

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIANA PIMENTEL GALHARDO

DESENVOLVIMENTO DE UMA ABORDAGEM DE EVOLUÇÃO SEXUADA EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* BASEADA NA SELEÇÃO DE DIPLÓIDES RECOMBINANTES POR CITOMETRIA DE FLUXO

CAMPINAS

2019

JULIANA PIMENTEL GALHARDO

DESENVOLVIMENTO DE UMA ABORDAGEM DE EVOLUÇÃO SEXUADA EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* BASEADA NA SELEÇÃO DE DIPLÓIDES RECOMBINANTES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de genética de microrganismos.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA JULIANA PIMENTEL GALHARDO E ORIENTADA PELO PROF. DR. GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA.

ORIENTADOR: PROF. DR. GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA

CAMPINAS

Identificação e informações acadêmicas do (a) aluno (a)

- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-5805-2610

- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/1970784538426620

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira – CRB 8/6972

Galhardo, Juliana Pimentel, 1991-

G132d Desenvolvimento de uma abordagem de evolução sexuada em Saccharomyces cerevisiae baseada na seleção de diploides recombinantes por citometria de fluxo / Juliana Pimentel Galhardo. – Campinas, SP :[s.n.], 2019.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Saccharomyces cerevisiae.* 2. Reprodução sexuada. 3. Citometria de fluxo. 4. Bioetanol. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of a sexually evolving approach in Saccharomyces cerevisiae based on selection of recombinant diploid using flow cytometry Palavras-chave em inglês: Saccharomyces cerevisiae Sexual reproduction Flow cytometry Bioethanol Área de concentração: Genética de Microorganismos Títulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador] Patrícia Pereira Coltri Alessandro dos Santos Farias Data da defesa: 29-07-2019 Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 29 de Julho de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Dra. Patricia Pereira Coltri

Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias

Os membros da Comissão Examinadora acima citados assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

Dedico esta dissertação aos meus pais. Por estarem ao meu lado durante toda esta trajetória e por sempre me apoiarem incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desse trabalho foi extremamente desafiador e só foi possível devido ao envolvimento, direto ou indireto, de inúmeras pessoas às quais sou extremamente grata.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira por ter me acolhido no LGE fornecendo toda a estrutura e suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Gleidson Silva Teixeira. Agradeço por toda a confiança em mim depositada e liberdade fornecida. Mas principalmente por ter me proposto o que, até hoje, foi meu maior desafio acadêmico.

Ao Felipe Franco da Rocha, a Janine Schincariol Sabino e ao Fernando Delgado Pretel por toda a paciência ao me ajudar a desbravar a citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. Jun Ishii da Universidade de Kobe por tão gentilmente nos ceder algumas versões de *GFP*.

A Eliane Laranja Dias por ser tão solícita, sempre me ouvindo e me ajudando a enfrentar as burocracias do projeto.

Aos "Filhos do Glei" por caminharem ao meu lado nestes dois anos. Muito obrigada Carla Maneira, Alessandro Coradini, Fellipe Mello e Monique Furlan. Aos meus amigos e companheiros Monique Furlan, Natália Coutouné, Felipe Bisolo, Breno Bandoni, Maurílio Junior, Michelle Alexandrino, Barbara Aliende, Nicholas Vinicius, Guilherme Furlan, Fábio Raya e Mariana Rebouças. Obrigada por me acolherem e estarem sempre ao meu lado à cada banda que não aparecia no gel, mas também por comemorarem toda e qualquer colônia transformada e analise de citometria que funcionava. Obrigada também por moldarem os momentos de lazer conforme as curvas de crescimento das minhas leveduras. Sem vocês não teria sido tão incrível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela excelênci curso e pesquisa o oferecido e também as agências de fomento. À FAPESP pelo financiamento do Projeto Regular (processo 2016/02506-7) ao qual o projeto desenvolvido etava relacionado e ao CNPq (processo 132983/2017-6) por financiar meu projeto.

Mas, acima de tudo, aos meus pais Lia e Rubens, por todo o suporte psicológico e acadêmico. Por me abraçar nos momentos de tensão e por repicarem e contarem colônia de levedura nos momentos de estresse ainda maiores.

RESUMO

A conscientização acerca de questões ambientais aumenta a demanda por combustíveis renovaveis. No cenário da indústria energética brasileira, o bioetanol tem grande destaque e sua demanda cresce anualmente. A produção de etanol depende das leveduras industriais, capazes de manter altos níveis de produtividade e rendimento sob as condições de estresse inerentes ao processo. Neste contexto, o desenvolvimento de linhagens mais adaptadas é uma necessidade contínua para a otimização do processo convencional, bem como para a viabilização econômica de tecnologias emergentes, como o etanol hemicelulósico. Para isto, a evolução adaptativa por reprodução sexuada figura como uma alternativa promissora e complementar à engenharia genética, que acelera a adaptação e permite a combinação de caracteres responsáveis pela robustez observada em diferentes linhagens industriais. Tipicamente, este processo consiste na dissecção de um grande número de tétrades e na análise de muitos segregantes, o que torna o processo extremamente laborioso. Sabe-se que Saccharomyces cerevisiae tem a capacidade de evadir o ciclo meiótico após a ocorrência de eventos de recombinação homóloga, e retomar o ciclo mitótico, gerando células com genoma altamente recombinado, denominada RTG (do inglês, Return to Growth). Por esta razão, este trabalho teve como principal objetivo desenvolver uma abordagem que produza diploides recombinantes sem a necessidade de esporulação; propondo uma metodologia rápida e facilmente aplicada ao estudo e desenvolvimento de leveduras dedicadas à processos industriais. Neste escopo, a expressão transiente de uma versão da proteína repórter GFP foi utilizada como marcador do ciclo celular para seleção de possíveis diploides recombinantes por citometria de fluxo. No período do presente projeto foi possível definir um bom sistema de expressão composto de uma GFP e uma OFP, bem como determinar os FACS gating a serem utilizados na abordagem proposta. No entanto ainda se faz necessário ajustes no que tange a meia vida do GFP.

