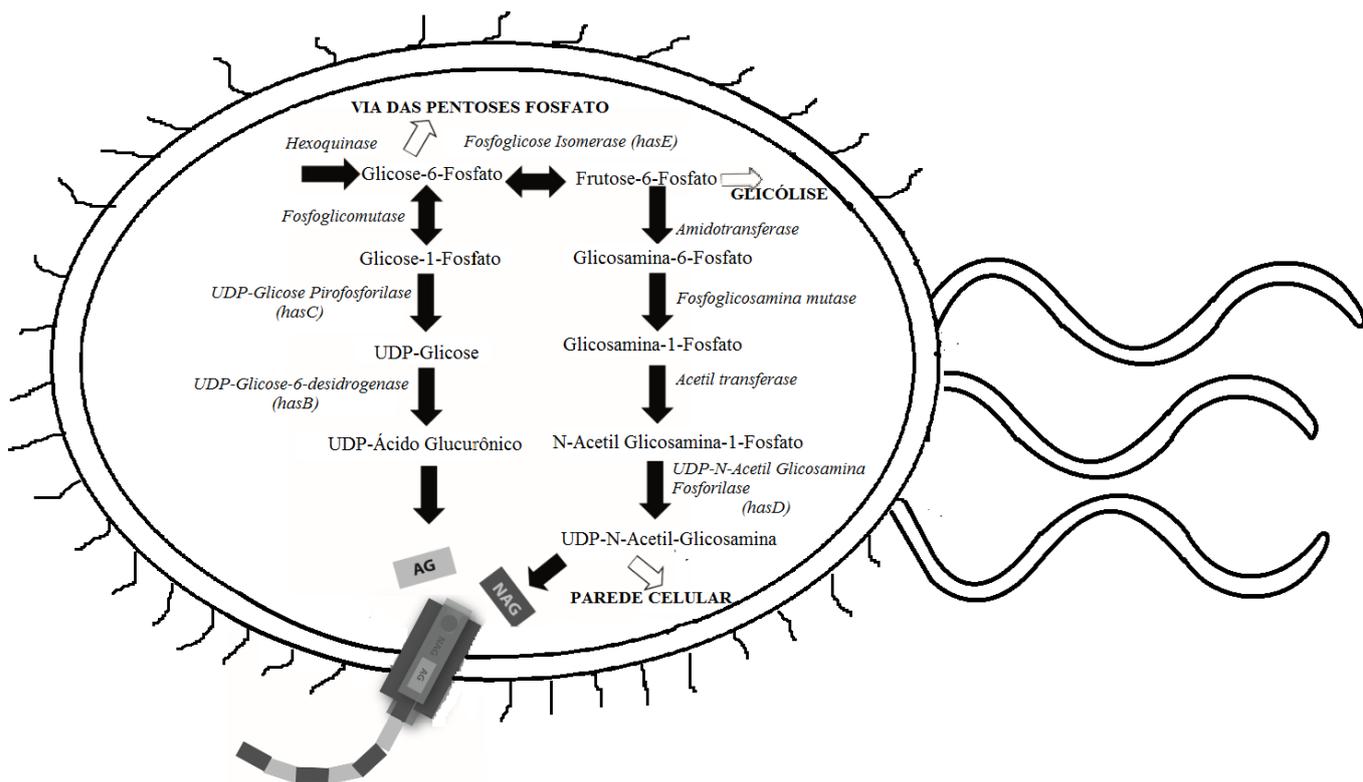


Figura 3. Via metabólica da síntese de Ácido Hialurônico em bactérias com destaque para a enzima HAS acoplada à membrana do microrganismo. Setas fechadas indicam reações sequenciais entre metabólitos, enquanto que setas abertas indicam desvios de metabólitos para um fluxo geral.

Para o reconhecimento de UDP-GlcUA e UDP-GlcNAc como substratos para a síntese de AH, as enzimas HAS ainda exigem que ambos os precursores estejam acoplados a uma molécula de uridina difosfato (UDP) em uma reação que exige o uso de uma molécula de ATP para a ligação de cada monossacarídeo. Em termos energéticos, as reações metabólicas que partem da via glicolítica até a síntese de 1 mol do dissacarídeo de AH demandam 3 mols de ATP, 2 mols de UTP, 2 mols de glicose e 1 mol de acetyl-CoA, além de gerar 1 mol de NADH que força a célula a buscar formas de reciclar NAD⁺ [9,18]. Em outras palavras, a biossíntese de AH não é apenas uma via que compete com o crescimento celular, como também é um processo que exige um gasto energético bastante alto para a célula que o produz e isto explica porque poucos microrganismos sintetizam AH naturalmente.

1.5 MICRORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE PARA A SÍNTESE DE AH

A produção de AH em microrganismos e animais é extremamente diferente em relação ao peso molecular e velocidade de síntese, sendo que microrganismos são 10x mais rápidos que animais [15,30]. As sérias desvantagens dos microrganismos que produzem AH naturalmente, levaram a transferência de vias metabólicas para outras bactérias como *Lactococcus lactis* [31–35], *Corynebacterium glutamicum* [36], *Agrobacterium sp* [37], *Escherichia coli* [24,38–42] e *Bacillus subtilis* [16,34,43] que chegaram a produzir 0,234 g/L, 1,2 g/L, 2,4 g/L, 3,8 g/L e 2,4 g/L de AH, respectivamente [18].

Os estudos citados acima envolvendo a manipulação genética de bactérias não nocivas usando a biossíntese de AH envolve a expressão dos genes *hasA*, *hasB* e *hasC*, além de por vezes em conjunto com o gene *hasD*. Embora bactérias produtoras de AH consigam sintetizar esta molécula em meios de cultura contendo apenas uma fonte de carbono e nitrogênio, os maiores rendimentos de AH em bactérias modificadas geneticamente é obtido a partir de crescimentos em batelada aeróbias e com meio complexos, ou seja, contendo vitaminas, sais, micronutrientes, co-fatores e outras moléculas específicas que interagem e ajudam no funcionamento das enzimas que formam o operon *has*[18]. Desta maneira, independente do microrganismo produtor, uma produção de viável de AH é considerado como um processo de alto custo devido à gastos principalmente com meios de cultura e purificação das cadeias do ácido.

Até o presente momento, somente um estudo anterior a este manipulou uma levedura para a produção de AH. Neste, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* teve seu metabolismo modificado para a síntese de AH através da inserção dos genes *hasA*, *hasB*, *hasC* e *hasD*, alcançando uma produção de 1,7 g/L[17]. Entretanto, o estudo apresenta um desafio em relação ao precursor de AH UDP-GlcNAc que é utilizado pela levedura para a síntese de quitina e parede celular, ocorrendo um desvio do fluxo da síntese de AH. Ainda, a utilização neste estudo de uma estratégia na qual os genes inseridos foram submetidos ao controle de promotores indutivos permitiu comprovar que a síntese de AH sofre uma dependência muito alta de uma concentração equilibrada dos 2 precursores no citoplasma da célula. Embora contrariamente ao esperado, em *Pichia pastoris* as enzimas HAS dependem mais do precursor UDP-GlcUA que de UDP-GlcNAC, enquanto que em

bactérias ocorre o inverso. Por fim, o estudo envolvendo *P. pastoris* utilizou metodologias de transformação com uso de plasmídeo com marca de seleção para antibiótico (zeocina), o que é uma característica indesejada para fermentações nas indústrias.

1.6 *Kluyveromyces lactis*

Esta levedura, quando descoberta, foi denominada *Saccharomyces lactis*, por parecer muito com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, as duas leveduras eram incapazes de realizar cruzamentos, o que fez *S. lactis* ser colocada no gênero *Kluyveromyces*, embora ainda pertença à mesma família de *Saccharomyces* [44]. Após ser isolada, *K. lactis* foi descrita em vários produtos derivados do leite (queijos, iogurtes, etc) e no próprio leite, o que a tornou uma levedura dita como inofensiva aos seres humanos. Segundo o FDA (Food and Drug Administration), “não existe relatos de toxicidade ou patogenicidade associados com a presença de *K. lactis* em comidas” [44]. Industrialmente uma cepa geneticamente modificada de *K. lactis* é utilizada para produção de quimosina [45].

K. lactis é ainda uma levedura muito estável quando modificada geneticamente e possui promotores com características atrativas para a produção heteróloga de compostos químicos, como por exemplo o promotor LAC4 nativo de *K. lactis* que é induzido 100x na presença de galactose ou lactose e não inibido por glicose[46]. Além disto, *K. lactis* possui kits comerciais disponíveis para sua modificação genética, como o “*K. lactis* Protein Expression Kit”, comercializado pela New England Biolabs Inc. (NEB) e que utiliza plasmídeos com marca de seleção dominante do gene *amdS*, que permite a levedura codificar uma enzima capaz de hidrolisar acetamida em um meio de cultura no qual a única fonte de nitrogênio disponível para utilização é acetamida.

Ainda, *K. lactis* possui relatos de transformação tanto por eletroporação quanto por choque térmico, apesar de não serem métodos que atingem eficiência tão alta quanto os realizados em *S. cerevisiae*, que é da mesma família. Os estudos envolvendo a produção de compostos heterólogos em *K. lactis* utilizam em sua maioria técnicas de eletroporação para a transformação das células, como por exemplo nas pesquisas de *K. lactis* produtora de Ácido Orótico [47], produtora da enzima Frutosil Transferase[48], produtora de Glicoamilase [49] e produtora de vitamina C[50]. Por outro lado, o kit “*K. lactis* Protein Expression Kit”, da New England Biolabs Inc. (NEB) comercializa células

de *K. lactis* cepa GG799 já prontas para transformação por choque térmico, o que fez com que a maioria dos estudos que usa choque térmico em células de *K. lactis* incluísse em suas metodologias o uso do kit, como nos estudos de *K. lactis* produtora da enzima Brazeína[51] e Enterocina [52]. Poucos estudos descrevem a utilização de choque térmico independente do kit da NEB para a transformação de células, como o estudo de *K. lactis* produtora de ácido glicólico[53], mas com uma eficiência menor do que aquela obtida quando utilizado o kit. Por fim, existem alguns estudos focados exclusivamente no teste de metodologias de transformação, tanto por eletroporação quanto por choque térmico, de células de *K. lactis* [54–57], o que mostra que ainda não existe uma metodologia de transformação considerada padrão de alta eficiência e independente de kits para *K. lactis*.

Finalmente leveduras são amplamente conhecidas por crescerem melhor em pHs ácidos, sendo vantajoso utilizar estas células como produtoras de compostos ácidos como o ácido hialurônico e que ainda co-produzem moléculas como o ácido lático. Em outras palavras, não só estas células não serão inibidas durante o crescimento celular como terão um ótimo crescimento e produção, pois também são menos sensíveis do que as bactérias. De forma específica, *K. lactis* já é uma levedura amplamente utilizada na produção de compostos heterólogos [45], como por exemplo quimosina, lactose e galactose, sendo desta forma uma levedura já adaptada a um ambiente industrial que apresenta oscilações de pressão e temperatura. Por todos estes motivos *K. lactis* foi escolhida como a linhagem hospedeira de trabalho neste estudo.

1.7 MERCADO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

Com as descobertas das utilizações do ácido hialurônico principalmente na área estética, a molécula ganhou interesse com o passar dos anos e atualmente é avaliada entre 5000 e 10000 US\$/kg dependendo do tamanho da cadeia e sua pureza [4,58]. Pesquisas realizadas pela empresa internacional "Transparency Market Research" [59] demonstraram que o Mercado mundial de ácido hialurônico foi de 5.32 bilhões de dólares em 2012 e deve atingir 9.85 bilhões de dólares em 2019.

O AH é o principal constituinte do humor vítreo (0,1 mg/ml de massa úmida), do fluido sinovial humano (3-4 mg/ml com massa de 10^6 Da) [10], do cordão umbilical (com massa de 10^6 Da) e em todo o organismo 50% do ácido está presente na pele [60], onde a mantém elástica e hidratada [61]. No entanto, em seres humanos o ácido hialurônico aumenta sua taxa intrínseca de degradação enquanto diminui sua taxa de síntese com o avanço da idade, sendo que pessoas com idade mais avançada não possuem a mesma quantidade de AH no organismo em comparação com crianças devido à decrescente capacidade das enzimas HAS sintetizarem AH com o tempo. Estima-se que 1/3 de toda a quantidade de ácido hialurônico em um homem de 70kg é sintetizada e clivada por dia [62].

Estes estudos levaram a indústria farmacêutica a utilizar este polissacarídeo na formulação de cosméticos para a pele e olhos [63,64], onde estima-se que 50% dos cremes existentes hoje no mercado para pele possuam ácido hialurônico [14]. Por outro lado, a indústria médica e farmacêutica o utiliza na injeção sob a epiderme para o tratamento e desaparecimento de rugas e nas articulações para o tratamento de osteoartrites onde atua como um lubrificante ósseo [2] e atenuador da dor [65]. Em quantidades menores, o ácido hialurônico é também utilizado na otorrinolaringologia auxiliando na espessura e viscosidade das cordas vocais [66] e como um biocarreador de fármacos pois se liga facilmente ao DNA e proteínas [58,67]. Mais atualmente, estudos sugeriram que o ácido hialurônico é promissor na redução de impulsos e sensibilidades de nervos, associados à dor [6].

Por ser uma molécula naturalmente presente na pele, olhos e articulações de todos os animais vivos, o uso do ácido hialurônico pelos humanos é considerado seguro à saúde independentemente de quem produziu (molécula universal), desde que as formulações apresentem pureza, geralmente exigida de 99% para aplicação em animais. Além disso, sua grande biocompatibilidade e degradação nos dois monossacarídeos precursores que também são considerados seguros tornam o AH uma excelente molécula para ser aplicada diretamente em humanos [68].

De acordo com um banco de dados contendo aproximadamente 80 milhões de documentos de patente de 90 diferentes países, o número de patentes contendo “Ácido Hialurônico” no título é crescente com o passar dos anos (Figura 4). Existem 4844 patentes contendo “Ácido Hialurônico” no título. A maioria das publicações envolve o

desenvolvimento de aplicações médicas e formulações, seguidas pelas indústrias de alimento e química. Dentre as especialidades das formulações médicas, mais da metade é desenvolvida para uso em preparações cosméticas (62%) seguida das de uso em cirurgias de várias áreas como a oftalmologia (28%) (Figura 4). O campo científico também despertou interesse nas moléculas de ácido hialurônico, com o tempo, publicações envolvendo esta molécula foram de 790 entre 1966-1975, 2200 entre 1976-1985, 3300 entre 1986-1895 e 7000 entre 1996-2006[4].

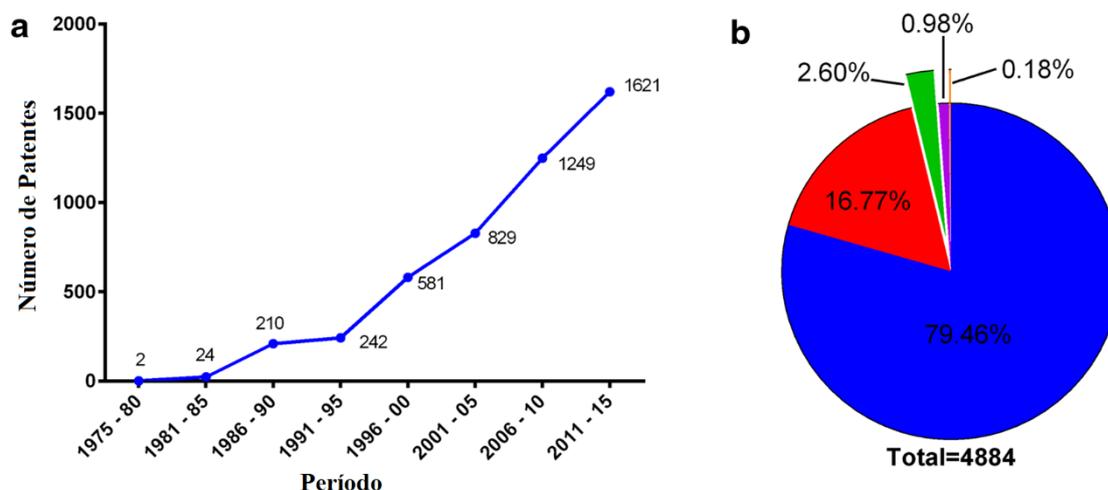


Figura 4. (a) Número de patentes envolvendo Ácido Hialurônico desde 1975 e (b) áreas chaves envolvendo o desenvolvimento das patentes que usam Ácido Hialurônico. Em azul preparações para a área médica, em vermelho para a área da Bioquímica, em verde para a área de alimentos, em laranja processos para o desenvolvimento de novas cadeias de ácido hialurônico e em amarelo outros objetivos.

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que a síntese de ácido hialurônico através da utilização de microrganismos produtores naturais envolve elevados custos relacionados com biossegurança, as cadeias de AH comercializadas atualmente possuem valores de compra altos. Para a síntese de AH, a utilização de células de levedura considerada segura ao homem, como *K. lactis*, consegue diretamente diminuir o custo desta molécula devido à ausência de processos muito rigorosos em relação à biossegurança e garantia de pureza do produto final. Desta forma, o problema central da utilização de um microrganismo patogênico na produção de AH é solucionado e os custos de produção barateados. As

pesquisas também ajudam a elucidar a fisiologia da levedura *K. lactis*, que embora utilizada em processos fermentativos, não possui estudos aprofundados nesta área.

Por fim, a síntese de AH em *K. lactis* é o 2º estudo na literatura que utiliza uma levedura para esta finalidade, o que pode auxiliar no estudo de como ocorrem alguns mecanismos da síntese de AH ainda desconhecidos pela ciência.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer cepas geneticamente modificadas de *Klyuveromyces lactis* produtoras de Ácido Hialurônico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho, juntamente com um fluxo de trabalho deste estudo estão resumidos abaixo e na figura 5:

- 1) Construção de vetores de expressão contendo os genes *hasA* e *hasB* para expressão das enzimas Hyaluronic Acid Synthase e UDP-Glucose-Dehydrogenase em células de *K. lactis*;
- 2) Buscar uma metodologia de transformação de alta eficiência para *K. lactis*, de modo a inserir no genoma da mesma os genes *hasA* e *hasB*, que codificam respectivamente as enzimas Hyaluronic Acid Synthase e UDP-Glucose-Dehydrogenase, de modo a completar a via metabólica da síntese de AH;
- 3) Inserir separadamente em *K. lactis* 4 distintas isoformas do gene *hasA*: 3 isoformas presente em animais e pertencentes à classe I e 1 isoforma nativa da bactéria *P. multocida* pertencente à classe II;
- 4) Caracterizar a produção de ácido hialurônico nas diferentes cepas geneticamente modificadas de *K.lactis*.

Estudo, escolha e síntese dos genes alvos
Construção da cepa geneticamente modificada



Figura 5. Fluxograma para a construção de cepa de *K. lactis* produtora de Ácido Hialurônico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Microrganismos

Tabela 2. Cepas microbianas utilizadas neste estudo.

Microrganismo	Cepa	Genótipo
Bactérias		
<i>Escherichia coli</i>	XL10-Gold (Stratagene)	Tetr Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMRmrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α (MCLAB Molecular Cloning Laboratories)	F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1
Levedura		
<i>Kluyveromyces lactis</i>	GG799 (New England Biolabs)	

Tabela 3. Nome das cepas originadas neste estudo.

Transformação com plasmídeo:	Genes inseridos / Espécie de Origem	Referência de Origem GenBank	Nome da Cepa gerada	Referência
pKlac BAP	<i>hasAP/Pasteurella multocida</i>	AF036004.2	BAP	Este estudo.
	<i>hasB/Xenopus laevis</i>	AY762616.1		
pKlac BA1	<i>hasA1/Homo sapiens</i>	NM_001523.3	BA1	Este estudo.
	<i>hasB/Xenopus laevis</i>	AY762616.1		
pKlac BA2	<i>hasA2/Homo sapiens</i>	NM_005328	BA2	Este estudo.
	<i>hasB/Xenopus laevis</i>	AY762616.1		
pKlac BA3	<i>hasA3/Homo sapiens</i>	NM_005329	BA3	Este estudo.
	<i>hasB/Xenopus laevis</i>	AY762616.1		
--	--		GG799 (selvagem)	NEB

4.1.2 Meios de cultura

- **LB**

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Peptona	1% (p/v)
NaCl	1% (p/v)

pH 7,2

Em caso de meio LB ágar, é adicionado ágar 1,5%.

Em caso de meio LB Amp, é adicionado ágar 1,5% e 100 µL/mL de Ampicilina.

- **SOB**

Triptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,06% (p/v)
KCl	0,05% (p/v)
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	20 mM

Os sais MgCl₂ e MgSO₄ foram diluídos no meio a partir de solução estoque 1M previamente filtrada com filtro de 0,22 µm.

- **SOC**

Triptona	2% (p/v)
Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,05% (p/v)
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glicose	20 mM

Os sais KCl, MgCl₂ e MgSO₄, bem como Glicose foram diluídos no meio a partir de solução estoque 1M previamente filtrada com filtro de 0,22 µm.

Em caso de meio SOC Amp, é adicionado Ágar 1,5% e 100 µL/mL de Ampicilina.

- **YPD (Yeast Peptone Dextrose)**

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

Em caso de meio YPD ágar, adicionado ágar 1,5%.

- **YPD otimizado para a produção de ácido hialurônico**

Glicose	4% (p/v)
Extrato de levedura	0,75 % (p/v)
Peptona	1% (p/v)
K ₂ HPO ₄	0,25% (p/v)
MgSO ₄	0,05% (p/v)
NaCl	0,5% (p/v)
Glutamina	0,04% (p/v)
Glutamato	0,06% (p/v)
Ácido Oxálico	0,02% (p/v)

- **YCB Ágar Acetamida**

Meio YCB (BD Difco™)	1,17% (p/v)
Acetamida	5 mM
Tampão Fosfato de Sódio	30 mM
Ágar	2% (p/v)

- **Meio YCB 10X**

Meio YCB (BD Difco™) 11,7% (p/v)
 Esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

4.1.3 Tampões e soluções

- **Acetamida 100X**

Acetamida 5,9% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 μm .

- **K₂HPO₄ 1 M**

K₂HPO₄ 17,42% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 μm .

- **MgCl₂ 1 M**

MgCl₂ 9,52% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 μm .

- **MgSO₄ 1 M**

MgSO₄ 12% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 μm .

- **CaCl₂ 1 M**

CaCl₂ 11 % (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 μm .

- **Glicose 1 M**

Glicose 18% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 μm .

- **NaH₂PO₄ 0,1 M**

NaH₂PO₄ . H₂O 2,78% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 μm .

- **Na₂HPO₄ 0,1 M**

Na₂HPO₄ . H₂O 2,84% (p/v)
Esterelizado por filtração em membrana de 0,22 μm .

- **Ácido Acético 0,1 M**
Ácido Acético Glacial 0,57% (v/v)
- **Acetato de Sódio 0,1 M**
Acetato de Sódio 1,36% (p/v)
- **Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M pH 7,0**
NaH₂PO₄ 0,1 M 42,30% (v/v)
Na₂HPO₄ 0,1 M 57,70% (v/v)
- **Tampão Acetato 0,2 M pH 6,0**
Ácido Acético 0,1 M 5,2% (v/v)
Acetato de Sódio 0,1 M 94,8 (v/v)

No caso de Tampão Acetato + NaCl 0,15M é adicionada à solução 0,88 g de NaCl.

- **Acetato de Lítio 1M**
Acetato de Lítio 6,6% (p/v)
Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
- **EDTA 0,5 M pH 8,0**
EDTA . 2H₂O 18,61% (p/v)
Ajustar pH da solução para 8,0 com NaOH.
Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
- **Tris-HCl 1M pH 8,0**
Tris base 12.11 % (p/v)
Ajustar pH da solução para 8,0 com HCl.
Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
- **Tampão TE 10X**
EDTA 0,5 M pH 8,0 2% (v/v)
Tris-HCl 1 M pH 8,0 10% (v/v)
Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
- **Solução de Acetato de Lítio**
Acetato de Lítio 1M 10% (v/v)
Tampão TE 10X 10% (v/v)
Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
- **Solução PEG mix**
PEG 4000 40% (p/v)
Tampão TE 10X 10% (v/v)

- Acetato de Lítio 1M 10% (v/v)
 Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
- **Solução estoque SDS 100X**
 SDS 10% (p/v)
 - **Solução estoque NaCl 1M (10X)**
 NaCl 5,8% (p/v)
 - **Brometo de Etídio**
 EtBr 10 mg/mL
 - **Tampão TBE 10X**
 Tris Base 10,78% (p/v)
 EDTA 0,58% (p/v)
 Ácido Bórico 0,55% (p/v)
 pH 8,0
 - **Tampão de Amostra**
 TE 20X 50% (v/v)
 Glicerol 30% (v/v)
 Azul de Bromofenol 0,25% (p/v)
 - **Tampão MES 1M pH 6,3**
 MES 19,52% (p/v)
 Ajustar pH da solução para 6,3 com KOH.
 Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
 - **Tampão de Transformação bacteriano (TFB)**
 MES 1M pH 6,3 1% (v/v)
 MnCl₂.4H₂O 0,89% (p/v)
 CaC₂.2H₂O 0,14% (p/v)
 KCl 0,74% (p/v)
 Cloreto de Hexamina Cobalto 0,080% (p/v)
 Solução esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.
 - **Marcador molecular para DNA**
 1 Kb DNA Ladder RTU (Ready-To-Use), 250-10.000 pb (Kasvi)
 - **Tampão de Ligação (Thermo Fisher Scientific®) 10X**
 Tris-HCL 400 mM
 MgCl₂ 100 mM
 DTT 100 mM

ATP 5 mM
pH 7,8

- **Tampão de PCR (Phoneutria) 10X**

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

- **Reagente CTAB para quantificação de Ácido Hialurônico**

CTAB 2,5% (p/v)
NaOH 2% (p/v)

4.1.4 Antibiótico

- **Ampicilina 1000X**

Ampicilina 100 mg/mL
Dissolvida em água deionizada ultra-pura e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm

4.1.5 Kits

- GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) – purificação e limpeza de soluções contendo DNA
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) – extração de DNA plasmidial de bactérias
- GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) – purificação de DNA a partir de bandas de gel de agarose
- GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) – extração de DNA genômico de leveduras
- SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) – RT-qPCR
- *K. Lactis* Protein Expression Kit (New England Biolabs Inc.) – transformação e expressão de compostos heterólogos em células de *K. lactis*.

