



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

Construção e caracterização de nanosensor para o
monitoramento do influxo de xilose em
Saccharomyces cerevisiae

Christiane Ribeiro Janner

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Coorientadora: Dr^a. Viviane Castelo Branco Reis

Brasília/ 2015

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

Construção e caracterização de nanosensor para o
monitoramento do influxo de xilose em
Saccharomyces cerevisiae

Christiane Ribeiro Janner

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Coorientadora: Dra. Viviane Castelo Branco Reis

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília/2015

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres, com apoio financeiro do CNPq e CAPES.

Banca Examinadora

Professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Universidade de Brasília
Presidente da Banca

Professora Dr^a. Sônia Maria de Freitas
Universidade de Brasília
Examinadora Interna

Professor Dr. João Ricardo Moreira de Almeida
Embrapa – Agroenergia
Examinador Externo

Professora Dr^a. Ildinete Silva Pereira
Universidade de Brasília
Membro Suplente

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela força e oportunidade de crescimento acadêmico e pessoal.

Ao meu pai Nilvo e à minha mãe Nidia pelo apoio incondicional e pelo incentivo de sempre buscar meus sonhos.

À minha irmã Juliana por ter sido sempre um exemplo a ser seguido.

Ao professor Fernando Araripe Torres pela oportunidade e por acreditar em mim, pela ajuda e disponibilidade sempre que necessário.

À Viviane Reis pelos ensinamentos de bancada e orientação durante todo o projeto, sempre estando disposta a ajudar.

À professora Sônia Maria de Freitas pelo auxílio oferecido em várias etapas do trabalho.

À professora Janice De Marco pelos ensinamentos dados com muita paciência e disponibilidade de ajudar.

À professora Lídia Pepe Moraes pelos ensinamentos e preocupações acerca do projeto.

A todos os colegas da BioMol, em especial aos amigos de laboratório: Luíza, Myrna, Maritza, Juliana, Marciano, Túlio, Vanessa, Ana, Daniel, Danuza, Tiago

e Vinícius, que sempre estiveram disponíveis a escutar e ajudar, além de tornarem agradável o ambiente de trabalho.

A todos os amigos que me ofereceram momentos de distração fora do laboratório, em especial ao Paulo Herrera, que sempre se fez presente em todos os momentos, principalmente naqueles em que mais precisava.

Aos técnicos da BioMol: Thompson, Ivonildes e Fátima, sem os quais seria muito mais difícil a realização de qualquer trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e por oferecer melhorias ao meu trabalho.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram e me ajudaram na realização deste projeto.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Abreviaturas	iv
Resumo	vi
Abstract	viii
1. Introdução	1
1.1. Etanol Lignocelulósico	1
1.2. Biomassa	2
1.3. Utilização da xilose no processo fermentativo	3
1.4. Estudo de transportadores	5
1.4.1. O Fenômeno da Fluorescência	6
1.4.2. Nanosensores FLIP	8
2. Objetivos	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. Estratégia	13
4. Material	14
4.1. Micro-organismos	14
4.2. Meios de Cultura	15
4.3. Tampões e Soluções	17
4.4. Enzimas	23
4.5. Vetores	24
4.6. <i>Primers</i>	24
4.7. <i>Kits</i>	25

5. Métodos	26
5.1. Análise <i>in silico</i> do nanosensor sintético	26
5.2. Preparo de células bacterianas competentes para choque térmico	26
5.3. Preparo de células bacterianas competentes por CaCl ₂	27
5.4. Transformação de bactéria por choque térmico	27
5.5. Ligação de fragmentos de DNA	28
5.6. Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)	28
5.7. Digestão de DNA com enzimas de restrição	29
5.8. Precipitação de DNA	29
5.9. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	29
5.10. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose	29
5.11. Purificação de fragmentos de DNA a partir do gel	30
5.12. Expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	30
5.13. Lise de células em homogeneizador de alta pressão	31
5.14. Análise de corpo de inclusão	31
5.15. Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida	32
5.16. Purificação de Proteínas	32
5.17. Dicroísmo Circular	33
5.18. Caracterização do nanosensor	34
5.19. Transformação de alta eficiência de leveduras	35
5.20. Transformação rápida de leveduras	36
5.21. Ensaios <i>in vivo</i>	36
6. Resultados	38
6.1. Análise estrutural da sequência sintética FLIPXylF	38
6.2. Síntese do gene FLIPXylF	40
6.3. Modificação do domínio de ligação à xilose	41

6.4. Expressão em <i>E. coli</i>	44
6.5. Purificação proteica	47
6.6. Caracterização dos nanosensores	49
6.6.1. Determinação de K_d	50
6.6.2. Determinação dos parâmetros termodinâmicos	53
6.6.3. Especificidade do nanosensor	55
6.7. Validação do nanosensor <i>in vivo</i>	56
7. Discussão	61
8. Conclusões e Perspectivas	68
9. Referências Bibliográficas	70
10. Anexos	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Jablonski .	7
Figura 2. Sobreposição do espectro de emissão (Em.) do fluoróforo CFP com o espectro de absorção do fluoróforo YFP (Abs.).	8
Figura 3. Exemplo de um nanosensor FLIP com propriedades de FRET.	10
Figura 4. Esquema da estratégia geral para a execução deste trabalho.	13
Figura 5. Alinhamento da sequência proteica do domínio de ligação à xilose (XBP) com a sequência do domínio de ligação à galactose/glicose ligado à glicose (2HPH).	38
Figura 6. Modelo tridimensional da proteína XBP.	40
Figura 7. Mapa de restrição do vetor pET21-FLIPX.	41
Figura 8. Desenho esquemático do nanosensor FLIPXyIF.	41
Figura 9. Sequência do nanosensor.	42
Figura 10. Amplificação do domínio de ligação à xilose truncado.	43
Figura 11. Confirmação da clonagem do domínio de ligação à xilose truncado no vetor pET21-FLIPX.	44
Figura 12. Expressão gênica dos nanosensores a 37 °C.	45
Figura 13. Espectro de dicroísmo circular distante da região UV (190 – 260 nm) do nanosensor intacto.	46
Figura 14. Expressão gênica dos nanosensores a 20 °C.	47
Figura 15. Purificação do nanosensor intacto por cromatografia de afinidade.	48
Figura 16. Purificação do nanosensor truncado por cromatografia de afinidade.	48

Figura 17. Espectro de emissão do nanosensor intacto a 25 °C.	49
Figura 18. Espectro de emissão do nanosensor truncado a 25 °C.	50
Figura 19. Curva de titulação do nanosensor truncado.	51
Figura 20. Comparação das curvas de titulação dos nanosensores intacto e truncado.	51
Figura 21. Curvas de titulação do nanosensor intacto.	52
Figura 22. Aproximação de Van't Hoff para a interação do nanosensor intacto com a xilose.	54
Figura 23. Especificidade do nanosensor intacto em relação à glicose, arabinose, xilulose e xilitol.	55
Figura 24. Curvas de titulação do nanosensor intacto para xilulose e xilitol.	56
Figura 25. Amplificação dos genes do nanosensor e do transportador <i>HXT7</i> .	57
Figura 26. Mapa de restrição do vetor Y1FLIPX e confirmação da clonagem do nanosensor no vetor Y1PGK1.	58
Figura 27. Mapa de restrição do vetor Y2HXT7 e PCR de colônia de 11 clones transformantes.	59
Figura 28. PCR de colônia de 13 clones transformantes.	60
Figura 29. Estrutura do bolso de ligação do substrato da proteína XBP.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens <i>E. coli</i> e seus respectivos fenótipos.	14
Tabela 2. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> e seus respectivos fenótipos.	15
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados neste trabalho.	24
Tabela 4. Constante de dissociação (K_d) do nanosensor intacto por xilose e $\Delta t_{\text{máx}}$ calculadas para cada temperatura estudada.	53
Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos encontrados para a interação entre o nanosensor intacto e a xilose.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å – ångström

ΔG – variação da energia livre de Gibbs

ΔH – variação de entalpia

ΔS - variação de entropia

APS – persulfato de amônio

DTT – ditioneitol

eCFP – *enhanced cyan fluorescent protein* (proteína ciano fluorescente)

EDTA – ácido etileno-diamino-tetra-acético

eYFP – *enhanced yellow fluorescent protein* (proteína amarela fluorescente)

FRET – *fluorescence resonance energy transfer* (transferência de energia por fluorescência)

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

GFP – *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

GRAS – *Generally Recognized as Safe* (geralmente reconhecido como seguro)

kb – quilobase = 1000 pares de bases

K_d – constante de dissociação

kDa – quilo Dalton = 1000 Daltons

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

nm – nanômetro

OD₆₀₀ – densidade óptica a 600 nm

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

pb – pares de bases

PCR - *polimerase chain reaction* (reação de polimerização em cadeia)

pH – potencial hidrogeniônico

p/v – peso por volume

SDS – *sodium dodecyl sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

TAE – tampão tris-acetato-EDTA

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamina

T_m – temperatura de anelamento

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar

v/v – volume por volume

XBP – *xylose binding protein* (proteína de ligação à xilose)

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo

RESUMO

Para o melhor aproveitamento da biomassa na produção de etanol lignocelulósico, a xilose, principal açúcar que compõe a hemicelulose, poderia ser fermentada juntamente com a glicose. No processo fermentativo, o micro-organismo mais utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma excelente produtora de etanol. Contudo, esta levedura não é capaz de fermentar pentoses, como a xilose. Embora já tenham sido desenvolvidas linhagens recombinantes que são capazes de metabolizar xilose, o processo ainda não é eficiente, sendo uma das limitações o transporte deste açúcar, que é realizado por meio de transportadores de hexose. Para analisar o influxo de xilose e assim verificar a afinidade de transportadores capazes de realizar a internalização deste açúcar, foi construído um nanosensor baseado na proteína periplasmática XBP (*Xylose Binding Protein*) e em proteínas fluorescentes. Assim, a XBP foi fusionada e flanqueada por duas variantes da GFP (*Green Fluorescent Protein*), a eCFP (*Cyan Fluorescent Protein*) e a Vênus (*Yellow Fluorescent Protein*), cujos espectros de emissão e excitação, respectivamente, são sobrepostos, permitindo assim a ocorrência do FRET. Alterações neste fenômeno podem ser mensuradas, permitindo o monitoramento de moléculas com resolução espacial e temporal *in vivo* e de mudanças conformacionais de proteínas associadas à interação de um ligante. Além disso, foi construída uma versão truncada do nanosensor, portando uma deleção na XBP para monitorar o processo de ligação do açúcar à proteína, mediante uma alteração mais expressiva do FRET. Primeiramente foram realizados estudos de modelagem a fim de verificar se o nanosensor apresentaria uma estrutura que favoreceria o FRET. Com a sequência definida, o gene foi sintetizado e posteriormente, foi realizada uma deleção de 69 pb no domínio de ligação à xilose por meio de PCR. Os dois genes codantes para o nanosensor intacto e truncado foram expressos em *Escherichia coli*. Após a purificação de ambas as proteínas por meio de cromatografia de afinidade, verificou-se ocorrência do FRET por ensaios de fluorimetria para os dois nanosensores. O nanosensor intacto exibiu uma K_d por xilose de aproximadamente 3,41 μM a 25 °C enquanto que o

nanosensor truncado apresentou uma K_d de aproximadamente 0,97 μM na mesma temperatura, possuindo este maior afinidade pelo açúcar que o nanosensor intacto. Para este também foram calculados os parâmetros termodinâmicos da interação, a qual exibiu um ΔH de aproximadamente 13 kcal/mol, ΔS de 68 cal/mol.K e ΔG de -7 kcal/mol. Estes valores indicam que a interação é espontânea, entropicamente guiada e favorecida por interações hidrofóbicas. Ensaio de especificidade do nanosensor intacto demonstraram que este também possui afinidade pelos açúcares xilulose (K_d de 0,24 μM) e xilitol (K_d de 0,31 μM). A expressão do nanosensor intacto em *Saccharomyces cerevisiae* revelou que os fluoróforos encontram-se funcionais no citoplasma da célula, porém não foi verificada a ocorrência do FRET, sendo necessária a otimização do ensaio *in vivo*.

ABSTRACT

Xylose, a highly abundant pentose present in hemicellulose, can be fermented along with glucose to improve harnessing of biomass to produce lignocellulosic ethanol. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is widely used in fermentative processes but is unable to use pentoses. Although strains that metabolize xylose had already been developed, the process remains inefficient. One bottleneck is the uptake of this sugar, since this is carried out by hexose transporters. Hence, studies on xylose transport are of utmost interest. In order to analyze the xylose uptake and therefore evaluate the affinity of sugar transporters, a nanosensor was built based on XBP (Xylose Binding Protein) fused to two variants of GFP (Green Fluorescent Protein), the eCFP and the eYFP, whose emission and excitation spectra, respectively, are overlapped, allowing the occurrence of FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Modifications in this phenomenon can be measured, which enables molecules monitoring of conformational changes in proteins, which is associated with a binding event. Besides, a new version of the nanosensor was constructed by PCR, which contains a deletion in XBP in order to evaluate if there is an increase in FRET efficiency. First of all, modelling studies were performed to verify if the nanosensor would present a tridimensional structure that enables the FRET occurrence. Then, the encoding genes for both nanosensors were expressed in *Escherichia coli*. Following the protein purification of both nanosensors by affinity chromatography, the occurrence of FRET was checked by fluorimetric assays. The intact nanosensor exhibited a K_d of 3,41 μM at 25 °C, while the truncated nanosensor exhibited 0,97 μM for K_d at the same temperature, demonstrating that the last one has more affinity for xylose than the intact nanosensor. For this, the thermodynamics parameters of the interaction were calculated, which exhibited a ΔH of 13 kcal/mol, ΔS of 68 cal/mol and a ΔG of -7 kcal/mol. These values indicated that the interaction is spontaneous, driving by entropy and favored by hydrophobic interactions. Also, specificity assays for intact nanosensor showed that it has affinity for xylulose (K_d of 0,24 μM) and xylitol (K_d of 0,31 μM). The expression of the intact nanosensor in *Saccharomyces cerevisiae* showed that the fluorophores are functional, but occurrence of FRET was not observed, being necessary the optimization of the *in vivo* assay.

1. Introdução

1.1. Etanol Lignocelulósico

A utilização de combustíveis fósseis traz inúmeros problemas, que estão relacionados à sua depleção e ao impacto ambiental, particularmente em relação ao aquecimento global (Goldemberg, 2007). Dessa forma, é necessário buscar alternativas aos combustíveis fósseis como fonte de energia, que sejam renováveis e que levem a um desenvolvimento sustentável. Uma opção é a utilização do etanol, que foi estabelecida no Brasil por meio do Proálcool (Programa Nacional do Álcool) lançado em 1975. Com esta iniciativa do governo, o país foi capaz de desenvolver uma promissora plataforma para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, gerando uma fonte de energia renovável e menos poluente que os combustíveis fósseis, sendo que hoje, a produção deste biocombustível é a que envolve menos custos (EPA, 2010).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de etanol a partir da cana-de-açúcar. Contudo, a partir dos anos 2000, houve um aumento notável na demanda pelo combustível. O aumento do preço do petróleo, a preocupação em proteger o meio ambiente, estabelecida pelo Protocolo de Kyoto, e interesses em desenvolver fontes de energia alternativas fizeram do etanol o principal candidato (Zafeiriou *et al.*, 2014). Somado a isso, houve um grande crescimento no número de veículos *flex* no Brasil, sendo que no início de 2014, estes constituíam aproximadamente 62% da frota de veículos leves no país, segundo dados da ÚNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar), havendo assim, uma demanda crescente por este biocombustível. Dessa forma, é imperativo o desenvolvimento de novas tecnologias que visem à melhoria na produção de biocombustíveis, e o etanol de segunda geração surge como principal alternativa para suprir a crescente demanda.

O etanol de segunda geração, também chamado de etanol lignocelulósico, utiliza como matéria prima a biomassa vegetal de resíduos agrícolas e florestais (madeira), o que confere ao Brasil um grande potencial para a sua produção já que o país possui a maior reserva de biomassa do planeta. Além disso, a cana-de-açúcar é a matéria-prima de maior produção em todo o mundo, sendo o Brasil seu o maior produtor (Cortez *et al.*, 2008).

Segundo dados da UNICA, a produção brasileira de cana-de-açúcar na safra de 2013/2014 foi de 653 milhões de toneladas, sendo que aproximadamente um terço é bagaço, que é queimado para a cogeração de energia elétrica (Cortez *et al.*, 2008). Na queima do bagaço de cana-de-açúcar, 35% da energia armazenada na planta podem ser convertidos em eletricidade; se fosse convertido em biocombustível, o aproveitamento seria de 50% (Pereira-Jr. *et al.*, 2008; Somerville, 2007).

Portanto, um aumento significativo na produção de etanol seria possível com o desenvolvimento de tecnologias que convertessem os polissacarídeos das folhas, da palha e do bagaço da cana-de-açúcar em combustível, o que representa dois terços da biomassa (Socol *et al.*, 2010). Dessa forma, haveria um aumento de produção sem aumentar a área plantada.

Além de utilizar resíduos e de reduzir custos de produção, uma vez que 70% destes resultam de matéria-prima (para o etanol de primeira geração) (Socol *et al.*, 2010), a produção de etanol lignocelulósico tem atraído considerável atenção devido ao seu potencial de mitigar o aquecimento global e aliviar a demanda por petróleo (Wang *et al.*, 2014). Ademais, a utilização da biomassa lignocelulósica derivada de resíduos agrícolas e florestais diminuiria a competição entre a produção de combustíveis e de alimentos.

1.2. Biomassa

Os resíduos que compõem a biomassa são constituídos de material lignocelulósico. A composição química deste varia entre as espécies, mas consiste aproximadamente de 25% de lignina e 75% de polímeros de carboidratos, ou seja, a celulose e a hemicelulose. A celulose é um polissacarídeo de alta massa molecular constituído de 4000 a 8000 moléculas de glicose conectadas por ligações β -1,4. Já a hemicelulose é um polissacarídeo de baixa massa molecular, apresentando menos de 200 resíduos variados, conectados por ligações β -1,3. As estruturas mais comuns são as xilanas, arabinoxilanas, glicomananas e galactoglicomananas (Aristidou e Pentillä, 2000).

Assim, o componente mais abundante da biomassa é a glicose. Em relação à hemicelulose, a xilose, uma pentose, é o açúcar mais abundante, constituindo uma fração de 5 a 20%, dependendo da matéria-prima. Dessa forma, a xilose é o segundo açúcar mais abundante da biomassa (Aristidou e Pentillä, 2000), sendo que sua fermentação juntamente com a glicose tornaria a produção de etanol mais rentável.

1.3. Utilização da xilose no processo fermentativo

Nos processos fermentativos, o micro-organismo mais utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura já é tradicionalmente utilizada em fermentação alcoólica de larga escala. Portanto, está bem adaptada ao contexto industrial, produzindo altos rendimentos de etanol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Além disso, é muito mais resistente ao ambiente tóxico dos hidrolisados lignocelulósicos que bactérias modificadas geneticamente (Kuyper *et al.*, 2005a), já que tolera altas concentrações de etanol no meio e inibidores presentes na biomassa hidrolisada (Saloheimo *et al.*, 2007). Ainda, tolera o baixo pH do processo fermentativo, que previne contaminação por bactérias (Wang *et al.*, 2013). Também, já foram desenvolvidas ferramentas moleculares para sua manipulação genética e possui um processo industrial já estabelecido (Young *et al.*, 2014), além de apresentar *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*).

Embora apresente várias vantagens, o maior inconveniente de utilizar a levedura *S. cerevisiae* para a fermentação de material lignocelulósico é a sua incapacidade de metabolizar e fermentar a xilose em etanol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Para contornar essa deficiência, vários trabalhos vêm sendo realizados, introduzindo-se a via metabólica de degradação da xilose no metabolismo da *S. cerevisiae*.

Os micro-organismos em geral metabolizam a xilose à xilulose por meio de duas vias distintas. A via de uma reação catalisada pela enzima xilose isomerase (XI) é típica de bactérias, enquanto que a via com dois passos envolvendo a xilose redutase (XR) e a xilitol desidrogenase (XDH) normalmente é encontrada em leveduras. Após a formação da xilulose, esta é

fosforilada e assim pode ser catabolizada por meio da via das pentoses-fosfato e pela via Embden-Meyerhof-Parnas, para a sua conversão a etanol (Aristidou e Penttillä, 2000). Dessa forma, a introdução da via de degradação de xilose no metabolismo da *S. cerevisiae*, seja ela de origem fúngica ou bacteriana, foi realizada integrando os respectivos genes ao genoma da levedura (Brat *et al.*, 2009; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Jeffries e Jin, 2004; Kuyper *et al.*, 2005a; Lönn *et al.*, 2003; Madhavan *et al.*, 2008).

Contudo, uma conversão eficiente de xilose em etanol é limitada por vários fatores, incluindo desequilíbrio do estado *redox* da célula quando são utilizadas as enzimas XR e XDH, insuficiente fluxo de xilose através da via das pentoses-fosfato quando comparado com outras leveduras e a falta de transportadores específicos de xilose (Matsushika *et al.*, 2009). Uma vez que a *S. cerevisiae* não expressa transportadores específicos para a xilose, o influxo desta é feito por meio de transportadores de hexose, que possuem baixa afinidade por esta pentose (Runquist *et al.*, 2009). Dessa forma, o transporte de xilose para o meio intracelular ocorre em taxas consideravelmente mais baixas do que para o transporte de glicose, o que limita a sua utilização (Hector *et al.*, 2008). Além disso, análises realizadas em linhagens adaptadas para um melhor crescimento em xilose indicaram aumento no nível de expressão de transportadores de hexose, verificado por microarranjo de DNA (Wahlbom *et al.*, 2003), além de uma cinética alterada do transporte de xilose (Kuyper *et al.*, 2005b). Assim, a translocação deste açúcar para o meio intracelular é um dos passos limitantes para a utilização da xilose (Hector *et al.*, 2008).

Apesar disto, trabalhos que realizaram uma superexpressão de transportadores de hexoses da família HXT (*Hexose Transporters*) em *S. cerevisiae* recombinante mostraram uma melhora no aproveitamento da xilose (Saloheimo *et al.*, 2007; Sedlak e Ho, 2004). No entanto, este açúcar só é utilizado após o consumo de glicose (Hector *et al.*, 2008). Outros trabalhos realizaram expressão heteróloga de transportadores específicos para a xilose. Em um deles, a expressão de transportadores de xilose de *Arabidopsis thaliana* em *S. cerevisiae* expressando os genes *XYL1* (xilose redutase de *Pichia stipitis*), *XYL2* (xilitol desidrogenase de *P. stipitis*) e *XKS1* (xiluloquinase endógena de *S. cerevisiae*), aumentou o acúmulo de xilose intracelular em

46%, levou a um aumento de 50% do consumo de xilose antes da depleção da glicose e aumentou em 30% a produtividade de etanol (Hector *et al.*, 2008). Outro estudo empregou o gene *GXF1* (facilitador de glicose/xilose) de *Candida intermedia* em uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de fermentar xilose, sendo demonstrado que a afinidade por este açúcar foi três vezes maior do que expressando os transportadores nativos. A linhagem com o transportador *GXF1* foi capaz de internalizar xilose duas vezes mais que a linhagem controle, obteve crescimento celular quase duas vezes maior e foi capaz de consumir xilose em baixas concentrações no meio durante toda a fermentação. Além disso, a produção de etanol ocorreu de forma mais rápida (Runquist *et al.*, 2009).