ABSTRACT

The awareness of environmental issues increases the demand for renewable fuels. In the scenario of the Brazilian energy industry, bioethanol stands out and its demand grows annually. The production of ethanol depends on industrial yeasts, capable of maintaining high levels of productivity and yield under the conditions of stress inherent to the process. In this context, the development of more adapted lineages is a continuous demand for the optimization of the conventional process, as well as for the economic viability of emerging technologies, such as hemicellulosic ethanol. For this, the adaptive evolution through sexual reproduction is a promising and complementary alternative to genetic engineering. This accelerates the adaptation and allows the combination of characters responsible for the robustness observed in different industrial strains. Typically, this process consists of the dissection of a large number of tetrads and the analysis of many segregants, which makes the process extremely laborious. It is known that Saccharomyces cerevisiae has the ability to evade the meiotic cycle after the occurrence of homologous recombination events, and to resume the mitotic cycle, generating cells with highly recombined genomes, called RTG (Return to Growth). For this reason, this work had as main objective to develop an approach that produces recombinant diploids without the need of sporulation; proposing a methodology that is quickly and easily applied to the study and development of yeasts dedicated to industrial processes. In this scope, the transient expression of a GFP was used as a cell cycle marker for the selection of possible recombinant diploids by flow cytometry. During the present work it was possible to define both a good expression system composed of a GFP and an OFP; and the FACS gating to be used on the approach. However adjustments are still necessary regarding GFP's half-life.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Representação dos principais elementos no core de um promotor.	22
Figura 2:	Conservação da estrutura dos cromóforos de proteínas fluorescentes.	24
Figura 3:	Conservação da estrutura terciária das proteínas fluorescentes.	25
Figura 4:	Representação esquemática do sistema óptico de um citômetro de fluxo.	28
Figura 5:	Representação esquemática das técnicas de dissecção de tétrades baseadas em citometria de fluxo.	29
Figura 6:	Demanda de etanol carburante.	31
Figura 7:	Representação esquemática do sistema brasileiro de produção de etano.	32
Figura 8:	Taxa e assinatura molecular da adaptação.	33
Figura 9:	Representação esquemática dos principais eventos da divisão meiótica e da estratégia para obteção de diploides recombinantes por RTG.	35
Figura 10:	Representação esquemática da análise de eficiência do RTG convencional para o híbrido prototrófico JGY_004.	42
Figura 11:	Screening por híbridos diploides gerados para padronização do RTG.	51
Figura 12:	Colônias obtidas após 12 horas de indução à esporulação e 24 horas de recuperação em meio YEPD-ágar a 30°C.	52
Figura 13:	Freqência de indivíduos recombinantes para ao menos um dos <i>loci</i> analisados em função do tempo de indução da esporulação e do tamanho da colônia.	54
Figura 14:	Número de <i>loci</i> recombinados em função do tempo de indução da esporulação para colônias pequenas.	55

Figura 15:	Frequência de diploides recombinantes recuperados por RTG após <i>shift</i> nutricional em placa com pH controlado.	57
Figura 16:	Caracterização fenotípica dos diploides recombinantes (DRs) recolhidos após o <i>RTG</i> .	58
Figura 17:	Confirmação da montagem dos vetores de expressão contendo o gene repórter <i>EGFP</i> .	62
Figura 18:	Confirmação da montagem dos vetores de expressão contendo o gene repórter <i>CyOFP1</i> .	63
Figura 19:	Confirmação da montagem dos vetores de expressão contendo o gene repórter <i>yZsGreen</i> e <i>ymUkG1</i> .	64
Figura 20:	Confirmação da montagem dos vetores de expressão contendo o sistema de coexpressão do <i>ymUkG1</i> e da <i>CyOFP1</i> .	65
Figura 21:	Determinação dos <i>FACS gatting</i> para identificação e coleta de diploides recombinantes.	67
Figura 22:	Análise da funcionalidade dos promotores candidatos por citometria de fluxo.	69
Figura 23:	Verificação da integridade e qualidade da extração de RNA total da linhagem JGY_004 papra os diferentem tempos de análise.	70
Figura 24:	Validação da expressão dos genes candidatos ao longo do ciclo celular mediante análise do RNA total.	71
Figura 25:	Análise da funcionalidade do promotor candidato 2 regulando a expressão da proteína repórter <i>CyOFP1</i> mediante citometria de fluxo.	74
Figura 26:	Resumo dos resultados obtidos por citometria de fluxo para análise das proteínas repórteres candidatas.	77
Figura 27:	Resultados obtidos por citometria de fluxo para definir se a proteína repórter <i>ymUkG1</i> se adequa as necessidades da abordagem proposta.	78
Figura 28:	Ilustração do <i>cassete</i> de expressão para o sistema de coexpressão de duas proteínas repórteres.	79
Figura 29:	Determinação dos <i>FACS gatting</i> para identificação e coleta de diploides recombinantes.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela I.	DNA <i>template</i> utilizado para cada amplificação realizada.	43
Tabela II.	Caracterização de linhagens utilizadas na padronização do RTG convencional.	50
Tabela III.	Relação dos promotores candidatos e função de seus respectivos genes.	60
Tabela IV.	Descrição dos vetores de expressão idealizados no presente projeto.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEST	<i>Barcode Enabled Sequencing of Tetrads</i> – sequenciamento de tétrades por intermédio de códigos de barras
BRE	<i>B Recognition Element</i> – elemento de reconhecimento do TFIIB
CDK1	Cyclin-dependent Kinase 1 (gene)
cDNA	Complementary DNA – DNA complementar
CDS	Coding sequence – sequência codificadora
CyOFP1	Cyan Orange Fluorescent Protein 1 (gene)
DJ-PCR	Double-Joint PCR
DR	Dipóide recombinante
DSB	Double Strand Break – quebra da dupla fita (de DNA)
DsRed	Discosoma Red Fluorescent Protein (gene)
EGFP	Enhanced GFP (gene)
EMS	Ethyl methanesulfonate
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC-A	Fluorescein IsoThioCyanate
FP	Fluorescent protein – proteína fluorescente
FSC	Forward Scatter Light
FSC-A	Forward Scatter Light - Area
FSC-H	Forward Scatter Light - Hight
FT	Fator de Transcrição
GFP	Green Fluorescent Protein – proteína fluorescente verde
GSO	Gleidson Silva Oligo
HFM1	Helicase Family Member gene (gene)

JAY	Juan Argueso Yeast
JGO	Juliana Galhardo Oligo
JGY	Juliana Galhardo Yeast
MATa	Mating type a
ΜΑΤα	Mating type a
MER3	Helicase Family Member 3 (gene)
Mlh1/3	MutL Homolog 1/3 (protein)
mRNA	RNA mensageiro
NHEJ	Non-homologous end-joint
OFP	Orange Fluorescent Protein – proteína fluorescente laranja
ORF	Open Reading Frame – quadro aberto de leitura
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction – reação em cadeia da polymerase
PE-A	PhycoErythrin – Area
PIC	Pre Initiation Complex – complex de pré iniciação
pJG	Plasmid Juliana Galhardo
PMT	Photomultiplier Tube – tubo fotomultiplicador
QTL	Quantitative Trait Loci – locus de característica quantitativa
RNA pol II	RNA Polimerase II
RTG	Return to Growth
SGD	Sccharomyces Genome Database
Sgs1	Slow Growth Suppressor 1 (proteina)
Spo11	SPOrulation11 (proteina)
SPS2	Sporulation Specific 2 (gene)
SSC	Side-Scattered Light
SSC-A	Side-Scattered Light – Area
Swel	Saccharomyces Weel (proteina)
TATAbox	Sequência consenso TATAbox
TBP	TATA binding protein – proteína de ligação à TATA

TSS	Transcription Start Site – sítio de início da transcrição
UTR 3'	UnTranslated Region 3' – região não trandusida 3'
UTR 5'	UnTranslated Region 5' - região não trandusida 5'
UV	UltraVioleta
ymUkG1	Yeast mutated Umi-konoko Green Fluorescent Protein
yZsGreen	Yeast Zoanthus sp. Green Fluorescent Protein