4.1.6 Enzimas

Dentre as enzimas utilizadas neste estudo envolvendo reações de PCR, ligação e desfosforilação e transcrição reversa de RNA estão:

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

- SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)
- Liticase de *Arthrobacter luteus* (10 U/ μ L)

Além disto, as enzimas de restrição utilizadas neste estudo em análises de restrição de plasmídeos e produtos de PCR estão listadas na tabela 4.

Tabela 4. Enzimas de restrição utilizadas neste estudo.

Enzima	Sítio	Tampão (Thermo Fisher Scientific®)	Temperatura
HindIII	A↓AGCTT	Fast Digest Green	37 °C
StuI	AGG↓CCT	Fast Digest Green	37 °C
BamHI	G↓GATCC	Fast Digest Green	37 °C
Sall	G↓TCGAC	Fast Digest Green	37 °C
XhoI	C↓TCGAG	Fast Digest Green	37 °C
Bsu36I	CC↓TNAGG	Fast Digest Green	37 °C
SacII	CCGC↓GG	Fast Digest Green	37 °C

4.1.7 Vetores

A Tabela 5 apresenta uma lista de todos os vetores utilizados neste estudo.

Tabela 5. Vetores utilizados neste estudo.

Vetor	Descrição	Referência
pKlac2	Vetor para expressão de genes em células de <i>Kluyveromyces lactis</i>	New England Biolabs Inc. (NEB)
p424-GPD	Vetor para construção de um sistema de expressão do gene <i>hasB</i>	American Type Culture Collection (ATCC)
pBSK-HASAP	Vetor contendo o gene sintético <i>hasAP</i> de <i>Pasteurella multocida</i>	Este estudo
pBSK-HASA1	Vetor contendo o gene sintético <i>hasA1</i> de <i>Homo sapiens</i>	Este estudo
pBSK-HASA2	Vetor contendo o gene sintético <i>hasA2</i> de <i>Homo sapiens</i>	Este estudo
pBSK-HASA3	Vetor contendo o gene sintético <i>hasA3</i> de <i>Homo sapiens</i>	Este estudo
pBSK-HASB	Vetor contendo o gene sintético <i>hasB</i> de <i>Xenopus laevis</i>	Este estudo
p424-GPD B	Vetor derivado de p424-GPD contendo um cassete de expressão do gene <i>hasB</i>	Este estudo
pKlac B	Vetor derivado de pKlac2 contendo um sistema de expressão do gene <i>hasB</i> para transformação em <i>K. lactis</i>	Este estudo
pKlac BAP	Vetor derivado de pKlac2 contendo um sistema de expressão do gene <i>hasB</i> e do gene <i>hasAP</i> para transformação em <i>K. lactis</i>	Este estudo

pKlac BA1	Vetor derivado de pKlac2 contendo um sistema de expressão do gene <i>hasB</i> e do gene <i>hasA1</i> para transformação em <i>K. lactis</i>	Este estudo
pKlac BA2	Vetor derivado de pKlac2 contendo um sistema de expressão do gene <i>hasB</i> e do gene <i>hasA2</i> para transformação em <i>K. lactis</i>	Este estudo
pKlac BA3	Vetor derivado de pKlac2 contendo um sistema de expressão do gene <i>hasB</i> e do gene <i>hasA3</i> para transformação em <i>K. lactis</i>	Este estudo

4.1.8 Oligonucleotídeos iniciadores

A Tabela 6 apresenta os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo. Os oligonucleotídeos contendo sítios para enzimas de restrição estão indicados em sublinhado.

Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Nome	Sequência (5' → 3')	Sítio para enzima
HASB-GPD-F	AAA <u>CCT NAG GGT</u> ACC GGC CGC AAA TTA AAG	Bsu36I
HASB-GPD-R	AAA <u>CCT NAG GCT</u> CGA GTT TAT CAT TAT CAA TAC TGC C	Bsu36I
HASA2-F	CCC <u>AAG CTT</u> AAAA ATG CAC TGT GAA AGA TTC	HindIII
HASA2-R	AAA <u>AGG CCT</u> TCA AAC ATC CAA GAC CAT AT	StuI
HASA3-F	CCC <u>AAG CTT</u> AAAA ATG CCA GTA CAG TTG AC	HindIII
HASA3-R	AAA <u>AGG CCT</u> TTA AAC TTC GGC AAA TGC TAA A	StuI
Rt-PCR HASA1-F	TTT TGC AGC ATG GTT GAG AGG	
Rt-PCR HASA1-R	CCT GAA GTA CCC CAA CCT GA	
Rt-PCR HASA2-F	GCA GAA ATG GGG TGG TAA GAG A	
Rt-PCR HASA2-R	CAC CCA CCA TTG GAT CTT CTT CTA AA	
Rt-PCR HASA3-F	GTT TGG AGG TCA AAC TTC CAC G	
Rt-PCR HASA3-R	TCT TAC CAC CCC ACT TTT GCA TA	

Rt-PCR HASAP-F	TCC ATT CGA GGT GAT TGT CAC AG	
Rt-PCR HASAP-R	GCA GCA CTA GCT TGG AAA CC	
Rt-PCR HASB-F	GAT GTG AAC CAA GCC AGG ATC	
Rt-PCR HASB-R	CAG CTT CTT GAA TTG CAC CAT CAA T	
Rt-PCR Actin KL-F	TCT CCT TGC CTC ACG CTA TC	
Rt-PCR Actin KL-R	CGG ACG ATT TCT CTT TCA GCG	

4.1.9 Equipamentos

Todas as leituras de densidade óptica descritas neste estudo foram realizadas em equipamento SpectraMax M2 Microplate Reader (Molecular Devices®) pela utilização de cubetas de plástico transparente de 12,5 mm x 12,5 mm com leituras à 600 nm em temperatura ambiente e utilizando água destilada como branco e líquido de diluições.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação de células bacterianas competentes

4.2.1.1 *E. coli* cepa XL10-Gold

Células de *E. coli*. foram semeadas em placa contendo meio LB ágar sem antibiótico a partir de estoque armazenado em freezer -80 °C por 16 horas a 37 °C. Em ambiente estéril cinco colônias foram inoculadas em 1 mL de meio SOB contendo MgSO₄ 20 mM. As colônias foram homogeneizadas em vortex em velocidade moderada e diluídas em mais 100 mL do mesmo meio em frasco de 1 litro. As células foram crescidas por 3 horas a 37 °C até OD₆₀₀ de 0,3. As células foram repassadas para tubos de polipropileno de 50 mL gelados estéreis de fundo cônico e estocadas no gelo por 10 minutos.

As células foram centrifugadas a 2700 xg por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em aproximadamente 20 mL (para cada tubo) de TFB gelado. As células ficaram em seguida estocadas no gelo por 10 minutos, centrifugadas a 2700 xg por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em aproximadamente 4 mL (para cada tubo) de TFB.

Todas as suspensões celulares foram unidas em um único tubo de polipropileno de 50 mL gelado estéril e adicionado 140 µL de DMSO por 4 mL de suspensão de células. A suspensão foi misturada por inversão e estocada em banho de gelo. O conteúdo foi rapidamente repassado a tubos em alíquotas de 100 µL e armazenado a -80 °C.

4.2.1.2 *E. coli* cepa DH5α

Células de *E. coli*. foram semeadas em placa contendo meio LB ágar sem antibiótico a partir de estoque armazenado em freezer -80 °C por 16 horas a 37 °C. Uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB sem antibiótico e incubada a 37 °C 16 horas a 250 RPM. Após o crescimento 2 mL da cultura foi repassado para 100 mL de meio LB sem antibiótico em frasco estéril de 500 mL. As células foram crescidas por 3 horas a 37 °C até OD₆₀₀ de 0,4. As células foram repassadas para tubos de polipropileno de 50 mL gelados estéreis de fundo cônico e estocadas no gelo por 10 minutos.

As células foram centrifugadas a 2700 xg por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em aproximadamente 16 mL (para cada tubo) de MgCl₂ (100 mM) gelado. As células foram centrifugadas a 2700 xg por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em aproximadamente 16 mL (para cada tubo) de CaCl₂ (100 mM) gelado. As células ficaram em seguida estocadas no gelo por 30 minutos, centrifugadas a 2700 xg por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em aproximadamente 5 mL (para cada tubo) de CaCl₂ (100 mM) gelado.

Todas as suspensões celulares foram unidas em um único tubo de polipropileno de 50 mL gelado estéril e adicionado 1 mL de glicerol puro estéril. A suspensão foi misturada por inversão e estocada em banho de gelo. O conteúdo foi rapidamente repassado a tubos em alíquotas de 100 µL e armazenado a -80 °C.

4.2.2 Transformação bacteriana em células de *E. coli*

Alíquotas de células competentes de *Escherichia coli* cepa XL10-Gold (nos casos de transformações de plasmídeos > 9 kb) ou de células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5α (nos casos de transformações de plasmídeos < 9 kb) congeladas a -80 °C em tubos criogênicos de 1,5 mL foram descongeladas por 10 minutos em banho de gelo. A seguir, foram misturados às células 10 µL de DNA resultante da reação da ligação ou 1

μL de plasmídeo intacto de interesse para amplificação (~ 100 ng de DNA por transformação). O tubo contendo células e DNA foi incubado por 30 minutos em gelo, após isto as células foram retiradas do gelo e imediatamente incubadas em banho de água à 42 °C por 90 segundos e então recolocadas imediatamente novamente em banho de gelo por 2 minutos. Após isto foram adicionadas ao tubo 900 μL de meio SOC e as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Após o período de incubação, 200 μL de células foram plaqueadas em meio SOC ágar seletivo contendo ampicilina e as placas foram colocadas invertidas em incubadora à 37 °C por 24 horas. O restante de células foi repassado a um tubo criogênico, misturado com glicerol puro estéril até concentração final de 15% e armazenado à -80 °C. Todos os processos descritos aqui foram feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril.

4.2.3 Reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR)

Todas as reações de amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dos genes, cassetes e plasmídeos relatados neste estudo foram feitas em microtubos de 0,2 mL contendo (a) 2 μL de tampão de PCR concentrado 10 vezes; (b) 0,6 μL de MgCl_2 25 mM; (c) 1 μL de Primer Forward 10 μM ; (d) 1 μL de Primer Reverse 10 μM ; (e) 0,5 μL de dNTP 10 mM; (f) 1 unidade ou 0,2 μL da enzima “*Taq DNA Polimerase*”; (g) 10 ng de DNA molde a ser amplificado e (h) água ultra pura deionizada até completar volume final de 20 μL . Os microtubos contendo as reações foram inseridos em termociclador com os seguintes ciclos de temperatura: (a) 1 ciclo de 95 °C por 7 minutos; (b) 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, seguido de temperatura de anelamento dos primers por 30 segundos, seguido por 72 °C por 2,5 minutos; (c) 1 ciclo de 72 °C por 10 minutos e (d) resfriamento indefinidamente à 12 °C.

4.2.4 Restrições com endonucleases e desfosforilações dos plasmídeos contendo os genes de interesse

Todas as restrições com endonucleases de plasmídeos circulares descritas neste estudo foram feitas simultaneamente com as reações de desfosforilação. Reações com endonucleases de restrição de genes, cassetes e produtos de PCR lineares foram realizadas sem o processo de desfosforilação. As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL contendo (a) 1 μg de DNA, (b) 2 μL de solução tamponante “Green Fast Digest Buffer” 10x concentrado (Thermo Fisher Scientific®), (c) 1 μL de enzima de restrição (*HindIII*

ou *StuI* ou *BamHI* ou *Sall* ou *XhoI* ou *Bsu36I*) “Fast Digest” (Thermo Fisher Scientific®), (d) 1 µL da enzima fosfatase “FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase” (Thermo Fisher Scientific®) nos casos onde há reação de desfosforilação e (e) água ultra-purificada deionizada até completar volume final de 20 µL. Nos casos em que a análise de restrição do DNA foi feita com 2 enzimas de restrição, 1 µL da segunda enzima também foi adicionada ao sistema, totalizando a ação de até 3 enzimas no sistema. Após preparada a reação de 20 µL, o microtubo foi incubado por 2 horas em incubadora à 37°C e após este tempo o microtubo foi aquecido a 80°C por 15 minutos para a inativação da enzima.

4.2.5 Purificação do DNA plasmidial e genômico

As reações de PCR ou as reações com endonucleases de restrição, contendo 1 µg de DNA e volume de 20 µL cada, foram purificadas de tampões, sais e restos de enzimas inativadas através da utilização do produto “GeneJET PCR Purification Kit” (Thermo Fisher Scientific®) seguindo as recomendações do manual do fabricante. Ao final do processo, foram obtidos aproximadamente 800 ng de cada DNA digerido e puro em um volume final de 30 µL.

4.2.6 Ligação dos genes de interesse com seus respectivos vetores

Os genes e cassetes “insertos” *hasAP*, *hasA1*, *hasA2*, *hasA3*, *hasB* foram inseridos nos plasmídeos “vetores” pKlac e, p424-GPD através de reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific®). Em um microtubo de 0,2 mL foram inseridos: (a) 100 ng de DNA vetor digerido linearizado desfosforilado; (b) 300 ng de DNA inserto digerido; (c) 2 µL de “T4 DNA Ligase Buffer” (Thermo Fisher Scientific®) concentrado dez vezes; (d) 2 µL de solução PEG 4000 à 50% (w/v); (e) 2 µL de enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific®) e (f) água ultra pura deionizada até completar volume final de 20 µL. O microtubo foi incubado overnight à 22 °C e após este tempo foi diretamente utilizado em transformação de células de *E. coli*.

4.2.7 Extração de DNA plasmidial de células de *E. coli*

Em ambiente estéril, dez colônias escolhidas aleatoriamente de *E. coli* crescidas em meio seletivo foram repassadas à 10 mL de meio SOC Amp com o auxílio de um

palito, onde foram incubadas em shaker à 37 °C e 200 RPM por 16 horas. Após este tempo, os plasmídeos foram purificados da cultura celular pela utilização do produto “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (Thermo Fisher Scientific®) seguindo recomendações do manual do fabricante. Ao final foram obtidos 50 µL de plasmídeo purificado com concentração em média de 400 ng/ µL.

4.2.8 Transformação em levedura *K. lactis*

Os plasmídeos foram transformados por choque térmico em células de *Kluyveromyces lactis* cepa GG799 através de protocolo de choque térmico de Gietz, R. D. e Woods, R. A. contendo várias adaptações [54]. Células selvagens de *Kluyveromyces lactis* (cepa GG799) foram crescidas em 5 mL de meio YPD em tubo de 50 mL dentro de shaker a 30 °C com agitação de 200 RPM por 24 horas. Após o crescimento, a densidade óptica a 600 nm da cultura celular foi lida e esta utilizada para a realização de um inóculo em 50 mL de meio YPD de modo que o crescimento celular inicie com OD₆₀₀ de 0,1. Este inóculo foi realizado em erlenmeyer aletado de capacidade de 250 mL e colocado em shaker a 30 °C com agitação de 200 RPM. Após aproximadamente 7 horas, a OD₆₀₀ foi novamente monitorada e espera-se o alcance de um valor entre 0,9 – 1. As células foram então repassadas à um tubo de fundo cônico de 50 mL e centrifugadas por 5 minutos a 3000 xg em temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com 5 mL de tampão TE e centrifugadas novamente por 3 minutos a 3000 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado, as células foram lavadas com 5 mL de solução de Acetato de Lítio e centrifugadas por 5 minutos a 3000 xg em temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado e as células foram ressuspendidas em 0,5 mL de solução de Acetato de Lítio. Após a homogeneização, com a pipeta foram repassados para um tubo de 1,5 mL: (a) 1 µg de plasmídeo linearizado em 20 µL de água deionizada; (b) 10 µL de DNA de esperma de salmão (10 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific®) e (c) 100 µL da suspensão de células. Em seguida foi adicionado ao tubo 700 µL de solução PEG, a mistura foi homogeneizada e colocada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo foi adicionado ao tubo 48 µL de DMSO puro estéril (Dimetilsulfóxido), misturado, e imediatamente foi aplicado um choque térmico nas células por 15 minutos à 42 °C em banho de água. Após o choque, as células foram centrifugadas por 2 minutos à 3300 xg em temperatura ambiente e lavadas 2 vezes

seguidas com 1 mL de água deionizada. Uma terceira ressuspensão foi realizada com 1 mL de água deionizada pura e desta suspensão celular foram plaqueados volumes de 20, 50 e 100 µL em meio seletivo YCB ágar contendo acetamida. As placas foram incubadas à 30 °C por 3-4 dias. O restante de células foi repassado a um tubo criogênico, misturado com glicerol até concentração final de 20% e armazenado à -80 °C. Todos os processos descritos neste tópico foram feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril.

4.2.9 Seleção e armazenamento das leveduras contendo os genes integrados com sucesso (PCR de colônia)

Após o crescimento de *Kluyveromyces lactis* geneticamente modificada em placa contendo meio seletivo YCB ágar acetamida, foram selecionadas aleatoriamente de cada placa 20 colônias. Cada colônia foi repassada para um microtubo de 0,4 mL contendo 20 µL de água deionizada. Os microtubos foram vigorosamente agitados de modo a suspender as células e em seguida foram colocados em banho de água à temperatura fervente por 10 minutos. Após este tempo, os microtubos foram passados a um banho de gelo e desta suspensão 1 µL foi retirado e utilizado como DNA molde para a realização de reação de PCR de modo a confirmar se os genes *hasA* e *hasB* estavam presentes no genoma de *K. lactis* pela utilização dos primers específicos para cada gene (tabela 3). Após os resultados da PCR, as colônias que apresentam os genes integrados no genoma foram repassadas à 5 mL de meio YPD em um tubo de fundo cônico de 50 mL e colocadas a 30 °C com agitação de 200 RPM por 48 horas. Após os 2 dias, 1 mL desta suspensão celular é repassada a um tubo criogênico, misturado com glicerol puro estéril até concentração final de 20% e armazenado à -80 °C. Todos os processos descritos neste parágrafo foram feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril.

4.2.10 Análise dos genes, RNAs, plasmídeos e cassetes.

Todos os genes, RNAs, cassetes e plasmídeos vindos ou não de reações de transcrição reversa, análise de restrição, desfosforilação, ligação e PCR descritos neste estudo foram analisados em gel de agarose 1%. 1 g de agarose foi dissolvida em 100 mL de tampão TBE 1X. Em seguida, a solução foi agitada e aquecida por 2 minutos em micro-ondas com potência a 70% e na solução foi adicionado Brometo de Etídio de modo a obter uma concentração final de 0,5 µg/mL. Após ocorrida a solidificação, no gel foram

aplicadas as amostras de DNA diluídas em tampão de carregamento juntamente com um marcador “1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi)”. O gel foi aplicado sob uma corrente de 80 Volts durante 60 minutos em tampão TBE 1X e em seguida analisado sob radiação ultravioleta.

4.2.11 Realização de PCR para análise dos transcritos gênicos

Os transcritos dos genes *hasAP*, *hasA1*, *hasA2*, *hasA3* e *hasB*, após inseridos em levedura, foram analisados após a transformação. Colônias de *K. lactis* crescidas em meio seletivo e contendo os genes *hasAP*, *hasA1*, *hasA2*, *hasA3* e *hasB* em seu genoma foram inoculadas em 10 mL de meio YPD otimizado para a produção de ácido hialurônico e crescidas a 30 °C com agitação de 200 *RPM* durante 16 horas. Após o crescimento, o RNA total de cada cepa foi extraído das culturas celulares utilizando reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies Inc., USA) seguindo as recomendações do manual do fabricante. Após a extração, o RNA foi analisado e quantificado por visualização em gel usando o marcador 1 Kb DNA Ladder RTU (Kasvi) como padrão. A transcrição reversa do RNA foi realizada com a utilização de SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante e utilizando 1 µg de RNA total. Em seguida foi feita uma PCR de acordo com a seção 4.2.3 utilizando cDNA como molde.

4.2.12 Caracterização fisiológica das cepas geneticamente modificadas de *K.lactis*

Colônias de *K. lactis* selecionadas contendo os genes *hasA* e *hasB*, em combinação ou não, foram inoculadas em 10 mL de meio YPD em um tubo de fundo cônico de 50 mL e incubadas por 48 horas a 30 °C com agitação de 200 *RPM*. Após os 2 dias, da suspensão celular foi retirada uma quantidade de células suficientes para o início de uma cinética de crescimento em erlenmeyer com OD₆₀₀ inicial de 0,1. Os erlenmeyers aletados, contendo 20% da capacidade total de meio YPD otimizado para a produção de ácido hialurônico, foram incubados em shaker por 96 horas a 30 °C com agitação de 200 *RPM*. Quando o caso, curvas de crescimento das diferentes células foram realizadas retirando-se em períodos de 1 em 1 hora alíquotas de 1 mL para leitura em comprimento de onda de 600 nm. Todos os processos descritos neste tópico foram feitos com o uso de materiais e em ambiente asséptico e estéril.

4.2.13 Purificação do ácido hialurônico do meio de cultura

Células de *Kluyveromyces lactis* contendo os genes *hasA* e *hasB*, em combinação ou não, após crescidas para análise da cinética de crescimento foram diluídas com 1 volume de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1% e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos para o despreendimento das cápsulas de ácido hialurônico ao redor das paredes celulares. Após este tempo o meio foi centrifugado a 5000 xg por 20 minutos a 4 °C e o sedimento celular foi descartado. O sobrenadante foi repassado a outro tubo de centrífuga, misturado com 1,5 volume de etanol gelado e incubado por 1 hora em câmara fria a 4 °C, onde foi observada a formação de um grande complexo viscoso insolúvel em suspensão nas soluções que contém ácido hialurônico. Em seguida a solução foi centrifugada a 5000 xg por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi novamente lavado com etanol gelado, centrifugado e por fim lavado com 0,5 volume da quantidade original de meio de NaCl 0,1 M e incubado à 37 °C overnight com agitação de 200 RPM para a dissolução do ácido hialurônico na solução.

4.2.14 Análise e quantificação da produção de ácido hialurônico em cepas de *K. lactis*

A análise e quantificação de ácido hialurônico foram realizadas pelo método do reagente Brometo de CetilTrimetilAmônio (CTAB) descrito por Nicola F. em 1956, com algumas adaptações [69]. A quantidade de 50 µL das soluções purificadas de ácido hialurônico obtida foi misturada com 50 µL de tampão Acetato de sódio 0,2 M pH 6,0 e colocada em poços de placa de Elisa 96 poços de fundo chato transparente. A placa contendo as amostras foram incubadas à 37 °C por 10 minutos para a sincronização de todas as amostras e em seguida foi adicionado 100 uL de reagente CTAB. Imediatamente em seguida, a absorbância da placa foi lida em equipamento sob um comprimento de onda de 400 nm por 10 minutos, no qual os dados de absorbância lidos aos 10 minutos foram registrados. Uma curva padrão foi feita pela utilização de soluções contendo 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/µL de ácido hialurônico sódico 99% purificado de *Streptococcus equi* (SigmaAldrich) diluídos em água ultra-pura deionizada. As absorbâncias da curva padrão foram lidas como descritas anteriormente neste parágrafo aos 10 minutos, com a diferença de que foram misturadas com tampão acetato 0,2 M pH 6,0 contendo NaCl (íon Na⁺ estabilizador das hélices de Ácido Hialurônico em

meio com alta pureza) à uma concentração final de 0,15M.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DO METABOLISMO DE *Kluyveromyces lactis* PARA A SÍNTESE DE ÁCIDO HIALURÔNICO

A construção de células geneticamente modificadas capazes de sintetizar Ácido Hialurônico envolveu um estudo prévio do metabolismo de *K. lactis* a partir de bases de dados genômicos contendo todo o genoma sequenciado de *K. lactis* (Banco de Dados KEGG Genome). Como a grande maioria das leveduras, *K. lactis* é capaz de sintetizar um dos precursores do AH, o UDP-GlcNAc que é usado pela levedura na síntese de parede celular, entretanto não é capaz de sintetizar o outro precursor UDP-GlcUA (Figura 6).

K.lactis contém via metabólica de síntese do composto UDP-Glucose, porém não possui a enzima UDP-Glucose dehydrogenase, responsável por converter UDP-Glucose no precursor UDP-GlcUA (Figura 6). Desta forma, para a síntese de AH na levedura são necessárias a inserção dos genes codificadores das enzimas UDP-Glucose dehydrogenase (HASB) e Hyaluronic Acid Synthase (HASA) (Figura 6). Embora bastante semelhante com a via metabólica de bactérias que sintetizam AH, o metabolismo criado em *K. lactis* para a síntese desta molécula difere do de bactérias. Enquanto que em bactérias o metabólito Glucosamine-6-P é convertido em Glucosamine-1-P (Figura 3), em *K. lactis* Glucosamine-6-P é convertido em N-Acetyl Glucosamine-6-P (Figura 6). No entanto, em termos energéticos e de uso de co-fatores, esta mudança não afeta em nada a produção de AH nos dois grupos de microrganismos.