Assim, o transporte de xilose para dentro da célula ainda é uma das maiores limitações para atingir um rendimento máximo de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos, sendo que o transporte ideal para uma maior fermentação da xilose seria específico para este açúcar e não inibido por outros carboidratos presentes em hidrolisados. Além disso, é necessário determinar se um aumento do influxo de xilose pode ser empregado como estratégia para aumentar a fermentação de xilose a partir de hidrolisados lignocelulósicos (Hector *et al.*, 2008).

1.4. Estudo de transportadores

A fim de determinar se um aumento do influxo de xilose pode ser empregado para uma maior produtividade de etanol e otimizar o processo de transporte de xilose para o interior da célula, faz-se necessário estudos acerca dos transportadores de açúcares, nos quais avalia-se a afinidade desses transportadores. Para tanto, uma das técnicas utilizadas é medir por cintilografia o influxo de xilose marcada com ^{14}C (Runquist *et al.*, 2009; Saloheimo *et al.*, 2007). No entanto, essa técnica não permite uma avaliação em tempo real, além de demandar cuidados especiais de manipulação e exigir estrutura para se trabalhar com material radioativo (Kaper *et al.*, 2008). Outro método empregado para medir a quantidade de xilose intracelular é a utilização de HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) (Hector *et al.*, 2008; Sedlak e Ho, 2004). Porém, essa técnica é imprecisa, pois não é possível

avaliar a quantidade exata que foi transportada, uma vez que a xilose já pode ter sido metabolizada no momento da medição. Assim, nenhuma dessas metodologias mensura as mudanças de metabólitos em tempo real nem consideram variações de concentração em nível celular, sendo que seria vantajosa uma técnica não invasiva para o melhor entendimento do metabolismo (Fehr *et al.*, 2002).

Como alternativa a estas técnicas, muitos sensores fluorescentes já estão disponíveis, e permitem o monitoramento de íons, moléculas, atividade enzimática e mudanças conformacionais de canais com resolução espacial e temporal em células vivas. Estes sensores facilitam não somente a mensuração de concentrações estacionárias ou níveis de atividade, como também permitem a quantificação de fluxo e cinética *in vivo* (Palmer *et al.*, 2011). Um dos sensores fluorescentes empregados são os nanosensores FLIP (*Fluorescent Indicator Protein*), baseados em proteínas periplasmáticas de bactéria. Eles têm sido utilizados com sucesso para detectar moléculas pequenas, fornecendo um novo conjunto de ferramentas para o monitoramento em tempo real dos níveis de metabólitos em células vivas (Kaper *et al.*, 2008).

Assim, técnicas que utilizam a fluorescência surgem como metodologias não invasivas com a vantagem de resolução temporal e espacial, além da possibilidade de serem utilizadas *in vivo*.

1.4.1. O fenômeno da fluorescência

A fluorescência é uma das formas de luminescência, na qual um fluoróforo absorve luz (excitação) em determinado comprimento de onda e emite em um comprimento de onda maior, devido à perda de energia. A emissão de luz ocorre a partir de estados eletronicamente excitados. Em estados excitados denominados “singletos”, o elétron excitado está pareado (por *spin* oposto) ao segundo elétron no orbital de estado fundamental. Conseqüentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente pela emissão de um fóton, que é a fluorescência. Ocasionalmente, o estado excitado singleto pode ser convertido em um estado denominado “triplete”. Neste, o elétron no orbital excitado possui a mesma orientação de

spin que o elétron do estado fundamental. A transição para este é dificultada e a emissão de luz ocorre mais devagar, que é a fosforescência (Lakowicz, 2006). A Figura 1 mostra o diagrama de Jablonski, diferenciando as duas formas de luminescência.

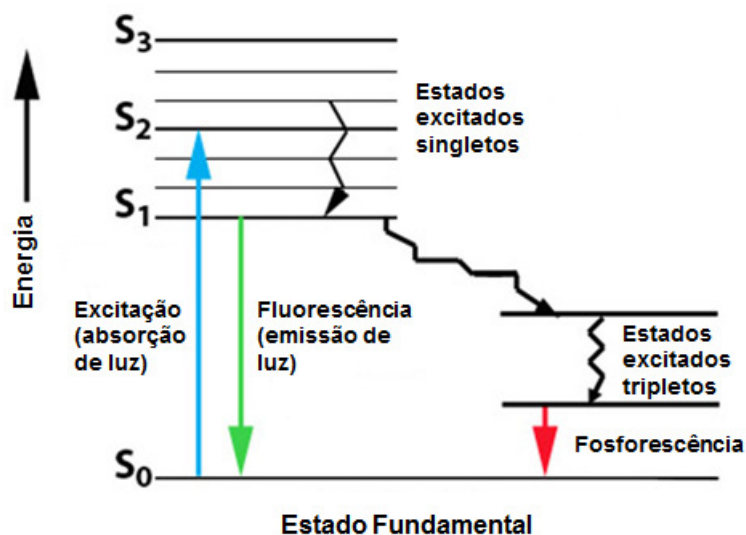


Figura 1: Diagrama de Jablonski. Fenômeno da fluorescência diferenciando-a da fosforescência. S_0 representa o estado fundamental, e S_1 , S_2 e S_3 , estados excitados. Modificado de Bharill (2010).

A fluorescência ocorre tipicamente em moléculas aromáticas. Uma importante característica da fluorescência é a alta sensibilidade de detecção, não havendo necessidade de lidar com as dificuldades inerentes aos marcadores radioativos. Devido a isso, houve um crescimento na utilização da fluorescência para a obtenção de imagens celulares e moleculares. Estas podem revelar a localização e concentração de moléculas intracelulares, ocasionalmente ao nível de detecção de uma única molécula devido à sua faixa específica de excitação e emissão (Lakowicz, 2006).

Um importante processo que ocorre no estado excitado é o FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Este processo ocorre sempre que o espectro de emissão de um fluoróforo, chamado de doador, sobrepõe-se ao espectro de absorção de outra molécula, chamada de aceptor (Lakowicz, 2006), como é mostrado na Figura 2.

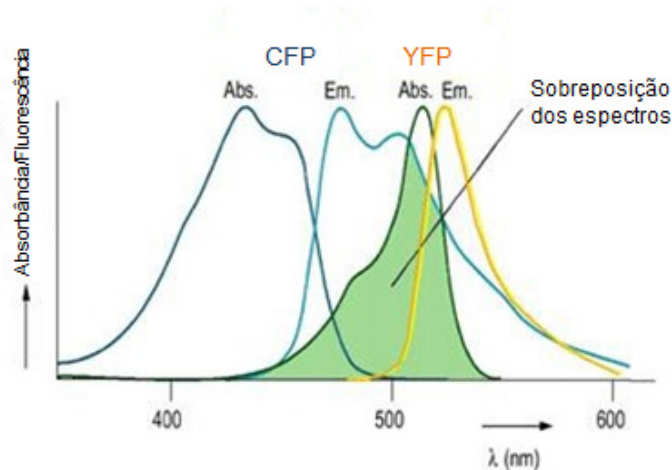


Figura 2: Sobreposição do espectro de emissão (Em.) do fluoróforo CFP com o espectro de absorção do fluoróforo YFP (Abs.). A área de sobreposição está mostrada em verde. Modificado de Ruzin (2014).

O FRET é um fenômeno eletrodinâmico que não envolve o surgimento de um fóton intermediário durante o processo, sendo resultado de uma interação dipolo-dipolo entre o doador e o acceptor (Lakowicz, 2006). Assim, após a excitação do fluoróforo doador, a energia é transferida ao acceptor e emitida por este, caso também seja um fluoróforo. A taxa de transferência de energia depende da extensão de sobreposição do espectro de emissão do doador e do espectro de absorção do acceptor, da orientação relativa dos dipolos de transição das moléculas doadora e acceptora e da distância entre estas (Lakowicz, 2006).

1.4.2. Nanosensores FLIP

Os nanosensores FLIP já mencionados foram baseados no fenômeno do FRET (Figura 2). Estes consistem de um domínio de ligação para determinada molécula acoplado a um par de proteínas fluorescentes variantes da GFP (*Green Fluorescent Protein*), que possuem propriedades que as fazem adequadas para o FRET (Kaper *et al.*, 2008). Normalmente, o domínio de ligação provém de uma PBP (*Periplasmatic Binding Proteins*). As PBPs constituem uma diversa família de proteínas que fazem parte de complexos

transportadores de *Escherichia coli* e outras bactérias e são capazes de se ligar a uma variedade de substratos com alta afinidade (Fehr *et al.*, 2002).

A bactéria *E. coli* possui uma proteína periplasmática de ligação à xilose, a XBP (*Xylose Binding Protein*), codificada pelo gene *xyIF*. Esta proteína faz parte do sistema de translocação de xilose para o citoplasma, sendo responsável pelo seu reconhecimento, possuindo alta afinidade por seu ligante (Sooriyaarachchi *et al.*, 2010).

Uma característica importante das PBPs para a construção de nanosensores é a sua capacidade de sofrer uma mudança conformacional devido à ligação de seu substrato (Fehr *et al.*, 2002). Com o nanosensor construído, essa mudança conformacional resultante da ligação do substrato aproxima ou afasta os dois domínios fluorescentes, resultando no fenômeno do FRET ou em alteração deste. Esta alteração permite o monitoramento do ligante em microscópio de fluorescência ou em fluorímetro. Devido à mudança conformacional, que resulta em variações no FRET, é possível determinar o nível dos metabólitos em tempo real (Kaper *et al.*, 2008).

Como visto na Figura 3, a excitação de um fluoróforo componente de um nanosensor na ausência de seu ligante resulta principalmente na emissão de um comprimento de onda de 475 nm, correspondente à emissão do primeiro domínio fluorescente. Com a ligação de seu substrato, que neste exemplo são íons de zinco, a proteína sofre uma mudança conformacional que leva à aproximação dos domínios fluorescentes, e em consequência, à alteração do FRET. Dessa forma, há a emissão de um comprimento de onda de 535 nm, proveniente do segundo fluoróforo. Assim, há um aumento relativo das emissões do segundo comprimento de onda (535 nm) em relação ao primeiro comprimento de onda (475 nm), devido à alteração do FRET.

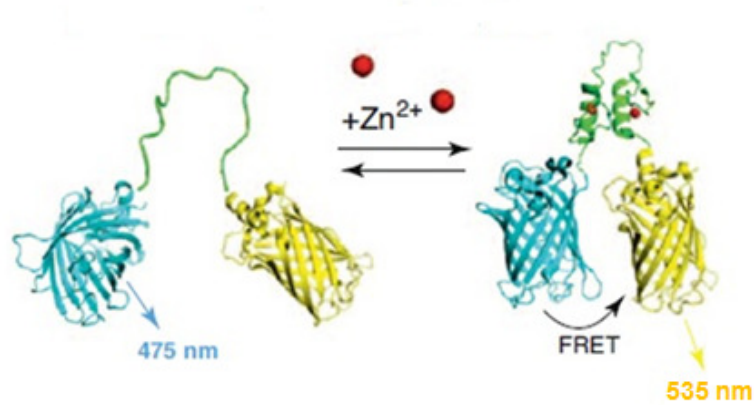


Figura 3: Exemplo de um nanosensor FLIP com propriedades de FRET. Sua ativação ocorre por mudança conformacional devido à ligação do seu substrato. Modificado de Palmer *et al.* (2011).

Um par de proteínas fluorescentes bastante comum e disponível para a construção de nanossensores é o par eCFP (*enhanced Cyan Fluorescent Protein*)/Vênus (eYFP - *enhanced Yellow Fluorescent Protein*). Essas proteínas são variantes da GFP isolada da água-viva *Aequorea victoria*. Tanto a eCFP (Heim e Tsien, 1996) quanto a eYFP (Wachter *et al.*, 1998) foram desenvolvidas por meio de mutações pontuais a partir da sequência da GFP. Ainda, a variante Vênus é uma versão melhorada da eYFP, cujas mutações proporcionaram um menor tempo de maturação da proteína e uma maior intensidade de fluorescência (Nagai *et al.*, 2002). Mutantes da GFP com espectros de emissão e excitação alterados são importantes por fornecer diferentes indicadores para monitorar múltiplos eventos celulares simultaneamente e para prover doadores e aceptores para pares com propriedades de FRET (Heim e Tsien, 1996).

Além disso, como a eficiência do FRET também depende da distância entre as moléculas doadora e aceptora, é possível realizar modificações no domínio de ligação ao substrato de modo a alterar seu tamanho. Deuschle *et al.* (2005) testaram diferentes modificações no domínio de ligação entre os fluoróforos de nanossensores para glicose e glutamato que já haviam sido descritos na literatura, com o objetivo de verificar se há uma melhora na eficiência do FRET. Dentre as modificações, foram realizadas inserções e deleções de resíduos de aminoácidos. Foi observado que uma

deleção de 31 resíduos de aminoácidos aumentou em três vezes a taxa de transferência de energia entre os fluoróforos em relação ao sensor original.

As PBPs já foram empregadas com sucesso para a construção de nanosensores FLIP, sendo estes utilizados na detecção e quantificação de vários metabólitos. Dentre os açúcares, já foram desenvolvidos sensores para a sacarose (Lager *et al.*, 2006), arabinose (Kaper *et al.*, 2008), maltose (Fehr *et al.*, 2002), ribose (Lager *et al.*, 2003) e glicose (Fehr *et al.*, 2003). Também já foram construídos nanosensores para aminoácidos como glutamato (Dulla *et al.*, 2008), triptofano (Kaper *et al.*, 2007) e leucina (Mohsin *et al.*, 2013). Ainda, foram concebidos nanosensores para diversos íons, como Cl^- (Zhong *et al.*, 2014), Ca^{2+} (Cornea *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Miyawaki *et al.*, 1997), Cu^+ (Liang *et al.*, 2014), Mg^{2+} (Lindenburg *et al.*, 2013), entre outros. Nanosensores para outros metabólitos como cAMP (Börner *et al.*, 2011) e citrato (Ewald *et al.*, 2011) também já foram descritos.

Por meio dos nanosensores FLIP, também é possível analisar o estado *redox* da célula (Oku *et al.*, 2013; Yano *et al.*, 2010), verificar atividade enzimática (Aoki e Matsuda, 2009; Stawarski *et al.*, 2014), analisar estruturas celulares (Intyre *et al.*, 2007), além de determinar a eficácia de drogas contra câncer (Bozza *et al.*, 2014) e AIDS (Cella *et al.*, 2014). Sendo assim, são inúmeras as aplicações para os nanosensores, que trazem a vantagem de realizar estudos *in vivo* não invasivos e em tempo real.

Dessa forma, os nanosensores podem ser aplicados em estudos de transportadores de xilose, sendo estes importantes para a escolha de transportadores, nativos ou heterólogos, que realizem uma translocação eficiente do açúcar em leveduras capazes de fermentar xilose a etanol, sendo que tal ferramenta ainda não foi explorada nem descrita na literatura.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Construir e caracterizar nanosensor de xilose para seu posterior uso na avaliação do grau de afinidade de transportadores no influxo de xilose em *S. cerevisiae*.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Analisar *in silico* o FLIP sintético;
- 2) Construir nanosensor truncado por meio de PCR;
- 3) Expressar genes dos nanosensores em *E. coli*;
- 4) Purificar os nanosensores;
- 5) Determinar K_d e parâmetros termodinâmicos da interação da xilose com o nanosensor intacto;
- 6) Validar o nanosensor *in vivo* (*S. cerevisiae*).

3. Estratégia

A estratégia geral para a execução do trabalho está esquematizada na Figura 4.

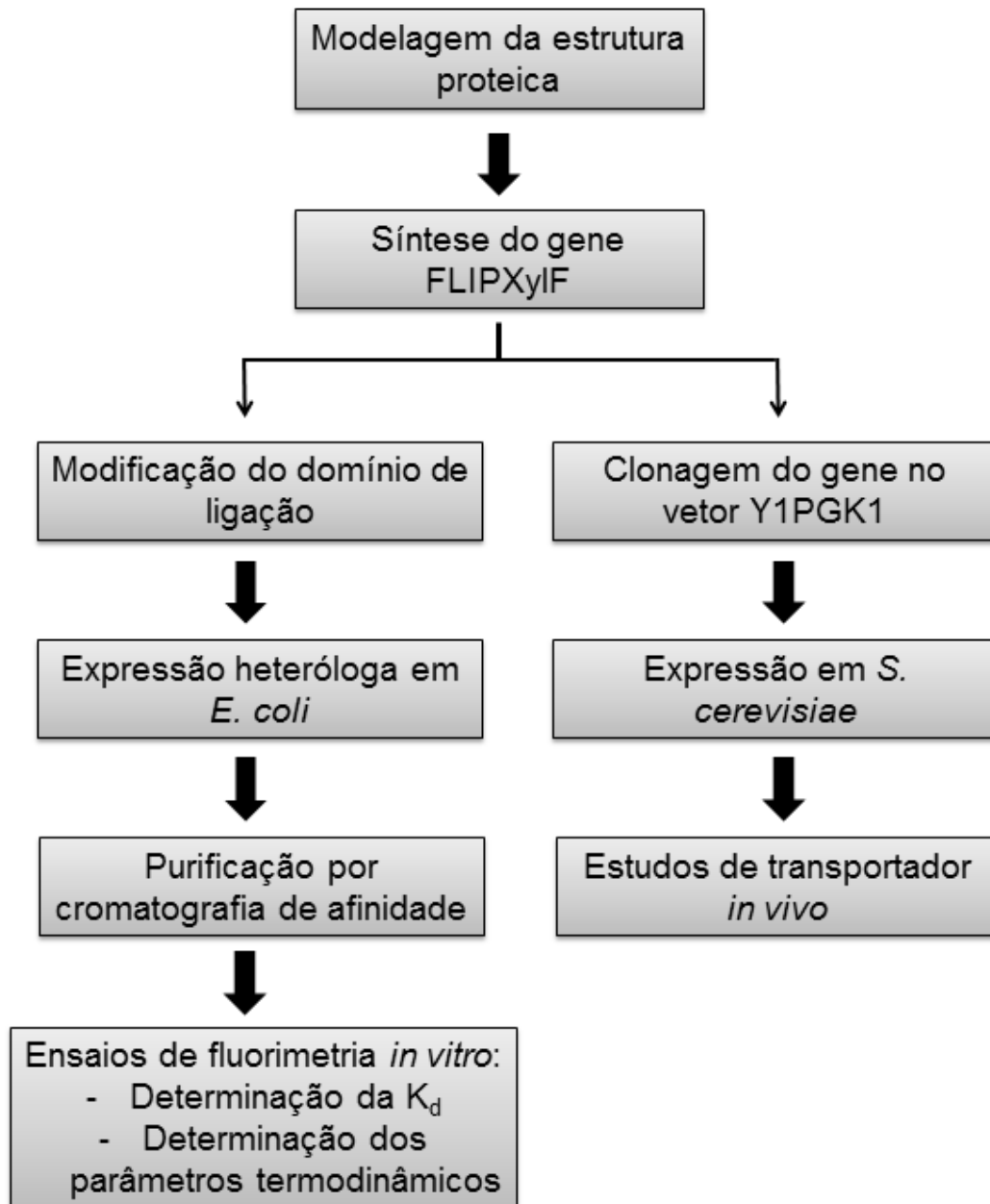


Figura 4: Esquema da estratégia geral para a execução deste trabalho.

4. Material

4.1. Micro-organismos

As Tabelas 1 e 2 descrevem o genótipo de todas as linhagens de bactéria e levedura utilizadas neste trabalho.

Tabela 1: Linhagens de *E. coli* e seus respectivos genótipos.

Linhagem	Genótipo	Referência
DH5α	$F^- \phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169$ $recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) phoA$ $supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^-$	Invitrogen™
XL10-Gold	$Tet^r \Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-$ $mr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1$ $gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lac^{\rho}$ $Z\Delta M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]$	Stratagene
BL21(DE3) pLysE	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pLysE (Cm ^R)	Novagen (2003)
C43 (DE3)	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)	Lucigen®
Origami (DE3)	$\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvull$ $phoR araD139 ahpC galE galk rpsL$ $F'[lac^+(lac^{\rho})pro] gor522 ::Tn10 (Tc^R)$ $trxB::kan$ (DE3)	Novagen (2003)
Rosetta (DE3)	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1$ (DE3) pRARE* (Cm ^R)	Novagen (2003)
Tuner (DE3)	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm lacY$ (DE3)	Novagen (2003)

* Codifica os genes de tRNA *argU*, *araW*, *ileX*, *glyT*, *leuW*, *proL*, *metT*, *thrT*, *tyrU* and *thrU*. Os códons raros AGG, AGA, AUA, CUA, CCC e GGA são suplementados.

Tabela 2: Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas e seus respectivos genótipos.

Linhagem	Genótipo	Referência
EBY.VW4000	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ hxt13Δ: :loxP hxt15Δ: :loxP hxt16Δ: :loxP hxt14Δ: :loxP hxt12Δ: :loxP hxt9Δ: :loxP hxt11Δ: :loxP hxt10Δ: :loxP hxt8Δ: :loxP hxt514Δ: :loxP hxt2Δ: :loxP hxt367Δ: :loxP gal2Δ stl1Δ: :loxP agt1Δ: :loxP ydl247wΔ: :loxP yjr160cΔ: :loxP</i>	Wieczorke et al. (1999)
RE1006	<i>MATα can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52</i>	R. Strich

4.2. Meios de Cultura

Para o cultivo de *E. coli* foram utilizados os seguintes meios, os quais foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 min:

Meio LB (*Luria-Bertani*):

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

O pH foi ajustado para 7,2.

Para o meio sólido, foi adicionado ágar 1,5% (p/v).

Meio SOB (*Super Optimal Broth*):

Triptona	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	10,0 mM

KCl 2,5 mM

O pH foi ajustado para 7,2.

Meio SOC (*Super Optimal Broth* com repressão catabólica):

SOB 100 mL

Glicose 20 mM

MgCl₂ 5 mM

MgSO₄ 5 mM

As soluções de glicose, MgCl₂ e MgSO₄ foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,2 µm.

Para o cultivo de *S. cerevisiae* foram utilizados os seguintes meios:

Meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*)

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Glicose/Maltose 2% (p/v)

A glicose e a maltose foram esterilizadas separadamente.

Quando necessário, foi adicionado adenina na concentração de 0,008%.

Para o meio sólido, foi adicionado ágar 1,5% (p/v).

Meio Mínimo com dextrose

YNB com sulfato de amônio 0,67% (p/v)

Glicose/Maltose 2,00% (p/v)

Quando necessário, foram suplementados os aminoácidos triptofano (0,002%), histidina (0,002%), leucina (0,003%), além de uracila (0,002%) e adenina (0,008%).

As dextroses foram esterilizadas em autoclave separadamente. Os demais componentes do meio foram esterilizados por meio de filtração em membrana de 0,2 μm .

4.3. Tampões e Soluções

4.3.1. Soluções para bactéria competente

- **Tampão de Transformação I**

RbCl	1,20% (p/v)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,99% (p/v)
Acetato de Potássio	0,03 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15% (p/v)
Glicerol	15,00% (p/v)

- **Tampão de Transformação II**

MOPS	0,02 M
RbCl	1,20% (p/v)
CaCl ₂ ·H ₂ O	1,10% (p/v)
Glicerol	15,00% (p/v)

4.3.2. Antibióticos

- Ampicilina (1000X) - 100 mg/mL
Dissolvida em H₂O MilliQ.
- Cloranfenicol (~ 500X) - 20 mg/mL
Dissolvido em etanol absoluto.
- Canamicina (1000X) – 50 mg/mL
Dissolvida em H₂O MilliQ.