SUMÁRIO

1	INTI	RODUÇÃO	19
2	REV	ISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
	2.1	Unidades fundamentais para expressão gênica em eucariotos	21
	2.2	Utilização de proteínas repórter fluorescentes em estudos de expressão gênica	23
	2.3	Princípios da citometria de fluxo	26
	2.4	Demanda e produção de etanol no cenário nacional	30
	2.5	Vantagens da reprodução sexuada para a adaptação evolutiva em <i>S. cerevisiae</i>	32
	2.6	Produção de diplóides recombinantes empregando reversão meiótica	34
3	JUST	ΓΙFICATIVA	36
4	OBJ	ΕΤΙVOS	38
	4.1	Objetivo geral	38
	4.2	Objetivos específicos	38
5	MAT	ΓΕRIAL E MÉTODOS	39
	5.1	Material Biológico	39
	5.2	Meios de cultivo	39

5.3 Construção e validação de híbridos diploides	40
5.4 RTG convencional	40
5.4.1 Indução da meiose e <i>shift</i> nutricional	40
5.4.2 Análise da eficiência do RTG para o híbrido hemizigoto prototrófico	41
5.5 Implementação da abordagem via citometria de fluxo	42
5.5.1 Montagem dos vetores de expressão	42
5.5.1.1 Síntese de <i>primers</i> para construção dos vetores de expressão	42
5.5.1.2 Reações de amplificação de regiões promotoras, genes e <i>backbon</i>	e. 42
5.5.1.3 Assemble de partes por Double-Joint PCR	43
5.5.1.4 Montagem dos vetores por <i>Gap-Repair</i> em <i>S. cerevisiae</i>	44
5.5.1.5 Transformação de <i>E. Coli</i> por eletroporação	44
5.5.1.6 PCR de colônia	45
5.5.1.7 Extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina	45
5.5.2 Construção de linhagens de <i>S. cerevisiae</i> pelo método de Acetato de Lítio (LiAc)	46
5.5.3 Definição dos parâmetros de análise mediante citometria de fluxo	46
5.6 Extração de RNA total	47
5.7 Síntese de cDNA	48
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1 RTG convencional – padronização da técnica	49
6.1.1 Construção de híbridos diplóides utilizados na padronização do métod	lo. 49
6.1.2 Implementação do RTG e avaliação da eficiência da técnica no híbrido hemizigoto prototrófico	o
6.1.2.1 Frequência de diplóides recombinantes recuperados após o <i>shift</i> nutricional	52
6.1.2.2 Frequência de interações ocorridas para cada evento analisado .	54

	6.1.3	Uso do RTG convencional para obtenção de diplóides recombinantes tolerântes a baixo pH	55
	6.2 Imj	plementação da abordagem via citometria de fluxo	58
	6.2.1	Seleção de promotores candidatos	59
	6.2.2	Construção de vetores de expressão e das linhagens utilizadas nas análises por citometria de fluxo	60
	6.2.3	Análises de citometria de fluxo	66
	6.2.3.1	Determinação dos parâmetros da análise por citômetria de fluxo para vetores de expressão contendo apenas uma variedade de GFP.	66
	6.2.3.2	2 Análise por citometria de fluxo para uso do <i>EGFP</i> como repórter	68
	6.2.3.3	Verificação da expressão dos genes controlados pelos promotores selecionados	70
	6.2.3.4	Análise por citometria de fluxo para o uso do <i>EGFP</i> como repórter.	72
	6.2.3.5	5 Análise por citometria de fluxo para o uso do <i>CyOFP1</i> como repórter	73
	6.2.3.0	6 Análise por citometria de fluxo para o uso das proteínas repórter <i>yZsGreen</i> e <i>ymUkG1</i>	75
	6.2.3.7	7 Implementação de um sistema baseao na coexpressão de duas proteínas repórteres por citometria de fluxo	78
7	CONCL	USÕES	82
8	REFERÍ	ÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
9	ANEXO	S	96
	A Co	mitê de ética	96
	B Dir	eitos autorais	97

1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento das consequências ambientais advindas da utilização dos combustíveis fósseis tem aumentado o interesse mundial pelos biocombustíveis, ou seja, aqueles derivados de matéria-prima renovável [1]. Neste contexto, o bioetanol e o biodiesel representam atualmente os principais biocombustíveis utilizados em todo o mundo, com o primeiro ocupando uma posição de destaque na economia brasileira [2, 3].

Com o advento da biotecnologia, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um organismo modelo para o estudo de mecanismos moleculares em eucariotos [4, 5], se tornou referência para o estudo de genes relacionados a estresses e "plataforma" para o desenvolvimento de "biofábricas" aplicadas à produção de biocombustíveis [6–9] e outros bioprodutos [10–14]. Em especial, leveduras adaptadas às condições industriais (leveduras industriais) têm atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa e empresas de biotecnologia por apresentarem bons desempenhos em condições adversas [15, 16].

Neste contexto, a busca por linhagens naturalmente mais adaptadas, a evolução por adaptação evolutiva, o uso de agentes mutagênicos como EMS (*Ethyl methanesulfonate*) ou a radiação UV, a fusão de protoplastos e a hibridização por cruzamento figuram entre as principais alternativas para o desenvolvimento de linhagens mais adaptadas à condição de interesse (revisado por Steensels e cols.(2014) [17]).

A hibridização por cruzamento, em particular, permite explorar a diversidade natural e combinar em uma mesma linhagem genes responsáveis pela robustez observada em linhagens distintas. Como exemplo, McDonald e cols. (2016) [18] demonstraram que em *S. cerevisiae* a evolução baseada na reprodução sexuada altera a dinâmica molecular da evolução e acelera a adaptação, evitando a fixação de mutações deletérias por "efeito carona", o qual é substancialmente observado na evolução sexuada.

Após a indução da esporulação, haploides de *S. cerevisiae* são tipicamente obtidos pela dissecção manual do asco (tétrade), utilizando micromanipulador acoplado ao microscópio [19]. Esporos podem também ser obtidos aleatoriamente – *random spore analysis* -, abordagem na qual a presença de tétrades é enriquecida pela morte seletiva das células vegetativas por meio de tratamento enzimático [20]. Tong e cols. (2001) [21] demonstraram mais eficiência utilizando marcadores de seleção – dominantes e auxotróficos – regulados por promotores ativos apenas em células haploides. Mais recentemente, ao menos dois métodos de análise de dissecção de tétrades baseados em citometria de fluxo foram desenvolvidos [22, 23]. Em todos os casos, no entanto, o processo é laborioso e requer meses de trabalho dependendo do número de segregantes desejado.