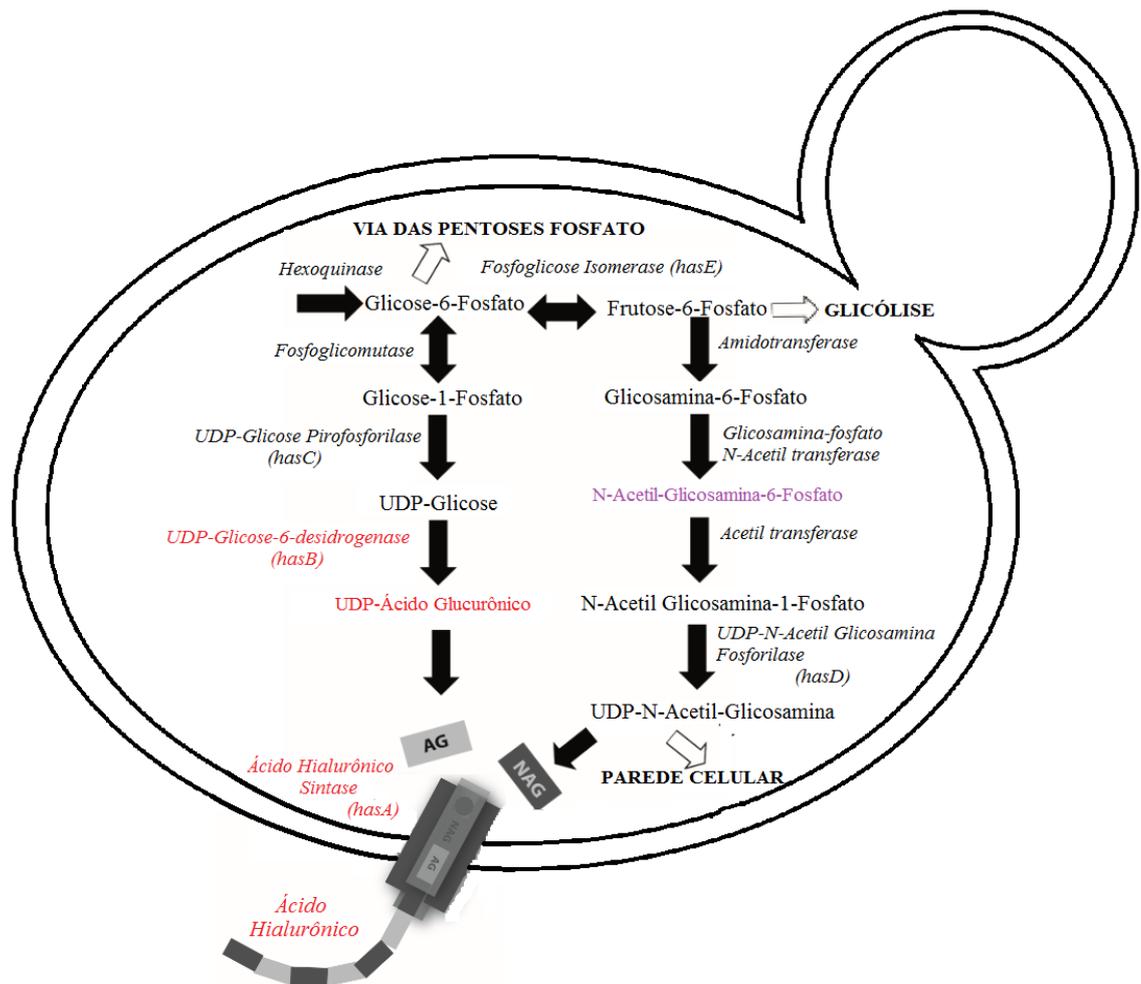


Figura 6. Metabolismo de Ácido Hialurônico de *K. lactis* originado neste estudo. Em roxo o metabólito existente em leveduras mas não em bactérias, em preto os metabólitos presentes em bactérias e leveduras e usados no metabolismo de Ácido Hialurônico, em vermelho os metabólitos e enzimas presentes em bactérias e ausentes em leveduras mas necessários para a síntese de AH. Setas fechadas indicam reações sequenciais entre metabólitos, enquanto que setas abertas indicam desvios de metabólitos para um fluxo geral

A caráter de comparação, foram construídos plasmídeos contendo quatro isoformas do gene *hasA*, que incluem os genes *hasA1*, *hasA2*, *hasA3* e *hasAP*, sendo os três primeiros genes presentes em *Homo sapiens* e que codificam as três enzimas Hyaluronan Synthases presentes em seres humanos, e o último presente na bactéria patogênica *Pasteurella multocida*. Em relação ao gene *hasB*, utilizou-se o gene isolado de *Xenopus laevis*. Este anfíbio é um dos organismos modelos em estudos envolvendo ácido hialurônico, principalmente por conter uma quarta isoforma da enzima HAS não presente em outros vertebrados. Além disto, os parâmetros cinéticos, de estrutura e regulação da enzima UDP – Glicose Desidrogenase (HASB) é um dos melhores para a contribuição de uma boa síntese de Ácido Hialurônico[70].

5.2 CONSTRUÇÕES DE PLASMÍDEOS PARA TRANSFORMAÇÃO EM *Kluyveromyces lactis*

De posse das sequências dos genes *hasA1*, *hasA2*, *hasA3*, *hasAP* e *hasB*, disponível no GenBank, respectivamente com as sequências de referência NM_001523.3, NM_005328, NM_005329, AF036004.2 e AY762616.1 foram sintetizados por empresa especializada plasmídeos contendo os genes citados acima otimizados para expressão em células de *K. lactis* utilizando como molde o plasmídeo pBluescript SK (-) e denominados pBSK-HASA1, pBSK-HASA2, pBSK-HASA3, pBSK-HASAP e pBSK-HASB, respectivamente. Cada plasmídeo foi sintetizado de modo a possuir: (i) o gene de interesse, (ii) uma origem de replicação para replicação em células de *Escherichia coli* e (iii) um gene de resistência ao antibiótico ampicilina para a seleção das células com plasmídeos.

Aos plasmídeos pBSK-HASA1, pBSK-HASAP e pBSK-HASB também foram inseridos sinteticamente sítios para enzimas de restrição à jusante e à montante da região codificadora do gene. Para ambos os plasmídeos pBSK-HASA1 e pBSK-HASAP, foram inseridos sítios para a enzima *HindIII* à montante e *StuI* à jusante das respectivas regiões codificadoras. Para o plasmídeo pBSK-HASB, foram inseridos sítios para a enzima *BamHI* à montante e *SalI* à jusante da região codificadora.

O plasmídeo pKlac2, obtido comercialmente (New England BioLabs Inc.®) e construído exclusivamente para ser utilizado na expressão em células de *Kluyveromyces lactis* é um plasmídeo constitutivo, realizando uma disrupção gênica no cromossomo B da levedura, desta forma, inserindo o gene de interesse em seu genoma (Figura 7). pKlac2 (Figura 8) contém essencialmente: (a) regiões 5' e 3' do promotor LAC4, onde ocorre a recombinação homóloga no cromossomo B da levedura; (b) região para inserção do(s) gene(s) de interesse entre as duas regiões do promotor LAC4; (c) origem de replicação para propagação em *Escherichia coli*; (d) sinal para fator α de secreção de proteínas; (e) gene codificando β -lactamase para seleção de bactérias em meio contendo ampicilina, e (f) um promotor ADH1 forte de leveduras guiando a expressão do (g) gene *amdS* para seleção de leveduras em meio sem nitrogênio contendo acetamida como única fonte (Figura 8).

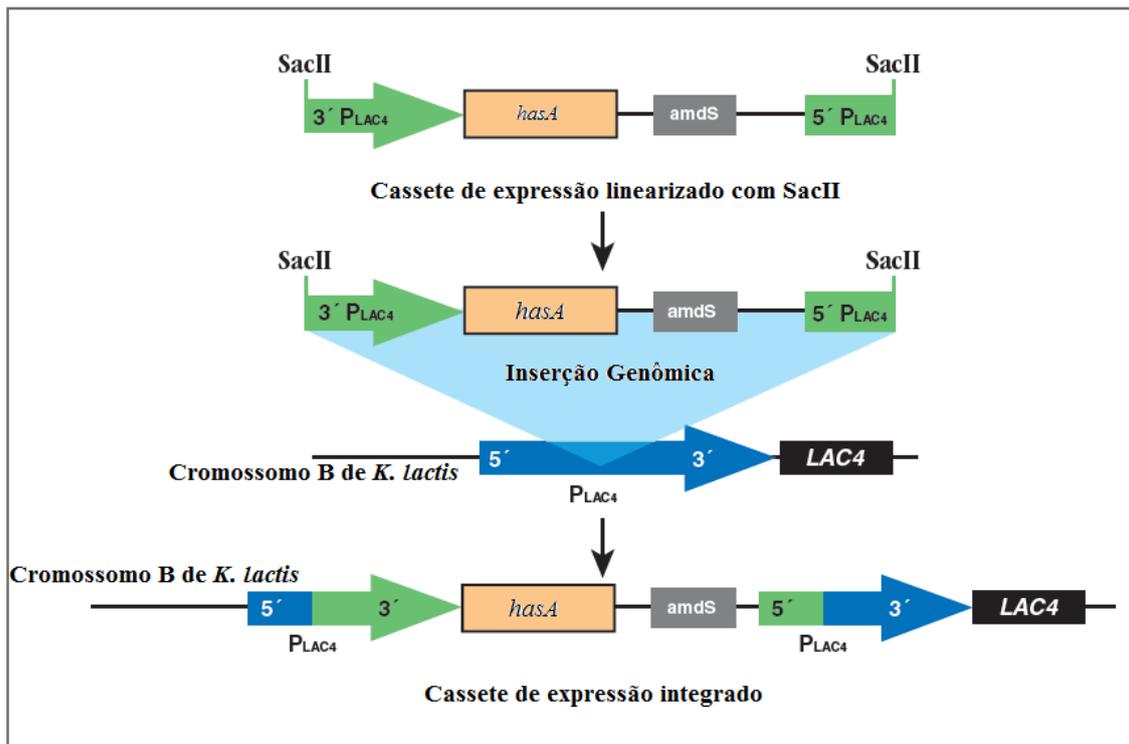


Figura 7. Integração genômica do cassete de expressão contendo o gene *hasA* no cromossomo de *K. lactis* através da utilização do plasmídeo pKlac2. Integração do cassete de expressão do gene *hasB* não mostrado.

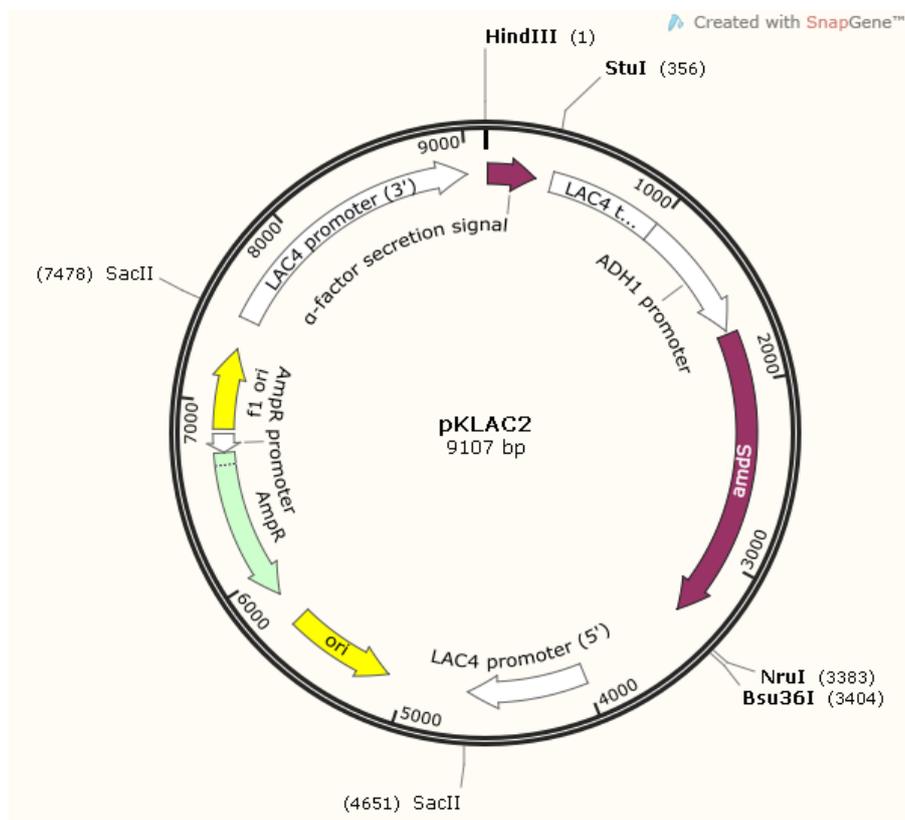


Figura 8. Mapa físico do plasmídeo pKlac2 utilizado para expressão em células de *Kluyveromyces lactis*.

No entanto, o plasmídeo sintético pKLac2 possui apenas uma região com múltiplos sítios de clonagem, bem como apenas um promotor e um terminador (LAC4) para guiar a expressão de apenas um gene de interesse (Figura 7). Desta forma, para a inserção dos genes *hasA* e *hasB* no referido plasmídeo, foi necessária a construção prévia do gene *hasB* no plasmídeo p424-GPD, para que ambos os genes obtenham uma região promotora à montante e uma região terminadora à jusante de suas regiões codificadoras. Apenas para realização de teste se há ou não produção de AH nas células, o plasmídeo p424-GPD foi escolhido por possuir o promotor constitutivo GPD, que é um forte promotor para expressão em leveduras nativo de *S. cerevisiae*.

O gene *hasB* foi retirado do plasmídeo pBSK-HASB através da utilização das enzimas de restrição *BamHI* e *Sall* e inserido em p424-GPD, também previamente tratado com *BamHI* e *Sall*, de modo a gerar p424-GPD B (Figura 9).

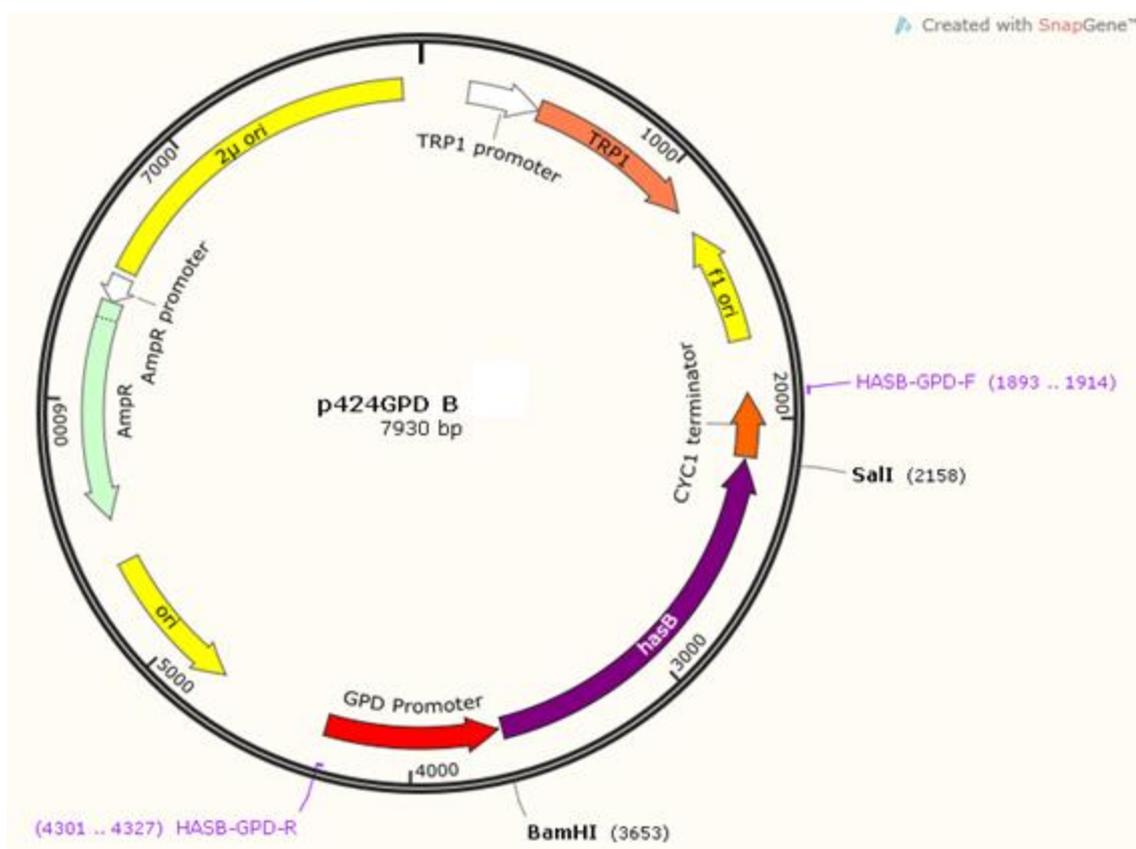


Figura 9. Mapa físico do plasmídeo p424-GPD B. Este plasmídeo é derivado do vetor p424-GPD contendo o gene *hasB* de *Xenopus laevis* para a geração de um sistema de expressão *hasB* guiado pelo promotor GPD e inserido através da utilização das endonucleases de restrição *BamHI* e *Sall*.

Para a confirmação da montagem do plasmídeo p424-GPD B (7930 pb) foram realizadas análises de restrição utilizando as enzimas *BamHI* e *Sall*, que liberaram

novamente o fragmento do gene *hasB* contendo 1495 pares de bases, como visto na figura 10. Além disto, uma segunda análise de restrição foi realizada utilizando 2 enzimas que realizaram uma restrição no plasmídeo p424-GPD B na extremidade 5' do promotor GPD e extremidade 3' do terminador CYC1 resultando na liberação do cassete de expressão do gene *hasB* contendo 2434 pb (Figura 10).

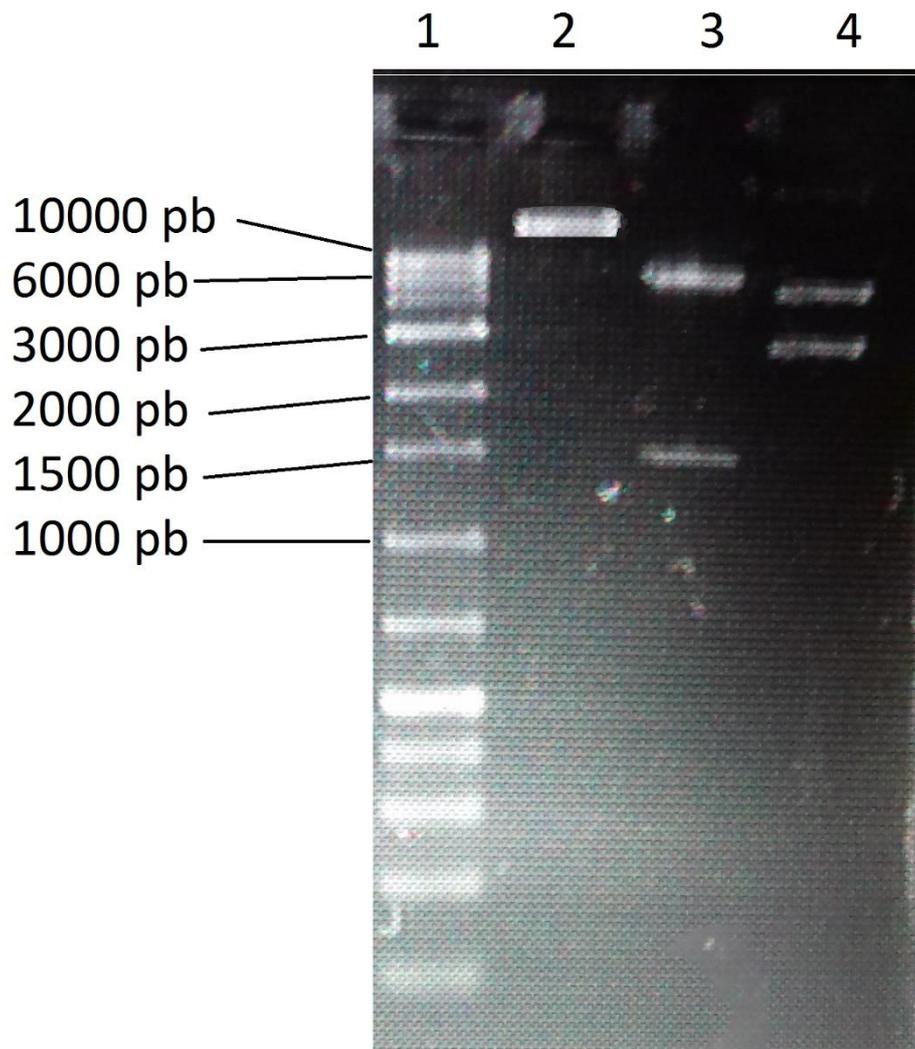


Figura 10. Análise de restrição para confirmação da montagem do plasmídeo p424-GPD B. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (1) Marcador Gene Ruler 1 kb plus M1191/M1192; (2) Plasmídeo p424-GPD B intacto; (3) Análise de restrição do plasmídeo p424-GPD B para a liberação do gene *hasB* contendo 1495 pb; (4) Análise de restrição do plasmídeo p424-GPD + HASB para a liberação do cassete de expressão do gene *hasB* contendo 2434 pb

Para que a inserção do cassete de expressão *hasB* não realizasse uma interrupção em uma região do plasmídeo pKlac2 contendo sequência gênica funcional para o mesmo, um estudo do mapa físico de pKlac2 (Figura 8) mostrou que apenas as endonucleases de

restrição com corte único no plasmídeo *Bsu36I* ou *NruI* poderiam ser utilizadas para esta finalidade (Figura 8). Desta forma foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores para anelamento na extremidade 5' do promotor GPD e na extremidade 3' do terminador CYC1 contendo ambos um sítio para restrição da endonuclease *Bsu36I* (Tabela 6). Após PCR do plasmídeo p424-GPD B com os oligonucleotídeos iniciadores citados, o cassette de expressão *hasB* contendo agora sítios para a endonuclease *Bsu36I* em ambas as extremidades 5' e 3' foi submetido à ação da enzima *Bsu36I* e ligado ao plasmídeo pKlac2 também tratado com *Bsu36I* originando o plasmídeo pKlac B (11547 pb). Para confirmação da montagem, uma análise de restrição do plasmídeo pKlac B utilizando *Bsu36I* liberou um fragmento de 2440 pb em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, compatível com o esperado a partir do estudo do mapa do plasmídeo (Figura 11).

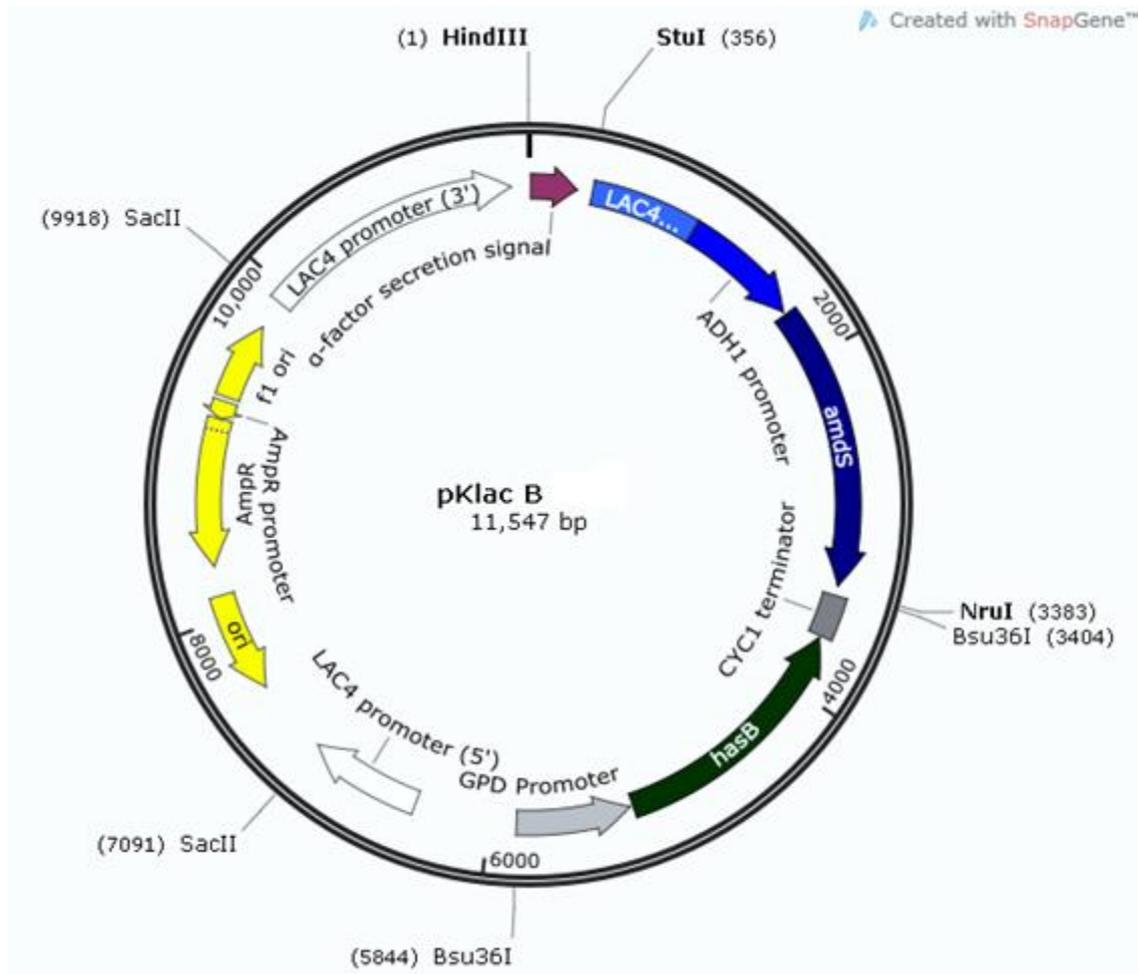


Figura 11. Mapa físico do plasmídeo pKlac B. Este vetor é derivado do plasmídeo pKlac2 e contém um cassette de expressão do gene *hasB* para ser usado em *K. lactis*.

O plasmídeo pKlac B foi então utilizado como vetor para a inserção, separadamente dos genes *hasA1*, *hasA2*, *hasA3* e *hasAP*. Como observado na Figura 11, pKlac B possui um sinal para fator α de secreção de proteínas (Figura 11), cujo objetivo é secretar proteínas que tenham a sequência genética inserida no plasmídeo. Como todas as enzimas envolvidas na síntese de ácido hialurônico utilizadas neste estudo necessitam estar dentro das células de *K. lactis* para que ocorra a produção de ácido hialurônico, foi necessário que, na inserção das isoformas do gene *hasA*, o fator α de secreção de proteínas fosse retirado. Por este motivo as enzimas *HindIII* e *StuI* foram escolhidas para que o gene *hasA* (com suas diferentes isoformas) fosse inserido em pKlac2, pois são as únicas enzimas de corte único no plasmídeo capazes de retirar o fator α de secreção (Figura 11).