- Tetraciclina (4000X para Origami (DE3) e ~1600X para XL10-Gold) - 50 mg/mL. Dissolvida em etanol absoluto.

Todos os antibióticos foram esterilizados por filtração em membrana de 0,2 µm.

4.3.3. Extração de DNA plasmidial

- **Solução I**

Tris-HCl (pH 8,0) 1,0 mM

EDTA 0,1 mM

- **Solução II**

NaOH 0,2 M

SDS 1,0% (p/v)

- **Solução III**

Acetato de sódio 3 M

Ácido acético 2 M

O pH foi ajustado para 5,0.

4.3.4. Análise de DNA em gel de agarose

- **Brometo de Etídio**

Brometo de Etídio 10 mg/mL

- **Tampão Tris-Acetato EDTA (TAE) 50X**

Tris-Acetato 2000 mM

EDTA pH 8,0 50 mM

- **Tampão de Amostra**

TAE 20X 50,00% (v/v)

Glicerol 30,00% (v/v)

Azul de Bromofenol 0,25% (p/v)

- **Marcadores de Massa Molecular**

- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).
- 1 kb DNA Ladder (Promega).

4.3.5. Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Gel Separador 12 %

Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) 2,5 mL

Tris-HCl 3 M pH 8,8 0,94 mL

SDS 10% (p/v) 0,075 mL

APS 10% (p/v) 0,05625 mL

TEMED 0,008 mL

Água MilliQ 3,63 mL

Esta receita é para um gel do sistema *Mini-PROTEAN* (Bio-Rad).

Gel Concentrador 4%

Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) 0,625 mL

Tris-HCl 1,5 M pH 6,8 1,250 mL

SDS 10% (p/v) 0,005 mL

4. MATERIAL

APS 10% (p/v)	0,0375 mL
TEMED	0,004 mL
Água MilliQ	27,500 mL

Esta receita é para um gel do sistema *Mini-PROTEAN* (Bio-Rad).

- **Tampão de Amostra desnaturante 4X**

Tris-HCl 1M pH 6,8	400 mM
SDS (v/v)	8,0 %
β -Mercaptoetanol (v/v)	8,0 %
Glicerol (v/v)	40,0 %
Azul de Bromofenol (p/v)	0,2 %

- **Tampão de Corrida – Tris-Glicina 5X**

Trizma base	125 mM
Glicina	960 mM
SDS (p/v)	0,5 %

- **Marcador de Massa Molecular para proteínas**

Foi utilizado o marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific). Este foi fervido a 100°C por cinco minutos antes de ser aplicado no poço.

- **Revelação de proteínas com *Comassie coloidal***

Comassie Blue G-250	0,1 % (p/v)
H ₃ PO ₄	2,0 % (v/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,0 % (p/v)

4.3.6. Indução e Lise Celular

- IPTG 2000X – 1 M
- Tampão PBS 1X:

NaCl	136,90 mM
Na ₂ HPO ₄	8,09 mM
NaH ₂ PO ₄	1,76 mM
KCl	2,69 mM
- Lisozima 1000X – 200 mg/ml
- Inibidores de Protease (Roche)

4.3.7. Purificação de proteína**4.3.7.1. Purificação em condições desnaturantes**

- **Tampão de lise**

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
NaCl	30 mM

- **Tampão desnaturante 1**

Tris-HCl pH 8,0	0,02 M
NaCl	0,50 M
Ureia	8,00 M

- **Tampão desnaturante 2**

Tris-HCl pH 8,0	0,02 M
Ureia	8,00 M

- **Tampão de Eluição**

Tris-HCl pH 8,0	0,02 M
Ureia	8,00 M
Imidazol	0,50 M

- **Tampão de Diálise 1**

Tris-HCl pH 8,0 0,02 M

Ureia 6 M; 4 M; 2 M

- **Tampão de Diálise 2**

Tris-HCl pH 8,0 0,02 M

4.3.7.2. Purificação em condições nativas

A) Purificação em bancada

- **Tampão de ligação – Tampão Fosfato de Sódio 20 mM (1000 mL)**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,78 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,38 g

NaCl 0,5 M 29,22 g

Imidazol 30 mM 2,00 g

O pH foi ajustado para 7,4 adicionando-se HCl.

- **Tampão de eluição – Tampão Fosfato de Sódio 20 mM (1000 mL)**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,78 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,38 g

NaCl 0,5 M 29,22 g

Imidazol 100-1000 mM

O pH foi ajustado para 7,4 adicionando-se HCl.

B) Purificação no sistema *ÄKTA pure*

- Tampão Fosfato de Sódio 20 mM com 0,5 M de NaCl.
- Tampão Fosfato de Sódio 20 mM com 0,5 M de NaCl e 0,5 M de imidazol.

Ambas as soluções tiveram seu pH ajustado para 7,4 com HCl e foram filtradas em membrana de 0,2 μm .

4.3.8. Ensaios de Fluorimetria

- Tampão Tris-HCl 0,5 M (50 mL)

Tris-base	3,03 g
-----------	--------

O pH foi ajustado para 7,0 adicionando-se HCl.

- Xilose 1 M
- Arabinose 1 M
- Glicose 1 M
- Xilulose 1 M
- Xilitol 1 M

Todas as soluções foram filtradas em membrana de 0,2 µm.

4.3.9. Transformação de leveduras

- **Mix para transformação de alta eficiência**

PEG 4000 (50% (p/v))	420 µL
----------------------	--------

Acetato de Lítio 2 M	36 µL
----------------------	-------

DNA carreador (2 mg/mL)	50 µL
-------------------------	-------

- **Tampão de transformação rápida**

PEG 4000 (50% (p/v))	80 µL
----------------------	-------

Acetato de Lítio 2 M	10 µL
----------------------	-------

DTT 1 M	10 µL
---------	-------

4.4. Enzimas

Foram utilizadas as enzimas de restrição BamHI, Sall, XhoI, NdeI, SmaI, NotI, BglII, EcoRV e PvuI (*New England Biolabs*). Para a polimerização de produtos de PCR foram utilizadas as enzimas *Phusion e Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific). Para a ligação de fragmentos de DNA foi utilizada a T4 DNA Ligase (USB). A SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase – Fermentas*) foi utilizada para a defosforilação de extremidades 5'. Todas as enzimas foram utilizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5. Vetores

Para a subclonagem de produtos de PCR, foi utilizado o vetor pPCV-B (Janner *et al.*, 2013). Para a expressão heteróloga em *E. coli*, utilizou-se o vetor pET21a+. Os vetores YEp352 (Moraes *et al.*, 1995) e Y1PGK1 (Reis, 2012) foram empregados para a expressão do transportador *HXT7* e do nanosensor, respectivamente, em *S. cerevisiae*.

4.6. Primers

Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 3, com os sítios de restrição sublinhados.

Tabela 3: *Primers* utilizados neste trabalho.

<i>Primer</i>	Sequência*	Sítio de restrição
FLIPXD-F	<u>AGGATCCCGCTGGCAAAA</u> AGATCGAGATA	BamHI
FLIPXD-R	<u>GTCGAC</u> GTGGAATCCGTCTTT	Sall
Y2T7-F	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATT CGAGCTCGGT <u>ACCCGGG</u> CTTCTC	SmaI
Y2T7-R	GCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGA CTCTAGAGGAT <u>CCCCGGG</u> TG	SmaI
ScFLIP-F	ACAAGAT <u>CTACA</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	BglII
ScFLIP-R	<u>TGCGGCCG</u> CTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	NotI

*Os sítios de restrição estão sublinhados

4.7. Kits

Os kits utilizados neste trabalho foram os seguintes:

- *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega): purificação de reações de PCR e de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose.
- *Pure Yield Plasmid Miniprep System* (Promega): purificação de plasmídeos em pequena escala.
- *Qiagen Plasmid Maxi kit* (Qiagen): purificação de plasmídeos em larga escala.

5. Métodos

5.1. Análise *in silico* do nanosensor sintético

A sequência do nanosensor FLIPXylF foi fundamentada na sequência descrita por Deuschle *et al.* (2005), cujo estudo desenvolveu um nanosensor (FLIP glu-600 $\mu\Delta$ 13) para glicose. Para o trabalho aqui apresentado, o domínio de ligação à galactose/glicose foi substituído pela XBP codificada pelo gene *xyIF* de *E. coli* (NCBI nº AAB18543). A fim de verificar se o domínio de ligação à xilose poderia interferir na estrutura da proteína fusionada e assim impossibilitar a ocorrência do FRET, a estrutura tridimensional foi analisada a partir de um modelo estrutural da proteína XBP, obtido por modelagem molecular por meio da ferramenta Geno3D (Combet *et al.*, 2002).

Esta análise envolveu o alinhamento da sequência proteica do domínio de ligação à xilose (NCBI nº 466704) com a sequência do domínio de ligação à galactose/glicose ligado à glicose, (PDP: 2HPH). Anterior à obtenção do modelo tridimensional, uma análise da predição da estrutura secundária da molécula foi realizada por meio da ferramenta NPS@ (*Network Protein Sequence Analysis*), disponível *online* (Combet *et al.*, 2000). Assim, a partir dos resultados obtidos por meio da análise da estrutura secundária, a ferramenta Geno3D foi utilizada para a predição da estrutura tridimensional da proteína XBP.

5.2. Preparo de células bacterianas competentes para choque térmico

As linhagens DH5 α e XL10-Gold foram utilizadas para os procedimentos de clonagem. As células foram retiradas de um estoque a -80 °C e semeadas em placas de meio LB com o antibiótico adequado, seguindo-se incubação a 37 °C por um período de 16 a 18 h. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SOB sem antibiótico e submetida à agitação de 200 rpm a 37 °C por 16 horas. Dois mL deste pré-inóculo foram inoculados em 100 mL de meio SOB e incubados a 37 °C sob agitação de 200 rpm por aproximadamente uma hora até atingir OD₆₀₀ de 0,3. Após o crescimento, a cultura foi resfriada em gelo por 15 min e as células foram coletadas por centrifugação a 3000 x g

por cinco minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em 32 mL de tampão de transformação I e incubadas no gelo por 15 min. A cultura foi novamente coletada sob as mesmas condições e ressuspensa em 4 mL de tampão de transformação II. Foram feitas alíquotas de 100 µL, as quais foram armazenadas em freezer a -80 °C.

5.3. Preparo de células bacterianas competentes por CaCl₂

As linhagens BL21 (DE3) pLysE, Rosetta (DE3) e demais linhagens de expressão testadas foram utilizadas para a produção de proteínas recombinantes. As células foram retiradas de um estoque a -80 °C e semeadas em placas de meio LB com o antibiótico adequado, sendo então incubadas a 37 °C por um período de 16 a 18 h. Após o crescimento, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB com antibiótico, seguindo-se incubação sob agitação (250 rpm) a 37 °C durante a noite. No dia seguinte, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio LB sem antibiótico, seguindo-se crescimento a 37 °C sob agitação até atingir a OD₆₀₀ de aproximadamente 0,3. Após a incubação, as células foram mantidas em gelo por 15 min, seguindo-se centrifugação a 5000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 mL de CaCl₂ 100 mM e incubadas em gelo por 15 min. A suspensão foi então centrifugada sob as mesmas condições e o sedimento ressuspensa em 1 mL de CaCl₂ contendo 15% de glicerol. A amostra foi dividida em alíquotas de 100 µL, sendo estas estocadas em freezer a -80 °C.

5.4. Transformação de bactéria por choque térmico

Para cada transformação, foi utilizada uma alíquota de células competentes armazenada em freezer a -80 °C. As células foram descongeladas em gelo por cinco minutos, sendo então adicionado o DNA (10 µL no caso de sistemas de ligação e aproximadamente 50 ng para vetores intactos). A suspensão foi incubada em gelo por 30 min e em seguida foi realizado o choque térmico a 37 °C por cinco minutos. Foram adicionados 900 µL de meio LB às células, as quais foram incubadas a 37 °C por uma hora.

Após a incubação, as células foram semeadas em meio LB ágar com o antibiótico adequado. Quando necessário, foi adicionado X-gal (0,004 % p/v) e IPTG (250 μ M) ao meio para seleção azul e branco. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite para o crescimento de colônias.

5.5. Ligação de fragmentos de DNA

Os sistemas de ligação foram preparados em volume final de 10 μ L com uma razão molar entre vetor e inserto de 1:3 a 1:5.

5.6. Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)

Para a preparação de DNA plasmidial a partir de bactéria, foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001) com modificações. Uma colônia transformante foi inoculada em 5 mL de meio LB, com posterior incubação a 37 °C por 16 a 18 h sob agitação (200 a 250 rpm). Após o crescimento, a cultura foi centrifugada a 10000 x *g* por 2 minutos, sendo as células ressuspendidas em 200 μ L de solução I. A seguir, foram adicionados 360 μ L de solução II recém-preparada, sendo então a mistura homogeneizada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 300 μ L de solução III resfriada e novamente a mistura foi homogeneizada e incubada em gelo por 5 minutos. Após, a amostra foi centrifugada a 10000 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 750 μ L de isopropanol 100%. A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 10000 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 200 μ L de solução I. A seguir, foram adicionados 110 μ L de acetato de amônio 7,5 M. A mistura foi homogeneizada em vortex, seguindo-se centrifugação a 10000 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 750 μ L de etanol 100% resfriado. Seguiu-se uma centrifugação a 10000 x *g* por 5 minutos, a partir da qual o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 50 μ L de etanol 70%. A amostra foi novamente centrifugada a 10000 x *g* por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. Para a secagem do precipitado, foi utilizado concentrador a vácuo. Após, o

precipitado foi ressuspendido em 50 μ L de água MilliQ contendo RNase A (20 μ g/mL). O DNA foi armazenado a -20 °C.

5.7. Digestão de DNA com enzimas de restrição

Foram seguidas as instruções do fabricante em todas as digestões de DNA realizadas. Para estas, o volume de enzima foi ajustado em até 10% do volume total da reação. A quantidade de enzima também foi adequada à quantidade de DNA. O tempo de incubação foi de duas horas.

5.8. Precipitação de DNA

Para a retirada de sais e de enzimas após a digestão do DNA, este foi precipitado adicionando-se à reação acetato de sódio na concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol 100% resfriado. A mistura foi incubada a -20 °C durante a noite, sendo posteriormente centrifugada a 10000 x *g* por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Seguiu-se nova centrifugação sob as mesmas condições, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado seco a vácuo. Após a secagem, o DNA foi ressuspendido em 10 μ L de água MilliQ.

5.9. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para as reações de PCR foram utilizadas as polimerases *Phusion* e *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific), sendo empregadas as recomendações do fabricante. Para o anelamento dos *primers*, foi utilizada a *T_m* fornecida pelo fabricante destes. Em todas as reações, a quantidade de DNA molde utilizada foi inferior a 10 ng.

5.10. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

Para a análise dos fragmentos de DNA, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose de Sambrook e Russel (2001), com modificações. O gel foi preparado com agarose na concentração de 1% (p/v), a

qual foi dissolvida em tampão TAE 1X. O brometo de etídio foi adicionado na concentração de 0,5 µg/mL. O DNA foi diluído em tampão de amostra 6X e aplicado no gel. Este foi submetido a um campo elétrico (5 V/cm) para a migração e separação dos fragmentos de DNA. Estes foram visualizados expondo-se o gel à luz ultravioleta.

5.11. Purificação de fragmentos de DNA a partir do gel

Para a purificação de fragmentos de DNA, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. A banda de interesse foi cortada do gel e eluída, sendo purificada com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA), segundo instruções do fabricante.

5.12. Expressão heteróloga em *E. coli*

Após a transformação das linhagens de expressão com o DNA de interesse, elas foram submetidas à indução em diferentes condições. Primeiramente, algumas colônias transformantes foram escolhidas aleatoriamente e inoculadas em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico adequado. As células foram incubadas a 37 °C por um período de 16 a 18 h sob agitação. Após o crescimento, foi realizado um novo inóculo 1% em meio LB sem antibiótico, o qual foi incubado a 37 °C sob agitação até atingir OD₆₀₀ de aproximadamente 0,6. Neste momento, as células foram induzidas com IPTG. Foram testadas distintas concentrações do agente indutor, temperaturas e tempo de incubação. Para a purificação a partir de corpos de inclusão, foi estabelecida uma concentração de IPTG de 0,5 mM e incubação a 37 °C e 200 rpm durante 1 h. Foram coletadas alíquotas de 1 mL do tempo zero (antes da indução) e após 1 h de indução para análise em gel SDS-PAGE. As alíquotas foram centrifugadas a 10000 x g por 2 minutos e as células foram ressuspensas em 20 µL de tampão de amostra desnaturante 4X e armazenadas a -20 °C. Ao final da indução, o restante da cultura foi centrifugado (2500 x g por 15 min) e ressuspensado em tampão de lise.

Para a purificação das proteínas em condições nativas, foi estabelecida uma concentração de IPTG de 0,5 mM e incubação a 20 °C durante 6 h.

Foram coletadas alíquotas de 1 mL do tempo zero (antes da indução) e de cada hora para análise em gel SDS-PAGE. As alíquotas foram centrifugadas a 10000 x *g* por 2 minutos e as células foram ressuspensas em 20 µL de tampão de amostra desnaturante 4X e armazenadas a -20 °C. Ao final da indução, as células foram coletadas (2500 x *g* por 15 min) e ressuspensas em tampão PBS juntamente com lisozima (0,2 mg/mL) e inibidores de protease (Roche), para posterior lise celular.

5.13. Lise de células em homogeneizador de alta pressão

A lise das células foi realizada no homogeneizador de alta pressão EmulsiFlex-C3 (AVESTIN, Inc., Canadá). Foram realizadas três passagens a uma pressão de 15000 a 20000 psi. O lisado foi centrifugado a 22000 x *g* por 15 min. Para a purificação a partir de corpos de inclusão, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensado em tampão desnaturante 1, sendo armazenado a 4 °C. Para a purificação em condições nativas, o sobrenadante foi armazenado a 4 °C e os debrís celulares ressuspensos diretamente em tampão de amostra desnaturante e também armazenado a 4 °C para posterior análise em gel SDS-PAGE.

5.14. Análise de corpo de inclusão

A análise de corpo de inclusão foi realizada para avaliar se a proteína de interesse foi produzida na fração solúvel da célula ou se foi acumulada na fração insolúvel. Após a lise celular, o lisado foi centrifugado a 10000 x *g* durante 3 min. O precipitado foi separado do sobrenadante e foi ressuspensado em 400 µL de tampão Tris-HCl 40 mM pH 8,0 contendo 0,2% de N-lauril-sarcosil, um detergente aniônico. Metade da suspensão foi guardada e a outra metade foi submetida à agitação em oscilador por 24 h a 20 °C. Assim, por meio deste tratamento, é possível separar a fração solúvel da insolúvel, sendo cada uma visualizada em gel SDS-PAGE, como descrita a seguir.

5.15. Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise de proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, utilizando-se sistema da *Bio-Rad*. Antes da sua aplicação no gel, as amostras diluídas em tampão foram fervidas a 100 °C por 5 minutos para desnaturação das proteínas. A corrida foi conduzida em tampão de corrida 1X com voltagem entre 100 e 120 V. Após seu término, os géis foram corados com *Comassie coloidal*, sendo submetidos à agitação durante a noite. Para a visualização das bandas, os géis foram descorados com água destilada.

5.16. Purificação de proteínas

A purificação dos nanosensores foi realizada utilizando a técnica de cromatografia de afinidade. Para a purificação em condições desnaturantes, foi utilizada a resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow*. Esta foi lavada cinco vezes com água MilliQ para a retirada de etanol e equilibrada com o tampão desnaturante 1. A amostra proveniente da lise celular e ressuspensa em tampão desnaturante 1 foi centrifugada e o sobrenadante foi aplicado na resina. A suspensão foi agitada em oscilador durante 1 h em temperatura ambiente. Após a retirada do *flow through*, a resina foi lavada 7 vezes com o tampão desnaturante 2, sendo realizada mais uma lavagem com o tampão de eluição. Para o redobramento da proteína, foram realizadas diálises contra o tampão de diálise 1, sendo diminuída gradativamente a concentração de ureia no tampão, finalizando com uma diálise contra o tampão de diálise 2, sem ureia. A proteína purificada foi armazenada a 4 °C.

A purificação dos nanosensores em condições nativas foi realizada tanto manualmente em bancada quanto no sistema *ÄKTA pure* (GE Healthcare). Para a purificação em bancada, também foi utilizada a resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow*. Esta foi lavada cinco vezes com água MilliQ para a retirada de etanol e equilibrada com o tampão de ligação, lavando-a cinco vezes com 2 volumes em relação ao volume de resina. À amostra foi adicionado 1 volume de tampão de ligação e a mistura foi adicionada à resina, sendo então submetida à agitação em oscilador durante 1 h a 4 °C. Após, a mistura foi

centrifugada ($5600 \times g$ durante 5 min) e o sobrenadante (*flow through*) retirado, sendo guardado para posterior análise. A resina foi então lavada 4 vezes com 2 volumes de tampão de ligação, sendo guardada cada uma dessas lavagens. Posteriormente, a resina foi novamente lavada com 2 volumes de tampão de eluição, realizando-se um gradiente de imidazol. A primeira lavagem foi realizada com tampão contendo 100 mM de imidazol, a segunda com 300 mM, a terceira com 500 mM e a quarta com 1000 mM. A proteína purificada foi submetida à diálise e concentração em tubo Amicon com membrana de 3 kDa e armazenadas a 4 °C.

Os nanosensores também foram purificados utilizando-se a coluna *HisTrap FF crude* no sistema *ÄKTA pure* (GE Healthcare). A fase de eluição da proteína foi composta por tampão fosfato 20 mM pH 7,4 e um gradiente crescente de imidazol (de 0 a 500 mM), com fluxo contínuo de 2ml/min. As alíquotas coletadas foram submetidas à diálise e à concentração em unidades filtrantes “Centriprep” de 10 kDa (Merck-Millipore, Alemanha), sendo então armazenadas a 4 °C.

5.17. Dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular permite verificar a estrutura secundária de proteínas em solução por meio da sua absorbância diferencial entre duas ondas eletromagnéticas circularmente polarizadas. Assim, a estrutura proteica do nanosensor intacto purificado em condições desnaturantes foi verificada utilizando o espectropolarímetro JASCO-815 (Japão) acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier (JASCO ETC-273T – Japão). A abertura dos *slits* do equipamento foi de 1 nm, com velocidade de escaneamento de 50 nm/min e tempo de resposta de 4 s.

Os espectros dicroicos foram obtidos na faixa de comprimento de onda longe da região de ultravioleta (190 – 260 nm) a 25 °C. A amostra foi diluída em tampão Tris-HCl pH 7,0 2 mM na concentração de 0,145 mg/mL e analisada em cubeta de 1 mm.

5.18. Caracterização do nanosensor por fluorimetria

A fim de determinar a constante de dissociação (K_d) do nanosensor, a qual avalia o grau de afinidade da proteína por xilose, foram realizadas curvas de titulação em fluorímetro, verificando-se a alteração do FRET ao comparar a emissão da eCFP e da variante Vênus (eYFP).