Alternativamente, Laureau e cols. (2016) [24] reportam uma aplicação biotecnológica para uma abordagem que elimina a necessidade de dissecção de tétrades. Esta explora a habilidade de *S. cerevisiae* retornar ao crescimento mitótico após ter passado pela Prófase I da Meiose, processo conhecido como *Return To Growth (RTG)*. Uma vez que células recuperadas são diploides altamente recombinantes, elas podem representar uma alternativa promissora para acelerar o desenvolvimento de linhagens e o entendimento sobre mecanismos moleculares que regulam fenótipos industriais relevantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Unidades fundamentais para expressão gênica em eucariotos

No dogma central da biologia molecular, tem-se que a informação genética contida no DNA é transcrita em uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) e esta é traduzida em uma unidade funcional denominada proteína. Podendo também, haver eventos de replicação do DNA. Neste contexto, é de extrema importância que todas estas etapas sejam devidamente reguladas, tanto no intuito de manter a homeostasia celular, quanto de responder a estímulos exógenos [25, 26]. Aqui será tratado apenas a primeira fase de regulação, abordando a relevância dos promotores na expressão gênica.

De modo geral, a informação genética contida no DNA está disposta em estruturas denominadas genes. Os genes eucariotos são compostos essencialmente de uma *ORF* (do inglês, *Open Reading Frame* – fase aberta de leitura); a qual é flanqueada por duas regiões *UTRs*, uma a 5' e outra a 3' (do inglês, *Untranslated Region* – regiões não traduzidas), e por fim, uma região promotora e outra terminadora.

A caracterização de promotores eucarióticos é relativamente complexa, mas sabe-se que eles podem ser divididos, essencialmente, em duas porções, uma parte denominada *core* e outra promotor regulador [27]. O *core* do promotor, por exemplo, corresponde ao conjunto mínimo de sequências reguladoras necessárias para que ele seja funcional. Estas sequências são relativamente conservadas e indicam onde a maquinaria de trancrição deve ser montada [28]. Sua sequência contém de 100 a 200 nucleotídeos [29, 30] e nela estão inclusas a TATA box e o BRE (do inglês, B Recognition Element, elemento de reconhecimento do TFIIB), comumente referidos como elementos -25 e -35 [27].

Os promotores de *S. cerevisiae* já foram alvo de diversos estudos, principalmente no que tange sua força (se ele é muito ou pouco expresso) [31–35], e também a respeito da

conservação e interação da TATA box com a TBP (do inglês, TATA Binding Protein – proteína de ligação à TATA) [36, 37]. No entanto, além desta, os promotores eucarióticos apresentam outras sequências relevantes em seu *core*. A Figura 1 traz uma representação destas regiões e as relaciona com os resultados obtidos por Lubliner e cols. (2015) [28] a respeito das possíveis características utilizadas na predição tanto de promotores fortes quanto fracos. Adiciona-se à lista de elementos presentes no *core* de um promotor a região PIC (do inglês, *Pre Initiation Complex* – complexo de pré iniciação, sequência em que o complexo de transcrição, contendo a RNA polimerase II – RNApol II se forma); a região de *scanning*, onde a RNA pol II busca pelo sitio de início de transcrição, e por fim o TSS (do inglês, *Transcription Start Site* – sitio de início de transcrição).



Figura 1: **Representação dos principais elementos no** *core* **de um promotor**. A estrutura básica do *core* de um promotor resume-se a 4 elementos primordiais: (i) TATAbox, (ii) PIC, (iii) sequência de scanning e (iv) TSS (sequência de iniciação). A maquinaria de transcrição começa a se formar com a ligação do FT (fator de transcrição) TBP (do inglês, *TATA Binding Protein* – proteína de ligação ao TATA) à sequência TATA, a partir dela os demais FTs são recrutados e a maquinaria, já completa (contendo, inclusive a RNApol II) é formada na região PIC. A RNApol II passa a buscar, *downstream* no promotor pela sequência iniciadora (TSS). Na figura, são destacadas as composições de nucleotídeos para cada uma das estruturas do *core*, para que se obtenha promotores de alta ou baixa atividade (representados em laranja e azul, respectivamente). [Adaptado de Lubliner e cols. (2015) [28]].

Por sua vez, a porção dita "reguladora" de um promotor localiza-se *upstream* do *core* e nela é possível encontrar diferentes combinações de sequências regulatórias, dentre as mais comuns distacam-se a CAAT box, o GC box e o Elemento Octâmero [27]. A combinação do número de cópias e posicionamento de uma ou mais destas sequências consenso é unica e inerente à cada promotor, conferindo-lhe a especificidade necessária para a regulação fina da expressão gênica ao longo do ciclo celular. Proteínas ditas 'ativadoras' são capazes de

reconhecer e se ligar à estas sequências reguladoras e interagir com o aparato basal de transcrição promovendo e aumentando a transcrição.

A presença de uma ampla diversidade de fatores de transcrição e suas respectivas combinações, somado à individualidade de cada promotor, permite uma forte regulação temporal da expressão de cada gene, conforme a necessidade da célula. Estas regiões promotoras, associadas tanto à determinadas funções celulares, quanto à momentos específicos do desenvolvimento, já se mostraram bastante relevantes no desenvolvimento de tecnologias e estudos de base. No que tange o desenvolvimento de técnologias, cita-se a a utilização de promotores específicos regulando proteínas repórteres fluorescentes para marcação de tétrades e haploídes *matting type* específico de *S. cerevisiae* [14, 15, respectivamente].

2.2 Utilização de proteínas repórter fluorescentes em estudos de expressão gênica

Proteínas fluorescentes podem ser bons repórteres para experimentos que envolvem o monitoramento e visualização de eventos intracelulares que demandam resolução temporal e/ou espacial. Conforme revisado por Rostad e cols. (2016) [38], a primeira proteína fluorescente (*FP*, do inglês, *Fluorescent Protein*) foi descrita na década de 1960 por Shimomura e cols (1962) [39], ela foi isolada da água viva *Aequorea victoria* e emitia fluorescência verde, sendo classificada como uma *GFP* (do inglês, *Green Fluorescent Protein* – Proteína Verde Fluorescente).

Desde então, estudos de caracterização estrutural da *GFP* de *A. victoria* permitiram que fossem elucidados os mecanismos que fazem com que essa classe de proteínas seja excitada em um determinado comprimento de onda e emita fluorescência em um comprimento de onda maior. Shimomura e cols. (1979) [40] forneceu o primeiro *insight* e propôs a estrutura do cromóforo para a *GFP*. Em 1993 essa informação foi revisada e aprimorada. Atualmente, sabe-se que o cromóforo corresponde aos aminoácidos *Serina*⁶⁵ – *Tirosina*⁶⁶ – *Glicina*⁶⁷ [41], sendo os resíduos 66 e 67 extremamente conservados dentre todas as *FPs*, independente do seu espectro de emissão (Figura 2) [42, 43].



Figura 2: Conservação da estrutura dos cromóforos de proteínas fluorescentes. É feita a comparação da estrutura do cromóforo de sete FPs distintas, cuja excitação e emissão se dá em diferentes comprimentos de onda. No centro da imagem é possível observar uma representação do espectro de luz e a indicação do pico de excitação de cada molécula. A cor utilizada para destacar cada um dos cromóforos representa seu espectro de emissão. (A) SBPFP2; (B) mEGFP; (C) mKO2; (D) mTurqoise2; (E) SYFP2; (F) mCherry; (G) TagRFP. [Retirado de Noelles e cols. (2017) [44]].