Os genes *hasAP* e *hasA1* foram extraídos diretamente dos plasmídeos sintéticos PBSK-HASAP e PBSK-HASA1, respectivamente, através do uso das endonucleases de restrição *HindIII* e *StuI*. Entretanto, os plasmídeos sintéticos que contém os genes *hasA2* e *hasA3*, respectivamente, pBSK-HASA2 e pBSK-HASA3, não tiveram sítios para as endonucleases de restrição *HindIII* e *StuI* inseridos nas extremidades de ambos os genes devido a um erro de síntese. Por este motivo, os plasmídeos sintéticos pBSK-HASA2 e pBSK-HASA3 precisaram ser submetidos a uma reação de PCR para extração dos genes *hasA2* e *hasA3*, reação de PCR esta que também teve como objetivo inserir um sítio para a enzima *HindIII* à montante e um sítio para a enzima *StuI* à jusante de ambas as regiões codificadoras através de oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para isto (Tabela 6).

Após a amplificação por PCR ou restrição com as endonucleases *HindIII* e *StuI*, os genes *hasA1*, *hasA2*, *hasA3* e *hasAP* foram inseridos, separadamente, no plasmídeo pKlac B também tratado com *HindIII* e *StuI*, originando, respectivamente os plasmídeos pKlac BA1 (Figura 12) com 12937 pb, pKlac BA2 (Figura 13) com 12863 pb, pKlac BA3 (Figura 14) com 12866 pb e pKlac BAP (Figura 15) com 14140 pb.

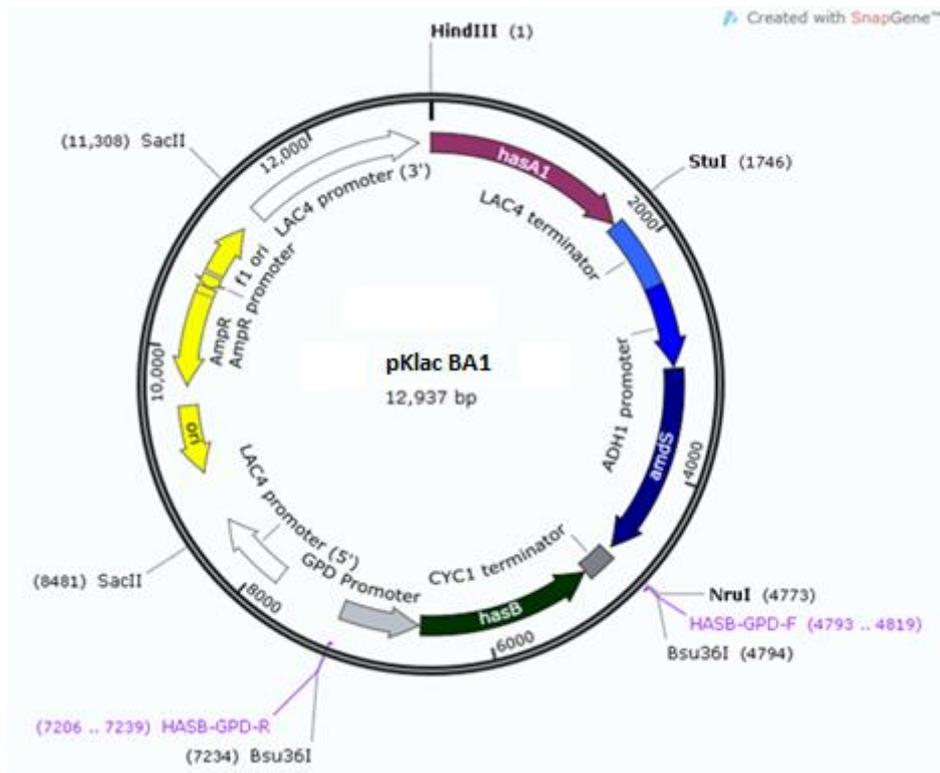


Figura 12. Mapa físico do plasmídeo pKlac BA1. Este vetor é derivado do plasmídeo pKlac B e contém além de um cassete de expressão do gene *hasB* um cassete de expressão da isoforma 1 do gene *hasA* utilizado na síntese de ácido hialurônico em humanos.

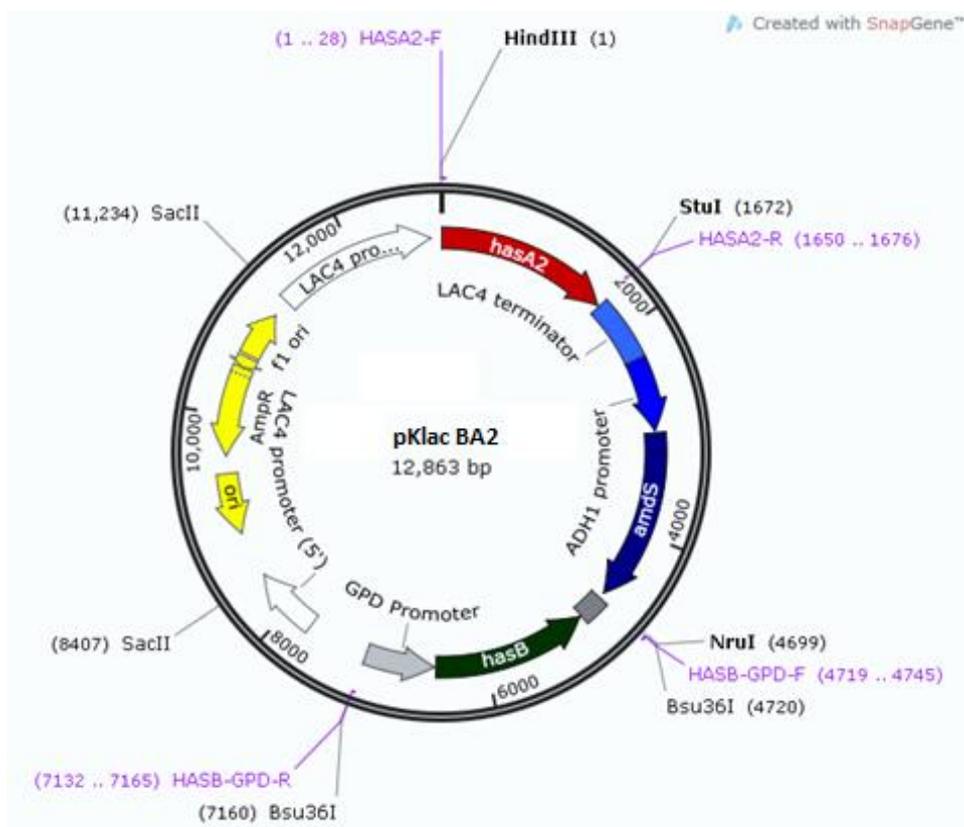


Figura 13. Mapa físico do plasmídeo pKlac BA2. Este vetor é derivado do plasmídeo pKlac B e contém além de um cassete de expressão do gene *hasB* um cassete de expressão da isoforma 2 do gene *hasA* utilizado na síntese de ácido hialurônico em humanos.

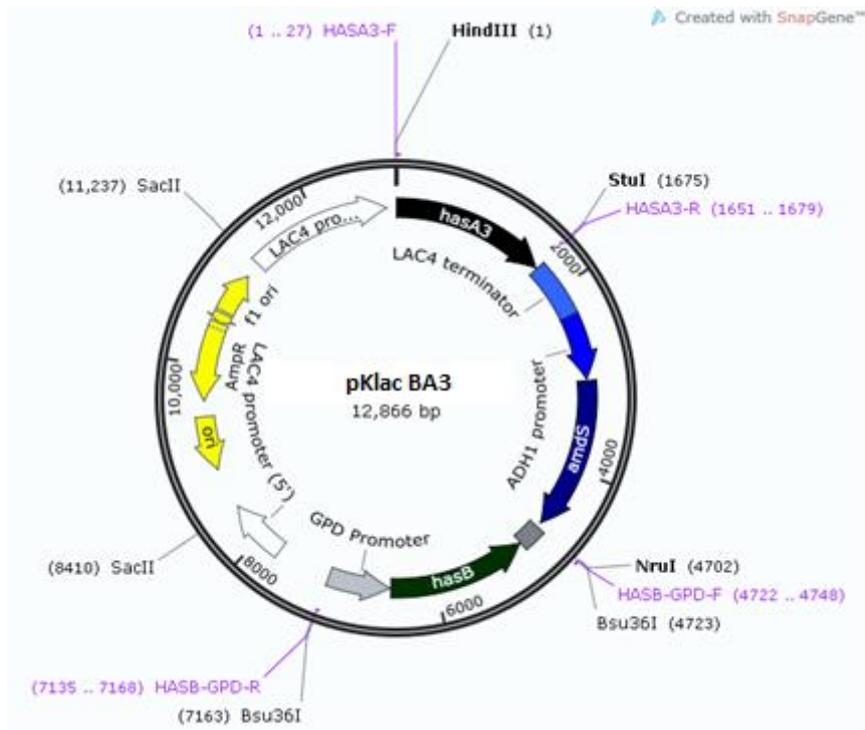


Figura 14. Mapa físico do plasmídeo pKlac BA3. Este vetor é derivado do plasmídeo pKlac B e contém além de um cassete de expressão do gene *hasB* um cassete de expressão da isoforma 3 do gene *hasA* utilizado na síntese de ácido hialurônico em humanos.

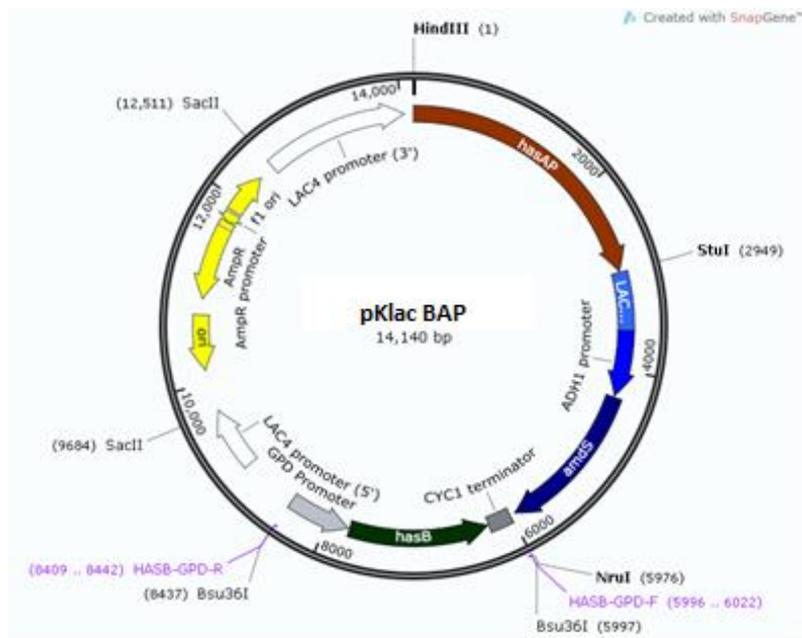


Figura 15. Mapa físico do plasmídeo pKlac BAP. Este vetor é derivado do plasmídeo pKlac B e contém além de um cassete de expressão do gene *hasB* um cassete de expressão da isoforma do gene *hasA* utilizado na síntese de ácido hialurônico na bactéria *Pasteurella multocida*.

Para a confirmação da montagem dos plasmídeos acima citados foram realizadas análises de restrição utilizando as enzimas *HindIII* e *StuI* em todos os plasmídeos pKlac

BA1, pKlac BA2, pKlac BA3 e pKlac BAP, a fim de observar a liberação das isoformas do gene *hasA*. Da mesma forma, com os mesmos plasmídeos foram feitas análises de restrição com as enzimas *BamHI* e *Sall* de modo a confirmar também a presença do gene *hasB*. Em todas as análises, os genes *hasA* e *hasB* foram confirmados, como visto na figura 16.

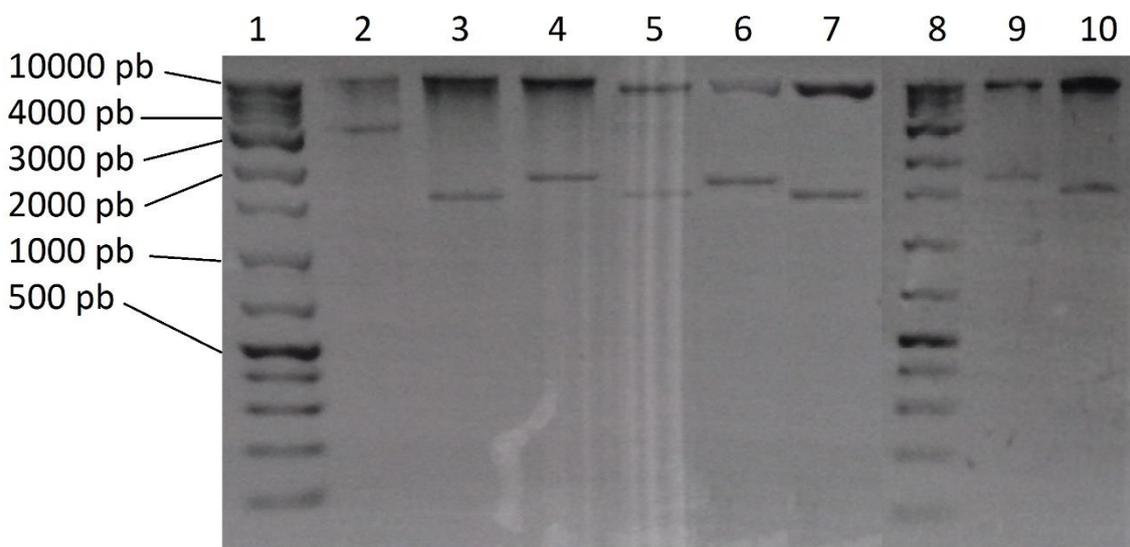


Figura 16. Análise de restrição para confirmação da montagem das isoformas do gene *hasA* e do gene *hasB* nos plasmídeos pKlac BAP, pKlac BA1, pKlac BA2 e pKlac BA3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (1) Marcador Gene Ruler 1 kb plus M1191/M1192; (2) pKlac BAP tratado com *HindIII* e *StuI* com liberação do gene *hasA* de 2948 pb; (3) pKlac BAP tratado com *BamHI* e *Sall* com liberação do gene *hasB* de 1485 pb; (4) pKlac BA1 tratado com *HindIII* e *StuI* com liberação do gene *hasA* de 1755 pb; (5) pKlac BA1 tratado com *BamHI* e *Sall* com liberação do gene *hasB* de 1485 pb; (6) pKlac BA2 tratado com *HindIII* e *StuI* com liberação do gene *hasA* de 1681 pb; (7) pKlac BA2 tratado com *BamHI* e *Sall* com liberação do gene *hasB* de 1485 pb; (8) Marcador Gene Ruler 1 kb plus M1191/M1192; (9) pKlac BA3 tratado com *HindIII* e *StuI* com liberação do gene *hasA* de 1684 pb; (10) pKlac BA3 tratado com *BamHI* e *Sall* com liberação do gene *hasB* de 1485 pb

5.3 TRANSFORMAÇÃO DE *Kluyveromyces lactis* GG799

O plasmídeo pKlac é um vetor integrativo (Figura 8), portanto necessita estar linearizado para que ocorra a integração no genoma de *K. lactis*. De acordo com as recomendações do fabricante do kit para transformação de *K. lactis*, os plasmídeos pKlac BA1, pKlac BA2, pKlac BA3 e pKlac BAP foram linearizados com *SacII*, o que também resultou na liberação de um fragmento do plasmídeo contendo origem de replicação para *E. coli* e um sistema de expressão do gene de resistência de ampicilina (Figura 8), que não são necessários para serem inseridos em *K. lactis*.

Embora o Kit “*K. lactis* Protein Expression Kit” (NEB) seja comercializado com células competentes de levedura e reagentes prontos para transformação por choque

térmico, apenas 3 transformações são possíveis de serem realizadas pelo kit, o que não seria suficiente para a transformação dos 4 plasmídeos contendo as 4 isoformas de *hasA* mais as transformações controles. Desta forma, um estudo envolvendo a escolha de um método de transformação das células de *K. lactis* independente do kit de transformação também foi realizado. Com os plasmídeos montados contendo os genes necessários para a síntese de AH foram realizadas transformações, tanto por choque térmico quanto por eletroporação, das células de *K. lactis* cepa GG799 obtidas através do kit “*K. lactis* Protein Expression Kit” (NEB) de acordo com a tabela 7.

Tabela 7. Metodologias de transformação de *K. lactis* utilizadas neste estudo.

Metodologia	Transformação	Parâmetros	Referência
1	Eletroporação	1,5 kV 25 μ F 200 Ω	[71]
2	Eletroporação	1,5 kV 25 μ F 200 Ω	[72]
3	Eletroporação	1,5 kV 25 μ F 200 Ω	[73]
4	Eletroporação	1,0 kV 25 μ F 400 Ω	[55]
5	Eletroporação	1,0 kV 25 μ F 400 Ω	[74]
6	Eletroporação	0,2 kV 25 μ F 400 Ω	[56]
7	Choque térmico	Choque à 42°C por 60 minutos com DNA de esperma de salmão	[54]
8	Choque térmico	Choque à 42°C por 30 minutos com DMSO	[57]
9	Choque térmico	Choque à 42°C por 15 minutos com DMSO e DNA de esperma de salmão	Este estudo. Adaptação da junção das metodologias 7 e 8.

Todas as transformações realizadas foram feitas de acordo com a referência mencionada na tabela 7, com exceção da quantidade de DNA plasmidial (pKlac BAP)

adicionado às células antes dos choques, que foi padronizado em todos os processos para 2 µg. Após realizadas as transformações, o número de colônias que surgiram nas placas contendo YCB ágar + acetamida foram analisadas de modo a calcular o número de transformantes em cada placa e conseqüentemente a eficiência de transformação, como mostrado na tabela abaixo:

Tabela 8. Número de colônias transformantes em placa e eficiência de transformação de acordo com as metodologias de transformação de *K. lactis* utilizadas neste estudo.

Metodologia	Σ Número de colônias transformantes nas placas	Eficiência da transformação (Nº transformantes/µg de plasmídeo)
1	9	44
2	12	60
3	14	70
4	5	22
5	3	~ 0
6	0	0
7	127	423
8	568	1893
9	~ 1100	~3666

Para o cálculo da eficiência de transformação mostrado na tabela 6 acima, a seguinte equação foi utilizada:

$$Eficiência = \frac{\sum \text{número de colônias nas placas}}{\mu\text{g de plasmídeo utilizado}} \times \frac{\text{volume } (\mu\text{L}) \text{ suspensão celular total}}{\sum \text{volume } (\mu\text{L}) \text{ aplicado nas placas}}$$

Como sugere a tabela 8, *K. lactis* cepa GG799 possui uma melhor eficiência de transformação quando utilizado choque térmico ao invés de eletroporação, embora a maioria dos estudos utilizem eletroporação nas manipulações genéticas de *K. lactis*. No entanto, estudos posteriores com outras cepas de *K. lactis* são necessárias para uma afirmação mais precisa sobre qual método de transformação é mais eficiente, pois a cepa de *K. lactis* utilizada neste estudo vem de um kit comercial desenvolvido para choque térmico, o que pode afetar as transformações por eletroporação. Além disto, as referências que utilizaram eletroporação não apresentaram valores tão baixos de eficiência quanto os apresentados na tabela 8, indicando que a mudança de cepa pode afetar o resultado da eficiência considerando que todos os experimentos foram realizados em condições idênticas de manipulação.

É válido notar também que apenas o número de colônias em placas foi contabilizado, de forma que não foram realizados testes sobre a correta integração do DNA vindo do plasmídeo pKlac2 no genoma de *K. lactis*. Em outras palavras, não foram testadas a ocorrência ou não de colônias falso-positivo.

As metodologias 7 e 8, que utilizaram choque térmico foram as mais eficientes, no entanto estas metodologias possuíam vantagens que completavam as desvantagens uma da outra, como por exemplo, o uso de um carreador de DNA na metodologia 7 enquanto a 8 não utilizava e o uso de DMSO (composto químico que facilita a entrada do DNA nas células através da permeabilização da parede celular da levedura) na metodologia 8 enquanto que a 7 não utilizava. Por este motivo, o protocolo 9 foi originado neste estudo a partir de adaptações da junção das metodologias 7 e 8. O protocolo 9 foi o que obteve os melhores resultados, bem como a maior eficiência de todas as metodologias (tabela 8). As placas após crescimento das células de levedura transformadas com o protocolo 9 são apresentadas abaixo na Figura 17.

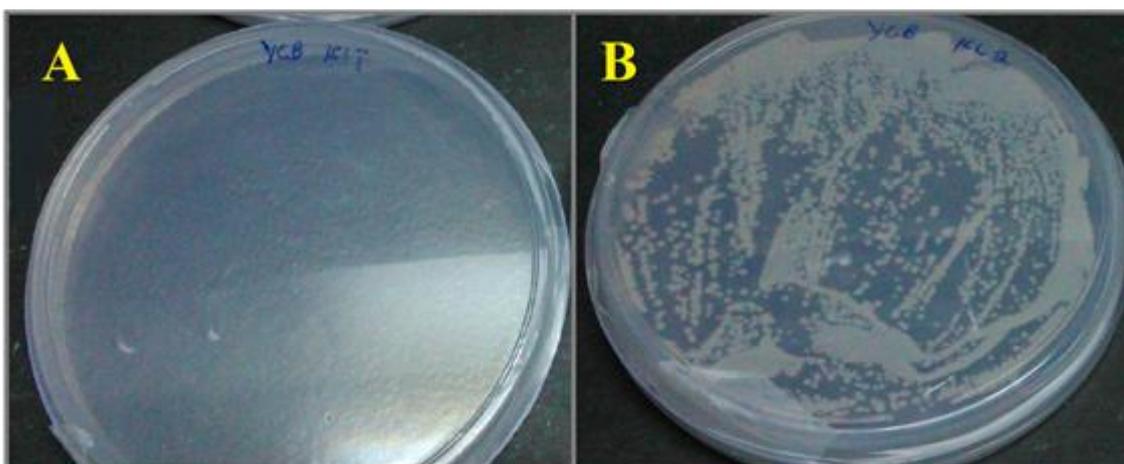


Figura 17. Placas de YCB Ágar + Acetamida com os resultados da transformação das células de *K. lactis* com o plasmídeo pKlac BAP utilizando a metodologia de transformação 9. (A) Placa controle contendo 100 µL de suspensão celular de *K. lactis* selvagem; (B) placa contendo 100 µL de suspensão celular de *K. lactis* após transformação.

Uma vez confirmada a melhor metodologia para transformação (Metodologia 9), esta foi utilizada em todas as transformações subsequentes de células de *K. lactis* realizadas neste estudo.

O nome das cepas de *K. lactis* construídas ao receberem os plasmídeos finais construídos neste estudo foram denominados como mostrado na Tabela 3.

5.4 ANÁLISE DE FENÓTIPO CELULAR

Caracteristicamente células que produzem AH possuem uma cápsula ao redor de suas membranas, o que afeta visivelmente as células quando vistas em microscopia eletrônica e em menor grau afeta a característica da colônia na placa. Após transformação das células com os plasmídeos pKlac BAP, pKlac BA1, pKlac BA2 e pKlac BA3, as cepas originadas foram denominadas, respectivamente, cepa BAP (contendo os genes *hasB* e *pmhasA*), cepa BA1 (contendo os genes *hasB* e *hasA1*), cepa BA2 (contendo os genes *hasB* e *hasA2*) e cepa BA3 (contendo os genes *hasB* e *hasA3*), como mostrado na Tabela 3.

De modo a forçar novamente a seleção nas colônias transformantes e confirmar que as mesmas realmente possuíam a marca de seleção capaz de degradar acetamida como fonte de nitrogênio para consumo, 48 colônias foram repassadas de placas vindas das transformações à uma placa nova contendo YCB sem acetamida (Placa A) e uma placa contendo YCB + acetamida (Placa B), como mostrado na Figura 18.

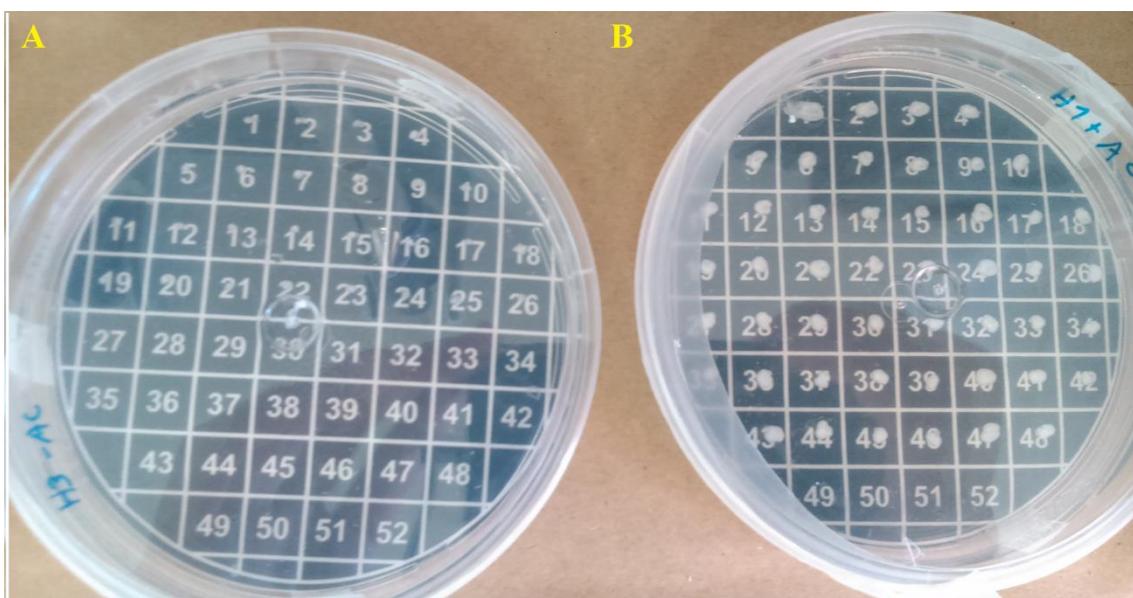


Figura 18. Seleção das colônias de *K. lactis* após transformação em placa numerada. À esquerda, placa A contém YCB Ágar – acetamida; à direita placa B contém YCB Ágar + acetamida. Em ambas as placas estão numeradas de 1 a 12, colônias de *K. lactis* transformadas com os genes *hasAP* e *hasB*, numeradas de 13 a 24 colônias de *K. lactis* transformadas com os genes *hasA1* e *hasB*, numeradas de 25 a 36, colônias de *K. lactis* transformadas com os genes *hasA2* e *hasB*, numeradas de 37 a 48, colônias de *K. lactis* transformadas com os genes *hasA3* e *hasB* e numeradas de 49 a 52, colônias de *K. lactis* selvagens (GG799).