Para os ensaios com xilose do nanosensor intacto, o equipamento utilizado foi o espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (Japão) acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier (JASCO ETC-273T - Japão). Os parâmetros do equipamento utilizados em todos os ensaios foram: velocidade de escaneamento de 1000 nm/min; abertura dos *slits* de excitação e emissão de 5 nm; tempo de resposta de 0,2 segundo com fotomultiplicador operando em sensibilidade média. O comprimento de onda utilizado para a excitação do nanosensor foi de 435 nm, pico de excitação máximo para a eCFP, sendo realizada uma varredura da emissão entre 445 e 600 nm. Os ensaios foram realizados em um volume de 500 μ L em cubeta de quartzo. Foi utilizado tampão Tris-HCl pH 7,0 na concentração de 2 mM e o nanosensor na concentração de 0,375 μ M. A concentração de xilose foi variada entre 0 e 10 μ M.

O mesmo ensaio foi realizado em triplicatas, nas temperaturas de 25 °C, 28 °C, 30 °C, 35 °C, 38 °C e 40 °C. A taxa de emissão foi calculada dividindo-se a intensidade de fluorescência do pico da eYFP pela intensidade de fluorescência do pico da eCFP. Assim, para cada temperatura, foi calculada a K_d por meio de regressão não-linear utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5. A Equação 1 (Moussa *et al.*, 2014) foi empregada para realizar a regressão.

$$R = (R_{\text{máx}} - R_{\text{apo}}) \cdot \frac{[S]}{(K_d + [S])} + R_{\text{apo}} \quad (\text{Equação 1})$$

onde [S] é a concentração do açúcar, R_{apo} é a taxa de emissão eYFP/eCFP na ausência do açúcar, e $R_{\text{máx}}$ é a maior taxa de emissão eYFP/eCFP na saturação.

Com o propósito de determinar os parâmetros termodinâmicos da interação entre a proteína e a xilose, os valores de K_d encontrados para cada

temperatura foram submetidos à aproximação de Van't Hoff (Equação 2). Esta aproximação relaciona o logaritmo natural de K_a (inverso de K_d) e o inverso da temperatura, sendo empregada para o cálculo de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS). Para a determinação da energia livre de Gibbs a 25 °C foi utilizada a Equação 3.

$$R \ln K_a = -\frac{\Delta H}{T} + \Delta S \quad (\text{Equação 2})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 3})$$

Além disso, outros açúcares foram testados para verificar a especificidade do nanosensor. Foram utilizados a glicose, a arabinose, a xilulose e o xilitol na mesma concentração que os ensaios realizados com xilose. Para estes testes, foi utilizado o espectrofotômetro de placa SpectraMax M3 (*Molecular Devices* – EUA), utilizando o mesmo tampão e a mesma concentração de proteína descritos anteriormente e excitação a 435 nm na temperatura de 30 °C, que é a temperatura de crescimento de *S. cerevisiae*. Foi coletado um espectro de emissão entre 445 e 600 nm. Ensaios com o nanosensor truncado com xilose também foram realizados neste equipamento, utilizando-se 0,375 μM de proteína, tampão Tris-HCl pH 7,0 na concentração de 2 mM a 25 °C, sendo coletado o mesmo espectro de emissão. O tratamento dos dados seguiu-se como anteriormente relatado, por meio da Equação 1.

5.19. Transformação de alta eficiência de leveduras

As células de *S. cerevisiae* foram transformadas de acordo com Gietz e Schiestl (2007). A linhagem a ser transformada foi inoculada em 5 mL de meio YPD e incubada a 30 °C/200 rpm durante 12 a 16 h. A titulação da cultura foi determinada em câmara de Neubauer e então as células foram inoculadas em meio 2YPD com adenina em uma concentração final de 5×10^6 células/mL. A cultura foi incubada a 30 °C/200 rpm até atingir uma concentração mínima de 2×10^7 células/mL. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a $3000 \times g$ durante 5 min a 20 °C e o sedimento foi ressuspensionado em 25 mL de

água estéril. Este procedimento foi repetido e em seguida as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em 1 mL de água estéril. Esta suspensão foi centrifugada por 30 s a 3000 x *g* e o sobrenadante foi descartado. As células foram novamente ressuspensas em 1 mL de água estéril e para cada transformação foram utilizadas alíquotas de 100 µL.

Para a transformação, as alíquotas foram centrifugadas a 13000 x *g* por 30 s e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 336 µL do *mix* de transformação e o DNA foi adicionado em um volume de 34 µL. A suspensão foi incubada a 42 °C durante 40 min para choque térmico e em seguida foi centrifugada nas mesmas condições citadas anteriormente. O sobrenadante foi retirado e as células foram semeadas em placa com meio seletivo e incubadas a 28 °C durante 3 a 4 dias para o crescimento de colônias.

5.20. Transformação rápida de leveduras

A transformação rápida de leveduras foi realizada conforme descrito em Chen *et al.* (1992). Uma colônia de levedura foi crescida em 5 mL de meio YPD durante 20 a 24 h. Após o crescimento, 200 µL da cultura em fase estacionária foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de transformação e 1 µg do DNA foi adicionado em um volume de 20 µL. A suspensão foi incubada a 45 °C durante 1h e em seguida as células foram semeadas em placa com meio seletivo, sendo incubadas a 28 °C durante 3 a 4 dias para o crescimento de colônias.

5.21. Ensaios *in vivo*

Para a realização de ensaios *in vivo*, as leveduras foram crescidas durante a noite a 28 °C em meio mínimo. Os testes foram realizados em microplaca no espectrofotômetro de placa SpectraMax M3 (*Molecular Devices* – EUA). Em cada poço a concentração de células foi igualada utilizando-se a OD₆₀₀ e utilizadas concentrações de xilose entre 0 e 600 mM, conforme o K_m (constante de Michaelis–Menten) do transportador *HXT7* para xilose. As células foram excitadas em 435 nm imediatamente após a adição de xilose,

5. MÉTODOS

sendo coletado um espectro de emissão entre 445 e 600 nm. Uma nova leitura foi realizada 15 min após a adição do açúcar.

Foi realizada também uma análise em microscópio confocal Leica TCS SP5. A cultura foi crescida durante a noite a 28 °C em meio mínimo. Para a visualização das células, 100 µL de cultura foram transferidos para uma lâmina sendo a xilose adicionada em uma concentração de 100 mM. Foi utilizado um filtro de excitação de 436/20 e dois filtros de emissões, 480/40 para a eCFP e 535/30 para a eYFP.

6. Resultados

6.1. Análise estrutural da sequência sintética FLIPXyIF

A construção do nanosensor foi baseada na fusão da proteína de ligação à xilose XBP de *E. coli*, com variantes da proteína verde fluorescente, a eCFP e a Vênus (variante da YFP), cujos espectros de emissão e excitação, respectivamente, se sobrepõem, possibilitando a ocorrência do FRET. Assim, a sequência do nanosensor FLIPXyIF foi fundamentada na sequência descrita por Deuschle *et al.* (2005), sendo que o domínio de ligação à galactose/glicose foi substituído pela proteína XBP. A fim de verificar se o domínio de ligação à xilose poderia interferir na estrutura da proteína fusionada e assim impossibilitar a ocorrência do FRET, a estrutura tridimensional foi analisada a partir de um modelo estrutural da proteína XBP.

Esta análise envolveu o alinhamento da sequência proteica do domínio de ligação à xilose com a sequência do domínio de ligação à galactose/glicose ligado à glicose (PDP: 2HPH), cujos resultados estão apresentados na Figura 5. Apesar de apresentarem baixa identidade (21%), alguns resíduos relacionados à interação com o ligante são conservados.

XBP	57	KV FVQSANGNEETQMSQIENMINRGVDVLVIIPYNGQVLSNVVKEAKQEGIKVLAYDR--	114
		++ + + ++ Q QI+ ++ +GV L I + V+++A+ + + V+ +++	
2HPH	36	QLLMNDSQNDQSKQNDQIDVLLAKGVKALAINLVDPAAGTVIEKARGQNVVFFNKEP	95
XBP	115	---MINDADIDFYISFDNEKVGELQAKALV-----DIVPQGN--YFLMGGSPVDNN	160
		++ D +Y+ D+++ G +Q + D+ G + L+ G P +	
2HPH	96	SRKALDSYDKAYVGTDSKESGIIQGDLIAKHWAANQGWDLNKDGQIQFVLLKGEPPGHPD	155
XBP	161	A-----KLFRAGQMKVLKPYVDSGKIKVVGQWVDGWLPENALKIMENALTA	207
		A K + Q+++ D+ + K D W+ G	
2HPH	156	AEARTTYVIKELNDKGIKTEQLQLDTAMWDTAQAKDKMDAWLSG-----P	200
XBP	208	NNNKIDAVVASNDATAGGAIQALSAQGLSGKVAISGQDADLAGIKRIAAGTQTMTVYKPI	267
		N NKI+ V+A+NDA A GA++AL A S + + G DA + + +G TV	
2HPH	201	NANKIEVVIANNNDAMAMGAVEALKAHNKSS-IPVFGVDALPEALALVKSGALAGTVLNDA	259
XBP	268	TLLANTAAEIAVELGNGQ	285
		A ++A L +G+	
2HPH	260	NNQAKATFDLAKNLADGK	277

Score: 45.1 bits (105); Expect: 3e-05;
Identities: 54/258 (21%);
Positives: 109/258 (42%); Gaps: 45/258 (17%)

Figura 5: Alinhamento da sequência proteica do domínio de ligação à xilose (XBP) com a sequência do domínio de ligação à galactose/glicose ligado à glicose (2HPH). Em azul: resíduos conservados relacionados à interação com o ligante; em vermelho: resíduo conservado relacionado ao movimento de dobradiça das proteínas, característico das PBPs.

Além disso, anterior à obtenção do modelo tridimensional, uma análise da predição da estrutura secundária da molécula foi realizada (Anexo A). Esses dados indicam que 41% dos aminoácidos estão envolvidos com a formação de alfa-hélices, 19% com folhas-beta e 39% com estruturas desordenadas, segundo a ferramenta NPS@ (*Network Protein Sequence Analysis*), disponível *online* (Combet *et al.*, 2000).

A partir desses resultados, foi obtido o modelo tridimensional da proteína XBP por homologia, por meio do programa Geno3D disponível na *Internet* (Combet *et al.*, 2002) (Figura 6). A qualidade da estrutura do modelo obtido foi averiguada pelo gráfico de Ramachandran (Anexo B), no qual aproximadamente 75% dos aminoácidos encontram-se em regiões mais favoráveis para formação das estruturas secundárias, enquanto que aproximadamente 18% encontram-se em regiões favoráveis. Esses dados indicam que o modelo apresenta qualidade estrutural e que pode ser utilizado para a análise da posição e do ambiente estrutural do domínio de ligação à xilose. O modelo também possibilita a análise do posicionamento adequado das proteínas fluorescentes, que é condizente com a adequada conformação para ligação da xilose, bem como para a ocorrência do FRET. Este modelo apresentou similaridades com o modelo original, conforme valores de aproximadamente 1,0 Å para o rmsd (*root mean square deviation*) indicando que os fluoróforos estão a uma distância que permite a ocorrência de transferência de energia entre um e outro, ou seja, do FRET.

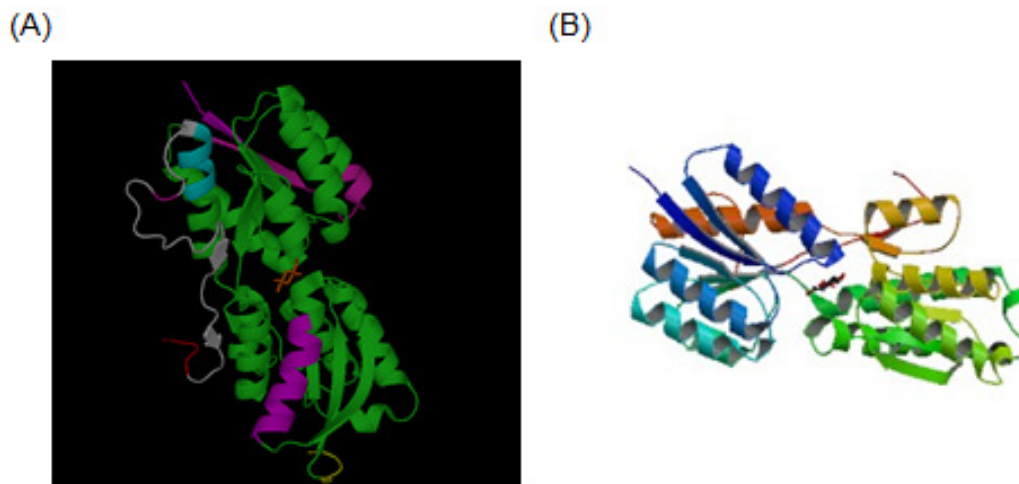


Figura 6: Modelo tridimensional da proteína XBP. (A) Modelo tridimensional da estrutura predita para o domínio de ligação à xilose; (B) Modelo tridimensional da estrutura da proteína de ligação à galactose/glicose depositado no PDB (2PHP).

6.2. Síntese do gene FLIPXyIF

O gene codante para o nanosensor foi sintetizado pela empresa *Epoch Biosciences* (Texas, EUA) e clonado no vetor de expressão pET21a+ como fragmento NdeI-XhoI, dando origem ao vetor pET21-FLIPX, mostrado na Figura 7.

Conforme mencionado, o gene é uma fusão de três diferentes sequências: as sequências codantes para a eCFP e para a eYFP (Vênus) que flanqueiam a sequência do gene *xyIF* nas regiões 5' e 3', respectivamente. Na região N-terminal da proteína foi fusionada uma sequência de *his-tag* que permite a purificação do nanosensor por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A Figura 8 mostra um desenho esquemático do nanosensor FLIPXyIF.

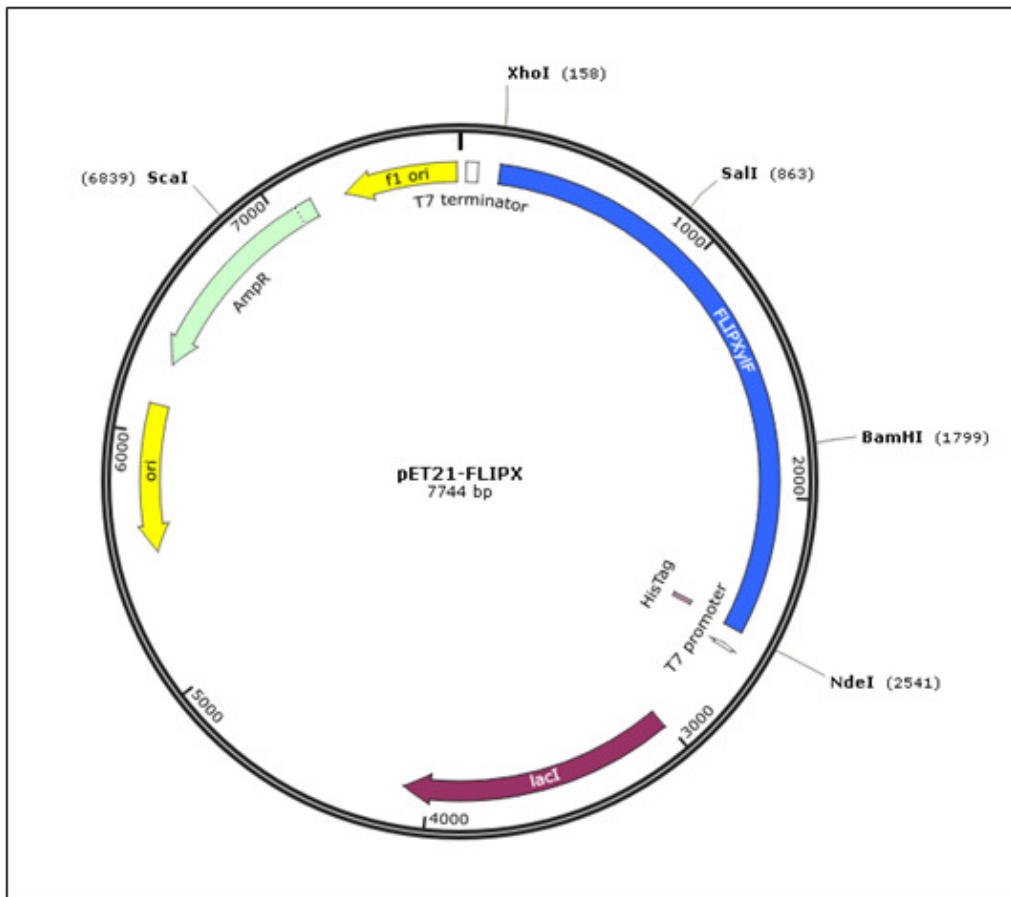


Figura 7: Mapa de restrição do vetor pET21-FLIPX. Em azul está representado o gene codante para o nanosensor, cuja transcrição está sob regulação do promotor T7.

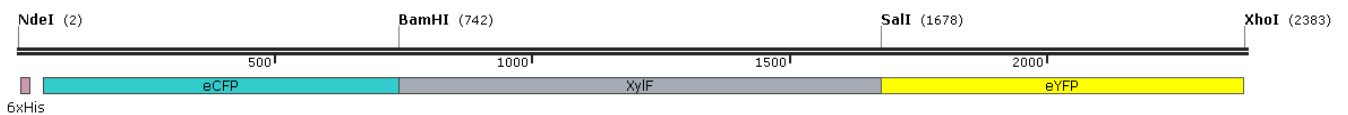


Figura 8: Desenho esquemático do nanosensor FLIPXYIF. Os sítios de restrição NdeI e XhoI flanqueiam o nanosensor; os sítios BamHI e Sall flanqueiam o domínio de ligação à xilose.

6.3. Modificação do domínio de ligação à xilose

A fim de verificar se uma diminuição no domínio de ligação à xilose melhoraria a eficiência do FRET, uma nova versão do nanosensor foi construída por meio de PCR. Foram utilizados o vetor pET21-FLIPX como molde e os *primers* FLIPXD-F e FLIPXD-R, que adicionam respectivamente sítios de BamHI e Sall às extremidades dos produtos amplificados, resultando

6. RESULTADOS

em um fragmento de aproximadamente 900 pb. A Figura 9 apresenta toda a sequência no nanosensor, sendo mostrada também a sequência que foi amplificada para a modificação do domínio de ligação à xilose. Foram deletados 69 pares de base na extremidade 5' da sequência do gene *xyIF*.

```
CATATGCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCCGCGGCAGCATGGTGAGCAAGGGC
GAGGAGCTGTTCCACCGGGTGGTGCCCATCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAG
TTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGC
ACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTGGGGCGTGCAGTGC
TTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTAC
GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCCCGGAGGTGAAGTTC
GAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATC
CTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAG
AACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
CACACCAGCAGAACACCCCATCGGGGACGGCCCGTCTGCTGCCCGACAACCACCTACCTGAGC
ACCCGCTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTG
ACCGCCGCCGGGATCGATCCCTTACCACCGTTGCTGCACACGCCAAAGAAAGTCAAAAATAGGTATG
CCGATTGATGATCTCCGCTTGAACGCTGGCAAAAAGATCGAGATATCTTTGTGAAAAAGGCAGAA
TCTCTCGGCGCGAAAAGTATTTGTACAGTCTGCAAATGGCAATGAAGAAACACAAAATGTCGCAGATT
GAAAACATGATAAACCGGGTGTGATGTTCTTGTCAATTATCCGTATAACGGTCAGGTATTAAGT
AACGTTGTAAGAAGCCAAACAAGAAGGCATTAAGTATTAGCTTACGACCGTATGATTAACGAT
GCGGATATCGATTTTATATTTCTTTGATAACGAAAAGTCGGTGAACGACGGCAAAAAGCCCTG
GTGATATTGTTCCGCAAGTAATTACTTCTGATGGCGGGCTCGCCGGTAGATAACACGCCAAG
CTGTTCCGCGCCGACAAAATGAAAGTGTAAAACCTTACGTTGATTCCGGAAAAATTAAGTCTGTT
GGTGACCAATGGGTTGATGGCTGGTTACCGGAAAACGCATTGAAAATTAAGGAAAACGCCGTAACC
GCCAATAATAACAAAATGATGCTGTAGTTGCCCTCAAACGATGCCACCGCAGGTGGGGCAATTCAG
GCATTAAGCGCGCAAGGTTTATCAGGGAAAGTAGCAATCTCCGGCCAGGATGCGGATCTCGCAGGT
ATTAACCGTATTGCTGCCCGTACGCAACATGACGGTGTATAAACCTATTACGTTGTTGGCAAT
ACTGCCGAGAAAATGCGGTTGAGTTGGGCAATGGTCAGGAACCAAAGCAGATACCACACTGAAT
AATGGCTGAAAGATGTCCCTCCCGCTCTGACACCGGATCGATGTGAATAAAAACCAACATCAA
GATACGGTAATTAAGACCGGATTCACGTCGACCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCTGTTGTCGAG
CTGGACGGCGAGCTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
GGCAAGCTGACCCGTAAGCTGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTG
ACCACCCCTGGCTACGGCTGCAGTGTCTGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTC
TTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAAC
TACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCCCATCGAGCTGAAGGGC
ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAAC
GTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATC
GAGGACGGCGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCAGCGCCCGGTG
CTGCTGCCCGACAACCACCTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGC
GATCACATGGTCTGCTGGAGTTGCTGACCGCCCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTAC
AAGTAACTCGAG
```

Figura 9: Sequência no nanosensor: as sequências em azul, preto e amarelo representam as regiões codantes para a eCFP, XBP e eYFP, respectivamente. O *his-tag* está representado em vermelho. As sequências sublinhadas são as regiões de anelamento para os *primers* para a modificação do domínio de ligação à xilose. Os sítios de restrição estão apresentados nas cores verde escuro (NdeI), rosa (BamHI), roxo (Sall) e vinho (XhoI). A sequência verde claro é o fragmento de 69 pb que foi deletado do domínio de ligação à xilose.

6. RESULTADOS

Na Figura 10, é possível observar a amplificação de um fragmento de aproximadamente 900 pb, conforme o esperado, correspondendo ao domínio de ligação à xilose truncado. Nos poços de um a cinco estão presentes diferentes reações de PCR com o mesmo fragmento amplificado.

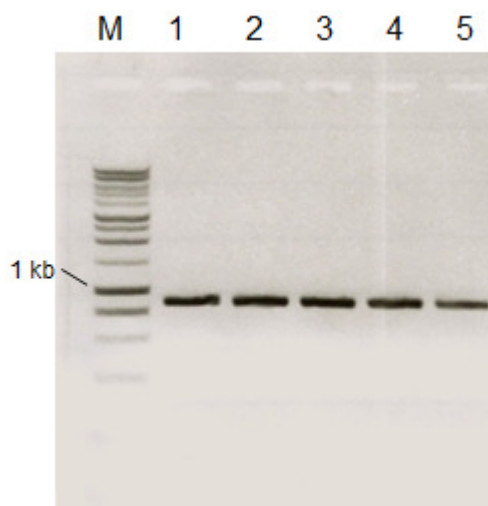


Figura 10: Amplificação do domínio de ligação à xilose truncado. Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. M: marcador 1 kb DNA ladder (Promega); 1 a 5: fragmentos amplificados.