A estrutura terciária das FPs também já foi elucidada e hoje sabe-se que, de um modo geral, todas seguem o padrão da GFP de *A. victoria*, descrito por Ormo e cols. (1996) [45]. Em linhas gerais, as proteínas fluorescentes são compostas por 11 folhas- β dispostas em forma de barril, gerando um interior hidrofóbico, no qual se insere a α -hélice contendo o cromóforo [44]. A Figura 3 exemplifica a conservação da estrutura terciária das proteínas fluorescentes.



Figura 3: Conservação da estrutura terciaria das proteínas fluorescentes. Diagrama de fita de 7 diferentes FPs. A cor das fitas representa o espectro de emissão de cada proteína. No topo de cada representação é apresentado o nome da FP. A primeira representação mostra a face larga do barril; a representação do meio apresenta a face fina e a última traz a vista de cima, deixando aparente as extremidades C e N terminal. [Retirado de Noelles e cols. (2017) [44]].

É interessante ressaltar que todas as proteínas fluorescentes têm ao menos algum grau de tendência a formar oligômeros, sendo necessária a realização de alterações específicas para que elas se mantenham como monômero. A DsRed (*Discosoma Red*), por exemplo, é uma *FP* cuja emissão ocorre na faixa do vermelho (583nm). Ela foi isolada de *Discosoma genus*, e em sua versão selvagem é obrigatoriamente tetrâmera, tanto *in vitro* [46, 47], quanto *in vivo* [46]. Baird e cols. (2000) [46], no intuito de possibilitar estudos de localização intracelular utilizando proteínas que emitam fluorescência em vermelho construiu uma versão dimérica e outra monomérica da DsRed, as quais são obtidas primordialmente por inserção de argininas na interface responsável pela interação dos monômeros [48].

O potencial de implementar o uso das *FPs* em estudos científicos só começou a de fato ser compreendido no início da década de 90, após o sequênciamento e clonagem da *GFP* oriunda de *A. victoria* [49] e, dois anos mais tarde, quando Chalfie e cols. (1994) [50] utilizaram pela primeira vez uma *GFP* como repórter para expressão de genes tanto em organismo procarioto quanto eucarioto (*Escherichia coli* e *Caenorhabditis elegans*, respectivamente).

A maior evidência do potencial científico e biotecnológico das proteínas fluorescentes surge em 2008 com a concessão do prêmio Nobel aos pesquisadores Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Tsien, responsáveis pelo descobrimento da GFP de *A. victoria*, pela demonstração do uso da GFP como um tag de DNA e pelo aumento da paleta de cores de proteínas fluorescentes, respectivamente.

A grande diversidade de cores de FP permite, atualmente, estudos multiparâmétricos e assim, grandes avanços são feitos, seja em pesquisa de base ou aplicada. Nos últimos anos foram feitas descobertas que ajudarão na elucidação de mecanismos até então pouco compreendidos, como os papéis de fatores de transcrição em embriões [51] e mecanismos de exocitose [52]. Já na área da saúde, está sendo realizada a análise de sequências pepitídicas visando um eficiênte sistema de *drug delivery* [53]; e também análises dos granulos formados pela proteína Exo1 na doença de Huntington [54].

2.3 Princípios da citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica bastante robusta que permite ao usuário contar, examinar e recolher eventos específicos de uma suspensão de células, partículas ou componentes celulares (Macey (2007) *apud* Adan e cols. (2017) [55, 56]). Ela é amplamente utilizada em análises biomédicas e em pesquisas de base no que tange a análise e a caracterização celular, tendo também aplicações biotecnológicas.

O princípio básico da citometria de fluxo relaciona-se com a difração do feixe de raios de um laser que incidem sobre uma única célula ou partícula. O tamanho da célula e sua complexidade citoplasmática faz com que os feixes difratem em diferentes angulações e sejam captados por um sistema óptico, gerando uma combinação de sinais única para cada evento [56, 57].

Para possibilitar a análise de eventos de modo individual, o sistema fluídico utiliza o foco hidrodinâmico, este é baseado no princípio da dinâmica de fluidos descrito em 1738 por Bernoulli (revisado por Watson (1999) [58]). Para que o foco hidrodinâmico ocorra corretamente, a amostra é injetada em uma cânula cujo diâmetro sofre constrição próxima ao ponto em que a célula é intersectada pelo feixe de lasers, denominado ponto de indagação.

As análises, propriamente ditas, ocorrem por intermédio dos sistemas óptico e computacional. O primeiro é responsável por gerar e captar os sinais de cada evento. De modo simplificado, o sistema óptico é formado por: (i) um feixe de laser, o qual é orientado por um

prisma até o ponto de indagação; (ii) pelos filtros e espelhos dicroicos, que direcionam e filtram a passagem de comprimentos de onda específicos; e (iii) pelos fotodiodos e PMTs (*Photo Multiplier Tube*, do inglês tubo fotomultiplicador), os quais captam e permitem a quantificação de cada estímulo. Deste modo, quando a amostra passa pelo ponto de indagação ela é interceptada pelo feixe de laser com um comprimento de onda apropriado e este feixe difrata em diferentes angulações em decorrência do tamanho da célula e de sua complexidade citoplasmática (revisado em [57, 59, 60].

A Figura 4 traz uma esquematização do sistema óptico. Dentre os parâmetros comumente utilizados em análises de citometria de fluxo, destacam-se as análises de FSC (do inglês, *Forward Scatter Channel*), SSC (do inglês, *Side Scatter Channel*) e a intensidade de fluorescência.

O FSC corresponde aos feixes difratados em ângulos de até 20° e relacionam-se ao tamanho da célula que passou pelo ponto de indagação. Já o SSC é dado por feixes difratados em ângulos maiores que 20°, estes correspondem à complexidade citoplasmática das células. Por fim, tem-se a intensidade de fluorescência, sua identificação e quantificação dependem da associação de um conjunto de filtros e espelhos dicroicos, estes responsáveis por direcionar determinados comprimentos de onda até um PMT [56, 57, 60].



Figura 4: Representação esquemática do sistema óptico de um citômetro de fluxo. O feixe de laser, do comprimento de onda necessário ao experimento é orientado por prismas [P] até o ponto de indagação; onde é interceptado pelas amostras. Os feixes que difratam em pequenas angulações (até 20°) são captados pelo fotodetector FSC, já os que difratam em maior angulação são captados pelo fotodetector SSC. A fluorescência emitida é filtrada pelos espelhos dicroicos [DM], os quais permitem de de feixes com comprimentos onda específicos. passagem [Adaptado de https://bitesizebio.com/31638/flow-cytometry-optics-system/].

A combinação destes fatores (FSC, SSC e intensidade de fluorescência para comprimentos de onda específicos) geram características únicas para cada evento avaliado e trazem grande relevância para aplicação, não só em estudos de base [61] e aplicações clinicas [62–65], mas também para aplicações industriais [66] e biotecnológicas, nomeadamente em estudos que buscam por QTLs em organismos de interesse industrial (do inglês, *Quantitative Trait Loci* – o qual faz referência a fenótipos que dependem de mais do que um *locus* gênico para serem evidenciados). Dentre as abordagens de citometria de fluxo com escopo na resolução de QTLs, cita-se o trabalho de Ludlow e cols. (2013) [22] e Treusch e cols. (2015) [23].