A fim de observar em única placa colônias de *K. lactis* transformantes das 4 cepas construídas, as placas numeradas representadas na Figura 18 foram divididas como:

- 1 a 12 → Cepa BAP
- 13 a 24 → Cepa BA1
- 25 a 36 → Cepa BA2
- 37 a 48 → Cepa BA3
- 49 a 52 → Cepa selvagem (controle)

Como esperado, as cepas transformantes (numeração 1 a 48) cresceram em meio YCB Ágar + acetamida pois continham corretamente integrado o gene *amdS* vindo do plasmídeo pKlac2 e usado como marca de seleção dominante, ao mesmo tempo que não conseguiram crescer ou cresceram muito discretamente na placa YCB Ágar – acetamida, validando que no meio apenas acetamida poderia ser utilizada como fonte de nitrogênio pelas células. Da mesma forma, colônias selvagens de *K. lactis* (numeração 49 a 52) não cresceram em nenhuma das placas, validando a impossibilidade de *K. lactis* de utilizar acetamida como fonte de nitrogênio não sendo transformada (Figura 18). Embora pareça contraditório, em todas as ocasiões no qual células de *K. lactis* foram crescidas em meio YCB sem acetamida (como na placa A) houve um discreto crescimento celular.

Ainda, foi observado durante a passagem das células entre as placas que, quando tocadas com uma alça estéril, as colônias da cepa BAP apresentavam se mais brilhosas e com um aspecto mais viscoso em comparação com as colônias de cepas selvagens crescidas em meio YPD Ágar. De forma oposta, as cepas BA1, BA2 e BA3 não mostraram quaisquer diferenças em relação aos aspectos físicos ou visíveis com a cepa selvagem.

5.5 PCR DE COLÔNIA PARA CONFIRMAÇÃO DA INTEGRAÇÃO GENÔMICA DE *hasA* E *hasB*

De forma a confirmar que as colônias transformantes de *K. lactis* crescidas em YCB Ágar + Acetamida continham corretamente integrado em seu genoma os genes *hasB* e *hasA* (com suas isoformas) foi realizada uma PCR de colônia com as colônias vindas da placa numerada (Figura 18). Como o próprio kit de transformação da NEB “*K. lactis* Protein Expression Kit” sugere, a marca de seleção dominante por acetamida permite mais facilmente verificar a ocorrência de uma possível entrada de 2 ou mais cópias dos

mesmos genes de interesse e do gene *amdS* em uma única célula, o que resulta em colônias de diâmetro maior nas placas contendo meio seletivo, pois há mais cópias do gene *amdS* sendo expressas e a levedura transformante torna-se capaz de utilizar mais acetamida para crescer. Por este motivo, para a PCR de colônia foram escolhidas de cada cepa as colônias maiores e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram de amplificação do gene *hasB* (Tabela 6), pois este é o único gene comum em todas as transformações deste estudo e, portanto, poderia ser usado em todas as PCRs. O resultado da PCR de colônia das células transformantes é mostrado no gel na Figura 19.

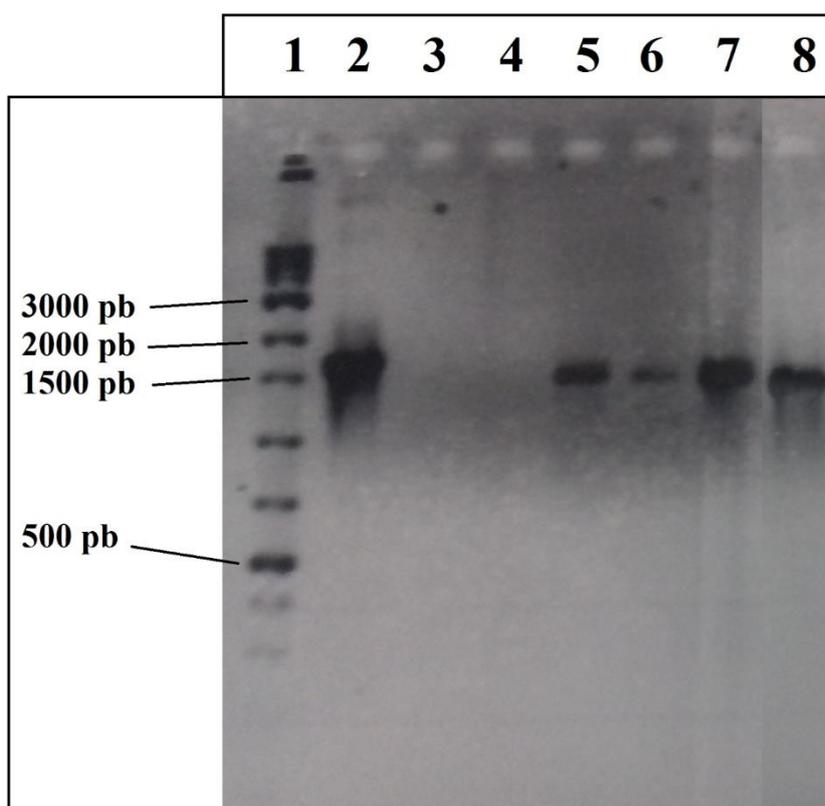


Figura 19. Análise de PCR de colônia da integração do gene *hasB* (1507 pb) nas cepas transformadas neste estudo. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (1) Marcador molecular Ladder 1kB RDU (Kasvi); (2) PCR do plasmídeo *pKlac B* com oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene *hasB* (controle +); (3) Controle negativo da reação com a utilização de água ao invés de suspensão celular; (4) PCR de colônia com células selvagem de *K. lactis* (controle -); (5) PCR de colônia com células de *K. lactis* cepa BAP; (6) PCR de colônia com células de *K. lactis* cepa BA1; (7) PCR de colônia com células de *K. lactis* cepa BA2; (8) PCR de colônia com células de *K. lactis* cepa BA3.

Assim como esperado (Figura 19), as cepas transformantes BAP, BA1, BA2 e BA3 tiveram amplificação do gene *hasB* (poços 5 a 8), enquanto que não houve amplificação de DNA vindo de colônia selvagem de *K. lactis* (poço 4), validando que esta levedura não possui em seu genoma o gene *hasB* naturalmente. Como o sistema de expressão *hasB* está diretamente ligado e vizinho ao sistema de expressão de *hasA* dentro do plasmídeo

pKlac2, a priori foi considerado neste estudo que a integração do gene *hasB* em *K. lactis* também indica a correta integração do gene *hasA*.

5.6 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS TRANSFORMANTES

Após análise da presença dos genes *hasB* e *hasA* (e suas diferentes isoformas) nas cepas construídas neste estudo, as células foram então crescidas por 24 horas em meio YPD com dados em triplicata para verificação da cinética de crescimento das células. O meio YPD, contendo extrato de levedura, peptona e fonte de carbono geralmente glicose, foi escolhido para primeira cinética de crescimento pois é o meio padrão de crescimento de leveduras. Como existe apenas 1 estudo anterior a este que utiliza levedura para produção de AH, ainda não existe um meio padronizado para melhor síntese de AH em leveduras, sendo necessário testes iniciais para a melhor adaptação de um meio de cultura. A cinética de crescimento, com dados em triplicata, das cepas construídas de acordo com a Tabela 3 é apresentado na Figura 20 abaixo:

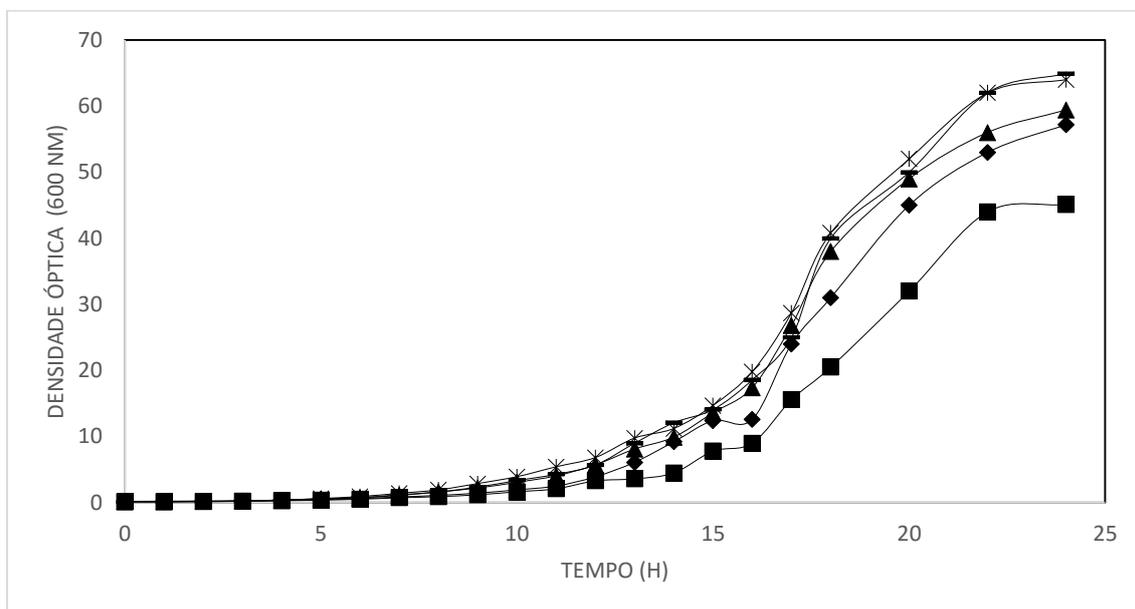


Figura 20. Cinética de crescimento das células de *K. lactis* construídas neste estudo em meio YPD. Em losango uma cepa selvagem (controle); em quadrado cepa BAP (contendo os genes *hasAP* e *hasB*); em triângulo cepa BA1 (contendo os genes *hasA1* e *hasB*); em traços cepa BA2 (contendo os genes *hasA2* e *hasB*); em asterisco cepa BA3 (contendo os genes *hasA3* e *hasB*).

Como observado na Figura 20, as cepas transformantes BA1, BA2 e BA3 apresentaram um perfil de crescimento semelhante ao visto na cepa controle não modificada geneticamente.. De modo oposto, a cepa BAP apresentou um crescimento um

pouco menor tanto em relação à controle como em relação às modificadas geneticamente com as isoformas HAS de humanos.

De forma a visualizar as diferenças no crescimento de forma melhor, o gráfico semi-logarítmico foi elaborado (Figura 21) de modo a observar o crescimento na fase exponencial e consequentemente calcular as taxas de crescimento de cada cepa, que pode ser visto na Tabela 9.

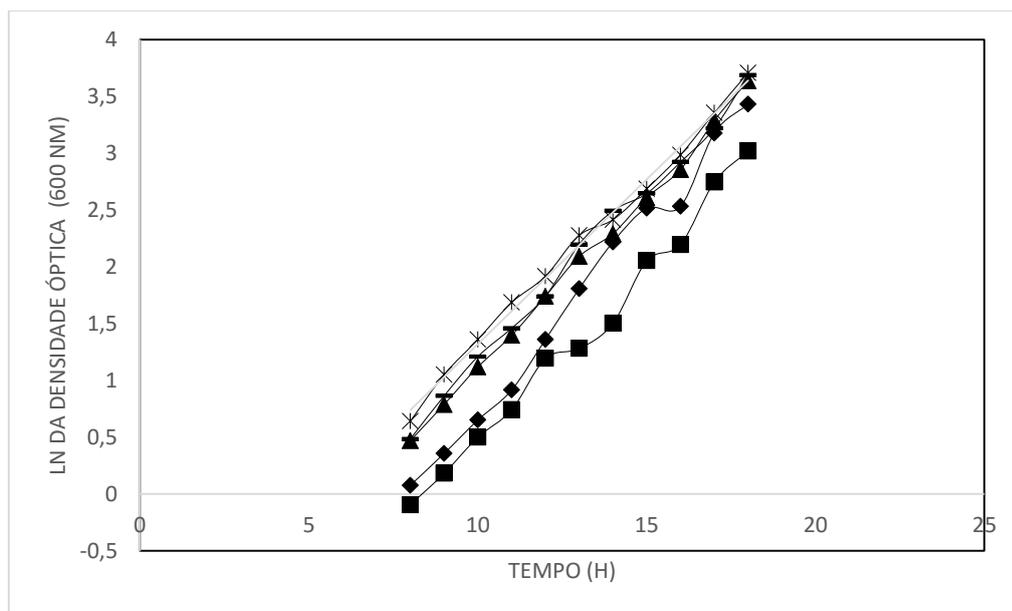


Figura 21. Cinética de crescimento exponencial (ln) das células de *K. lactis* construídas neste estudo. Média de leituras em triplicata. Em losango cepa selvagem (controle); em quadrado cepa BAP (contendo os genes *hasAP* e *hasB*); em triângulo cepa BA1 (contendo os genes *hasA1* e *hasB*); em traços cepa BA2 (contendo os genes *hasA2* e *hasB*); em asterisco cepa BA3 (contendo os genes *hasA3* e *hasB*).

Tabela 9. Taxa de crescimento e OD₆₀₀ final após 24 h de crescimento das cepas construídas neste estudo em YPD para produção de AH.

Cepa	Taxa de Crescimento máxima (μ_{max})	OD ₆₀₀ Final
Selvagem (GG799)	0,295 ± 0,02	57,2
BAP	0,271 ± 0,03	45,1
BA1	0,297 ± 0,01	59,4
BA2	0,303 ± 0,02	64,9
BA3	0,291 ± 0,02	64

Como visto na Tabela 9 as cepas contendo as isoformas de HAS de humanos (BA1, BA2 e BA3) cresceram estatisticamente iguais à cepa controle, em outras palavras, todas apresentaram taxas similares de crescimento máximo e, portanto, não pode ser considerado que as cepas GG799, BA1, BA2 e BA3 tiveram cinéticas de crescimento distintas entre si. Em contrapartida, a cepa BAP apresentou cinética e taxa de crescimento

máximo com valores mais baixos que todas as outras cepas estudadas. Como nas células a síntese de AH compete com as vias metabólicas de crescimento celular principalmente por desviar metabólitos da glicólise (Figura 6), tal resultado indica previamente uma possível não produção de AH nas cepas BA1, BA2 e BA3 e uma síntese em níveis pequenos de AH na cepa BAP. De forma a confirmar esta hipótese, a concentração de Ácido Hialurônico nos sobrenadantes vindos das cinéticas de crescimento foi quantificada pelo protocolo de CTAB.

5.7 QUANTIFICAÇÃO DE AH EM MEIO YPD

Mais conhecido como CTAB, o Brometo de Cetil Trimetil Amônio é um composto químico que, dentre todos os compostos presentes nos meios de cultura utilizados neste estudo, forma complexos insolúveis exclusivamente com moléculas de AH. De forma a se obter uma relação entre a OD₄₀₀ do meio contendo os complexos insolúveis e a quantidade em gramas de AH, uma curva padrão foi previamente feita e apresentada na Figura 22, na qual foram utilizadas soluções padrões de 0, 0,2, 0,4, 0,6; 0,8, e 1,0 g/L.

Os complexos insolúveis formados entre CTAB e Ácido Hialurônico são instáveis, em outras palavras, começam a se dissociar após 10 minutos [75]. Por este motivo, a reação entre AH-CTAB deve ser monitorada exatamente em intervalos de tempo iguais para diferentes amostras, considerando que a quantidade de complexos em meio muda conforme o tempo de reação avança. De forma a obter uma curva padrão com tempos de leitura iguais, todos os dados foram obtidos aos 10 minutos de reação (Figura 22).

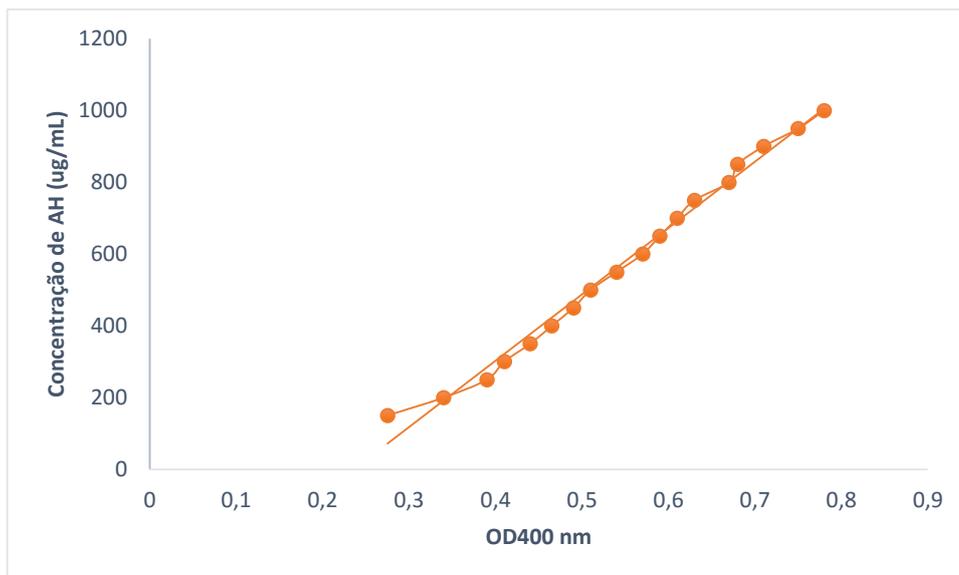


Figura 22. Curva padrão da relação entre AH e o complexo AH-CTAB. Todos os valores de OD foram lidos aos 10 minutos de reação contados a partir do momento da mistura entre reagente de CTAB com as soluções padrões de AH contendo 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 g/L de AH. $R^2=0,99012$

A partir da Figura 22 a equação da curva padrão que relaciona OD₄₀₀ e quantidade de AH em meio foi:

$$y = 1847,9x - 436,21$$

Em que:

X = leitura de OD400 apresentada a partir da reação de CTAB com sobrenadante de meio

Y = Quantidade de AH (mg/L) de AH no meio

O sobrenadante do meio de cultura utilizado no crescimento das cepas controle, BAP, BA1, BA2 e BA3, após serem purificados por protocolo de sedimentação com etanol gelado conforme descrito na seção 4.2.13, foi então submetido à reação de CTAB e após utilização da equação da curva padrão apresentada acima os valores de AH (g/L) contido nos meios das cepas é apresentado abaixo na Tabela 10.

Tabela 10. Quantidade de AH produzida pelas cepas construídas neste estudo em YPD-Glicose.

Cepa	Quantidade de AH (g/L)
Selvagem (GG799)	$0 \pm 0,03$
BAP	$0,09 \pm 0,02$
BA1	$0 \pm 0,04$
BA2	$0 \pm 0,02$
BA3	$0 \pm 0,02$

Como esperado, apenas a cepa BAP produziu AH e em valores considerados baixos quando comparados às bactérias e até mesmo *P. pastoris* modificada

geneticamente, que atingiu 1,7 g/L [17]. A fim de tentar obter uma melhor produção de AH, um meio otimizado para a síntese desta molécula foi utilizado em uma segunda cinética de crescimento.

5.8 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS TRANSFORMANTES EM MEIO YPD OTIMIZADO

A síntese de AH pelas células não apenas demanda energia na forma de co-fatores como também utiliza metabólitos como Acetil-CoA em algumas reações, que é uma fonte de energia central para a célula. Além disto, tanto as HAS de classe I como de classe II necessitam de íons co-fatores Mg^{2+} para seu correto funcionamento. Devido a isto e com base no estudo da produção de AH em *Pichia pastoris*[17], um meio YPD contendo a adição de alguns sais criado a partir de cinéticas de crescimento em *Streptococcus sp.*[76] foi utilizado para análise das cepas de *K. lactis*. O novo meio YPD otimizado está descrito na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11. Composição do meio YPD otimizado para a produção de AH com breve resumo de suas funções.

Componente	Concentração (L⁻¹)	Função para a célula
Glicose	40	Fonte de carbono
Extrato de levedura	7,5	Fonte de nitrogênio
Peptona	10	Fonte de nitrogênio
K ₂ HPO ₄	2,5	Fonte de fosfato.
MgSO ₄	0,5	Íon Mg. Cofator das enzimas HAS.
NaCl	5	Íons Na ⁺ . Usado na estabilização durante a formação das cadeias de AH.
Glutamina	0,4	Utilizado como co-fator na reação que gera Glucosamina-6-P.
Glutamato	0,6	Regenera Glutamina, que é usado como co-fator na via de AH.

A cinética de crescimento acompanhada através da medição de OD₆₀₀ em triplicata no meio YPD otimizado é apresentada abaixo na Figura 23.

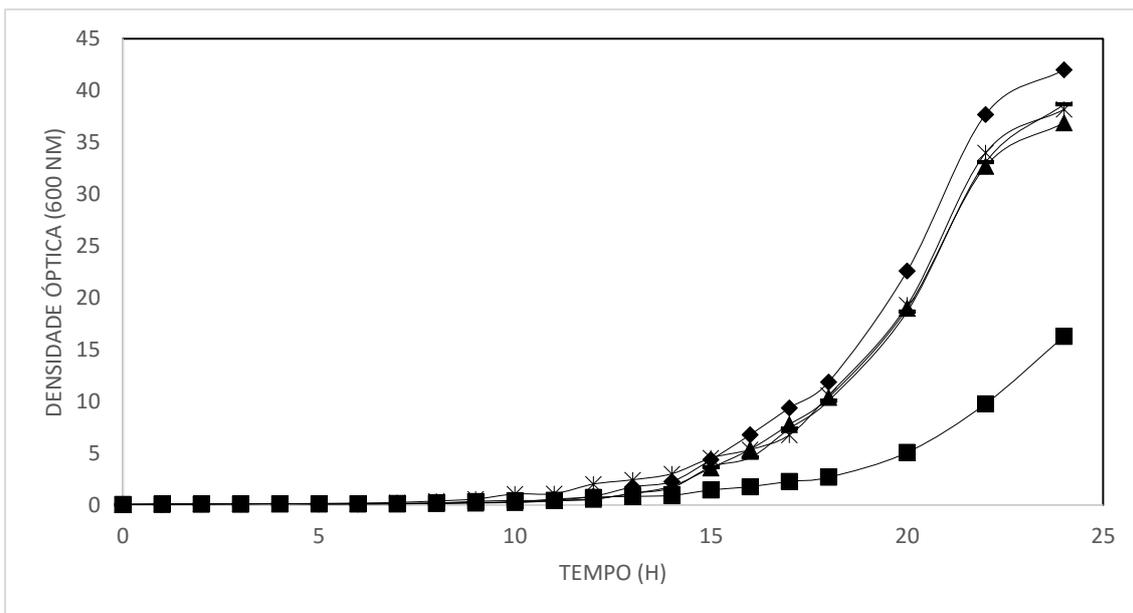


Figura 23. Cinética de crescimento das células de *K. lactis* contruídas neste estudo. Dados em triplicata. Em losango uma cepa selvagem (controle); em quadrado cepa BAP (contendo os genes *hasAP* e *hasB*); em triângulo cepa BA1 (contendo os genes *hasA1* e *hasB*); em traços cepa BA2 (contendo os genes *hasA2* e *hasB*); em asterisco cepa BA3 (contendo os genes *hasA3* e *hasB*).

Em relação à cepa selvagem controle (GG799) as cepas BA1, BA2 e BA3 não obtiveram significativa diferença de crescimento quando comprado estatisticamente. Entretanto a cepa BAP apresentou visível retardo no crescimento e de modo a visualizar as taxas de crescimento, o gráfico semi-logarítmico foi elaborado (Figura 24) com os valores das taxas de crescimento máximo apresentados abaixo (Tabela 12).

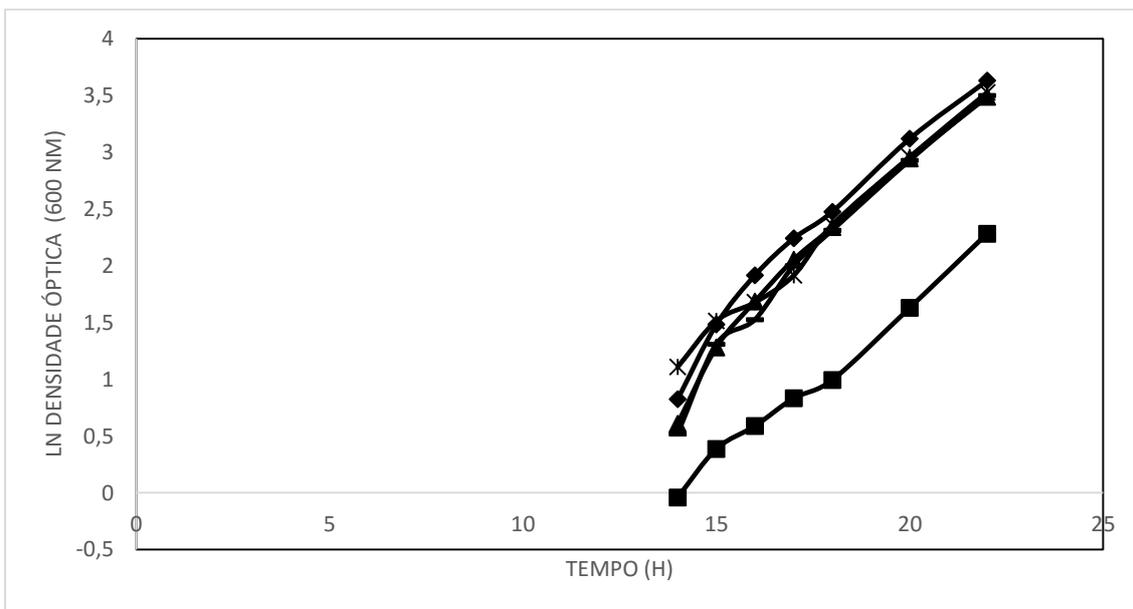


Figura 24. Cinética de crescimento exponencial (\ln) das células de *K. lactis* contruídas neste estudo. Dados em triplicata biológica. Em losango cepa selvagem (controle); em quadrado cepa BAP (contendo os genes *hasAP* e *hasB*); em triângulo cepa BA1 (contendo os genes *hasA1* e *hasB*); em traços cepa BA2 (contendo os genes *hasA2* e *hasB*); em asterisco cepa BA3 (contendo os genes *hasA3* e *hasB*).