Após a purificação das reações de PCR, o fragmento amplificado foi ligado ao vetor pPCV-B (Janner *et al.*, 2013). O sistema de ligação foi utilizado para transformar *E. coli* DH5 α , utilizando-se seleção azul e branco. Quatro colônias transformantes brancas foram selecionadas randomicamente e inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina. Posteriormente à extração plasmidial, foi realizada uma análise de restrição com as enzimas BamHI e Sall para verificar a inserção do fragmento no vetor. Sendo o resultado positivo, o fragmento liberado pela digestão com estas enzimas de um clone foi purificado a partir de gel de agarose e ligado ao vetor pET21a-FLIPX que foi previamente digerido com BamHI e Sall. Células DH5 α foram transformadas com o sistema de ligação, sendo semeadas em meio LB com ampicilina. Após a extração plasmidial, foi confirmada a construção do plasmídeo portando o nanosensor truncado por meio de digestão com as enzimas BamHI e Sall, como mostra a Figura 11. A digestão com estas enzimas libera um fragmento de 900 pb correspondente ao domínio de ligação à xilose. Também foi realizada uma

digestão com as enzimas NdeI e XhoI que libera um fragmento de aproximadamente 2,4 kb, correspondente ao nanosensor completo. O novo plasmídeo foi denominado pET21-FLIPX Δ .

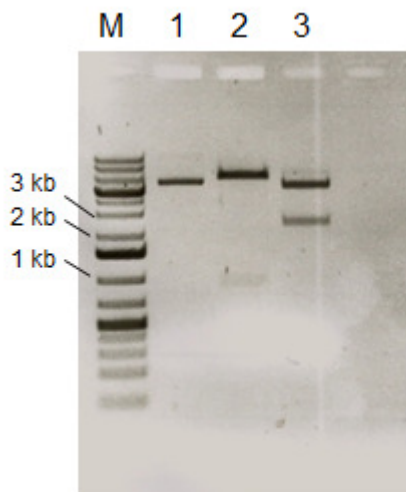


Figura 11: Confirmação da clonagem do domínio de ligação à xilose truncado no vetor pET21-FLIPX. Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. M: marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific); 1: vetor pET21-FLIPX Δ intacto; 2: digestão com BamHI e Sall; 3: digestão com NdeI e XhoI.

Após a obtenção do plasmídeo pET21-FLIPX Δ , linhagens de expressão de *E. coli* foram transformadas com este e com o plasmídeo pET21-FLIPX para a produção do nanosensor truncado e intacto, respectivamente. Clones expressando ambos os genes foram obtidos com sucesso.

6.4. Expressão em *E. coli*

A linhagem BL21 (DE3) de *E. coli* foi escolhida para a expressão heteróloga dos nanosensores por ser mais amplamente utilizada para propósitos gerais de expressão (Novagen, 2003). Esta linhagem foi testada portando tanto o plasmídeo pLysS quanto o pLysE, sendo que com este último houve maior expressão dos genes. A síntese proteica dos nanosensores intacto e truncado na linhagem BL21 (DE3) pLysE utilizando-se 0,5 mM de IPTG e incubação a 37 °C pode ser vista na Figura 12. A massa molecular do nanosensor intacto foi determinada em 87,7 kD e do nanosensor truncado em 85,4 kD, segundo a ferramenta *ProtParam* (ExPASy).

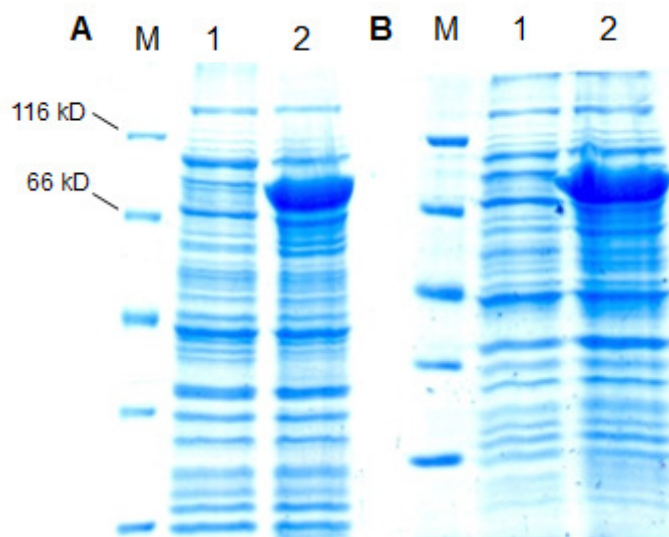


Figura 12: Expressão gênica dos nanosensores a 37 °C. Nanosensor intacto (A) e truncado (B). Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% corado com comassie coloidal. M: marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific); 1: perfil proteico imediatamente antes da indução com IPTG; 2: perfil proteico após 1 h de indução.

Como a expressão gênica na linhagem BL21 (DE3) resultou na formação de corpos de inclusão, as condições de cultura foram alteradas para menor concentração do agente indutor e menor temperatura de crescimento, porém, não foi possível a purificação de uma quantidade substancial da proteína na forma nativa. Devido a isto, foram realizadas tentativas de purificação em condições desnaturantes, nas quais os corpos de inclusão são submetidos a tratamento com ureia. Entretanto, o dobramento da proteína realizado após a purificação não foi eficaz, o que foi demonstrado pela técnica de dicroísmo circular (Figura 13). Por meio do espectro dicroico, nota-se que não há a formação de bandas dicroicas características, ou seja, a proteína não apresentou estruturas secundárias após o processo de renaturação. Este ensaio foi realizado para o nanosensor intacto.

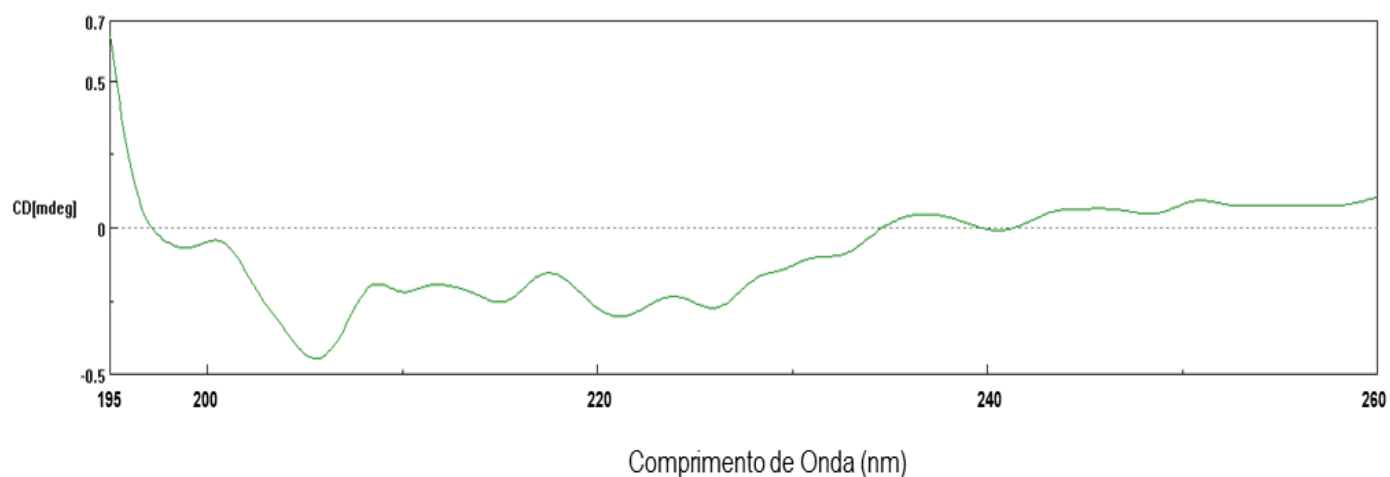


Figura 13: Espectro de dicroísmo circular distante da região UV (190 – 260 nm) do nanosensor intacto. O ensaio foi realizado em tampão Tris-HCl (pH 7,0) a 25 °C.

Dessa forma, foram testadas outras linhagens de *E. coli* para expressão: Origami (DE3), C43 (DE3), Tuner (DE3) e Rosetta (DE3), dentre as quais se destacou a última. Esta linhagem possui a permease *lacY1* deletada, possibilitando uma entrada homogênea de IPTG em toda a população, o que permite um ajuste dos níveis de expressão de acordo com a concentração do agente indutor (Novagen, 2003). Assim, células da linhagem Rosetta (DE3) foram induzidas com sucesso utilizando 0,5 mM de IPTG, com crescimento a 20 °C, como pode ser observado na Figura 14. O clone produtor de nanosensor intacto foi denominado R1 e aquele que expressou o nanosensor truncado foi denominado de R1 Δ . Com as proteínas sintetizadas, seguiu-se a purificação dos nanosensores em condições nativas.

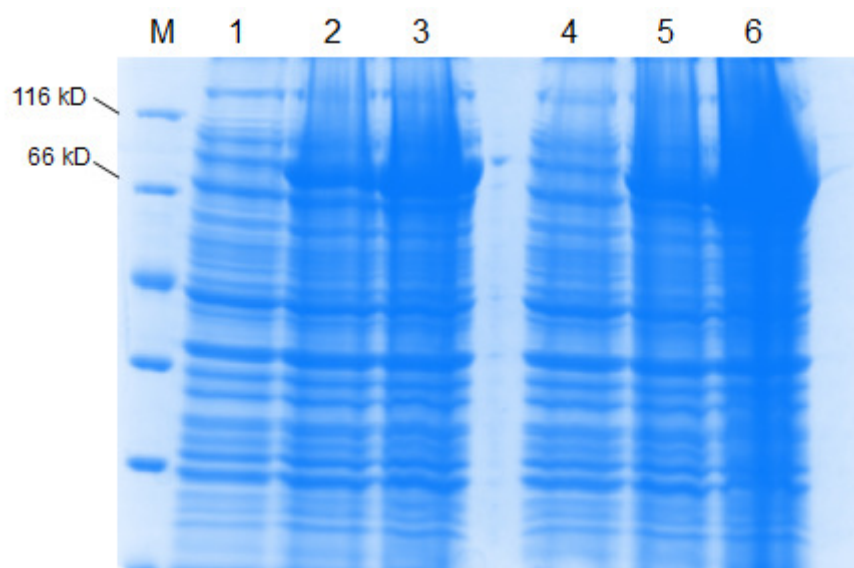


Figura 14: Expressão gênica dos nanosensores a 20 °C. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% corado com comassie coloidal. M: marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific); 1: perfil proteico do clone R1 imediatamente antes da indução; 2: perfil proteico do clone R1 após 1 h de indução; 3: perfil proteico do clone R1 após 6 h de indução; 4: perfil proteico do clone R1 Δ imediatamente antes da indução; 5: perfil proteico do clone R1 Δ após 1 h de indução; 6: perfil proteico do clone R1 Δ após 6 h de indução.

6.5. Purificação proteica

Após a produção heteróloga das proteínas e lise das células utilizando-se homogeneizador de alta pressão, o lisado foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A Figura 15 apresenta um gel SDS-PAGE da purificação do nanosensor intacto a partir do clone R1 realizada no sistema *ÄKTA Pure* (GE). A proteína foi eluída em um pico cuja concentração de imidazol foi de 75 mM.

A Figura 16 apresenta o gel SDS-PAGE da purificação do nanosensor truncado a partir do clone R1 Δ , a qual foi realizada utilizando-se um gradiente crescente de concentração de imidazol, sendo a proteína eluída em 140 mM.

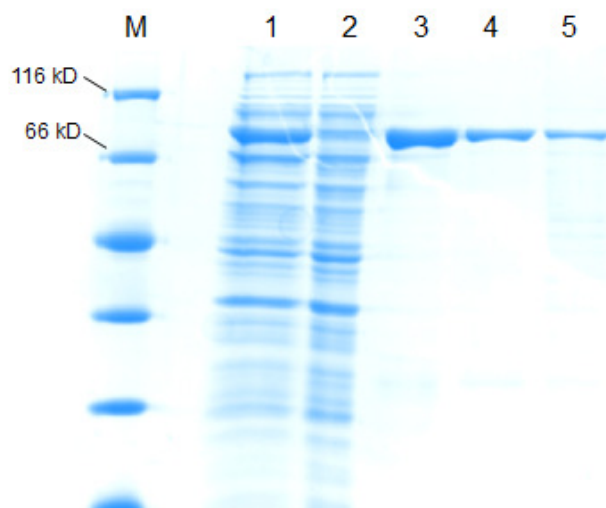


Figura 15: Purificação do nanosensor intacto por cromatografia de afinidade. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% corado com comassie coloidal. M: marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific); 1: sobrenadante após lise celular; 2: *flow through*; 3 e 4: eluição utilizando-se 75 mM imidazol; 5: eluição utilizando-se 300 mM imidazol.

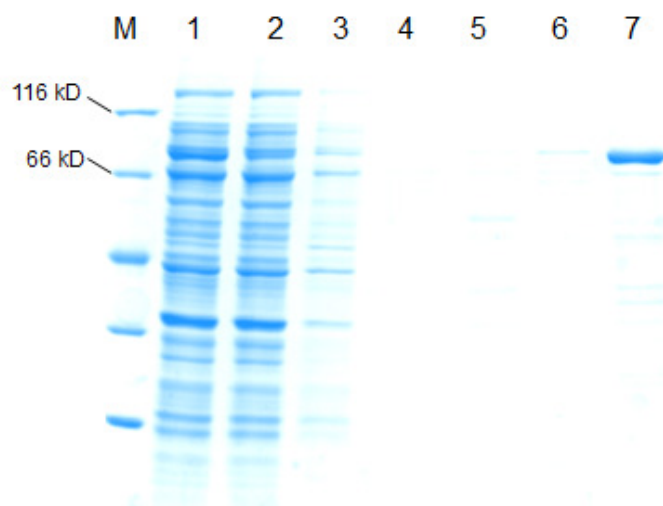


Figura 16: Purificação do nanosensor truncado por cromatografia de afinidade. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% corado com comassie coloidal. M: marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific); 1: sobrenadante após lise celular; 2: *flow through*; 3 a 7: gradiente de imidazol, no qual a proteína foi eluída em 140 mM.

6.6. Caracterização dos nanosensores

A caracterização dos nanosensores *in vitro* envolveu a aquisição de espectros de emissão quando a proteína foi excitada em 435 nm, excitando dessa forma, somente a variante eCFP. O espectro de emissão para o nanosensor intacto (FLIXylF) está apresentado na Figura 17 e para o truncado (FLIXylF Δ) na Figura 18, sendo ambos coletados a 25 °C. O primeiro pico do espectro é a emissão pelo domínio eCFP e o segundo é a emissão pelo domínio eYFP. É possível observar uma alteração do espectro de emissão em ambos os sensores à medida que xilose é adicionada devido à ligação desta à proteína.

Para o nanosensor intacto também foram coletados espectros em outras temperaturas: 28 °C, 30 °C, 35 °C, 38 °C e 40 °C, com o intuito de calcular os parâmetros termodinâmicos da interação entre a proteína e a xilose, os quais estão apresentados no Anexo C.

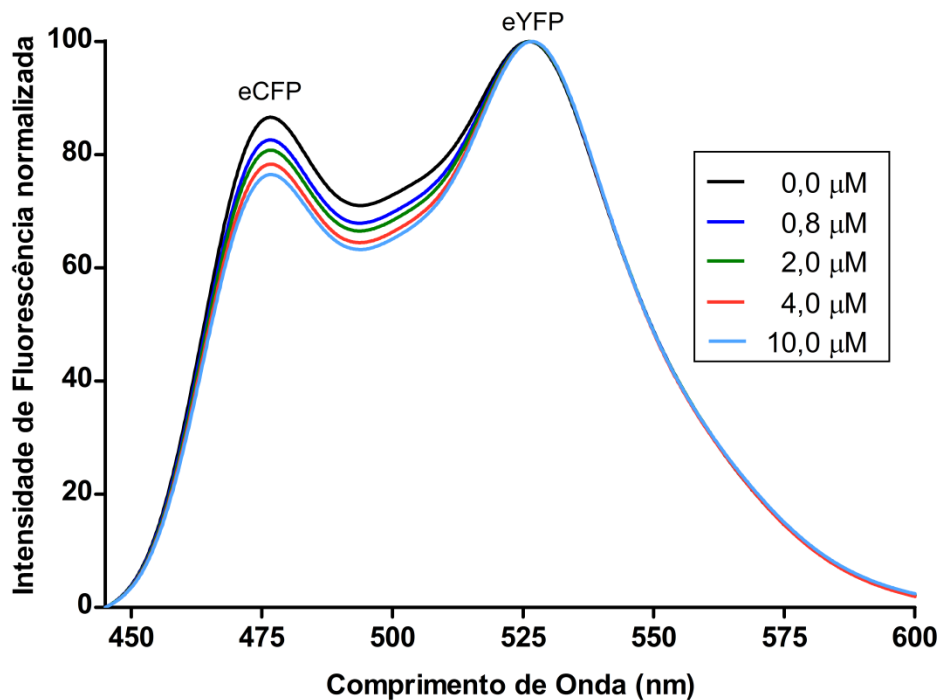


Figura 17: Espectro de emissão do nanosensor intacto a 25 °C. O ensaio foi realizado na ausência de xilose e na presença de diferentes concentrações do açúcar. eCFP indica o pico de emissão pela variante eCFP e eYFP indica o pico de emissão pela variante eYFP (Vênus).

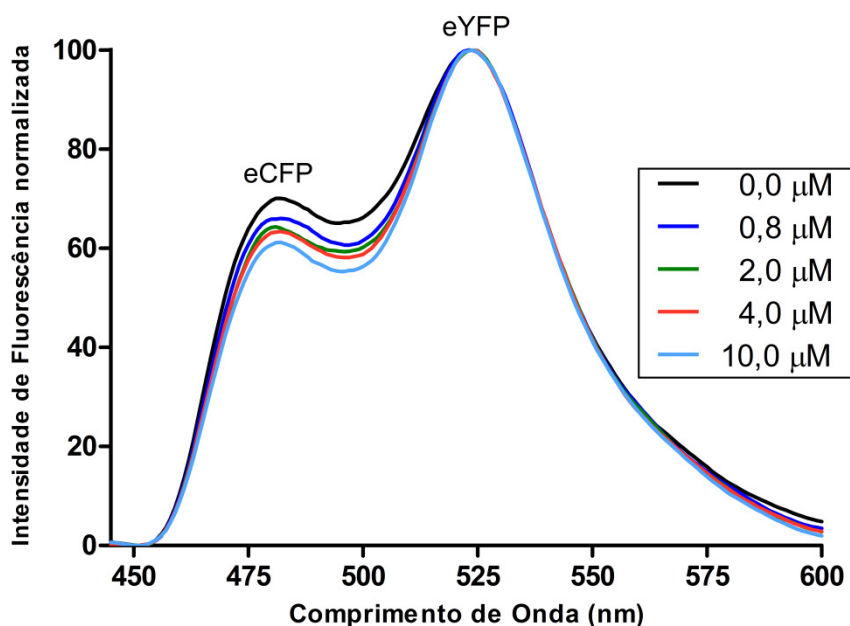


Figura 18: Espectro de emissão do nanosensor truncado a 25 °C. O ensaio foi realizado na ausência de xilose e na presença de diferentes concentrações do açúcar. eCFP indica o pico de emissão pela variante eCFP e eYFP indica o pico de emissão pela variante eYFP (Vênus).

6.6.1. Determinação de K_d

A alteração dos espectros de emissão observada é indicativo de que houve alteração de FRET em resposta à ligação do substrato ao nanosensor, uma vez que há um aumento da taxa de emissão entre os domínios fluorescentes eYFP e eCFP. Por meio dessa taxa, foi feita uma curva de saturação relacionando as taxas de emissão obtidas com concentrações de xilose entre 0 e 10 μM e submetendo-as à aproximação apresentada na Equação 1. Com esta, é possível determinar a K_d aparente do nanosensor por xilose, constante que indica a afinidade da proteína pelo seu ligante. A Figura 19 apresenta a curva obtida por meio dessa aproximação para o nanosensor truncado em ensaio realizado a 25 °C. Para este, a K_d encontrada nesta temperatura foi de $0,9750 \pm 0,2148 \cdot 10^{-6}$ M, que representa uma alta afinidade por xilose, sendo que a taxa de emissão máxima entre o estado saturado e na ausência do ligante foi de 0,168. A Figura 20 apresenta uma comparação das curvas obtidas para o nanosensor intacto e truncado e a Figura 21 apresenta as curvas para o nanosensor intacto em todas as temperaturas estudadas.

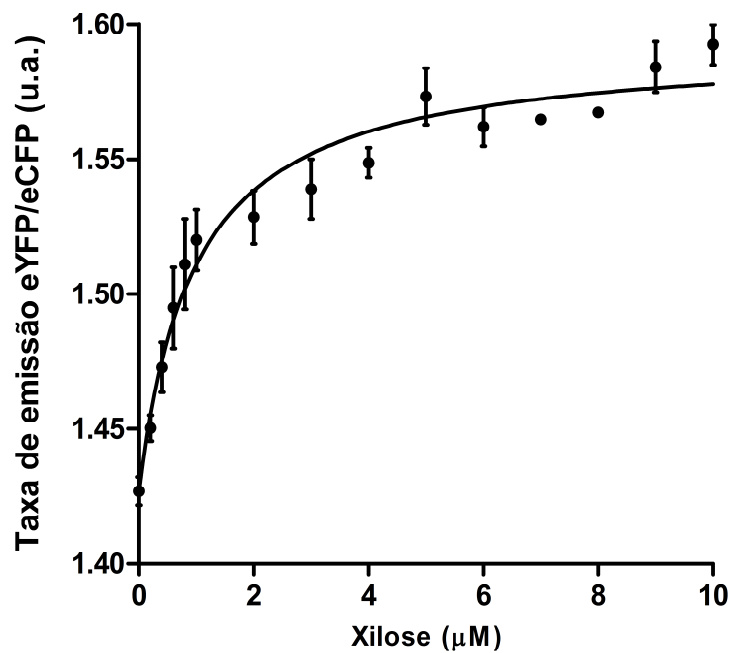


Figura 19: Curva de titulação do nanosensor truncado. O eixo Y representa a taxa de emissão eYFP/eCFP quando o nanosensor foi excitado em 435 nm a 25 °C. As barras representam o erro padrão das triplicatas.

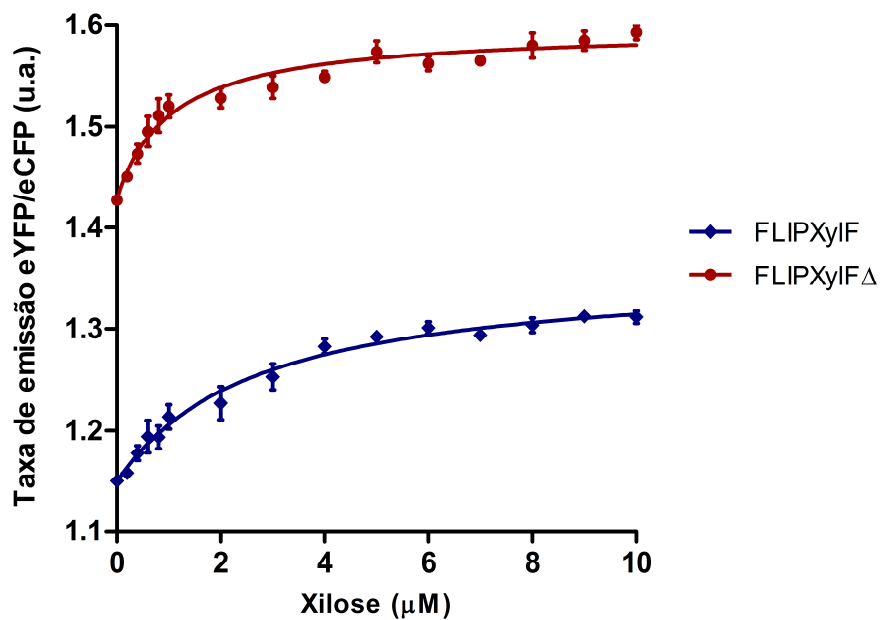


Figura 20: Comparação das curvas de titulação dos nanosensores intacto e truncado. O eixo Y representa a taxa de emissão eYFP/eCFP quando os nanosensores foram excitados em 435 nm a 25 °C. As barras representam o erro padrão das triplicatas.