Ludlow e cols. [22], perceberam a laboriosidade de realizar a dissecção manual de tétrades de *S. cerevisiae* e propuseram uma metodologia de esporulação que permite o rastreio dos quatro haploides irmãos (oriundos de uma mesma tétrade). Nesta abordagem é criada uma biblioteca de plasmídeos contendo a CDS (do inglês, *CoDing Sequence* – sequência codificadora) da *EGFP* fusionada à CDS do gene *SPS2* (SPorulation Specific 2, responsável

pela organização da parede de β -Glucano do esporo), desta maneira, leveduras transformadas com este plasmídeo podem ser esporuladas e as tétrades expressando o *EGFP* são recolhidas por *cell sorting* acoplado à citometria de fluxo. Após lise dos ascos e genotipagem os haploides podem ser identificados pelo *barcode* quanto a sua origem. Com o desenvolvimento desta técnica, o trabalho de 1 mês de dissecção de tétrades foi resumido à 3 horas de citometria de fluxo (Figura 5A).

Já Treusch e cols. [23], sugere uma abordagem de separação de haploides de *S. cerevisiae* mediante uso de um plasmídeo, o qual permite a expressão de duas proteínas repórteres distintas de modo independente baseando-se no *matting type* dos haploides analisados. Deste modo, ele permitiu que fosse realizada a separação de haploides tanto MATa, quanto MATa via citometria de fluxo eliminando tanto a necessidade de dissecar tétrades de modo manual, quanto de genotipar os haploides recolhidos (Figura 5B).



Figura 5: Representação esquemática das técnicas de dissecção de tétrades baseadas em citometria de fluxo. (A) BEST – Barcode Enabled Sequencing of Tetrads [22] e (B) Abordagem proposta por Treusch e cols (2015)[23]. Ambas as aplicações são bastante parecidos nos três primeiros passos e baseiam-se na transformação de uma linhagem diploide com o plasmídeo gerado no respectivo trabalho (1); seguido da indução à esporulação (2) e do recolhimento de eventos de interesse por cell sorting acoplado à citometria de fluxo (3). Em (A) tem-se o recolhimento de tétrades e subsequente dissecção das mesmas. Já em (B), são recolhidos haploides MATa e MATa separadamente.

2.4 Demanda e produção de etanol no cenário nacional.

Em decorrência da primeira crise do petróleo em 1973, o Governo Brasileiro instaurou o Programa Nacional do Álcool (Próalcool) por intermédio do Decreto nº 76.592 (de novembro de 1975). Este, surgiu com objetivo de firmar a segurança energética do país e resultou no maior programa de incentivo ao desenvolvimento e emprego de energia renovável do mundo, unindo pesquisadores e empresários na empreitada de substituir parte da demanda de gasolina pelo etanol [67].

A primeira década do Programa foi bastante frutífera, aumentando a produção de etanol e consequentemente aumentando a porcentagem de etanol na composição da gasolina; a qual passou de 5% (valor mandatório desde 1930) para pouco mais de 20% em 1985 [67, 68]. No entanto, mediante a queda no preço do petróleo e a melhora no cenário internacional do açúcar, o Próalcool ficou estagnado até que foi encerrado em 1990 [69] e só voltou a expandir no início dos anos 2000, mediante aumento de pressões no que tange sustentabilidade e questões ambientais, isso agregado ao lançamento dos carros *flex-fuel* em 2003 [70].

O advento dos carros *flex-fuel* tornou o etanol carburante uma realidade no país e hoje compõem a maior parte de nossa frota veicular. A Empresa de Pesquisa Energética (EPE), em conjunto com o Ministério de Minas e Energia do Brasil divulgam anualmente um "Plano Decenal de Expansão de Energia" [3, 71]. Em 2018 foi lançado o plano referente ao planejamento e as expectativas de crescimento da demanda de etanol carburante para o período compreendido entre 2018 e 2027, nele, dados históricos apontam que, em 2017 o Brasil consumiu 27 bilhões de litros de etanol carburante e considerando a perspectiva menos otimista esta demanda será, em 2030, de 38 bilhões de litros (aproximadamente 40% maior do que a atual) (Figura 6).



Figura 6: Demanda de Etanol Carburante. Previsão decenal da demanda brasileira de etanol carburante calculada pela Empresa de Pesquisa Energética e apresentada em conjunto com o Ministério de Minas e Energia Brasileiro em 2017. [Retirado do Plano Decenal 2027, EPE (2017) [72]].

A perspectiva do aumento na demanda do etanol para os próximos anos requer que sejam feitas melhorias no sistema de produção, tanto no que tange o aumento da produtividade da biomassa, quanto no aumento da eficiência e produtividade da *S. cerevisiae* ao longo do processo de fermentação.

O processo de produção de etanol brasileiro é bastante peculiar e oferece alguns desafios para as leveduras que perfazem a fermentação. A Figura 7 apresenta, em linhas gerais, nosso sistema de produção. Inicialmente a cana de açúcar é recolhida e levada para a moagem, gerando suco e melaço de cana de açúcar. Estes são clarificados e encaminhados às dornas de fermentação. Na dorna, junto ao substrato, são adicionadas as leveduras (*S. cerevisiae*). Tipicamente, a safra brasileira é iniciada com um inóculo misto, contendo grande porcentagem de uma linhagem denominada *starter*, comumente uma levedura de fermentação de pão e associado à ela, adiciona-se porcentagens menores de leveduras ditas industriais, as quais são mais robustas e tem capacidade de fermentar mesmo sob os estresses inerentes ao sistema produtivo [73, 74]. Por fim, após o processo fermentativo, o vinho, produto da fermentação, é separado da massa de leveduras por centrifugação e é encaminhado aos destiladores.

É de grande importância ressaltar que nosso processo não é estéril, permitindo que microrganismos (nomeadamente bactérias lácticas) oriundos da biomassa, ou mesmo presentes na dorna, contaminem o processo fermentativo [75]. Deste modo, como solução a este problema, foi adotado no Brasil, um sistema de reciclo de leveduras. Após encaminhar o vinho ao sistema de destilação, as leveduras são recuperadas e encaminhadas ao processo de reciclo, o qual ocorre mediante tratamento dos microrganismos com ácido sulfúrico (pH e 1,8 -2,5) [73, 76].



Figura 7: Representação esquemática do sistema brasileiro de produção de etanol. A cana é transportada à usina e passa por uma etapa de moagem (A). Em seguida o suco proveniente da moagem é clarificado e passa a ser chamado de mosto. Este é conduzido à dorna de fermentação, onde são adicionadas as leveduras e é iniciado o processo fermentativo (B). Ao fim da fermentação o vinho (produto da fermentação) é separado das leveduras por centrifugação e encaminhado aos destiladores (C). Inerente ao processo brasileiro de fermentação, é realizado o processo de reciclo das leveduras (D). Nesta etapa a massa de microrganismos obtida por centrifugação passa por um tratamento com ácido sulfúrico (pH 1,8 à 2,5), no intuito de eliminar a contaminação por bactérias; e em seguida é reinoculada na próxima batelada.