Tabela 12. Taxa de crescimento das cepas construídas neste estudo em YPD-Glicose otimizado para produção de AH.

Cepa	Taxa de Crescimento máxima (μ_{\max})	OD ₆₀₀ Final
Selvagem (GG799)	0,333 ± 0,01	42
BAP	0,276 ± 0,02	16,3
BA1	0,341 ± 0,02	36,9
BA2	0,3533 ± 0,01	37,6
BA3	0,3014 ± 0,01	38,7

5.9 QUANTIFICAÇÃO DO AH EM MEIO YPD OTIMIZADO

A partir do sobrenadante do meio YPD otimizado, o AH foi quantificado pela utilização do protocolo de CTAB e os dados são mostrados abaixo na Tabela 13.

Tabela 13. Quantidade de AH produzida pelas cepas construídas neste estudo em YPD otimizado.

Cepa	Quantidade de AH (g/L)
Selvagem (GG799)	0 ± 0,05
BAP	0,18 ± 0,01
BA1	0 ± 0,03
BA2	0 ± 0,02
BA3	0 ± 0,03

Como nos resultados do meio YPD comum (Tabela 10), apenas a cepa BAP conseguiu sintetizar AH no meio YPD otimizado, produzindo 0,18 g/L de AH, o dobro do alcançado no meio YPD comum, enquanto as cepas BA1, BA2 e BA3 não. Este resultado corresponde ao visto na Figura 23, em que apenas a cepa BAP apresentou um padrão de crescimento diferente e menor em relação às outras cepas modificadas geneticamente bem como à cepa controle. Ainda, do ponto de vista físico, foi claramente notável que o meio de cultura após o fim do crescimento da cepa BAP apresentou-se um pouco viscoso, enquanto que o das outras cepas não (dado não mostrado).

5.10 ANÁLISE DOS TRANSCRITOS DAS CEPAS

Devido ao fato de apenas a cepa BAP produzir AH, mesmo com as cepas BA1, BA2 e BA3 contendo os genes para síntese de AH, uma análise da presença ou não dos transcritos dos genes *hasA* e *hasB* nas cepas BA1, BA2 e BA3 foi realizado de modo a verificar se estas cepas não estavam produzindo AH devido a erro de transcrição.

O RNA total de todas as cepas construídas neste estudo juntamente com uma cepa selvagem foi extraído e em seguida o cDNA dos mRNAs da célula foi sintetizado. Com o auxílio de oligonucleotídeos iniciadores específicos para anelamento no cDNA vindo

dos transcritos dos genes *hasAP*, *hasA1*, *hasA2*, *hasA3* e *hasB* (Tabela 6) uma PCR foi realizada de forma a saber se os genes citados estavam ou não sendo transcritos. Como a cepa BAP produziu AH em meio, esta foi utilizada como controle positivo e uma cepa selvagem como controle negativo. O resultado da PCR do cDNA em gel de agarose é apresentado na Figura 25 abaixo.

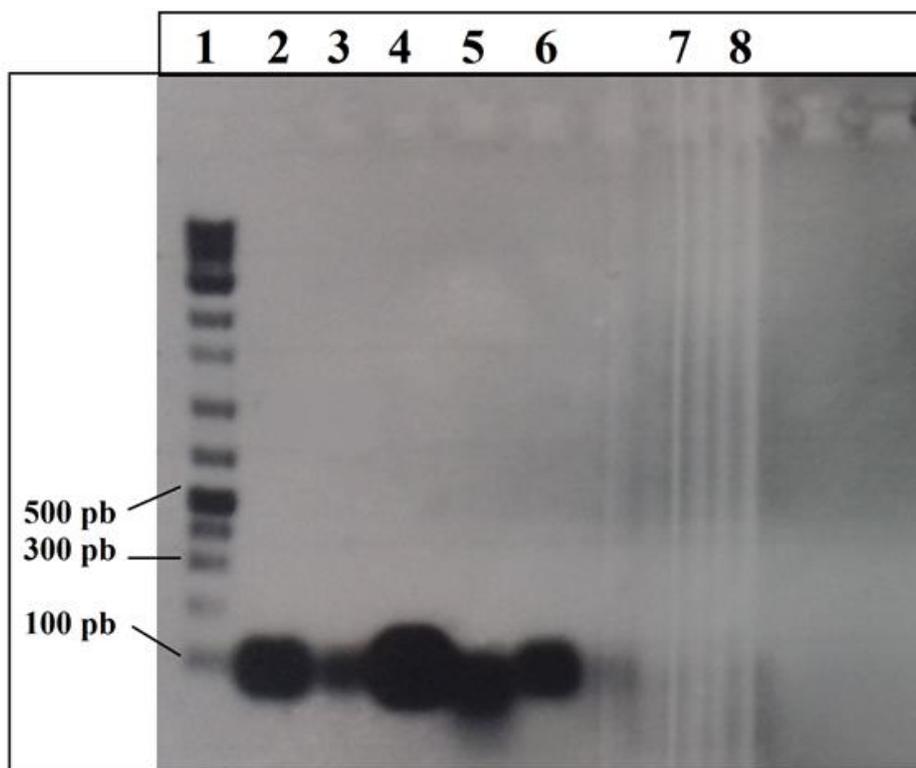


Figura 25. PCR de cDNA para análise dos transcritos dos genes inseridos em *K. lactis*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (1) Marcador molecular Ladder 1kb RDU (Kasvi); (2) PCR de cDNA vindo da cepa BAP para amplificação de parte do transcrito do gene *hasB* (142 pb) (controle +); (3) PCR de cDNA vindo da cepa BAP para amplificação de parte do transcrito do gene *hasAP* (129 pb) (controle +); (4) PCR de cDNA vindo da cepa BA1 para amplificação de parte do transcrito do gene *hasA1* (135 pb); (5) PCR de cDNA vindo da cepa BA2 para amplificação de parte do transcrito do gene *hasA2* (158 pb); (6) PCR de cDNA vindo da cepa BA3 para amplificação de parte do transcrito do gene *hasA3* (133 pb) (7) PCR de cDNA vindo de cepa selvagem (GG799) para amplificação de parte do transcrito do gene *hasB* (129 pb) (controle -); (8) PCR do RNA total da célula antes da síntese de cDNA vindo da cepa BAP para amplificação de parte do gene *hasAp* (129 pb) (controle negativo)..

Como visto na Figura 25, nas suas respectivas cepas os genes *hasA1*, *hasA2*, *hasA3* ou *hasAP* juntamente com *hasB* foram transcritos, o que era esperado para a cepa BAP. Desta maneira, as cepas BA1, BA2 e BA3 não produziram AH devido a algum erro que, até o momento, não é possível identificar onde possa estar ocorrendo. Ainda, o resultado visto na Figura 25 no poço 8 confirma que não há nas amostras, após a extração do RNA total, contaminação de DNA genômico, validando que os amplicons obtidos foram sintetizados a partir de cDNA.

5.11 ANÁLISE DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

K. lactis é uma levedura capaz de crescer não apenas em glicose, como também em outras fontes de carbono como lactose e frutose. Uma vez que a síntese de AH parte de um desvio direto da via glicolítica (Figura 6), espera-se que outras fontes de carbono que abasteçam a glicólise (sejam por hidrólise em monômeros de glicose ou por reação tendo como produto um intermediário da glicólise) também funcionem para a síntese de AH em qualquer célula. *K. lactis*, por ser uma levedura encontrada naturalmente no leite tem uma preferência maior por lactose em relação a outras fontes de carbono. Além disto, lactose é formada por monômeros de glicose e induz em *K. lactis* 100 vezes o promotor indutivo LAC4, o mesmo que está controlando a expressão das quatro isoformas dos genes *hasA* inseridos em *K. lactis* nesta tecnologia. A fim de observar os efeitos que as fontes de carbono podem ter na produção de AH por *K. lactis*, foram realizados ensaios com meio YPD otimizado como descrito na Tabela 11 e separadamente com 3 fontes de carbono distintas: lactose, galactose e frutose, sendo esta última também escolhida para análise de crescimento por ser feita, juntamente com frutose, de monômeros de glicose e também consumida por *K. lactis*.

Como já mostrado nas Tabela 10 e Tabela 13, embora com os genes *hasA* no genoma, as cepas *K. lactis* BA1, BA2 e BA3 não sintetizaram AH mesmo em meio YPD-Glicose otimizado e por este motivo nas cinéticas de crescimento testando diferentes fontes de carbono apenas a cepa BAP e GG799 (selvagem) foram utilizadas.

5.11.1 Galactose

Seguindo como descrito na Tabela 11, Glicose foi substituída por Galactose gerando o meio YPGal Otimizado, o que gerou a seguinte cinética de crescimento das cepas BAP e GG799 (Figura 26).

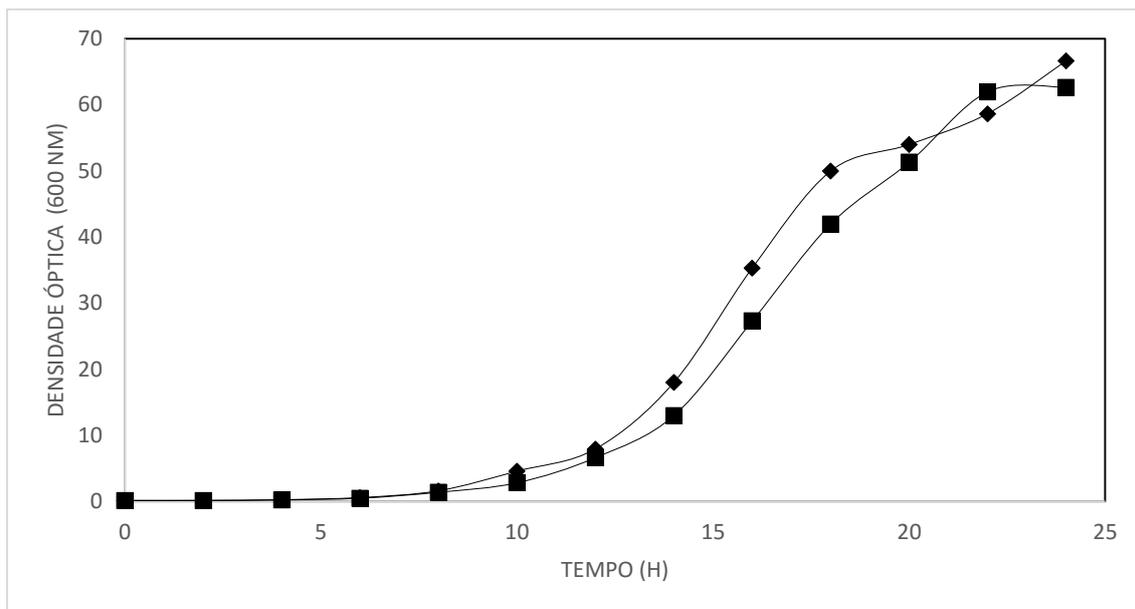


Figura 26. Cinética de crescimento das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes *hasAP* e *hasB*) em meio YPGal otimizado. Dados vindos de triplicata. Em losango cepa GG799 selvagem (controle); em quadrado cepa BAP modificada geneticamente produtora de AH.

Não houve diferença significativa de crescimento entre as cepas selvagem e BAP, embora esta última tenha crescido discretamente menos que a cepa selvagem, o que sugere que a cepa BAP não produz ou produz muito pouco AH em meio contendo galactose como fonte de carbono.

Com o gráfico semi-logarítmico (ln) também construído (Figura 27), as taxas de crescimento e a quantidade de AH quantificado no meio pelo método de CTAB estão descritas na Tabela 14 abaixo.

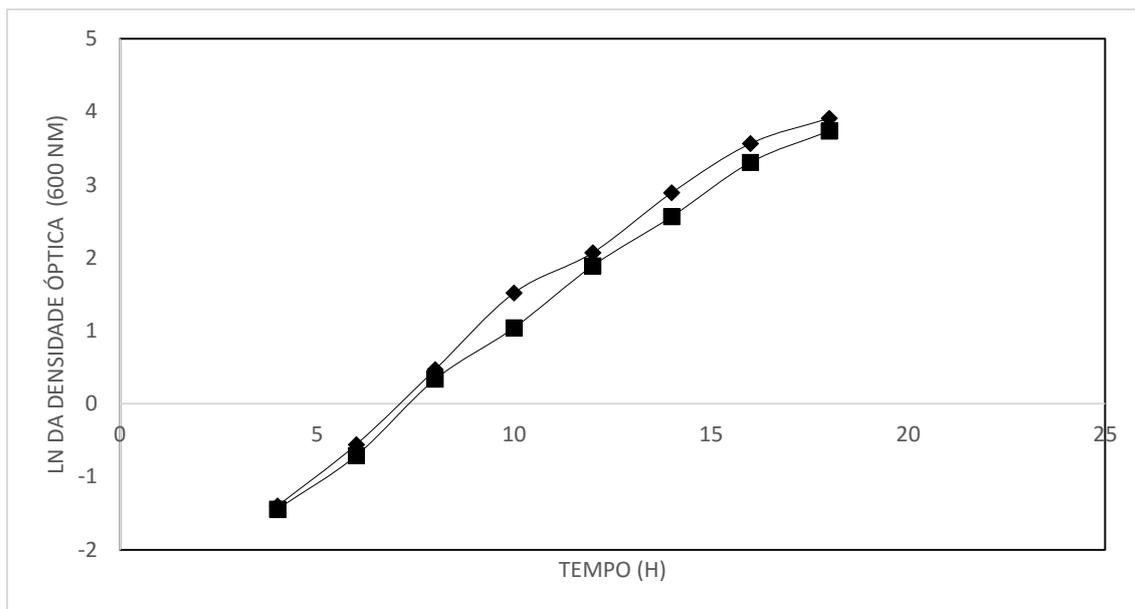


Figura 27. Cinética de crescimento exponencial com valores em ln das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes *hasAP* e *hasB*) em meio YPGal otimizado. Dados vindos de triplicata. Em losango cepa GG799 selvagem (controle); em quadrado cepa BAP modificada geneticamente produtora de AH.

Tabela 14. Taxa de crescimento e produção de AH das cepas GG799 e BAP em meio YPGal Otimizado.

Cepa	Taxa de crescimento (μ_{max})	OD ₆₀₀ final	Quantidade de AH obtida (g/L)
GG799	0,3905 ± 0,04	66	0
BAP	0,3801 ± 0,03	62	0,06 ± 0,01

5.11.2 Lactose

Como descrito na Tabela 11, do meio otimizado para produção de AH glicose foi substituída por Lactose gerando o meio YPLac Otimizado. Em ensaio com este meio, a seguinte cinética de crescimento das cepas BAP e GG799 foi observada (Figura 28).

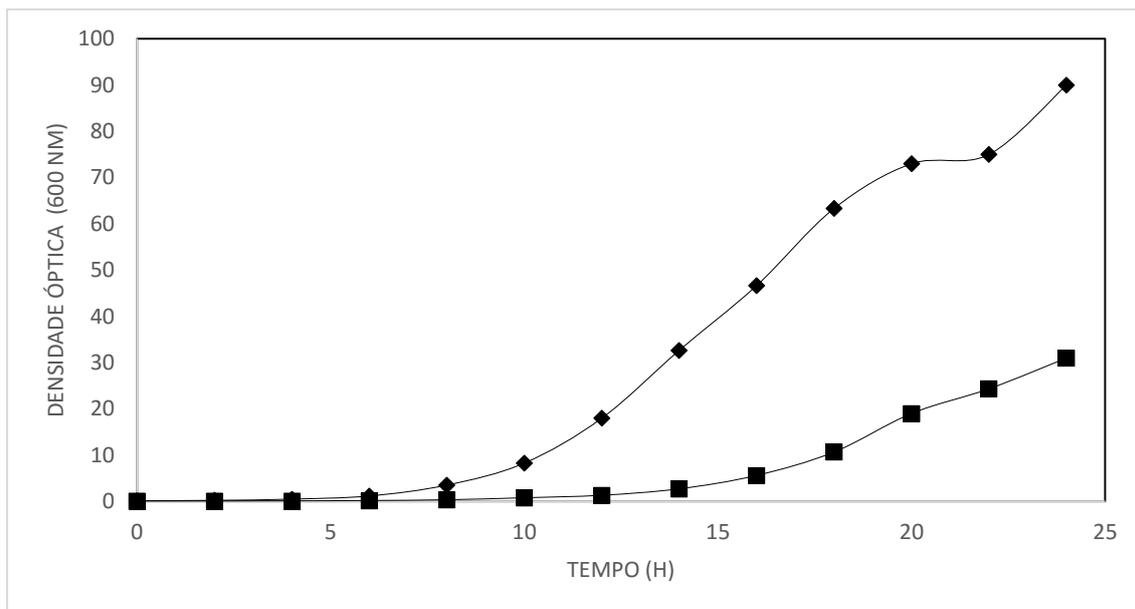


Figura 28. Cinética de crescimento das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes *hasAP* e *hasB*) em meio YPLac otimizado. Dados vindos de triplicata. Em losango cepa GG799 selvagem (controle); em quadrado cepa BAP modificada geneticamente produtora de AH.

Houve diferença significativa no crescimento entre as cepas selvagem e BAP, tendo esta última crescido consideravelmente menos que a selvagem. Desta forma, considera-se que algo no metabolismo da cepa BAP está sendo afetado, provavelmente o metabolismo da síntese de AH, o que sugere previamente que a cepa BAP produziu AH em meio com lactose como fonte de carbono.

Com o gráfico semi-logarítmico (ln) também construído (Figura 29), as taxas de crescimento e a quantidade de AH quantificado no meio pelo método de CTAB estão descritas na Tabela 15 abaixo.

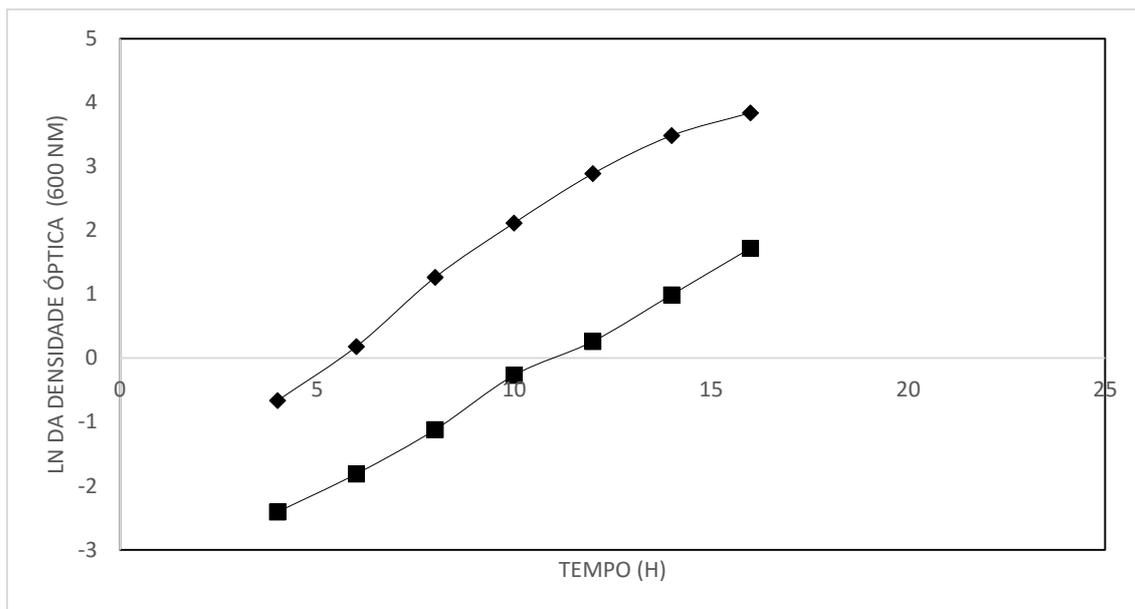


Figura 29. Cinética de crescimento exponencial com valores em ln das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes *hasAP* e *hasB*) em meio YPLac otimizado. Dados vindos de triplicata. Em losango cepa GG799 selvagem (controle); em quadrado cepa BAP modificada geneticamente produtora de AH.

Tabela 15. Taxa de crescimento e produção de AH das cepas GG799 e BAP em meio YPLac Otimizado.

Cepa	Taxa de crescimento (μ_{\max})	OD ₆₀₀ final	Quantidade de AH obtida (g/L)
GG799	$0,38084 \pm 0,03$	90	0
BAP	$0,2641 \pm 0,04$	31	$0,39 \pm 0,05$

5.11.3 Sacarose

Finalmente, de acordo com a Tabela 11, do meio YPD otimizado, Glicose foi substituída por Sacarose gerando o meio YPSuc Otimizado, o que gerou a seguinte cinética de crescimento das cepas BAP e GG799 (Figura 30).

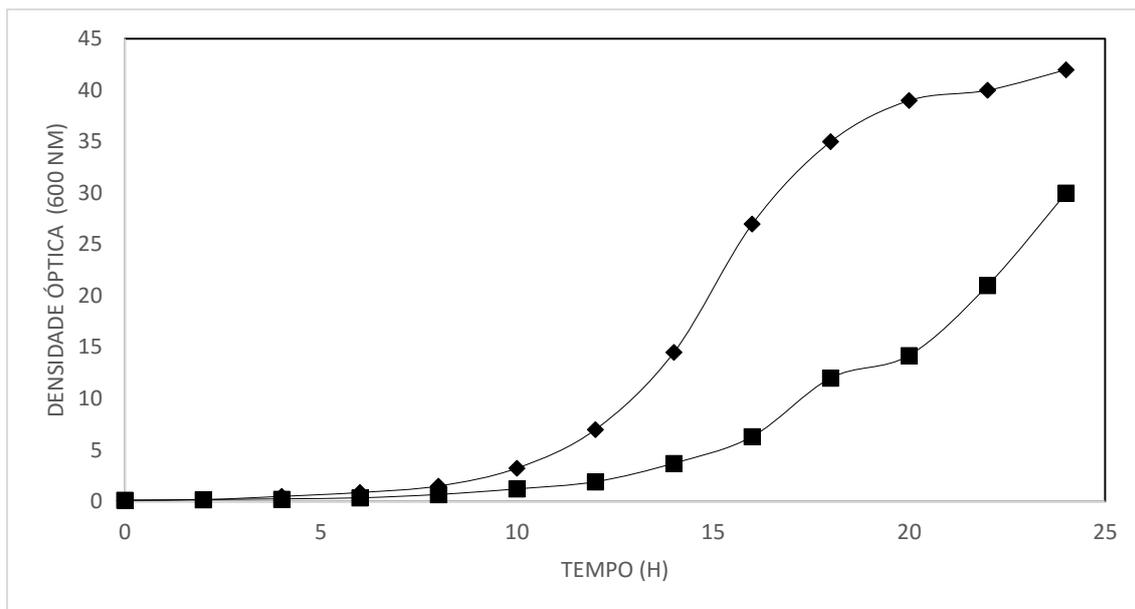


Figura 30. Cinética de crescimento das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes *hasA* e *hasB*) em meio YPSuc otimizado. Dados vindos de triplicata. Em losango cepa GG799 selvagem (controle); em quadrado cepa BAP modificada geneticamente produtora de AH.

Como observado no meio YPLac otimizado, houve também uma diferença significativa no crescimento entre as cepas selvagem e BAP. Embora a cepa BAP tenha novamente crescido menos que a cepa controle, o crescimento de BAP não foi tão baixo quanto o crescimento visto em meio YPLac otimizado (Figura 28). Este resultado também sugere que há uma produção de AH pela cepa BAP em meio YPSuc, mas não tanto quanto o observado em meio YPLac otimizado.

Com o gráfico semi-logarítmico (ln) também construído (Figura 31), as taxas de crescimento e a quantidade de AH quantificado no meio pelo método de CTAB estão descritas na Tabela 16 abaixo.

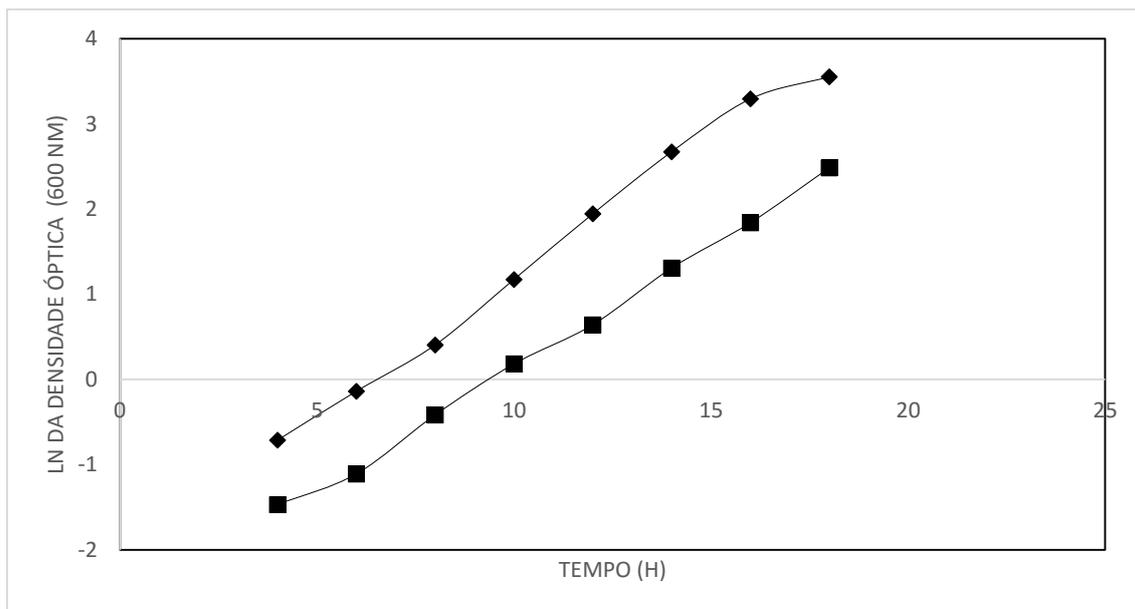


Figura 31. Cinética de crescimento exponencial com valores em ln das cepas GG799 (selvagem) e BAP (contendo os genes *hasAP* e *hasB*) em meio YPSuc otimizado. Dados vindos de triplicata. Em losango cepa GG799 selvagem (controle); em quadrado cepa BAP modificada geneticamente produtora de AH.