6. RESULTADOS

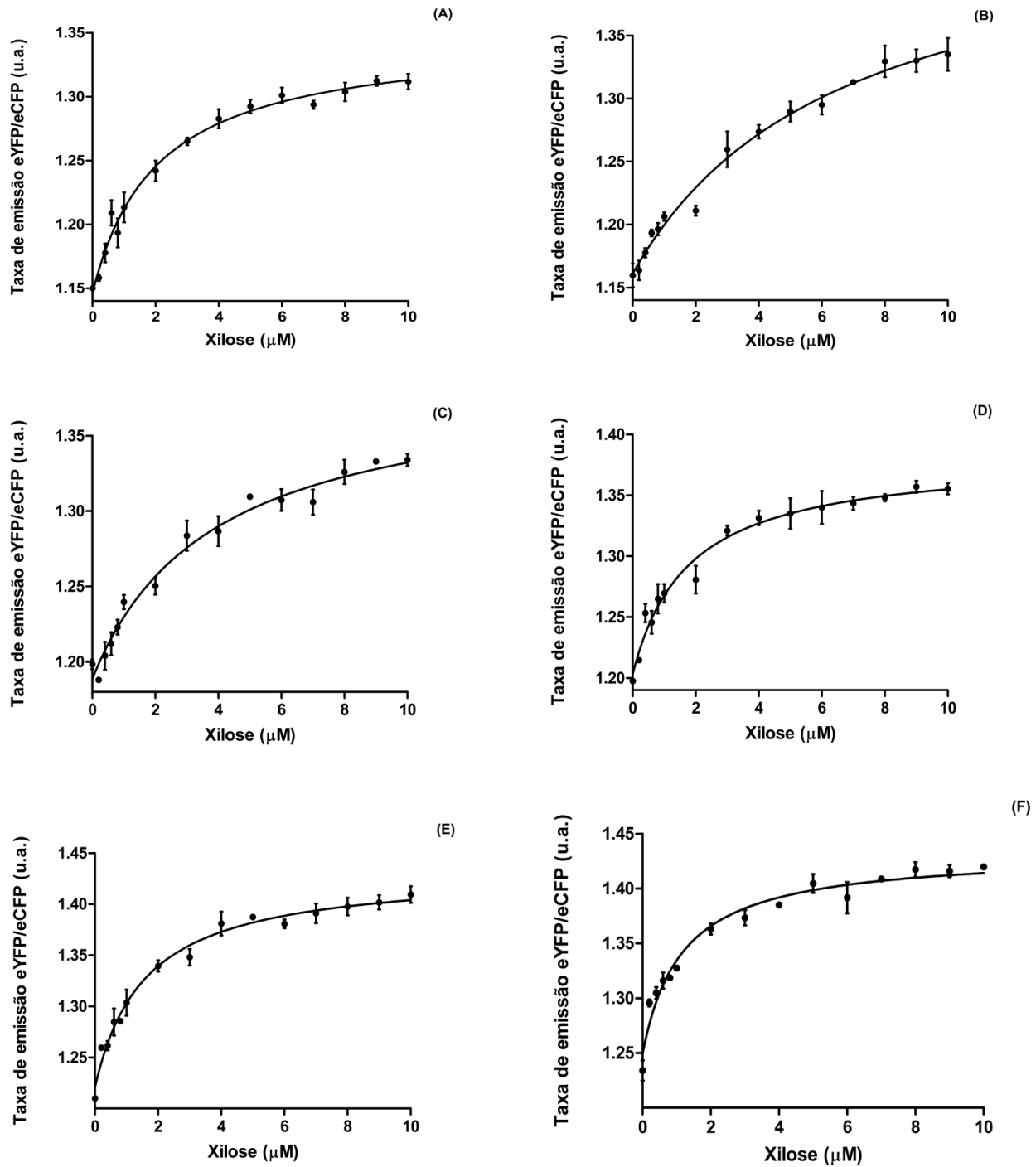


Figura 21: Curvas de titulação do nanosensor intacto. O eixo Y representa as taxas de emissão entre a eYFP e eCFP nas temperaturas de 25 °C (A); 28 °C (B); 30 °C (C); 35 °C (D); 38 °C (E) e 40 °C (D). As barras representam o erro padrão das triplicatas.

É possível notar diferenças em relação ao espectro (Figuras 17 e 18) e à taxa de emissão (Figura 20) entre os nanosensores, possivelmente devido à um dobramento diferenciado que no nanosensor FLIPXylF Δ sofreu por ter uma região deletada. Além disso, por meio das curvas apresentadas na Figura 21, foi possível determinar a K_d do nanosensor intacto por xilose para cada temperatura estudada, as quais estão mostradas na Tabela 4. Os valores encontrados indicam que a proteína possui uma alta afinidade por xilose. A tabela também apresenta a máxima taxa de emissão encontrada, sendo esta a diferença entre a taxa de emissão quando a proteína estava saturada e na ausência do ligante ($\Delta t_{\text{máx}}$).

Tabela 4: Constante de dissociação (K_d) do nanosensor intacto por xilose e $\Delta t_{\text{máx}}$ calculadas para cada temperatura estudada.

Temperatura (°C)	K_d (μM)	$\Delta t_{\text{máx}}^*$
25	3,414 \pm 1,780	0,173
28	2,971 \pm 1,195	0,187
30	2,613 \pm 0,872	0,149
35	1,738 \pm 0,355	0,167
38	1,504 \pm 0,458	0,212
40	1,362 \pm 0,229	0,202

*Máxima variação na taxa de emissão entre a ausência e a saturação do ligante.

6.6.2. Determinação dos parâmetros termodinâmicos

A fim de determinar os valores termodinâmicos da interação entre o nanosensor intacto e a xilose, os valores encontrados de K_d foram submetidos à aproximação de Van't Hoff apresentada na Equação 2. Esta aproximação relaciona o logaritmo natural da constante de associação K_a (inverso de K_d) da interação entre a proteína e seu ligante com o inverso das temperaturas. O

gráfico está apresentado na Figura 22. Os parâmetros termodinâmicos encontrados estão apresentados na Tabela 5.

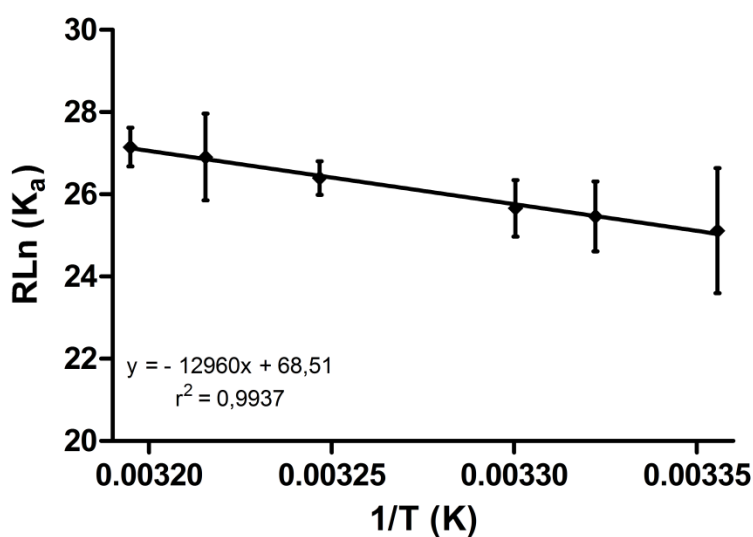


Figura 22: Aproximação de Van't Hoff para a interação do nanosensor intacto com a xilose. Por meio desta relação, foram calculados os valores da variação de entalpia (ΔH) e de entropia (ΔS). As barras representam o erro padrão das triplicatas.

Tabela 5: Parâmetros termodinâmicos encontrados para a interação entre o nanosensor intacto e a xilose.

Parâmetros termodinâmicos	Interação FLIPXylF - xilose
ΔH (kcal/mol)	$12,960 \pm 0,516$
ΔS (cal/mol.K)	$68,510 \pm 1,689$
ΔG^{25} (kcal/mol)	$-7,456 \pm 0,518$

6.6.3. Especificidade do nanosensor

Para verificar a especificidade do nanosensor FLIPXylIF (intacto), este foi testado com outros açúcares que estão presentes na biomassa, a glicose e a arabinose. Além disso, é necessário testá-lo contra intermediários da via de degradação de xilose, como o xilitol e a xilulose, que podem interferir na ligação do nanosensor à xilose quando da realização de testes *in vivo*. O ensaio foi realizado a 30 °C utilizando-se as mesmas concentrações de açúcar que o ensaio realizado para xilose. A Figura 23 mostra a variação na taxa de emissão do nanosensor intacto presença de diferentes concentrações dos açúcares citados. Para a glicose e a arabinose, é possível observar uma variação nesta taxa, porém não significativa, resultando em uma baixa alteração de FRET, não sendo possível calcular as constantes de dissociação do nanosensor por estes açúcares utilizando-se este método. Já para a xilulose e xilitol, houve uma maior variação na taxa de emissão entre os fluoróforos comparando-se a proteína na ausência e na presença do ligante, verificando-se a ocorrência de FRET e demonstrando que o nanosensor também apresenta afinidade por estes açúcares.

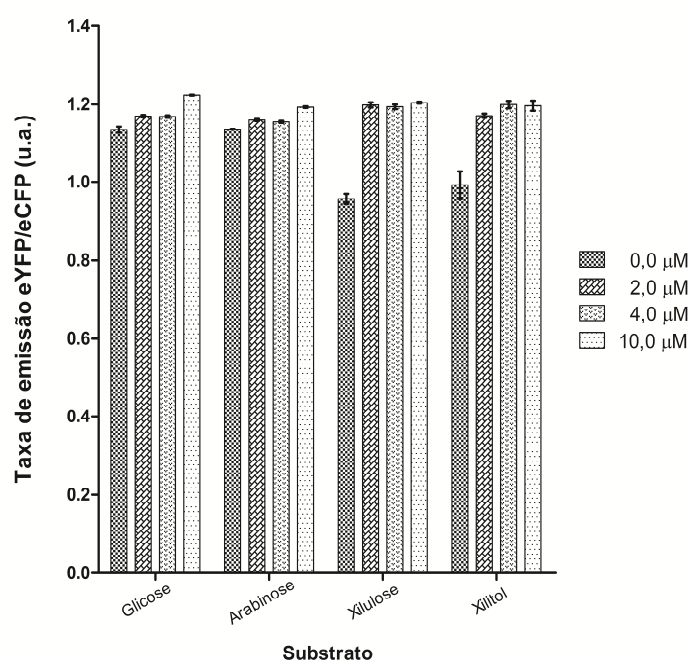


Figura 23: Especificidade do nanosensor intacto em relação à glicose, arabinose, xilulose e xilitol.

Por meio das curvas apresentadas na Figura 24, foi possível a determinação da K_d para a xilulose ($0,244 \cdot 10^{-6} \pm 0,028 \cdot 10^{-6}$ M) e para o xilitol ($0,3112 \cdot 10^{-6} \pm 0,049 \cdot 10^{-6}$ M), sendo que na mesma temperatura, a K_d encontrada para a xilose foi de $2,613 \cdot 10^{-6} \pm 0,872 \cdot 10^{-6}$ M. Dessa forma, o nanosensor apresenta maior afinidade por estes açúcares do que para xilose.

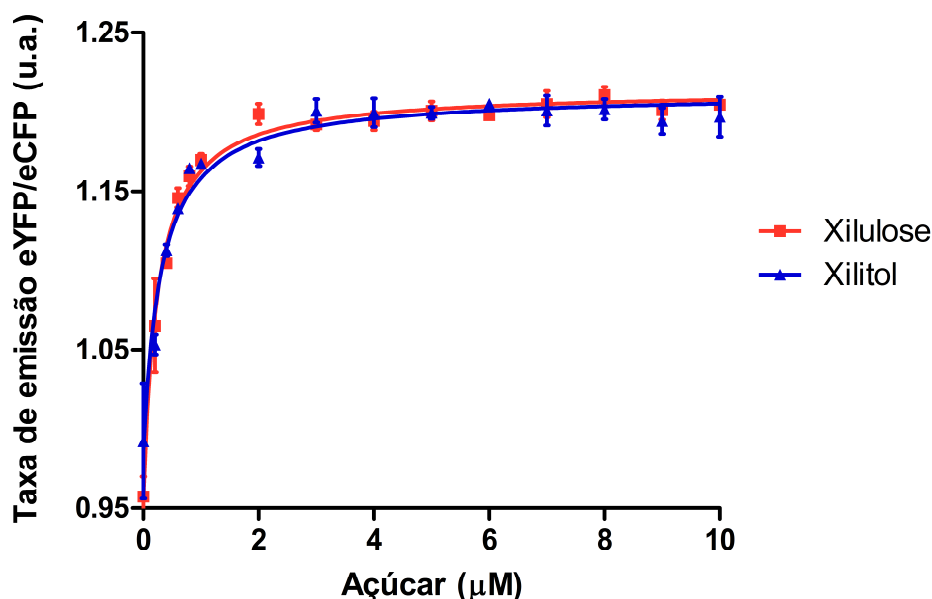


Figura 24: Curvas de titulação do nanosensor intacto para xilulose e xilitol. O eixo Y representa as taxas de emissão entre a eYFP e eCFP quando o nanosensor foi excitado a 435 nm a 30 °C. As barras representam o erro padrão das triplicatas.

6.7. Validação do nanosensor *in vivo*

A fim de verificar o uso do nanosensor *in vivo*, este foi clonado no vetor Y1PGK1 (Reis, 2012) para sua expressão na linhagem EBY.VW4000. Esta linhagem foi desenvolvida no trabalho de Wieczorke *et al.* (1999), no qual foram nocauteados 20 genes codantes para transportadores de hexoses, bloqueando assim, a absorção destes açúcares. Portanto, a expressão de um determinado transportador nesta linhagem possibilita seu estudo isoladamente. Para tanto, o gene codante para o transportador *HXT7* foi clonado no vetor YEp352 (Moraes *et al.*, 1995) para a sua expressão nesta linhagem.

6. RESULTADOS

Para a amplificação do gene do nanosensor intacto foram utilizados os *primers* ScFLIP-F e ScFLIP-R que adicionam sítios de BglII e NotI, respectivamente, às extremidades dos produtos amplificados e o vetor pET21FLIPX como molde, gerando um fragmento de aproximadamente 2,4 kb. A amplificação do transportador HXT7 foi realizada com os *primers* Y2H7-F e Y2H7-R, que adicionam 50 pb em ambas as extremidades para a sua recombinação no vetor YEp352 digerido com a enzima SmaI. Como molde, foi utilizado o DNA genômico da linhagem de *S. cerevisiae* S288c. O fragmento assim amplificado apresenta aproximadamente 2,5 kb. A Figura 25 apresenta a amplificação dos dois fragmentos de acordo com os tamanhos esperados.

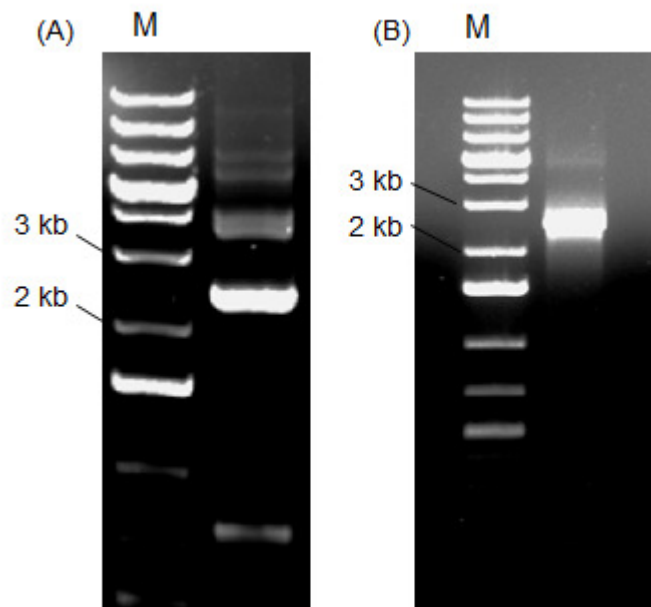


Figura 25: Amplificação dos genes do nanosensor (A) e do transportador *HXT7* (B). Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. M: marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder.

É possível observar na Figura 25 (A) que houve amplificação de fragmentos inespecíficos, assim, a banda de interesse foi eluída e purificada a partir do gel de agarose, sendo o fragmento correspondente ao nanosensor clonado no vetor pPCV-B (Janner *et al.*, 2013), para sua posterior digestão com as enzimas NotI e BglII. O vetor Y1PGK1 (Reis, 2012) foi digerido com as enzimas NotI e BamHI e ligado ao gene do nanosensor digerido. Uma vez que os sítios BamHI e BglII geram extremidades compatíveis, é possível sua ligação, contudo, o sítio é destruído. Após a ligação, células XL10-Gold foram

6. RESULTADOS

transformadas, e colônias transformantes foram inoculadas em meio LB líquido para extração de DNA plasmidial. Para a confirmação da clonagem, o DNA foi digerido com a enzima NotI, sendo esperada a linearização do plasmídeo em um tamanho de 9,7 kb. Além disso, também foram realizadas digestões com as enzimas EcoRV e PvuI separadamente, que cortam tanto o inserto como o vetor. Para a digestão com EcoRV, espera-se a liberação de fragmentos de 225 pb, 2683 pb e 6842 pb. Já para a enzima PvuI, a digestão geraria fragmentos de 1209 pb, 1870 pb, 2817 pb e 3854 pb. A Figura 26 apresenta o mapa de restrição do vetor resultante, o qual foi denominado de Y1FLIPX e as digestões com as enzimas citadas, sendo confirmada a clonagem.

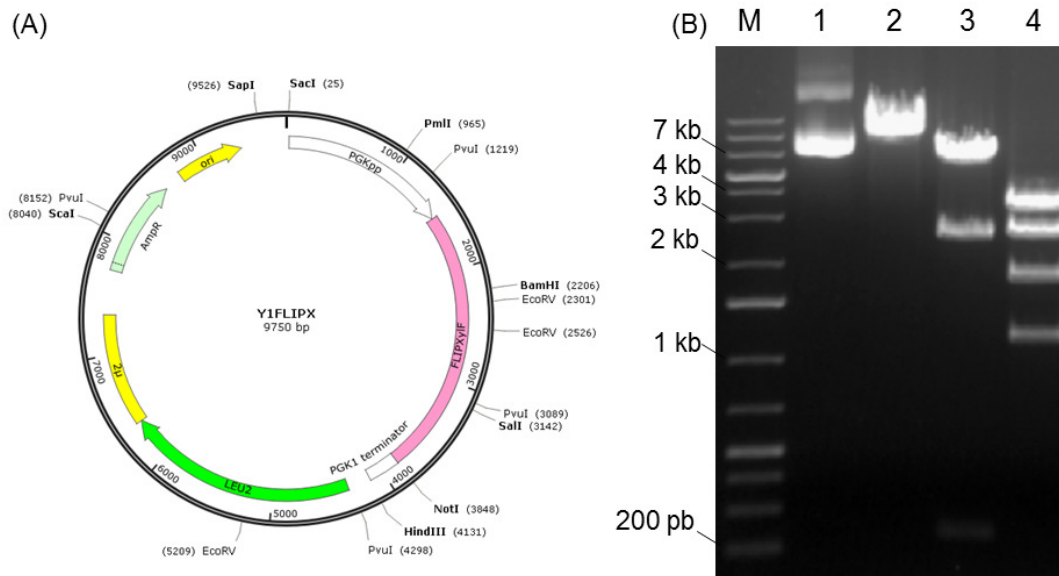


Figura 26: (A) Mapa de restrição do vetor Y1FLIPX; (B) confirmação da clonagem do nanosensor no vetor Y1PGK1. M: marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific); 1: Y1FLIPX intacto; 2: digestão com NotI; 3: digestão com EcoRV; 4: digestão com PvuI. Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio.

Para a construção de um plasmídeo contendo o transportador *HXT7*, este foi amplificado de modo a ter 50 pb de homologia em ambas as extremidades com o vetor YEp352 digerido com a enzima *SmaI*. A linhagem EBY.VW4000 foi transformada com o fragmento amplificado e com o vetor digerido, para a obtenção do plasmídeo por meio de recombinação homóloga

6. RESULTADOS

in vivo entre os fragmentos. Colônias transformantes foram submetidas à PCR de colônia para verificar a construção do vetor. Os *primers* utilizados foram o AmpInt 3' que se anela à uma região interna ao gene de resistência à ampicilina e o pHXT7 3' que se anela à região promotora do gene do *HXT7*, gerando um fragmento de aproximadamente 2,2 kb. A Figura 27 apresenta o mapa de restrição do vetor resultante, denominado de Y2HXT7 (A) e o resultado da PCR de colônia de 11 clones utilizando os *primers* citados (B).

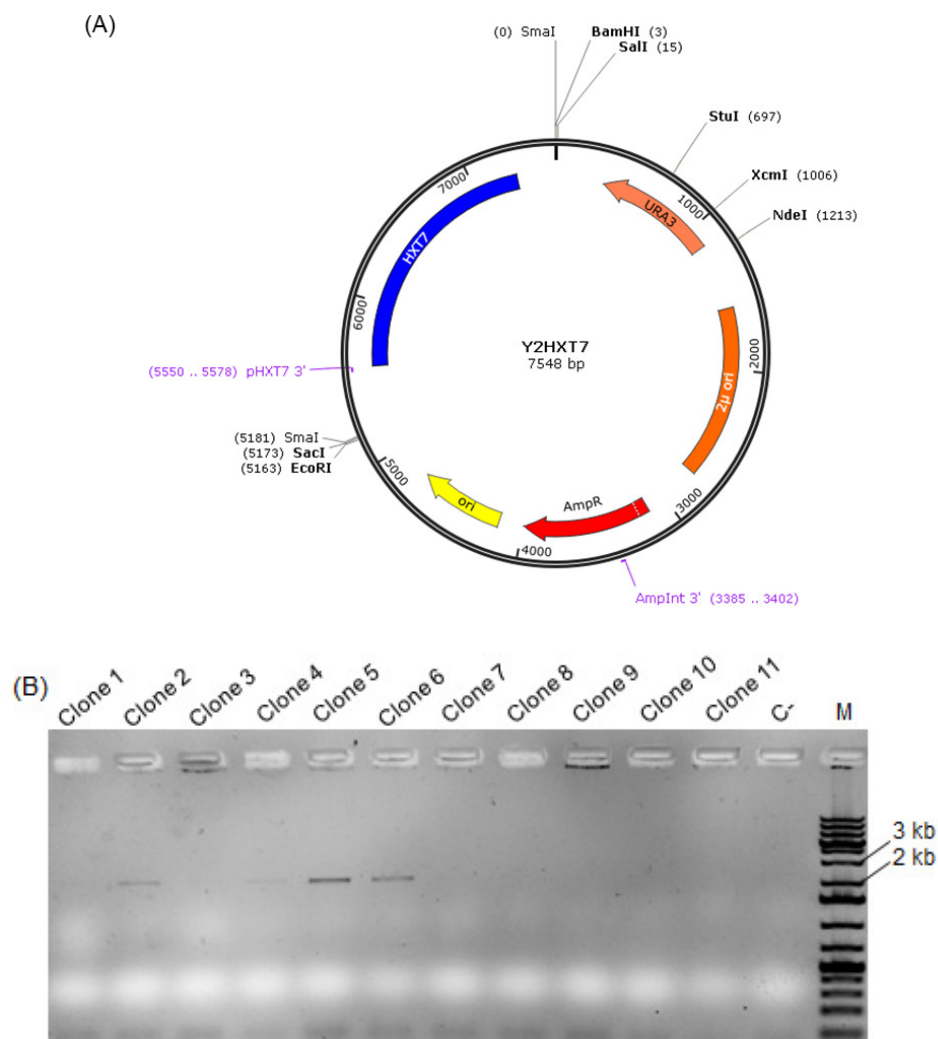


Figura 27: (A) Mapa de restrição do vetor Y2HXT7; (B) PCR de colônia de 11 clones transformantes. C-: reação sem adição de DNA; M: marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific). Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio.