2.5 Vantagens da reprodução sexuada para a adaptação evolutiva em S. cerevisiae

A diversidade genética pode ser gerada pelo surgimento de mutações *de novo* (não relacionadas à meiose), mas é derivada principalmente de eventos de reprodução sexuada. Estes recombinam a informação genética previamente existente nas gerações parentais e permitem que novas características sejam estabelecidas [77].

Em 1904 Weismann [78] publicou a hipótese de que a evolução sexuada permite que a seleção natural seja mais ativa. Apesar da teoria de Wismann ser amplamente aceita, existem

estudos que demostram a ocorrência de evolução adaptativa por meio da reprodução assexuada [79–83]. Neste contexto, Kao e Sherlock (2008) [80] fizeram a primeira caracterização molecular da evolução assexuada em *S. cerevisiae*. Em resumo, os autores concluíram que a ocorrência da interferência clonal, definida como a competição de mutações benéficas em organismos distintos de uma população de padrão reprodutivo assexuado, é essencial para a evolução de uma população em desenvolvimento mitótico. Por outro lado, presume-se que isto pode ser também um fator determinante para a reduzida taxa de evolução observada.

Em relação ao papel da reprodução sexuada sobre a evolução, Goddard e cols. (2005) [84] demostraram um aumento na taxa de adaptação em relação à reprodução assexuada para *S. cerevisiae*. Além disso, McDonald e cols. (2016) [18] comprovaram recentemente que populações com reprodução sexuada desfazem a dupla carga genética das mutações deletérias, que tipicamente se valem do "efeito carona" e consequentemente altera a dinâmica molecular da evolução e acelera a adaptação. Os autores avaliaram 1.000 gerações de populações sob crescimento mitótico ou meiótico e confirmaram maior aumento do fitness de populações evoluindo sexualmente (Figura 8A). Analisando as mutações fixadas em cada população, observaram que durante a reprodução sexuada menos mutações são fixadas, prevalecendo as não-sinônimas (Figura 8B), sugerindo que a seleção natural atua de modo mais eficiente neste padrão de evolução.



Figura 8: Taxa e assinatura molecular da adaptação. A. Aumento do fitness após 1.000 gerações para as populações submetidas à evolução assexuada e sexuada. Notar maior aumento do fitness para a população sexualmente evoluída. **B.** Quantificação das mutações ocorridas nas populações sob evolução assexuada e sexuada. Notar que na evolução sexuada menos mutações são fixadas, prevalecendo as não-sinônimas. (Adaptado de McDonald e cols. (2016) [18]).

2.6 Produção de diploides recombinantes empregando reversão meiótica

Linhagens diploides de *S. cerevisiae* dispõem de dois padrões de crescimento. Quando em condições nutricionais ótimas, ou seja, quando há fontes de carbono e nitrogênio, elas apresentam reprodução clonal mediada por um ciclo reprodutivo mitótico (brotamento). Já quando submetidas a estresse elas iniciam o ciclo meiótico típico, que culmina na esporulação, ou seja, divisão da célula mãe e subsequente formação de quatro haploides confinados em um asco, estrutura comumente referida como tétrade [85].

Na esporulação ocorre a duplicação do material gênico durante a interfase, seguido da segregação dos cromossomos homólogos (divisão equacional ou Meiose I), subsequente separação das cromátides irmãs (divisão reducional ou Meiose II) e formação da tétrade [85]. Em especial, a Prófase I da Meiose é caracterizada pelo elevado número de eventos de recombinações entre cromossomos homólogos. Estes eventos iniciam com a ocorrência de quebras da dupla fita do DNA (DSBs, do inglês *Double-Strand Breaks*), mediadas por Spo11 (*SPOrulation*) [86–88].

Os DSBs podem resultar tanto na formação de eventos de *crossover*, quanto na não ocorrência de *crossover* [89, 90]. Estes são altamente regulados em termos genéticos, sendo controlados por fatores que decidem a posição de quebra no DNA ou medeiam o processamento das recombinações (revisado por Youds e Boulton (2011) [90]). Neste processo, destacam-se proteínas que se ligam ao DNA como a Mlh1/3 (*MutL Homolog*) e a helicase Mer3, também denominada Hfm1 (*Helicase Family Member*) e Sgs1 (*Slow Growth Suppressor*). Após a ocorrência de DSBs, eucariotos são capazes de reparar o dano mediante recombinação homóloga ou pela junção de extremidades não homólogas – *non-homologous end-joint* (*NHEJ*) – ainda na fase G2 da intérfase [91, 92].

Embora os eventos DSBs e *crossover* mediados por Spo11 sejam característicos da Meiose I, em *S. cerevisiae* a progressão da divisão pode ser interrompida mediante um *shift* nutricional, fazendo com que as células retomem seu ciclo de divisão mitótico [24, 93]. Esta habilidade é conhecida como *Return to Growth* (RTG). No entanto, ela deve acontecer, impreterivelmente até o final da Prófase I, precedendo o momento denominado ponto de irreversibilidade, após o qual as células se comprometem a finalizar a meiose [87, 94]. A Figura 9 traz uma representação dos principais eventos da divisão meiótica e da estratégia para obtenção de diploides recombinantes por RTG.



Figura 9: Representação esquemática dos principais eventos da divisão meiótica e da estratégia para obtenção de diploides recombinantes por RTG. A. Haploides são combinados por cruzamento para se obter o diploide híbrido de interesse. B. Células diploides são transferidas para meio de esporulação que induz a divisão meiótica. C. Após a Prófase I da Meiose – etapa do ciclo celular onde ocorre *crossover* – células são transferidas para meio de cultura padrão (shift nutricional). Estas, cessam a meiose e retornam ao crescimento por mitose. Notar que diploides recuperados após RTG são híbridos recombinantes, geneticamente distintos dos parentais haploides e diploide.

O RTG é possível devido ao controle negativo exercido pela quinase Swel (*Saccharomyces* Wee1) sobre a proteína Cdk1 (*Cyclin-dependente kinase*) [94, 95]. Segundo Liu e Wang (2006) [95], a Cdk1 está associada à replicação do DNA e à segregação dos cromossomos homólogos, tendo seu pico de expressão entre a intérfase e a Meiose. Assim, a regulação negativa de Swe1 em Cdk1 após o *shift* nutricional evita que sejam formadas células multinucleadas e permite o brotamento [87]. Após ocorrência do RTG a "célula mãe" pode ou não ter sofrido *crossover*. Esta terá um genoma 4C que irá segregar equacionalmente, distribuindo aleatoriamente duas cromátides possivelmente recombinadas entre a "célula mãe" e a "células filha" (broto diploide). Após o brotamento, tem-se duas células diploides altamente recombinantes [24] (Figura 9C).

Ao menos cinco estudos já demonstraram que é possível obter diploides recombinantes para um, dois ou quatro *loci* por meio do RTG [87, 96] [93, 97] [24]. Recentemente, foi demonstrada a aplicação do RTG para fins biotecnológicos. Neste contexto, Laureau e cols. (2016) [24] utilizam *rounds* subsequentes de RTG em uma mesma linhagem no intuito de reduzir a heterozigosidade e permitir o estudos de QTLs, sem a necessidade da dissecção de tétrades.