Tabela 16. Taxa de crescimento e produção de AH das cepas GG799 e BAP em meio YPSuc Otimizado.

Cepa	Taxa de crescimento (μ_{max})	OD ₆₀₀ final	Quantidade de AH obtida (g/L)
GG799	$0,3252 \pm 0,02$	42	0
BAP	$0,2861 \pm 0,05$	30	$0,28 \pm 0,03$

A fim de uma melhor visualização dos resultados das taxas de crescimento e produção de AH nos diferentes meios e pela utilização das diferentes fontes de carbono, a Tabela 17 abaixo representa um resumo de todos os dados apresentados até aqui.

Tabela 17. Taxas de crescimento e produção de AH das cepas construídas em todos os meios de cultura testados neste estudo para a produção de Ácido Hialurônico.

Meio	GG799 (Selvagem)			BAP			BA1			BA2			BA3		
	Taxa (μ_{\max})	OD ₆₀₀ final	AH (g/L)	Taxa (μ_{\max})	OD ₆₀₀ final	AH (g/L)	Taxa (μ_{\max})	OD ₆₀₀ final	AH (g/L)	Taxa (μ_{\max})	OD ₆₀₀ final	AH (g/L)	Taxa (μ_{\max})	OD ₆₀₀ final	AH (g/L)
YPD Glc	0,29	57,2	0	0,27	45,1	0,09	0,30	59,4	0	0,30	64,9	0	0,29	64	0
YPD Glc Otimizado	0,33	42	0	0,28	16,3	0,18	0,34	36,9	0	0,35	37,6	0	0,30	38,7	0
YPGal Otimizado	0,39	66	0	0,38	62	0,06	--	--	--	--	--	--	--	--	--
YPLac Otimizado	0,31	90	0	0,26	31	0,39	--	--	--	--	--	--	--	--	--
YPSuc Otimizado	0,32	42	0	0,28	30	0,28	--	--	--	--	--	--	--	--	--

6. DISCUSSÃO

Embora *K. lactis* seja uma levedura já bem utilizada em processos industriais[45], não há tantos estudos sobre a fisiologia desta levedura como *S. cerevisiae*, que é de sua mesma família. Esta carência de estudos dificulta a obtenção de conclusões precisas em estudos envolvendo a manipulação genética de *K. lactis*, pois muitos mecanismos que podem interferir na síntese de determinados metabólitos podem ainda ser desconhecidos. Em comparação com *S. cerevisiae*, considerada microrganismo padrão dentre as leveduras e que pertence à mesma família de *K. lactis*, observam-se algumas diferenças fundamentais para a escolha de uma destas leveduras em estudos de engenharia metabólica, como pode ser visto na Tabela 18 abaixo, adaptada do estudo de Rodicio e Heinisch [46].

Tabela 18. Características chaves de *K. lactis* comparada à *S. cerevisiae*. Tabela adaptada do estudo de Rodicio e Heinisch.

Característica	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. lactis</i>
Tempo de geração^a	80 min	80 min
Metabolismo energético	Crabtree-positivo	Crabtree-negativo
Utilização central de glicose	Glicólise	Via das pentoses fosfato
Disponibilidade de vetores e sistemas de transformação	Disponibilidade excelente	Pouca disponibilidade
Qualidade da recombinação homóloga^b	Excelente	Boa ^b
Genoma sequenciado	Sim	Sim
Aplicações Biotecnológicas	Fermentações clássicas; Produções heterólogas	Produtos laticínios; Produções heterólogas

a Tempo de geração obtido em cepas de laboratório (\pm 10 min) em meio rico a 30 °C.

b Pode ser aumentada usando uma cepa *Klu80* deletada

Uma vez que *K. lactis* é considerada uma levedura com efeito Crabtree-negativo (Tabela 18) sugere-se que esta é uma levedura com metabolismo ideal para a síntese de AH, diferente de *S. cerevisiae*. A síntese de AH depende de um alto custo energético para a célula, custo este equilibrado pela utilização de moléculas que são majoritariamente sintetizadas durante um metabolismo aeróbio (UTP, ATP, Glutamina, NAD⁺ e Acetil-

CoA), desta forma, é de se esperar que a síntese de AH seja incrementada quando há mais respiração celular em relação à fermentação alcoólica, processo que não ocorre de forma muito ideal em leveduras com efeito Crabtree-positivo. Esta característica de respiração celular de *K. lactis* a torna uma boa candidata à síntese de AH.

Igualmente aos estudos de metabolismo, protocolos de transformação de *K. lactis* também não são tão pesquisados (Tabela 18) e dependem em grande parte atualmente da utilização do kit comercial “*K. lactis* Protein Expression Kit” (NEB) que oferece células para transformação por choque térmico de alta eficiência, porém com metodologia de preparação de células competentes em segredo. A partir das observações do trabalho aqui realizado, sugere-se que protocolos de utilização de choque térmico são mais eficientes para a entrega de DNA exógenos em *K. lactis* do que protocolos que utilizam eletroporação, entretanto é válido considerar que a cepa de levedura utilizada neste trabalho (GG799) foi obtida do kit comercial citado acima e desta forma espera-se desta cepa de fato uma maior adaptação ao uso de choque térmico. A fim de obter resultados mais precisos são necessários mais estudos de transformação de *K. lactis* com a utilização de outras cepas. Ao contrário do esperado, na literatura, é observado que a grande maioria das manipulações genéticas de *K. lactis* (~90%) envolve o uso de eletroporação[45,46], o que mostra que esta tende a ser uma melhor metodologia que choque térmico para transformação em outras cepas de *K. lactis* usadas em laboratório.

Utilizado nas transformações de *K. lactis*, o plasmídeo pKlac2 (Figura 8) mostrou-se como um excelente vetor para entrega de DNA. Nas transformações feitas neste estudo a integração dos genes *hasA* no promotor LAC4 no cromossomo B da levedura ocorreu de forma correta, não tendo havido resultados identificados, por PCR de colônia, de recombinação em locais que não fossem pLAC4 (dado não mostrado). É válido ainda considerar que, como representado nas Figura 12 a 15, as orientações de todas as isoformas dos genes *hasA* estavam invertidas (fita sense) em relação à orientação dos genes *hasB* (fita antisense). Estudos relatam que diferenças na orientação de 2 genes em *S. cerevisiae* afeta de diferentes maneiras a atividade das enzimas codificadas por estes mesmo genes [77]. Por este motivo, é pertinente um estudo posterior com a inversão da orientação dos genes *hasB* em relação a *hasA*, de modo a visualizar se tais efeitos causariam um aumento na produção de ácido hialurônico nas cepas modificadas ou mesmo se este seria o motivo das cepas BA1, BA2 e BA3 não sintetizarem AH

Ambos os promotores utilizados neste trabalho, pGPD e pLAC4, conseguiram corretamente guiar a expressão dos genes *hasA* e *hasB*, respectivamente. Tal resultado é validado pois a cepa BAP conseguiu sintetizar AH tendo o gene *hasAP* guiado por pLAC4 e o gene *hasB* guiado por pGPD (Figura 15). Desta maneira, é considerado que as cepas BA1, BA2 e BA3 não sintetizaram ácido hialurônico por motivos que não envolvem a atividade não funcional de promotor. Nativo de *S. cerevisiae*, o promotor GPD (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase), também conhecido como TDH3, é um dos melhores promotores constitutivos relatados na literatura[78]. Por *S. cerevisiae* ser da mesma família de *K. lactis* esperava-se que este promotor apresentasse também um ótimo funcionamento nesta última. Entretanto, para otimização da produção de AH, idealmente outros promotores indutivos serão escolhidos futuramente e otimizados para testes guiando os genes *has*, principalmente *hasB* e *hasC*. Nativo de *K. lactis*, o promotor LAC4 é um dos principais promotores estudados nesta levedura. Além de ser um promotor indutivo, pLAC4 não é inibido por glicose, como ocorre em *S. cerevisiae*, o que o torna um promotor ideal para sistemas de expressão em *K. lactis*[45].

Tanto em *S. cerevisiae* como em *K. lactis* existe um operon dedicado à regulação de melibiose/galactose (MEL/GAL) e lactose/galactose (LAC/GAL), respectivamente, já que *S. cerevisiae* não é capaz de utilizar lactose como fonte de carbono. A regulação de ambos os operons é realizada por diferentes proteínas com funções específicas, mas bastante semelhantes em ambas as leveduras. Em *S. cerevisiae*, Gal4 é uma proteína que se liga ao DNA em uma sequência próxima ao promotor LAC4, o que resulta em um recrutamento de co-ativadores e complexos de pré-iniciação necessários para o início da atividade do operon MEL/GAL. Na ausência de galactose na célula, um regulador negativo denominado Gal80 acopla-se à Gal4 prevenindo que esta última induza a expressão do operon MEL/GAL. Existem ainda 2 outras proteínas denominadas Gal3 e GAL1, que são 78% idênticas em homologia e funcionam como um sensor de galactose intracelular. Gal3/Gal1 é uma enzima galactoquinase (converte galactose + ATP \leftrightarrow galactose-1-fosfato + ADP) com baixa atividade catalítica, mas que possui grande afinidade pelos substratos galactose e ATP. Uma vez ligado aos seus substratos, Gal3/Gal1 forma um complexo com Gal80, o que impede esta última de regular negativamente Gal4. Em outras palavras, quando há galactose intracelular, Gal3/Gal1 funciona como um competidor de Gal4 pela ligação com Gal80, permitindo que Gal4 possa ativar o operon MEL/GAL[79].

Em *K. lactis* o sistema do operon LAC/GAL é bastante semelhante ao descrito em *S. cerevisiae*, entretanto *K. lactis* não possui Gal3, possuindo apenas Gal1, que nesta levedura é uma proteína bifuncional. Resumidamente, Gal1 ao mesmo tempo que se liga à Gal80 também ativa Gal4, realizando a ativação do operon LAC/GAL simultaneamente com o impedimento da atividade do regulador negativo Gal80. Em *K. lactis* o operon LAC/GAL é formado pelos genes LAC12 e LAC4, que codificam respectivamente, uma lactose permease e uma β -galactosidase, responsáveis por internalizar galactose/lactose extracelular e utiliza-la como fonte de carbono.[80]

Embora bastante semelhantes, há uma diferença relevante entre os operons MEL/GAL de *S. cerevisiae* e LAC/GAL de *K. lactis* que necessita ser considerada em estudos de engenharia metabólica. Enquanto que o operon MEL/GAL é reprimido por glicose, o operon LAC/GAL não[81]. Supõe-se que glicose interfere na ligação de Gal4 necessária para a ativação do operon MEL/GAL, entretanto, em *K. lactis*, Gal4 (ou *kLac9*) é insensível à esta interferência. Por este motivo, embora neste estudo os genes *hasA* estejam sob controle do promotor Lac4, a utilização de fontes de carbono como Sacarose ou glicose não devem ter um efeito diferente na regulação dos genes *hasA* quando comparada à utilização de lactose ou galactose. Mesmo assim, estudos sobre o nível de transcrição dos genes *hasA* em diferentes fontes de carbono são futuramente necessários para a validação desta hipótese.

Como já previsto em outros estudos com outras cepas[82], *K. lactis* apresentou também uma vantagem frente às outras leveduras em relação à marca de seleção. Enquanto ainda hoje outras leveduras como *S. cerevisiae* e *P. pastoris* ainda utilizam técnicas de modificações genéticas com plasmídeos que conferem resistência a antibióticos pelas leveduras[17,53], *K. lactis* mostrou ser capaz de utilizar de forma eficiente a marca de seleção dominante por acetamida, que não envolve o uso de nenhum antibiótico ou molécula considerada tóxica e é uma característica atrativa pelas indústrias de escalonamento.

Em relação ao metabolismo de AH, desde o início a cepa BAP (contendo os genes *hasAP* e *hasB*) mostrou clara tendência à produção de AH, com características diferentes até mesmo em placa em relação à cepa controle, enquanto que as cepas BA1, BA2 e BA3 não. De forma interessante, os gráficos das cinéticas de crescimento das leveduras conseguiram prever sempre corretamente a produção ou não de AH pelas células. Cada vez que uma cepa em estudo apresentava cinética de crescimento igual ou melhor que a

cepa controle (selvagem) era esperado que esta cepa não estivesse produzindo AH e vice-versa. Tal observação explica porque a cepa BAP, que produziu AH em todas as análises de crescimento, também cresceu menos que a cepa controle em todos os meios otimizados, como pode ser observado nos gráficos. Em média, a cepa BAP atingia determinada OD₆₀₀ 3 horas depois que as cepas GG799, BA1, BA2 e BA3 já haviam atingido a mesma OD₆₀₀.

Como visto na Tabela 17, a produção de AH dobrou quando partiu de meio YPD-Glicose padrão para meio YPD-Glicose otimizado. Como este último possuía íons cofatores e sais que ajudam na síntese de AH [76] pelas enzimas HAS era esperada a observação deste resultado.

Em relação às fontes de carbono, a observação da figura 32 pode ajudar a entender os valores obtidos e também mostrados na Tabela 17. A utilização de Galactose no meio foi a que trouxe pior resultado de síntese de AH, além de ter originado uma cinética de crescimento quase idêntica entre as cepas GG799 e BAP. Na via metabólica da célula, Galactose entra como precursor do metabólito Glicose-1-P, que por sua vez é utilizado na via de síntese de UDP-GlcUA (Figura 32), em outras palavras, Galactose é uma péssima fonte de carbono para síntese de AH pois não gera metabólitos que abasteçam a via glicolítica e por fim ainda ativa a via de síntese de apenas um dos precursores do AH, neste caso o UDP-GlcUA. Como o AH para ser produzido de forma eficaz necessita da presença no citoplasma dos 2 precursores de forma equilibrada, a maior ativação de apenas a via de 1 precursor não fornece resultados bons. Ainda, observa-se que de todos os resultados apresentados neste estudo (Tabela 17), o teste com Galactose foi o que apresentou maior taxa de crescimento e atingiu maior OD final, o que pode ser explicado pois sem sintetizar AH a célula desviou melhor seu fluxo para o crescimento celular, considerando também que *K. lactis* utiliza galactose como fonte de carbono e possui o promotor LAC4 indutivo até 100 vezes mais por galactose.

Em relação aos meios contendo lactose e frutose, ambos estes açúcares são formados, em combinação com outro açúcar, por monômeros de glicose, desta forma ambos quando hidrolisados na célula abastecem a via glicolítica, o que é vantajoso para a síntese de AH e observado na Tabela 17. Entretanto, o meio com Lactose produziu mais AH que o meio com sacarose pois este último além de glicose libera frutose que também entra na via glicolítica (via frutose-6-fosfato) na célula (Figura 32) mas não tem efeito nos promotores indutivos de *K. lactis*. Lactose, por outro lado, libera glicose e galactose

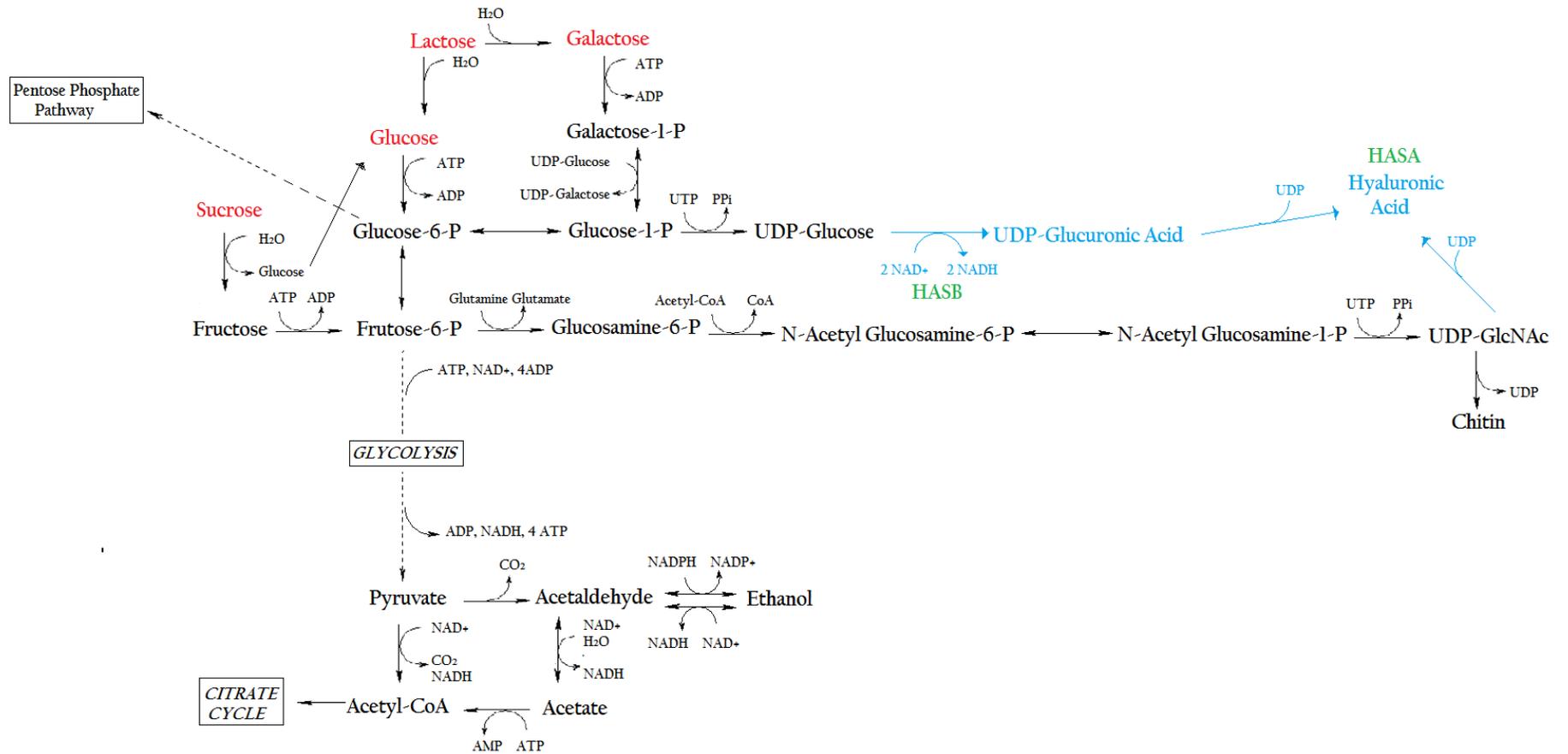


Figura 32. Metabolismo de Ácido Hialurônico a partir da Glicólise construído neste estudo. Em vermelho as fontes de carbono testadas em cinéticas de crescimento neste trabalho. Em azul as 2 reações inseridas no metabolismo de *K. lactis* para a síntese de AH. Em verde o nome das enzimas inseridas em *K. lactis* para a síntese de AH. Setas fechadas indicam reações diretas. Setas pontilhadas indicam reações com alguns metabólitos intermediários não mostrados. Dentro de caixas representação de vias inteiras.

fazendo com que glicose possa partir para a via de síntese de UDP-GlcNAc e galactose possa partir para a via de síntese de UDP-GlcUA via Glicose-1-fosfato (Figura 32) equilibrando os 2 precursores do AH na célula e criando um ambiente perfeito para o funcionamento da enzima HAS. Além disto, galactose induz 100 vezes os promotores indutivos de *K. lactis*, principalmente o promotor LAC4, que neste caso está guiando os genes *hasA* inseridos na levedura. Em outras palavras, lactose é a melhor fonte de carbono para a síntese de AH neste estudo.

Por fim, não houve produção de AH pelas cepas BA1, BA2 e BA3 provavelmente devido a um erro no acoplamento destas enzimas à membrana da levedura. Como já mostrado na Figura 2 as HAS de humanos possuem vários domínios acoplados à membrana da célula[83] enquanto que HAS de *P. multocida* possui apenas um [84]. De forma esperada, não deve ser difícil o acoplamento da HAS de *P. multocida* na célula, entretanto os vários domínios que HAS de humanos possui deve ter complicado o acoplamento da enzima na membrana da levedura o que a fez tornar-se não funcional. Os resultados de PCR a partir de cDNA que mostrou que os genes *hasA1*, *hasA2* e *hasA3* estavam sendo transcritos nas células ajuda a afirmar esta teoria de que há algum erro após a transcrição. No entanto, estudos mais específicos são necessários para realmente provar que parte após a transcrição ou mesmo durante a própria transcrição das *has* apresentou problemas na célula. Não existe na literatura relato de uso das HAS de humanos em microrganismos modificados geneticamente, preferivelmente as HAS de classe I utilizadas são de bactérias[32,34,41,43] e não de humanos para estudos como estes, por este motivo não há como saber baseado em outros dados onde estaria a falha de produção de AH pelas cepas BA1, BA2 e BA3. Embora da mesma classe, como visto na Figura 2, as HAS de humanos possuem ainda mais domínios transmembrânicos que as HAS de bactérias.

Finalmente, *K. lactis* sempre se mostrou uma levedura com ótimas características para a síntese de uma molécula como o AH, entretanto, seu metabolismo focado na via das pentoses fosfato (tabela 18) pode ser considerado um problema para a síntese de AH. A VPP nas células realiza um sequestro dos metabólitos Glicose-6-Fosfato e Frutose-6-fosfato, ambos utilizados na síntese dos 2 precursores do AH (Figura 32). Futuramente e de forma a incrementar a síntese de AH na cepa BAP, é válido realizar a deleção de alguns genes alvos que competem com a síntese de AH, principalmente as enzimas envolvidas na fase não oxidativa da VPP. Estudos com deleções destes e alguns outros genes alvos,

como a própria quitina sintase, que utiliza UDP-N-Acetil Glucosamina como precursor, são válidos para a análise de uma melhor produção de AH.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo aqui apresentado obteve sucesso na criação de 4 diferentes cepas da levedura *Kluyveromyces lactis* cepa GG799 contendo os genes necessários para fazer a mesma sintetizar ácido hialurônico, no entanto, a produção de AH foi observada em apenas 1 das cepas. Além disto, frente ao outro único estudo existente da produção de AH em leveduras[17], o melhor resultado obtido aqui (0,39 g/L) corresponde a aproximadamente 23% do melhor resultado apresentado em *Pichia pastoris* (1,7 g/L) e 10% da média de produção das cepas de *Streptococcus* produtoras naturais de AH.

No entanto é válido notar, que *K. lactis* além de não ser adaptada à produção de uma molécula de alto custo energético como o AH, também não teve neste estudo algumas estratégias utilizadas tanto na pesquisa com *Pichia pastoris* como nas pesquisas utilizando outros microrganismos para a síntese de AH. Dentre estas estratégias que podem ser usadas em estudos futuros com a mesma cepa criada aqui pode-se citar (1) uso de promotor indutivo para guiar o gene *hasB* juntamente com a inserção de outra cópia do gene *hasC* na célula também sob controle de promotor indutivo de modo à conseguir equilibrar durante o crescimento das células a concentração dos 2 precursores do AH com estratégias de indução; (2) utilização de outro tipo de fermentação como batelada alimentada que é sugerida na literatura como melhor forma de produzir AH; (3) deleções de vias metabólicas que competem com a síntese de AH na célula (VPP; quitina sintase); (4) super expressões de vias metabólicas que auxiliam na síntese de AH na célula (sacarose fosforilase); (5) estudo mais aprofundado da enzima HAS de modo a saber se a modificação de algum dos seus inúmeros receptores podem ser modificados para aumentar a síntese de AH e (6) estudo mais aprofundado do próprio metabolismo e fisiologia de *K. lactis*, que não é tão bem explorado e elucidado, tendo inclusive apenas 1 estudo na literatura de análise de fluxo metabólico nesta levedura.[46]

Embora com produção de AH considerada baixa, a elucidação das eficiências de protocolos de transformação de *K. lactis* juntamente com o segundo relato no mundo de

produção de AH em leveduras tornam este estudo promissor para a geração de uma futura cepa competidora no mercado de AH e na elucidação da fisiologia de *K. lactis*.