6. RESULTADOS

Assim, o clone 5 foi escolhido para a sua transformação com o vetor Y1FLIPX. A Figura 28 mostra o resultado da PCR de colônia de 13 clones selecionados utilizando os *primers* FLIPXD-F e FLIPXD-R para verificar a presença do vetor nos transformantes, gerando um fragmento de aproximadamente 900 pb conforme esperado.

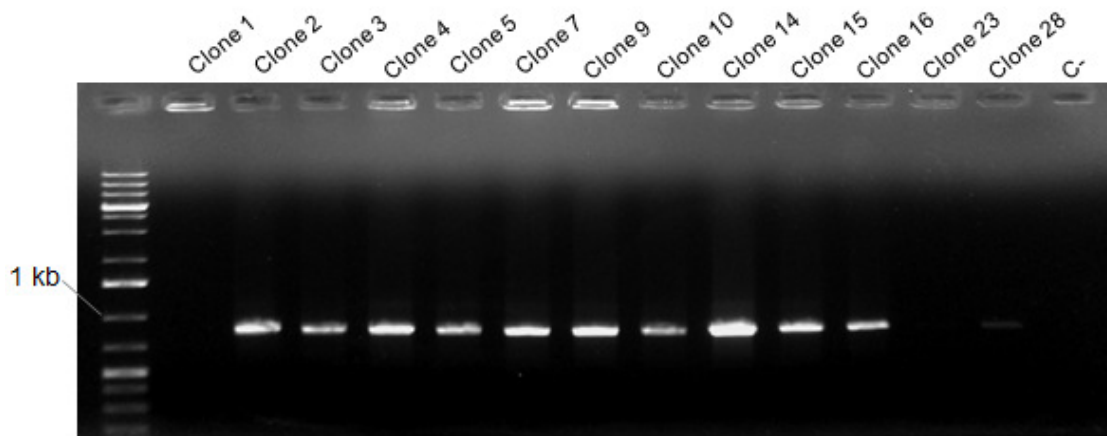


Figura 28: PCR de colônia de 13 clones transformantes. C-: reação sem adição de DNA; M: marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific). Eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio.

Além disso, a linhagem RE1006 também foi transformada com o nanosensor FLIPXyIF. Como esta possui todos os transportadores, ela poderia ser utilizada como controle positivo da entrada de xilose nos ensaios *in vivo*. Além disso, ambas as linhagens também foram transformadas com os respectivos vetores vazios, compondo os controles negativos.

O clone 7 foi utilizado para ensaios preliminares em microscópio confocal e em espectrofotômetro de placa, sendo que neste último foram realizados em triplicatas. Por meio destes, observou-se que as células fluorescem, mas não foi possível observar variações no FRET para todas as unicatas, obtendo-se resultados divergentes, sendo necessário o aprimoramento do ensaio.

7. Discussão

A utilização da xilose nos processos fermentativos é de suma importância para uma produção de etanol mais rentável, uma vez que este açúcar é o de maior abundância na biomassa após a glicose. Porém, o maior desafio para o uso da xilose é a incapacidade da levedura *S. cerevisiae*, o micro-organismo mais utilizado na fermentação alcoólica, em metabolizar eficientemente este açúcar. Para contornar essa deficiência, diversos estudos realizaram com sucesso a introdução da via metabólica de xilose, seja ela de origem fúngica ou bacteriana, no metabolismo de *S. cerevisiae*. Contudo, outras dificuldades surgiram, como o transporte da xilose para o interior da célula. Este açúcar é uma pentose, enquanto que a levedura *S. cerevisiae* possui somente transportadores de hexose, que possuem baixa afinidade por xilose quando comparada à glicose. Dessa forma, estudos que visem verificar a afinidade e cinética de transportadores nativos ou heterólogos no influxo de xilose podem revelar quais seriam os transportadores ideais para a internalização da xilose durante a fermentação. Uma forma de realizar tais estudos é a utilização de nanosensores FLIP com propriedades de FRET. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi a construção e a caracterização de um nanosensor de xilose para seu posterior uso na avaliação da afinidade de transportadores no influxo deste açúcar.

Estes sensores podem ser codificados geneticamente, fornecendo vantagens para aplicações *in vivo*: (1) expressão estável; (2) eficiente introdução em uma variedade de tipos celulares e organismos; (3) mensuração de mudanças dentro de compartimentos subcelulares; e (4) controle eficiente sobre a produção do sensor (Deuschle *et al.*, 2005). Assim, o primeiro passo para a construção do nanosensor foi a determinação de uma sequência codificadora seguida de modelagem da estrutura tridimensional da proteína. O modelo resultante indicou que o nanosensor apresentaria uma estrutura adequada para a ocorrência do FRET. Além disso, uma outra versão do nanosensor foi concebida, contendo uma deleção de 23 aminoácidos no domínio de ligação à xilose, a fim de verificar se ocorreria mudanças no FRET.

Após a determinação da sequência, síntese do gene codificador e da modificação do domínio de ligação, gerando uma nova versão do sensor, os genes codantes para ambos os nanosensores foram submetidos à expressão na bactéria *E. coli*. A utilização deste hospedeiro traz várias vantagens como altos níveis de expressão do gene heterólogo, baixo custo, rápido crescimento e falta de modificações pós-traducionais, não requerida para uma variedade de proteínas (Tolia e Joshua-Tor, 2006). Contudo, a super produção de proteínas heterólogas no citoplasma de *E. coli* é frequentemente acompanhada por seu mau dobramento e acúmulo em agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão (Baneyx, 1999).

Primeiramente, foram realizadas tentativas de purificar as proteínas alvo em condições nativas na linhagem BL21 (DE3) de *E. coli*, contudo, a quantidade de proteína produzida na fração solúvel foi ínfima quando comparada à fração insolúvel. De fato, é possível que toda a produção de uma proteína heteróloga se dê na fração insolúvel. Entre os anos de 2008 e 2011, o centro de pesquisas *Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease* produziu aproximadamente 3500 proteínas recombinantes, das quais 30% foram sintetizadas somente na fração insolúvel, sem proteína aparente na fração solúvel, o que foi verificado por gel SDS-PAGE (Leibly *et al.*, 2012).

Como a expressão em corpos de inclusão traz a vantagem de facilitar o isolamento e a purificação da proteína alvo (Swartz, 2001) realizou-se a purificação a partir dos corpos de inclusão. Porém, a purificação em condições desnaturantes requer múltiplos procedimentos de recuperação, como o redobramento da proteína desnaturada (Leibly *et al.*, 2012). O procedimento para a remoção do agente desnaturante é um passo chave para uma recuperação eficiente das proteínas e embora já tenham sido descritos métodos que tiveram sucesso no redobramento da proteína, em muitos casos o rendimento é baixo devido à precipitação das proteínas (Yamaguchi e Miyazaki, 2014). Ainda, a utilização da diálise para retirar o agente desnaturante tem um rendimento de recuperação menor que 40% (Yamaguchi e Miyazaki, 2014). Neste trabalho, após a purificação em condições desnaturantes, foi realizada diálise para a remoção da ureia. Esse procedimento mostrou-se ineficiente, uma vez que foi demonstrado por meio de

dicroísmo circular que a proteína não possuía estruturas secundárias formadas, possivelmente devido a um enovelamento incorreto da proteína mesmo após a retirada do agente desnaturante.

Dessa forma, foi necessário buscar a expressão dos nanosensores para que fossem sintetizados na fração solúvel da célula. Existem muitos métodos para reduzir a formação de corpos de inclusão, que incluem reduzir a temperatura de crescimento da cultura, reduzir as taxas de expressão gênica, otimizar a utilização dos códons e coexpressar chaperonas (Baig *et al.*, 2014). Assim, outras linhagens de *E. coli* e outras condições de indução foram testadas, sendo possível a produção dos nanosensores na fração solúvel utilizando-se a linhagem Rosetta (DE3), 0,5 mM de IPTG e crescimento a 20 °C. Esta linhagem possui a permease *lacY1* deletada, possibilitando uma entrada homogênea de IPTG em toda a população, o que permite um ajuste dos níveis de expressão de acordo com a concentração do agente indutor (Novagen, 2003). Assim, apesar de utilizar uma menor concentração de IPTG levando a menores níveis de expressão, há o aumento da solubilidade da proteína alvo. Além disso, com um crescimento mais lento a menores temperaturas, há mais tempo para o dobramento das proteínas produzidas, possibilitando uma menor formação de corpos de inclusão. Ainda, esta linhagem foi desenvolvida para utilizar códons raramente usados em *E. coli* de forma a expressar proteínas eucarióticas, como é o caso da eCFP e eYFP. Dessa forma, foi possível realizar a purificação em condições nativas dos nanosensores intacto e truncado a partir de suas expressões na linhagem Rosetta (DE3).

A caracterização dos nanosensores FLIPXylF e FLIPXylF Δ *in vitro* demonstrou que ambos apresentam alta afinidade por xilose e taxa de emissão entre os fluoróforos semelhante ao nanosensor FLIP glu-600 μ Δ 13 (Deuschle *et al.*, 2005), refletindo a similaridade da estrutura tridimensional das proteínas. Nanosensores desenvolvidos para outras moléculas também apresentaram $\Delta t_{\text{máx}}$ similares aos desenvolvidos neste trabalho (Fehr *et al.*, 2002; Lager *et al.*, 2003; Lager *et al.*, 2006; Yano *et al.*, 2010). Contudo, quanto maior for a $\Delta t_{\text{máx}}$, maior é a sensibilidade de detecção do sensor (Lager *et al.*, 2003), sendo interessante a melhoria das taxas de emissão para a obtenção de sensores

mais sensíveis ao metabólito em questão. Com este propósito, Liu *et al.* (2011) desenvolveram sensores para íons Ca^{2+} com $\Delta t_{\text{máx}}$ de até 20 por meio de mutações pontuais na variante eCFP, o que aumentou a sobreposição de seu espectro com a eYFP, melhorando a eficiência de FRET. Além disso, no estudo citado também foram testadas diferentes combinações de pares de FRET, concluindo-se que a alteração da orientação dos cromóforos pode levar a melhoria do sinal de FRET. Assim, a pequena $\Delta t_{\text{máx}}$ encontrada para os nanosensores FLIPXylF e FLIPXylF Δ pode ser devido a um alinhamento não favorável dos dipolos dos fluoróforos. Ademais, para gerar sensores mais sensíveis, ou seja, com maiores mudanças na taxa de emissão, podem ser realizadas modificações nas sequências que ligam as proteínas fluorescentes com o domínio de ligação à xilose em combinação com mutações neste último (Fehr *et al.*, 2002).

Em relação ao nanosensor truncado, a modificação do domínio de ligação envolveu a deleção de 23 aminoácidos da sua extremidade N-terminal. Deuschle *et al.* (2005) discute que a diminuição do domínio de ligação em menos de 20 aminoácidos não apresentou efeitos de alteração de FRET, sendo que acima disso, a resposta do sensor aumentava. A deleção realizada no nanosensor FLIPXylF não alterou de forma significativa a eficiência de transferência de energia, já que a uma temperatura de 25 °C, a $\Delta t_{\text{máx}}$ do nanosensor truncado foi de 0,168 e para o intacto foi de 0,173.

As Figuras 18 e 20 mostram as diferenças no espectro e nas taxas de emissão, do nanosensor truncado em relação ao intacto, respectivamente, o que possivelmente ocorreu devido às diferenças na estrutura proteica dos nanosensores (Lager *et al.*, 2003). Além disso, o estudo estrutural da XBP realizado por Sooriyaarachchi *et al.* (2010) mostrou que algumas mudanças conformacionais são observadas dentro no domínio N-terminal, particularmente próximo ao resíduo que se liga ao substrato Arg16, que tornam a proteína mais ordenada. Na sequência apresentada neste trabalho, este é o resíduo de posição 24, ou seja, os resíduos imediatamente anteriores a ele foram deletados na versão truncada do nanosensor. Assim, as mudanças conformacionais observadas por Sooriyaarachchi *et al.* (2010) não estariam presentes nesta versão da proteína, o que pode ter levado a um dobramento

diferenciado, explicando assim as pequenas diferenças de espectro e de taxa de emissão em relação ao nanosensor intacto.

Para este último, o estudo em diferentes temperaturas resultou em uma taxa de transferência de energia cuja média foi de 0,164 (aumento de 13,7% em média). Para cada temperatura estudada, foi calculada a constante de dissociação aparente (K_d) do nanosensor para a xilose, medida que fornece indícios sobre a afinidade da proteína pelo seu ligante. Os valores encontrados estão descritos na Tabela 4 e por meio deles é possível inferir que o nanosensor FLIPXylF possui uma alta afinidade por xilose.

Sooriyaarachchi *et al.* (2010) também realizou estudos de afinidade para a XBP, encontrando uma K_d aparente de 0,13 μM a 25 °C, enquanto que o valor encontrado neste trabalho foi de $3,414 \pm 0,178 \mu\text{M}$. A diferença observada pode ser devido aos diferentes métodos empregados para a mensuração da constante. No estudo citado, foi utilizado mudanças no microambiente do triptofano mensuradas por meio de fluorescência para determinar a K_d . Além disso, a fusão da XBP com as proteínas fluorescentes pode modificar de forma geral a estrutura da proteína, alterando a ligação do seu substrato.

Por meio dos valores de K_d encontrados em diferentes temperaturas, foi possível a determinação dos parâmetros termodinâmicos da interação entre o nanosensor e a xilose por meio da aproximação de Van't Hoff. Os valores dos parâmetros termodinâmicos elucidam características acerca da associação entre moléculas, que está relacionada a ligações não covalentes, como interações de hidrogênio, de Van der Waals, eletrostáticas e hidrofóbicas. Assim, o valor encontrado de ΔG^{25} ($\Delta G^{25} < 0$) indica que a interação da proteína com o seu ligante é espontânea, sendo um valor próximo ao da hidrólise do ATP, calculado em aproximadamente -9 kcal/mol (Kamerlin e Warshel, 2009). Dessa forma, a interação do nanosensor com a xilose ocorre espontaneamente e de forma favorável. Além disso, o ΔH positivo ($\Delta H > 0$) sugere uma interação endotérmica. Ainda, foi encontrado um valor de ΔS positivo, sendo que segundo Zhang *et al.* (2011) tais valores sendo positivos indicam um processo entropicamente guiado. O aumento de entropia é explicado pela desorganização das moléculas de água que estavam previamente ligadas à proteína em solução na ausência do ligante. A adição

deste as exclui da interface de interação com a proteína, resultando no aumento de entropia (Freitas *et al.*, 1999).

Além disso, o sinal e a magnitude dos parâmetros termodinâmicos foram relacionados com tipos individuais de interações que podem ocorrer durante os processos de associação envolvendo proteínas: (a) $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$ – interações hidrofóbicas; (b) $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$ – interações de hidrogênio e forças de Van der Waals; (c) $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ – interações eletrostáticas (Ghalandari *et al.*, 2014). Assim, conclui-se que as interações hidrofóbicas desempenham um importante papel na interação do nanosensor com a xilose. Essa afirmação é corroborada por Sooriyaarachchi (2010) em cujo trabalho é relatado que para PBPs que reconhecem açúcares, resíduos aromáticos localizados no bolso de ligação do substrato são uma característica bastante comum, fornecendo interações de empilhamento de moléculas aromáticas e interações hidrofóbicas. A Figura 29 mostra o posicionamento dos átomos no bolso de ligação do substrato da proteína XBP, sendo possível observar que a xilose faz interações hidrofóbicas com os resíduos Phe141 e Trp169.

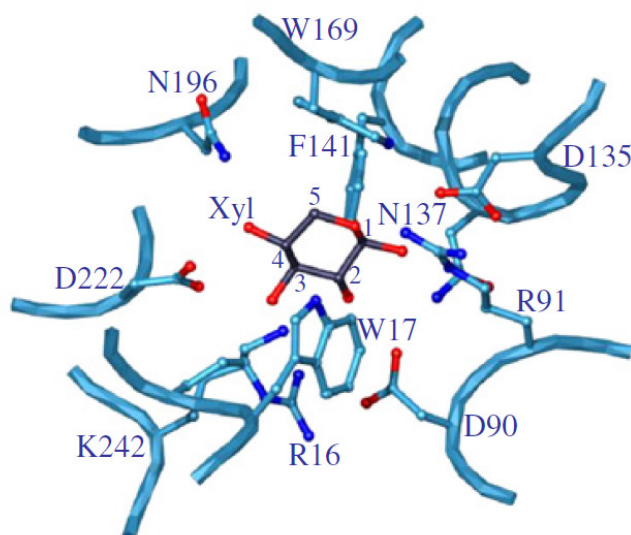


Figura 29: Estrutura do bolso de ligação do substrato da proteína XBP. Retirado de Sooriyaarachchi *et al.* (2010).

A princípio, as PBPs devem ser altamente específicas para seu ligante, uma vez que as bactérias as utilizam como sensores de quimiotaxia (Fehr *et al.*, 2002). Assim, quando o nanosensor intacto foi testado contra glicose e

arabionose, observou-se baixa alteração de FRET, conforme o esperado. Contudo, ao testá-lo contra xilulose e xilitol, intermediários da via de metabolização de xilose, houve alteração de FRET, sendo que o nanosensor apresentou maior afinidade por estes intermediários do que por xilose. A xilulose é um isômero da xilose enquanto que o xilitol é resultado de sua redução, sendo moléculas bem similares à xilose, que são reconhecidas pela XBP. Não obstante, é possível melhorar a especificidade do nanosensor por xilose gerando mutantes ao identificar potenciais resíduos relacionados ao evento de ligação. Sabe-se que os resíduos Arg16, Asp90, Arg91, Asp135, Asn137, Asn196, Asp222, Lys242, Phe141 e Trp169 participam da interação açúcar-proteína (Sooriyaarachchi *et al.*, 2010) (Figura 29), sendo que sua modificação pode alterar as propriedades de ligação do nanosensor com o substrato. Além disso, a geração de mutantes é interessante pois leva à construção de nanosensores com diferentes constantes de dissociação e afinidade, sendo possível o monitoramento de uma maior variação na concentração de xilose. Entretanto, uma vez que o nanosensor também exibiu afinidade pelo xilitol, este pode ser utilizado indiretamente para a mensuração de xilose em ensaios *in vivo*, uma vez que esta pode ser reduzida a xilitol no citoplasma da levedura.

A expressão do nanosensor FLIPXylF na levedura *S. cerevisiae* não levou a alterações significativas no FRET. Sendo uma proteína, o nanosensor é altamente influenciável por fatores ambientais como pH e concentração de íons e metabólitos presentes no citoplasma. Moussa *et al.* (2014) demonstrou que estes biosensores são muito sensíveis aos vários parâmetros estudados, como pH, sal e concentração do tampão utilizado, íons e metabólitos, alertando que deve ser tomado cuidado ao realizar a calibração dos nanosensores *in vitro* com o intuito de deduzir dados quantitativos *in vivo*. De fato, comparando-se nanosensores *in vitro* e *in vivo*, espera-se que a taxa de emissão de fluorescência seja menor em ensaios *in vivo* (Ewald *et al.*, 2011). Assim, a não detecção de FRET nos ensaios *in vivo* pode ser devido à mudanças da conformação da proteína quando produzida no citoplasma da levedura. Dessa forma, é necessário que as condições do ensaio *in vivo* sejam aprimoradas e padronizadas.

8. Conclusões e Perspectivas

Diversas PBPs têm sido utilizadas para a construção de nanosensores que visam o monitoramento de seus respectivos ligantes. Neste trabalho, a XBP foi utilizada com sucesso para a construção de um nanosensor de xilose, cujo uso posterior será importante para o estudo e a escolha de transportadores para o influxo deste açúcar em *S. cerevisiae* capaz de fermentar a xilose.

Uma nova versão do nanosensor foi construída por PCR, deletando-se 23 aminoácidos do domínio de ligação à xilose, esperando-se que um menor domínio de ligação aumentasse a eficiência do FRET. Contudo, não foram verificadas mudanças significativas na transferência de energia. Além disso, esse nanosensor apresentou diferenças no espectro e na taxa de emissão em relação ao nanosensor intacto, possivelmente devido a um dobramento diferenciado dessa nova versão da proteína. Futuramente, os parâmetros termodinâmicos da interação do nanosensor truncado com a xilose serão determinados assim como testes de especificidade realizados.

O nanosensor intacto apresentou alterações na ocorrência do FRET quando o ligante foi adicionado em concentrações crescentes. Além disso, exibiu alta afinidade por xilose e sua interação com o ligante é espontânea ($\Delta G < 0$). Ainda, os valores de ΔH e ΔS indicam que interações hidrofóbicas desempenham um papel importante na ligação da xilose com o nanosensor.

Para o nanosensor intacto, os testes de especificidade com arabinose e glicose, ambos presentes na biomassa, mostraram que o nanosensor não possui afinidade por estes. Contudo, para a xilulose e xilitol, intermediários da via da degradação da xilose, o nanosensor apresentou não só afinidade, como uma menor constante de dissociação, possuindo assim maior afinidade por estes açúcares do que por xilose. Dessa forma, mutações em aminoácidos relacionados à interação com o ligante e a construção de uma biblioteca com mutações randômicas poderiam ser realizadas para a melhoria da especificidade do nanosensor por xilose. Contudo, sendo o xilitol produto da redução da xilose, este poderia ser utilizado para mensuração da xilose de

forma indireta devido à ligação deste ao nanosensor. Além disso, mutações nos domínios fluorescentes podem levar à melhoria do sinal de FRET.

Por meio de ensaios preliminares expressando-se o nanosensor intacto em *S. cerevisiae* foi possível verificar que as células fluorescem, ou seja, o nanosensor está sendo expresso, porém não se observou de forma eficiente a ocorrência do FRET, sendo preciso a realização de melhorias neste teste. O nanosensor truncado também será expresso em *S. cerevisiae* para que seja determinado qual nanosensor fornece melhor sinal e mensuração *in vivo*.

9. Referências Bibliográficas

Aoki, K., Matsuda, M., 2009. Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nature Protocols*. 4, 1623-1631.

Aristidou, A., Penttillä, M., 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*. 11, 187 - 198.

Baig, F., Fernando, L.P., Salazar, M.A., Powell, R.R., Bruce, T.F., Harcum, S.W., 2014. Dynamic Transcriptional Response of *Escherichia coli* to Inclusion Body Formation. *Biotechnology and Bioengineering*. 111, 980-999.

Baneyx, F., 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 10, 411-421.

Bharill, S., 2010. Single Molecule Fluorescence Studies of Ribosome Dynamics: An Application of Metal Enhanced Fluorescence. University of North Texas Health Science Center.

Börner, S., Schwede, F., Schlipp, A., Berisha, F., Calebiro, D., Lohse, M.J., Nikolaev, V.O., 2011. FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. *Nature Protocols* 6, 427-438.