8. PRODUÇÕES RELEVANTES

Ao longo do tempo que o projeto de pesquisa aqui descrito foi desenvolvido, houveram contribuições para a difusão e transferência do conhecimento científico na área de biologia molecular fisiologia de leveduras e no campo do AH. Anterior a este estudo, há apenas 2 patentes depositadas sobre produção de AH em levedura, sendo 1 delas com destaque ao processo de purificação do ácido e não à produção. Além de já ter uma patente depositada (Número do pedido BR 10 2016020186 1), este projeto também obteve grande destaque nas áreas de biologia molecular, com apresentações em congressos brasileiros de foco acadêmico (XX Simpósio Nacional de Bioprocessos/SINAFERM e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas/SHEB) e comercial (6º encontro técnico do RHAE/Programa de Formação de Recursos Humanos em Áreas Estratégicas), bem como em universidades de destaque na biotecnologia fora do Brasil (PhD course "Industrial Biotechnology for Lignocellulose Based Processes" Chalmers University of Technology/Gothenburg; Sweden). Em relação às publicações este projeto já teve 1 revisão publicada[18] e possui 2 artigos em andamento.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rakkhumkaew N, Shibatani S, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. Hyaluronan synthesis in cultured tobacco cells (BY-2) expressing a chlorovirus enzyme: Cytological studies. *Biotechnol. Bioeng.* 2013;110:1174–9.
2. Yamada T, Kawasaki T. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. *J. Biosci. Bioeng.* 2005;99:521–8.
3. Gandhi NS, Mancera RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* 2008. p. 455–82.
4. Selyanin MA, Boykov PY, Khabarov VN. The History of Hyaluronic Acid Research and Initial Use. 2015. p. 1–8.
5. Liu L, Liu Y, Li J, Du G, Chen J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb. Cell Fact.* [Internet]. 2011;10:99. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3239841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med. (Praha).* 2008;53:397–411.
7. Armstrong DC, Johns MR. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63:2759–64.
8. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Nastasi G, Calatroni A. Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes. *Biochimie* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2010;92:204–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.10.006>
9. Schiraldi C, Gatta A La, Rosa M De. *Biotechnological Production and Application of Hyaluronan.* 2010;
10. Boeriu CG, Springer J, Kooy FK, van den Broek L a. M, Eggink G. Production Methods for Hyaluronan. *Int. J. Carbohydr. Chem.* [Internet]. 2013;2013:1–14. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijcc/2013/624967/>
11. Don MM, Shoparwe NF. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. *Biochem. Eng. J.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;49:95–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.001>
12. Ward PN, Field TR, Ditcham WGF, Maguin E, Leigh JA. Identification and disruption of two discrete loci encoding hyaluronic acid capsule biosynthesis genes *hasA*, *hasB*, and *hasC* in *Streptococcus uberis*. *Infect. Immun.* 2001;69:392–9.
13. Kendall FE, Heidelberger M, Dawson MH. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of Group A *Streptococcus*. *J. Biochem.* 1937;61–9.
14. Liu L, Liu Y, Li J, Du G, Chen J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb. Cell Fact.* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;10:99. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3239841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

15. Chong BF, Blank LM, Mclaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005;66:341–51.
16. Jia Y, Zhu J, Chen X, Tang D, Su D, Yao W, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. *Bioresour. Technol.* [Internet]. 2013;132:427–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.150>
17. Jeong E, Shim WY, Kim JH. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *J. Biotechnol.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;185:28–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.018>
18. de Oliveira JD, Carvalho LS, Gomes AMV, Queiroz LR, Magalhães BS, Parachin NS. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microb. Cell Fact.* [Internet]. 2016;15:119. Available from: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0517-4>
19. DeAngelis PL. Molecular directionality of polysaccharide polymerization by the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* 1999;274:26557–62.
20. Tlapak-Simmons VL, Baggenstoss BA, Clyne T, Weigel PH. Purification and lipid dependence of the recombinant hyaluronan synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*. *J. Biol. Chem.* 1999;274:4239–45.
21. Mausolf A. Das hyaluronat synthesierende system bei Streptokokken. *Wissenschaftliche Forschungsbeiträge Biol.* 20. 1988;
22. Vigetti D, Viola M, Karousou E, De Luca G, Passi A. Metabolic control of hyaluronan synthases. *Matrix Biol.* [Internet]. International Society of Matrix Biology; 2014;35:8–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.002>
23. DeAngelis PL. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase. *Biochemistry.* 1996;35:9768–71.
24. DeAngelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *J. Biol. Chem.* 1993;268:14568–71.
25. DeAngelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* 1993;268:19181–4.
26. Hoshi H, Nakagawa H, Nishiguchi S, Iwata K, Niihara K, Monde K, et al. An engineered hyaluronan synthase: characterization for recombinant human hyaluronan synthase 2 *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2004;279:2341–9.
27. Volpi N, Schiller J, Stern R, Soltés L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr. Med. Chem.* 2009;16:1718–45.
28. Pummill PE, Achyuthan AM, Deangelis PL. Enzymological Characterization of Recombinant *Xenopus* DG42, A Vertebrate Hyaluronan Synthase. *Biochemistry.* 1998;273:4976–81.
29. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 1999;274:25085–92.
30. Armstrong DC, Cooney MJ, Johns MR. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997;47:309–12.

31. Prasad SB, Jayaraman G, Ramachandran KB. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010;86:273–83.
32. Chien L-J, Lee C-K. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;77:339–46.
33. Prasad SB, Ramachandran KB, Jayaraman G. Transcription analysis of hyaluronan biosynthesis genes in *Streptococcus zooepidemicus* and metabolically engineered *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012;94:1593–607.
34. Chien L-J, Lee C-K. Enhanced Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis* by Coexpressing Bacterial Hemoglobin. *Biotechnol Prog.* [Internet]. 2007;23:1017–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bp070036w>
35. Sheng JZ, Ling PX, Zhu XQ, Guo XP, Zhang TM, He YL, et al. Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*: A case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer. *J. Appl. Microbiol.* 2009;107:136–44.
36. Nešvera J, Pátek M. Tools for genetic manipulations in *Corynebacterium glutamicum* and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011;90:1641–54.
37. Mao Z, Chen RR. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. *Biotechnol. Prog.* 2007;23:1038–42.
38. Weigel PH. Functional characteristics and catalytic mechanisms of the bacterial hyaluronan synthases. *IUBMB Life.* 2002;54:201–11.
39. DeAngelis PL, Jing W, Graves M V, Burbank DE, Van Etten JL. Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1. *Science.* 1997;278:1800–3.
40. Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 2003;328:307–17.
41. Mao Z, Shin HD, Chen R. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009;84:63–9.
42. Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab. Eng.* 2008;10:24–32.
43. Widner B, Dollen S Von, Tang M, Heu T, Sloma A, Sternberg D, et al. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:3747–52.
44. Bonekamp FJ, Oosterom J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* - A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994;41:1–3.
45. Van Ooyen AJJ, Dekker P, Huang M, Olsthoorn MM a, Jacobs DI, Colussi P a., et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:381–92.
46. Rodicio R, Heinisch JJ. Yeast on the milky way: Genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast.* 2013;30:165–77.
47. Carvalho N, Coelho E, Gales L, Costa V, Teixeira JA, Moradas-ferreira P. Production of orotic acid by a Klura3 D mutant of *Kluyveromyces lactis*. *J. Biosci. Bioeng. Elsevier Ltd;* 2015;xx:6–11.
48. Spohner SC, Czermak P. Heterologous expression of *Aspergillus terreus* fructosyltransferase in *Kluyveromyces lactis*. *N. Biotechnol. Elsevier B.V.;* 2016;33:473–9.

49. Paciello L, Romano ÆF, Alteriis ÆE De. Glucoamylase by recombinant *Kluyveromyces lactis* cells : production and modelling of a fed batch bioreactor. 2010;525–32.
50. César J, Rosa C, Colombo LT, Caroline M, Alvim T, Avonce N, et al. Metabolic engineering of *Kluyveromyces lactis* for L-ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. 2013;1–13.
51. Yun C, Kong JN, Chung J, Kim M, Kong K. Improved secretory production of the sweet- tasting protein , brazzein , in *Kluyveromyces lactis*. 2016;
52. Loreto B, Jime JJ, Arbulu S, Herranz C, Cintas LM. Use of Synthetic Genes for Cloning , Production and Functional Expression of the Bacteriocins Enterocin A and Bacteriocin E 50-52 by *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. 2014;
53. Koivistoinen OM, Kuivanen J, Barth D, Turkia H, Pitkänen J, Penttilä M, et al. Glycolic acid production in the engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. 2018;1–16.
54. Gietz BRD, Woods RA, Peg DNA. [4] Transformation of Yeast by Lithium Acetate / Single-Stranded Carrier DNA / Polyethylene Glycol Method. 2002;350:87–96.
55. Kooistra R, Hooykaas PJJ, Steensma HY. Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. 2004;781–92.
56. Rajagopal K, Kumar P, Kumar R, Fatima K. competent *Escherichia coli* , *Bi fi dobacterium sp .* and *Kluyveromyces lactis* cells. MGENE. Elsevier B.V.; 2014;2:807–18.
57. Hill J, Donald KAG, Griffiths DE. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:6688.
58. Marcellin E, Chen WY, Nielsen LK. Metabolic Pathway Engineering for Hyaluronic Acid Production. *Carbohydrate-Modifying Biocatal.* 1st ed. 2011. p. 571–84.
59. Sudip S. Global Hyaluronic Acid Products Market Driven by High Demand for Anti-ageing Products, to Reach US\$9.85 bn by 2019 [Internet]. 2016 [cited 2016 Jun 13]. Available from: <http://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/global-hyaluronic-acid-products-market.htm>
60. Caldas Pan N, Vignoli JA, Baldo C, Pedrine Colabone Celligoi MA. Ácido Hialurônico: Características, Produção Microbiana E Aplicações Industriais. *BBR - Biochem. Biotechnol. Reports* [Internet]. 2013;2:42. Available from: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/bbr/article/view/16567>
61. Guillaumie F, Malle BM, Schwach-Abdellaoui K, Beck T. A new sodium hyaluronate for skin moisturization and antiaging. *Cosmet. Toilet.* [Internet]. 2006;121:51–8. Available from: <http://www.cosmeticsandtoilettries.com.sci-hub.org/formulating/function/moisturizer/2558886.html>
62. Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E. Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem. J.* [Internet]. 1981;200:415–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1163551&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: Are we there yet? *Glycobiology.* 2003;13.
64. Erickson M, Stern R. Chain gangs: New aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem. Res. Int.* 2012;

65. Akmal M, Singh A, Anand A, Kesani A, Aslam N, Goodship A, et al. The effects of hyaluronic acid on articular chondrocytes. *J. Bone Jt. Surg. - Br. Vol.* [Internet]. 2005;87-B:1143–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16049255> <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/cgi/doi/10.1302/0301-620X.87B8.15083>
66. Chan RW, Gray SD, Titze IR. The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* 2001;124:607–14.
67. Esposito E, Menegatti E, Cortesi R. Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: A comparative study. *Int. J. Pharm.* 2005;288:35–49.
68. Schiraldi C, Gatta A La, Rosa M De. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers.* 2010. p. 387–412.
69. Nicola DF. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *Rockefeller Inst. Med. Res.* 1955;
70. Vignetti D, Ori M, Viola M, Genasetti A, Karousou E, Rizzi M, et al. Molecular cloning and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the amphibian *Xenopus laevis* and its involvement in hyaluronan synthesis. *J. Biol. Chem.* 2006;281:8254–63.
71. Becker DM, Guarente L. High-Efficiency Transformation of Yeast by Electroporation. *Methods Enzymol.* 1991;182–187.
72. Manivasakam P, Schiestl RH. High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. 1993;21:4414–5.
73. Lin-cereghino J, Wong WW, Xiong S, Giang W, Linda T, Vu J, et al. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. 2005;38:4–6.
74. Sanchez M, Iglesias FJ, Santamaria C, Dominguez A. ~ ~ Cla. 1993;59:2087–92.
75. Oueslati N, Leblanc P, Harscoat-Schiavo C, Rondags E, Meunier S, Kapel R, et al. CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form. *Carbohydr. Polym.* 2014;112:102–8.
76. Im JH, Song JM, Kang JH, Kang DJ. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009;36:1337–44.
77. Bae JY, Laplaza J, Jeffries TW. Effects of gene orientation and use of multiple promoters on the expression of XYL1 and XYL2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008;145:69–78.
78. Blazeck J, Garg R, Reed B, Alper HS. Controlling promoter strength and regulation in *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic hybrid promoters. *Biotechnol. Bioeng.* 2012;109:2884–95.
79. Jayadeva Bhat P, Murthy TV. Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Mechanism of galactose-mediated signal transduction. *Mol. Microbiol.* 2001;40:1059–66.
80. Zachariae W, Kuger P, Breunig KD. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator LA1C9 (K1GAL4). *Nucleic Acids Res.* 1993;21:69–77.

81. Ruzzi M, Breunig KD, Ficcarda G, Hollenberg CP. Positive regulation of the beta-galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis* is mediated by an upstream activation site that shows homology to the GAL upstream activation site of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1987;7:991–7.
82. Read JD, Colussi PA, Ganatra MB, Taron CH. Acetamide Selection of *Kluyveromyces lactis* Cells Transformed with an Integrative Vector Leads to High-Frequency Formation of Multicopy Strains □. 2007;73:5088–96.
83. Itano N, Kimata K. Mammalian Hyaluronan Synthases. *IUBMB Life* [Internet]. 2002;1:195–9. Available from: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0517-4>
84. DeAngelis PL, Jing W, Drake RR, Achyuthan AM. Identification and Molecular Cloning of a Unique Hyaluronan Synthase from *Pasteurella multocida**. *J. Biol. Chem.* 1998;273:8454–8458.

10.ANEXOS

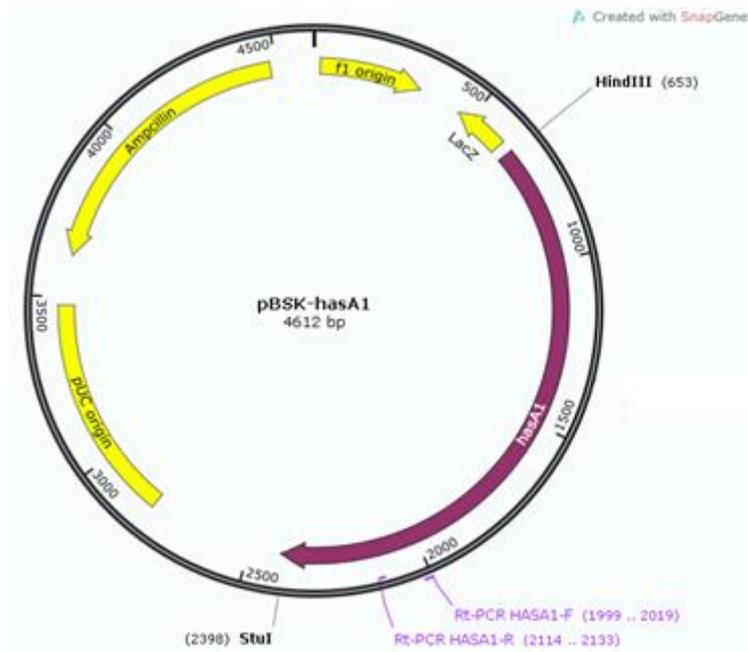


Figura 33. Mapa físico do plasmídeo sintético pBSK-HASA1 que contém o gene *hasA1* (Hialuronan Sintase isoforma 1) vindo de *Homo sapiens* e otimizado para a levedura *K. lactis*. Em destaque os sítios para as enzimas *HindIII* e *StuI* inseridos sinteticamente nas extremidades do gene *hasA1*, bem como o local de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores para análise futura de transcritos do gene.

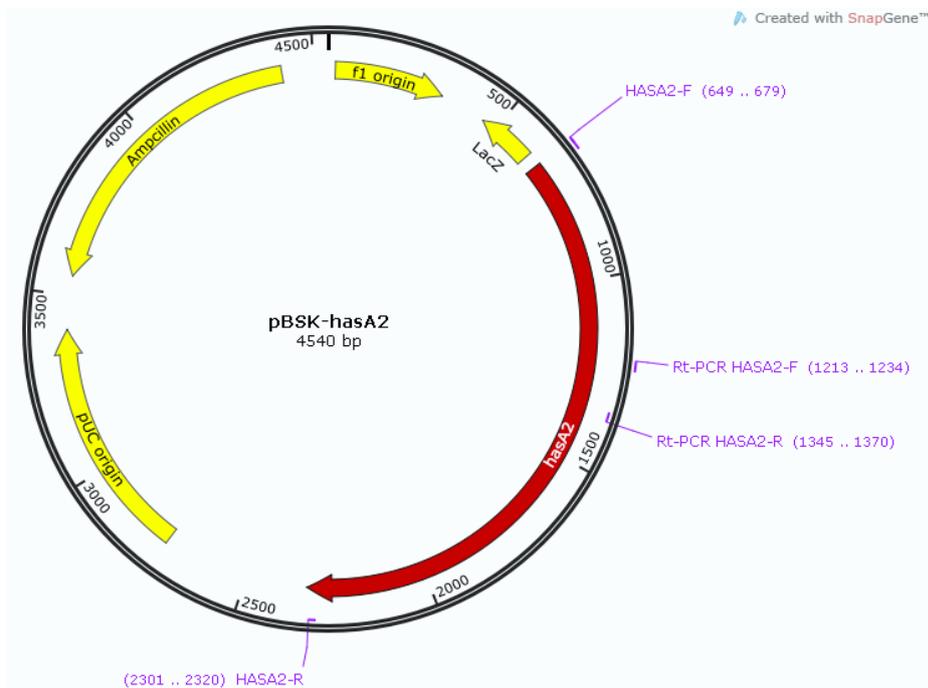


Figura 34. Mapa físico do plasmídeo sintético pBSK-HASA2 que contém o gene *hasA2* (Hialuronan Sintase isoforma 2) vindo de *Homo sapiens* e otimizado para a levedura *K. lactis*. Em destaque os sítios para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores responsáveis por inserir nas extremidades do gene *hasA2* sítios para as enzimas de restrição *HindIII* e *StuI*, bem como o local de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores para análise futura de transcritos do gene.

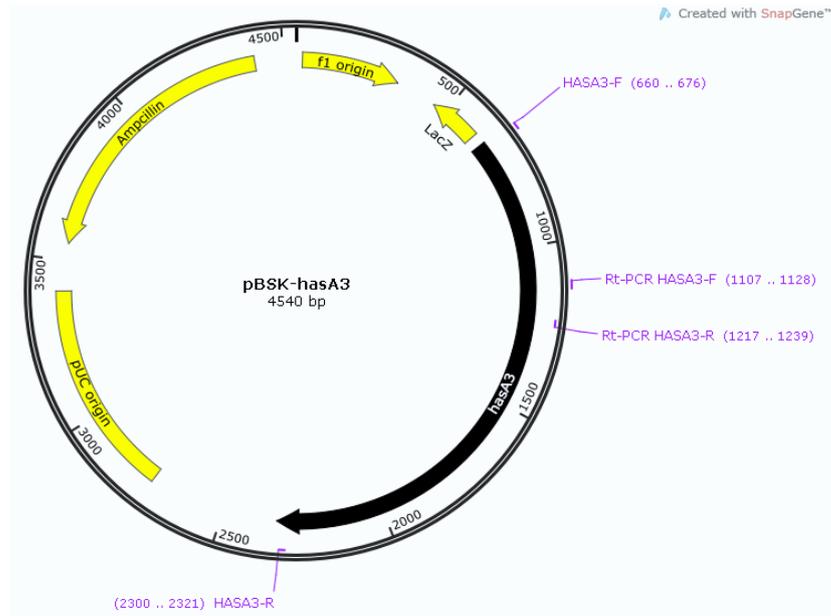


Figura 35. Mapa físico do plasmídeo sintético pBSK-HASA3 que contém o gene *hasA3* (Hialuronan Sintase isoforma 3) vindo de *Homo sapiens* e otimizado para a levedura *K. lactis*. Em destaque os sítios para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores responsáveis por inserir nas extremidades do gene *hasA3* sítios para as enzimas de restrição *HindIII* e *StuI*, bem como o local de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores para análise futura de transcritos do gene.

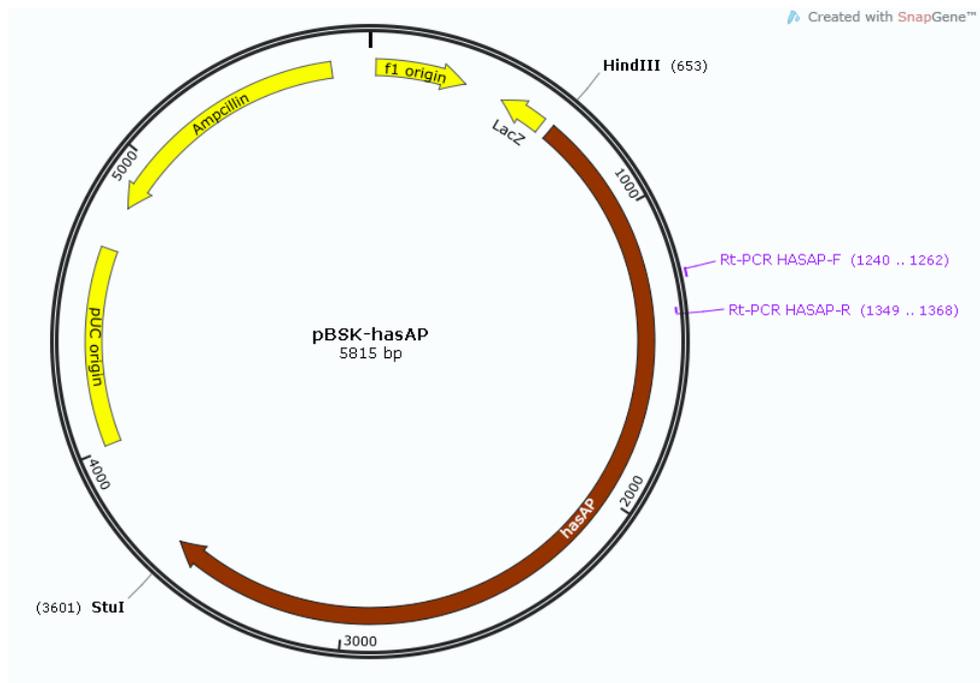


Figura 36. Mapa físico do plasmídeo sintético pBSK-HASAP que contém o gene *hasAP* (Hialuronan Sintase) vindo de *Pasteurella multocida* e otimizado para a levedura *K. lactis*. Em destaque os sítios para as enzimas *HindIII* e *StuI* inseridos sinteticamente nas extremidades do gene *hasAP*, bem como o local de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores para análise futura de transcritos do gene.

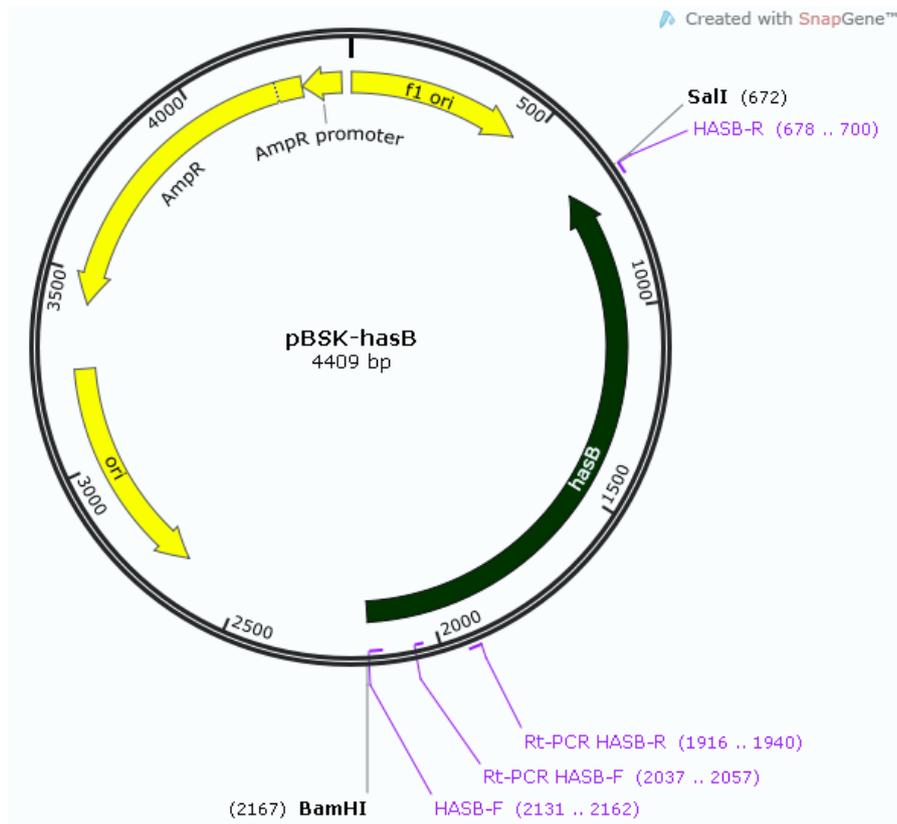


Figura 37. Mapa físico do plasmídeo sintético pBSK-HASB que contém o gene *hasB* (UDP-Glucose Desidrogenase) vindo de *Xenopus laevis* e otimizado para a levedura *K. lactis*. Em destaque os sítios para as enzimas BamHI e SalI inseridos sinteticamente nas extremidades do gene *hasB*, bem como o local de anelamento dos olinucleotídeos iniciadores para análise futura de transcritos do gene.

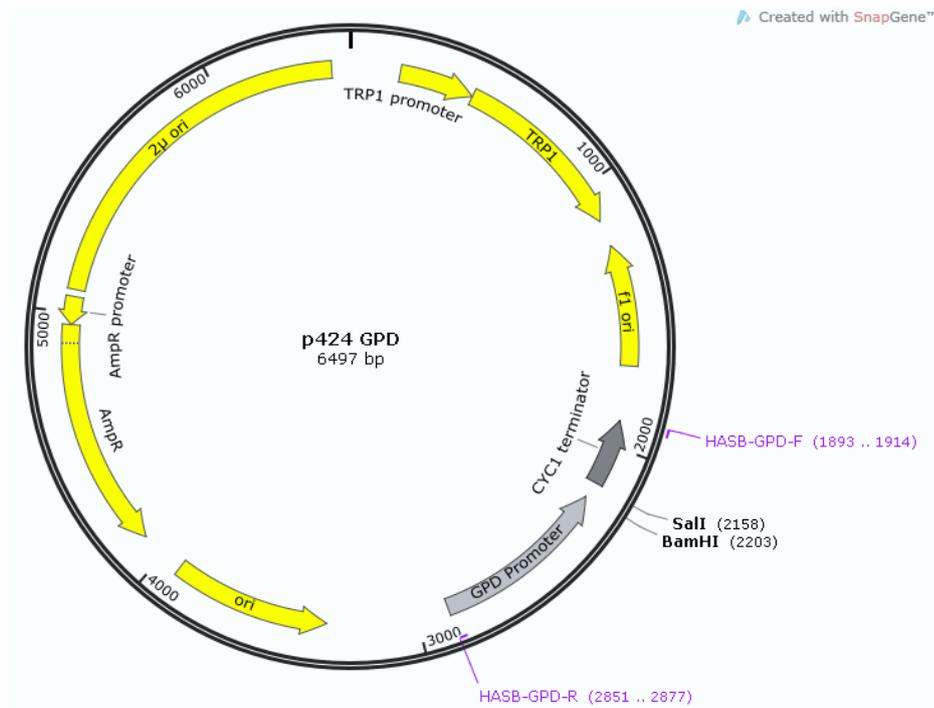


Figura 38. Mapa físico do plasmídeo p424-GPD utilizado neste estudo para construção do sistema de expressão do gene *hasB*.