Bozza, W.P., Di, X., Takeda, K., Rosado, L.A.R., Pariser, S., Zhang, B., 2014. The Use of a Stably Expressed FRET Biosensor for Determining the Potency of Cancer Drugs. *PLOS ONE*. 9(9): e107010. doi:10.1371/journal.pone.0107010.

Brat, D., Boles, E., Wiedemann, B., 2009. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 2304–2311.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cella, L.N., Biswas, P., Yates, M.V., Mulchandani, A., Chen, W., 2014. Quantitative Assessment of In Vivo HIV Protease Activity Using Genetically Engineered QD-Based FRET Probes. *Biotechnology and Bioengineering*. 111, 1082-1087.

Chen, D.-C., Yang, B.-C., Kuo, T.-T., 1992. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current Genetics*. 21, 83-84.

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., Deléage, G., 2000. NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 147-150.

Combet, C., Jambon, M., Deléage, G., Geourjon, C., 2002. Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. 18, 213-214.

Cornea, R.L., Nitu, F., Gruber, S., Kohler, K., Satzer, M., Thomas, D.D., Fruen, B.R., 2009. FRET-based mapping of calmodulin bound to the RyR1 Ca²⁺ release channel. *PNAS*. 106, 6128–6133.

Cortez, L.A.B., Lora, E.E.S., Gómez, E.O., 2008. Biomassa no Brasil e no mundo, Biomassa para energia. UNICAMP, Campinas - SP.

Deuschle, K., Okumoto, S., Fehr, M., Looger, L.L., Kozhukh, L., Frommer, W.B., 2005. Construction and optimization of a family of genetically encoded metabolite sensors by semirational protein engineering. *Protein Science*. 14, 2304-2314.

Dulla, C., Tani, H., Okumoto, S., Frommer, W.B., Reimer, R.J., Huguenard, J.R., 2008. Imaging of glutamate in brain slices using FRET sensors. *Journal of Neuroscience Methods*. 168, 306-319.

EPA, U.S., 2010. Renewable Fuel Standard Program (RFS2) Regulatory Impact Analysis.

Ewald, J.C., Reich, S., Baumann, S., Frommer, W.B., Zamboni, N., 2011. Engineering Genetically Encoded Nanosensors for Real-Time *In Vivo* Measurements of Citrate Concentrations. *PLOS ONE*. 6(12): e28245. doi:10.1371/journal.pone.0028245

Fehr, M., Frommer, W.B., Lalonde, S., 2002. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors. *PNAS*. 99, 9846-9851.

Fehr, M., Lalonde, S., Lager, I., Wolff, M.W., Frommer, W.B., 2003. *In Vivo* Imaging of the Dynamics of Glucose Uptake in the Cytosol of COS-7 Cells by Fluorescent Nanosensors *The Journal of Biological Chemistry*. 278, 19127-19133.

Freitas, S.M.d., Ikemoto, H., Ventura, M.M., 1999. Thermodynamics of the Binding of Chymotrypsin with the Black-eyed Pea Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor (BTCI). *Journal of Protein Chemistry*. 18, 307-313.

Ghalandari, B., Divsalar, A., Saboury, A.A., Haertlé, T., Parivar, K., Bazl, R., Eslami-Moghadam, M., Amanlou, M., 2014. Spectroscopic and theoretical investigation of oxali-palladium interactions with b-lactoglobulin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 118, 1038-1046.

Gietz, R.D., Schiestl, R.H., 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*. 2, 31-34.

Goldemberg, J., 2007. Ethanol for a Sustainable Energy Future. *Science*. 315, 808 - 810.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74, 937-953.

Hector, R.E., Qureshi, N., Hughes, S.R., Cotta, M.A., 2008. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 80, 675-684.

Heim, R., Tsien, R.Y., 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*. 6, 178-182.

Intyre, J.M., Muller, E.G., Weitzer, S., Snydsman, B.E., Davis, T.N., Uhlmann, F., 2007. *In vivo* analysis of cohesin architecture using FRET in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*. 26, 3783–3793.

Janner, C.R., Brito, A.L.P., Moraes, L.M.P., Reis, V.C.B., Torres, F.A.G., 2013. pPCV, a versatile vector for cloning PCR products. *SpringerPlus*. 2:441 doi:10.1186/2193-1801-2-441.

Jeffries, T.W., Jin, Y.-S., 2004. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63, 495-509.

Kamerlin, S.C.L., Warshel, A., 2009. On the Energetics of ATP Hydrolysis in Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*. 113, 15692-15698.

Kaper, T., Lager, I., Looger, L.L., Chermak, D., Frommer, W.B., 2008. Fluorescence resonance energy transfer sensors for quantitative monitoring of pentose and disaccharide accumulation in bacteria. *Biotechnology for Biofuels*. 1:11 doi:10.1186/1754-6834-1-11.

Kaper, T., Looger, L.L., Takanaga, H., Platten, M., Steinman, L., Frommer, W.B., 2007. Nanosensor Detection of an Immunoregulatory Tryptophan Influx/Kynurenine Efflux Cycle. *PLOS Biology*. 5, 2201-2210.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kuyper, M., Hartog, M.M.P., Toirkens, M.J., Almering, M.J.H., Winkler, A.A., Dijken, J.P.v., Pronk, J.T., 2005a. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*. 5, 399-409.

Kuyper, M., Toirkens, M.J., Diderich, J.A., Winkler, A.A., Dijken, J.P.v., Pronk, J.T., 2005b. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Research*. 5, 925 - 934.

Lager, I., Fehr, M., Frommer, W.B., Lalonde, S., 2003. Development of a fluorescent nanosensor for ribose. *FEBS Letters*. 553, 85 - 89.

Lager, I., Looger, L.L., Hilpert, M., Lalonde, S., Frommer, W.B., 2006. Conversion of a Putative Agrobacterium Sugar-binding Protein into a FRET Sensor with High Selectivity for Sucrose. *Journal of Biological Chemistry*. 281, 30875-30883.

Lakowicz, J.R., 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third ed. Springer US, New York.

Leibly, D.J., Nguyen, T.N., Kao, L.T., Hewitt, S.N., Barrett, L.K., Voorhis, W.C.V., 2012. Stabilizing Additives Added during Cell Lysis Aid in the Solubilization of Recombinant Proteins. *PLOS ONE*. 7(12): e52482. doi:10.1371/journal.pone.0052482.

Liang, J., Guo, L., Ding, Y., Xia, L., Shen, Y., Qin, M., Xu, Q., Cao, Y., Wang, W., 2014. Genetically encoded red fluorescent copper(I) sensors for cellular copper(I) imaging *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 443, 894–898.

Lindenburg, L.H., Vinkenborg, J.L., Oortwijn, J., Aper, S.J.A., Merks, M., 2013. MagFRET: The First Genetically Encoded Fluorescent Mg²⁺ Sensor. *PLOS ONE*. 8(12): e82009. doi:10.1371/journal.pone.0082009.

Liu, S., He, J., Jin, H., Yang, F., Lu, J., Yang, J., 2011. Enhanced dynamic range in a genetically encoded Ca^{2+} sensor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 412, 155–159.

Lönn, A., Träff-Bjerre, K.L., Otero, R.R.C., Zyl, W.H.v., Hahn-Hägerdal, B., 2003. Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated xylA from *Thermus thermophilus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 32, 567-573.

Madhavan, A., Tamalampudi, S., Ushida, K., Kanai, D., Katahira, S., Srivastava, A., Fukuda, H., Bisaria, V.S., Kondo, A., 2008. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Biotechnologically Relevant Enzymes and Proteins*. 82, 1067-1078.

Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., Sawayama, S., 2009. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84, 37 - 53.

Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adam, J.A., Ikurak, M., Tsien, R.Y., 1997. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 388, 882-887.

Mohsin, M., Abdin, M.Z., Nischal, L., Kardam, H., Ahmad, A., 2013. Genetically encoded FRET-based nanosensor for *in vivo* measurement of leucine. *Biosensors and Bioelectronics*. 50, 72-77.

Moraes, L.M.P.d., Astolfi-filho, S., Oliver, S.G., 1995. Development of yeast strains for the efficient utilisation of starch: evaluation of constructs that express alpha-amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43, 1067-1076.

Moussa, R., Baierl, A., Steffen, V., Kubitzki, T., Wiechert, W., Pohl, M., 2014. An evaluation of genetically encoded FRET-based biosensors for quantitative metabolite analyses *in vivo*. *Journal of Biotechnology*. 191, 250 - 259.

Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., Miyawaki, A., 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*. 20, 87 - 90.

Novagen, 2003. pET System Manual.

Oku, M., Hoseki, J., Ichiki, Y., Sakai, Y., 2013. A fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based redox sensor reveals physiological role of thioredoxin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 587, 793-798.

Palmer, A.E., Qin, Y., Park, J.G., McCombs, J.E., 2011. Design and application of genetically encoded biosensors. *Trends in Biotechnology*. 29, 144-152.

Pereira-Jr., N., Couto, M.A.P.G., Anna, L.M.M.S., 2008. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery 1ª Edição ed. UFRJ, Rio de Janeiro.

Reis, V.C.B., 2012. Modificações genéticas em linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação de xilose, Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília.

Runquist, D., Fonseca, C., Radström, P., Spencer-Martins, I., Hahn-Hägerdal, B., 2009. Expression of Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombination xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 82, 123-130.

Ruzin, S., 2014. Biological Imaging Facility - Berkeley University

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Saloheimo, A., Rauta, J., Stasyk, O.V., Sibirny, A.A., Penttilä, M., Ruohonen, L., 2007. Xylose transport studies with xylose -utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74, 1041-1052.

Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sedlak, M., Ho, N.W.Y., 2004. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast*. 21, 671-684.

Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.d.S., Medeiros, A.B.P., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Bon, E.P.d.S., Moraes, L.M.P.d., Araújo, J.d.A., Torres, F.A.G., 2010. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*. 101, 4820–4825.

Somerville, C., 2007. Biofuels. *Current Biology*. 17, R-115 - R-119.

Sooriyaarachchi, S., 2010. Structural Studies of Sugar Binding Proteins, Department of Molecular Biology. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Sooriyaarachchi, S., Ubhayasekera, W., Park, C., Mowbray, S.L., 2010. Conformational Changes and Ligand Recognition of *Escherichia coli* D-Xylose Binding Protein Revealed *Journal of Molecular Biology*. 402, 657-668.

Stawarski, M., Rutkowska-Wlodarczyk, I., Zeug, A., Bijata, M., Madej, H., Kaczmarek, L., Wlodarczyk, J., 2014. Genetically encoded FRET-based biosensor for imaging MMP-9 activity. *Biomaterials*. 35, 1402-1410.

Swartz, J.R., 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 12, 195-201.

Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., 2006. Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nature Methods*. 3, 55-64.

Wachter, R.M., Elsliger, M.-A., Kallio, K., Hanson, G.T., Remington, S.J., 1998. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure*. 6, 1267-1277.

Wahlbom, C.F., Otero, R.R.C., Zyl, W.H.v., Hahn-Hägerdal, B., Jönsson, L.J., 2003. Molecular Analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* Mutant with Improved Ability To Utilize Xylose Shows Enhanced Expression of Proteins Involved in Transport, Initial Xylose Metabolism, and the Pentose Phosphate Pathway. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 740-746.

Wang, C., Shen, Y., Hou, J., Suo, F., Bao, X., 2013. An assay for functional xylose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Biochemistry*. 442, 241-248.

Wang, X., Jin, M., Balan, V., Jones, A.D., Li, X., Li, B.-Z., Dale, B.E., Yuan, Y.-J., 2014. Comparative Metabolic Profiling Revealed Limitations in Xylose-Fermenting Yeast During Co-Fermentation of Glucose and Xylose in the Presence of Inhibitors. *Biotechnology and Bioengineering*. 111, 152 - 164.

Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P., Boles, E., 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 464, 123-128.

Yamaguchi, H., Miyazaki, M., 2014. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies *Biomolecules* 4, 235-251.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Yano, T., Oku, M., Akeyama, N., Itoyama, A., Yurimoto, H., Kuge, S., Fujiki, Y., Sakai, Y., 2010. A Novel Fluorescent Sensor Protein for Visualization of Redox States in the Cytoplasm and in Peroxisomes. *Molecular and Cellular Biology*. 30, 3758–3766.

Young, E.M., Tong, A., Bui, H., Spofford, C., Alper, H.S., 2014. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. *PNAS*. 111, 131-136.

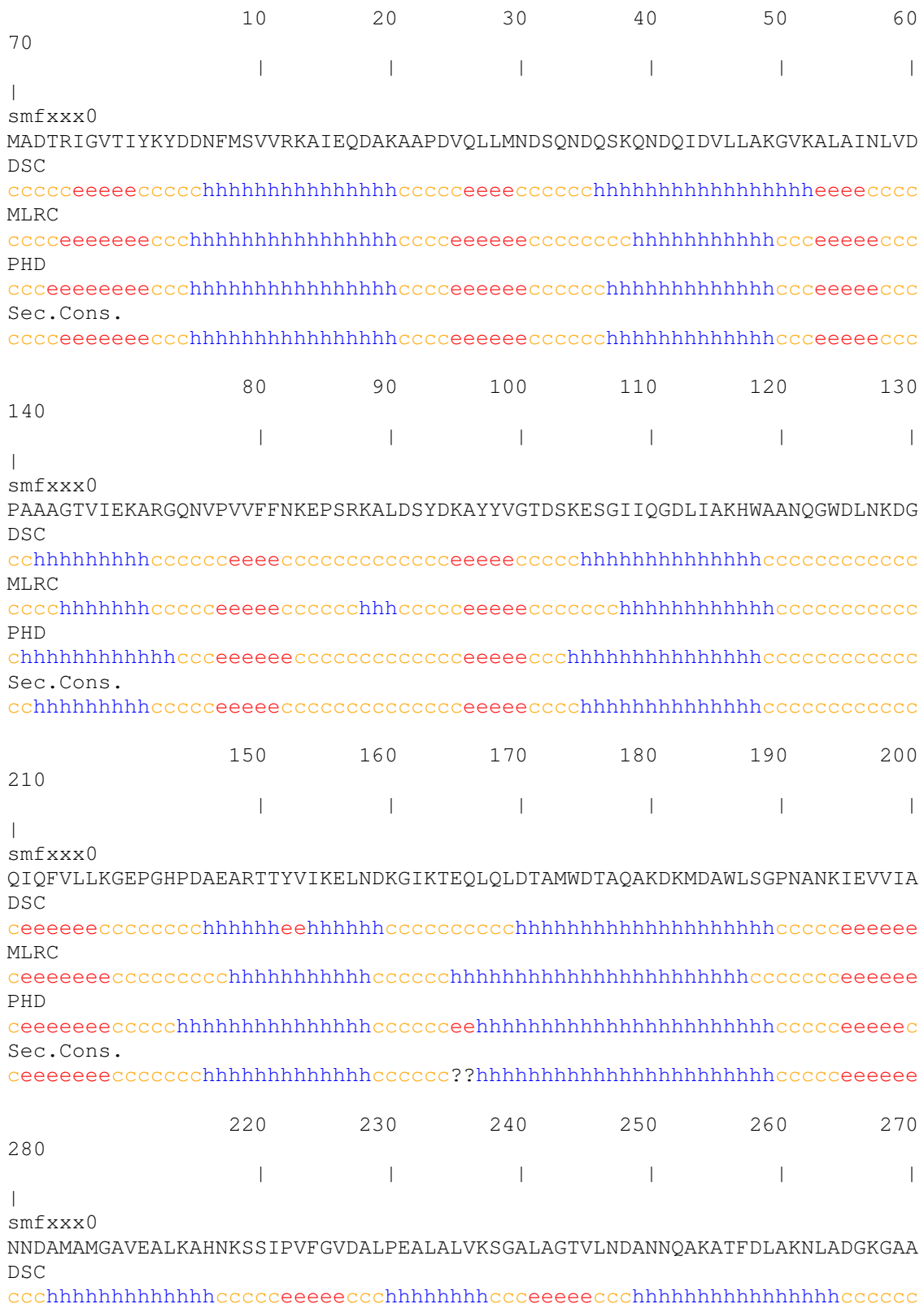
Zafeiriou, E., Arabatzis, G., Tampakis, S., Soutsas, K., 2014. The impact of energy prices on the volatility of ethanol prices and the role of gasoline emissions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33, 87 - 95.

Zhang, Y., Li, J.-H., Ge, Y.-S., Liu, X.-R., Jiang, F.-L., Liu, Y., 2011. Biophysical Studies on the Interactions of a Classic Mitochondrial Uncoupler with Bovine Serum Albumin by Spectroscopic, Isothermal Titration Calorimetric and Molecular Modeling Methods. *Journal of Fluorescence*. 21, 475-485.

Zhong, S., Navaratnam, D., Santos-Sacchi, J., 2014. A Genetically-Encoded YFP Sensor with Enhanced Chloride Sensitivity, Photostability and Reduced pH Interference Demonstrates Augmented Transmembrane Chloride Movement by Gerbil Prestin (SLC26a5). *PLOS ONE*. 9(6): e99095. doi:10.1371/journal.pone.0099095.

10. Anexos

Anexo A: Predição da estrutura secundária da proteína XBP.



MLRC
 ccchhhhhhhhhhhhhccccceeecccchhhhhhhhhhhccccceeeccccchhhhhhhhhhhhhhhcccccc
 PHD
 cchhhhhhhhhhhhhhhccccceeecccchhhhhhhhhhhccccceeecccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcccccc
 Sec.Cons.
 ccchhhhhhhhhhhhhhhccccceeecccchhhhhhhhhhhccccceeecccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcccccc

	290	300
smfxxx0	DGTNWKIDNKVVRVPYVGVDKDNLA	
DSC	ccccccccccccceeeccc	cccccccccc
MLRC	ccccceeeccc	eeeeeeeecccccc
PHD	ccccccccccccceeeccc	cccccc
Sec.Cons.	ccccccccccccceeeccc	eeeeeeeecccccc

Sequence length : 305

DSC :

Alpha helix	(Hh)	:	124	is	40.66%
3 ₁₀ helix	(Gg)	:	0	is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0	is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0	is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	51	is	16.72%
Beta turn	(Tt)	:	0	is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0	is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	130	is	42.62%
Ambiguous states (?)		:	0	is	0.00%
Other states		:	0	is	0.00%

MLRC :

Alpha helix	(Hh)	:	119	is	39.02%
3 ₁₀ helix	(Gg)	:	0	is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0	is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0	is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	62	is	20.33%
Beta turn	(Tt)	:	0	is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0	is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	124	is	40.66%
Ambiguous states (?)		:	0	is	0.00%
Other states		:	0	is	0.00%

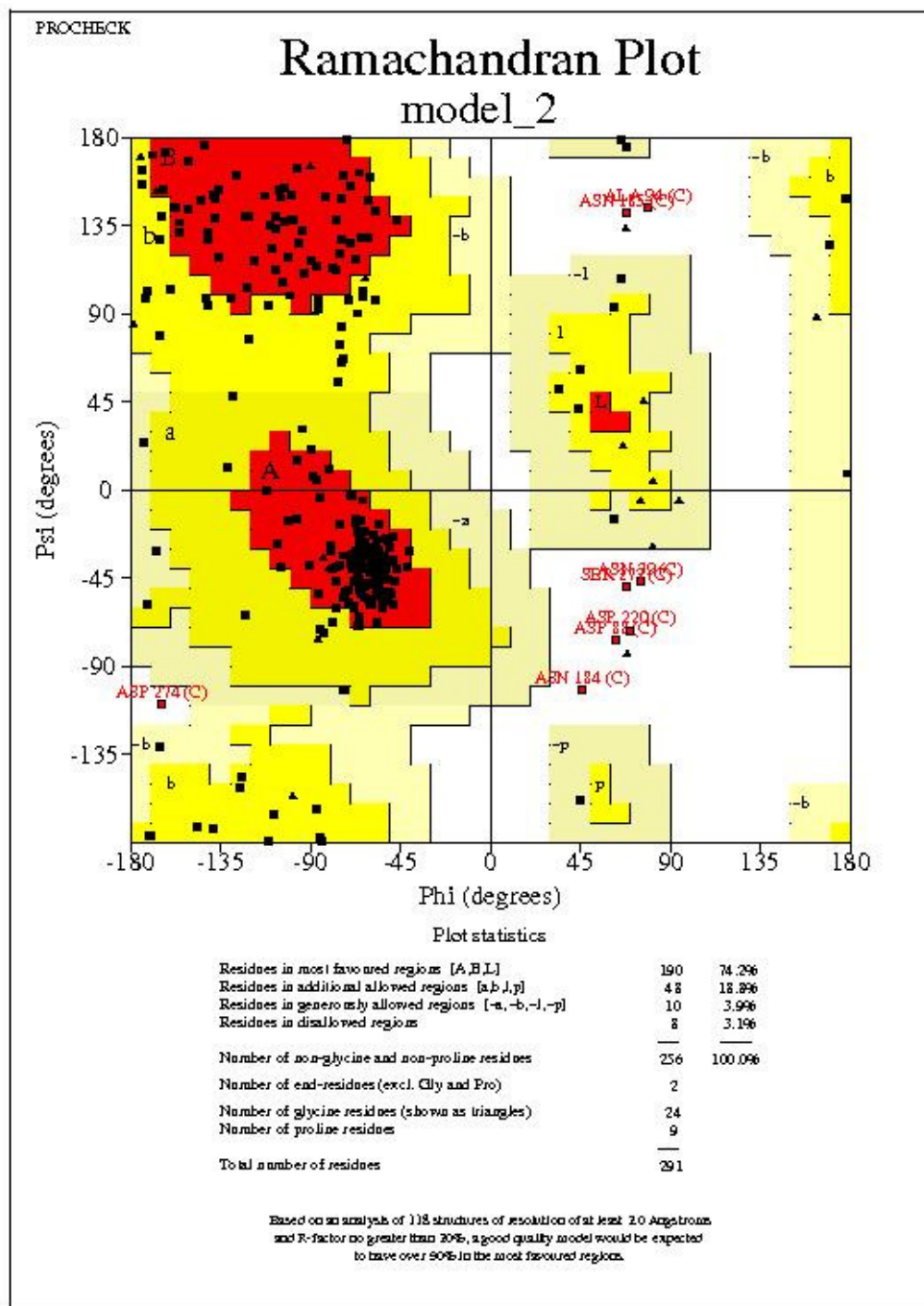
PHD :

Alpha helix	(Hh)	:	132	is	43.28%
3 ₁₀ helix	(Gg)	:	0	is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0	is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0	is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	63	is	20.66%
Beta turn	(Tt)	:	0	is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0	is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	110	is	36.07%
Ambiguous states (?)		:	0	is	0.00%
Other states		:	0	is	0.00%

Sec. Cons. :

Alpha helix	(Hh)	:	125	is	40.98%
3 ₁₀ helix	(Gg)	:	0	is	0.00%
Pi helix	(Ii)	:	0	is	0.00%
Beta bridge	(Bb)	:	0	is	0.00%
Extended strand	(Ee)	:	59	is	19.34%
Beta turn	(Tt)	:	0	is	0.00%
Bend region	(Ss)	:	0	is	0.00%
Random coil	(Cc)	:	119	is	39.02%
Ambiguous states (?)		:	2	is	0.66%
Other states		:	0	is	0.00%

Anexo B: Gráfico de Ramachandran para averiguação do modelo predito.



Anexo C: Espectros de emissão do nanosensor intacto em várias temperaturas. O ensaio foi realizado na ausência de xilose e na presença de diferentes concentrações do açúcar.