3 JUSTIFICATIVA

Dado que processos industriais incluem diversos fatores de estresse que prejudicam o rendimento e/ou produtividade da etapa fermentativa, o emprego de leveduras mais bem adaptadas tem potencial de conceder ganhos indiretos na produtividade. Neste cenário, linhagens resistentes a baixos pH podem reduzir custos operacionais na indústria de etanol de primeira geração. Por exemplo, uma levedura com alta produtividade de etanol capaz de se manter viável após os inúmeros reciclos representaria maior rendimento ao longo de toda uma safra. O mesmo benefício poderia ser obtido para linhagens utilizadas na produção de etanol de segunda geração, as quais precisam de uma robustez adicional, dado que são inseridas em meio repleto de inibidores provenientes do pré-tratamento da biomassa.

Como uma alternativa à engenharia genética a evolução adaptativa em laboratório é uma abordagem muito promissora para acelerar o processo de obtenção de linhagens mais bem adaptadas às condições industriais. Em *S. cerevisiae* esta pode ser conduzida tanto mediante reprodução assexuada quanto sexuada, sendo o segundo método mais eficiente por alterar a dinâmica molecular da evolução em decorrência das mudanças nas taxas de mutações fixadas, e consequentemente, aumentando a taxa de adaptação [18, 84].

Em geral, a abordagem de evolução sexuada depende da obtenção e análise de haploides, seleção dos que melhor representam seus respectivos parentais diploides e cruzamento entre eles. Para isto, são necessárias ao menos cinco etapas: (i) indução da esporulação do diploide; (ii) dissecção de tétrades; (iii) fenotipagem dos haploides; (iv) cruzamento e (v) fenotipagem dos novos diploides [19, 98].

Destas, as etapas (ii) e (iii) merecem atenção por serem significativamente laboriosas e dificultarem a aplicação da evolução por reprodução sexuada. Apesar de existirem abordagens de obtenção e dissecção de tétrades em larga escala utilizando citometria de fluxo [22, 23], estas são suscetíveis a pequenas diferenças morfológicas, taxas de esporulação e/ou viabilidade dos esporos observada entre linhagens [24, 99, 100]. Por essa razão, dependem de
um longo período de padronização (resultados preliminares dos projetos FAPESP 2016/02506-7 e 2014/26719-4, os quais tem por objetivo aprimorar as técnicas implementadas por Ludlow e cols. (2013) [22] e Treusch e cols. (2015) [23]).

Por outro lado, a obtenção de haploides que representam melhor o diploide parental pode depender da análise de centenas à milhares de segregantes. Isto se deve ao fato de que a maioria dos fenótipos observados em populações naturais são características quantitativas, ou seja, controlados por alelos de diversos genes organizados em regiões denominadas QTLs [101].

Neste contexto, a proposta de aplicação do RTG como ferramenta para a evolução sexuada elimina as duas etapas mais laboriosas e resume-se em: (i) indução da esporulação do diploide; (ii) reversão da meiose por *shift* nutricional e (iii) testes dos novos diploides. No entanto, é importante considerar que para se obter um número significativo de diploides recombinantes o *shift* nutricional deve ocorrer no momento em que a maioria das células encontram-se na Prófase I da Meiose. Embora Laureau e cols. (2016) [24] tenham estabelecido 5-7 horas como tempo ideal para a reversão da meiose do híbrido estudado (SK1 x s288c), é bem conhecido que a transição entre as fases do ciclo celular é consideravelmente variável entre diferentes linhagens de *S. cerevisiae* [102–104], sugerindo a necessidade de caracterização prévia do ciclo meiótico para cada diploide que pretende-se evoluir. O que, de fato, inviabilizaria a aplicação desse método.

O emprego da citometria de fluxo na análise e coleta de células expressando a proteína repórter durante a Prófase I da Meiose elimina a necessidade de padronização do momento ideal para reversão do ciclo, uma vez que não há limite para o número de células analisadas em citômetro de fluxo. Além disso, garante que o *shift* nutricional seja aplicado apenas em células que já realizaram recombinação e ainda não avançaram irreversivelmente para o fim da meiose, eliminando contaminação por diploides não recombinantes e/ou células que já passaram do ponto de comprometimento.

Uma vez estabelecida, a aplicação da proposta – referida como *RTGeasy* – na evolução sexuada de *S. cerevisiae* irá contribuir significativamente para o contínuo estudo e desenvolvimento de leveduras industriais, aplicadas à protudção de bioetanol e de outros bioprodutos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Este projeto teve como principal objetivo desenvolver uma ferramenta que possibilite, a partir de culturas heterogêneas, distinguir, selecionar e coletar diploides recombinantes gerados por RTG. Com isto, pretendia-se estabelecer uma metodologia simples, rápida e facilmente aplicada ao estudo e desenvolvimento de leveduras utilizadas em processos industriais. A proposta baseia-se na indução da expressão do repórter GFP durante Prófase I da Meiose e no emprego da citometria de fluxo para separação e coleta de possíveis diploides recombinantes.

4.2 Objetivos específicos

- A. Selecionar regiões promotoras de genes, preferencialmente, codificantes para proteínas envolvidas direta ou indiretamente na recombinação homóloga (regulação, quebra ou reparo do DNA);
- B. Construir vetores contendo a CDS do gene repórter GFP fusionado ao terminador *CYC1* e a cada promotor selecionado;
- C. Transformar o híbrido JAY x CEN.PK, hemizigoto para os *loci* de interesse e estabelecer parâmetros de citometria de fluxo (FACS *gatting*) para separação e coleta de células expressando o repórter GFP;
- D. Padronizar protocolo de indução do RTG pela análise da ocorrência de diploides auxotróficos para uracila, triptofano, histidina e leucina derivados do híbrido JAY x CEN.PK;
- E. Coletar eventos de interesse por citometria de fluxo e avaliar a eficiência de recolhimento de diplóides recombinantes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material biológico

Foram utilizadas 7 linhagens de *S. cerevisiae*: os haploides JAY289 (*MATa*; prototrófica), JAY290 (*MATa*, prototrófica), CEN.PK2-1D (*MATa*; ura3-52; trp1-289; leu2-3; his3 $\Delta 1$), ACY_503c (derivado de PE-2 e pH tolerante – presente na coleção do Laboratório de Genômica e Bioenergia¹); os híbridos diploide JGY_004 (JAY289 x CEN.PK2-1D – *MATa/MATa URA3/ura3-52; TRP1/trp1-289; LEU2/leu2-3,112; HIS3/his3\Delta 1*); JGY_016 (ACY_503c x CEN.PK2-1D – pH tolerante); e o diploide JP-1. A cepa de *Escherichia coli* DH10 β foi utilizada em procedimentos de clonagem.

5.2 Meios de cultivo

O meio de cultura YEPD [10 g/L extrato de levedura; 20 g/L peptona; 20 g/L glicose] foi utilizado para propagar levedura. Para a indução da esporulação foi utilizado o meio de pré-esporulação SPS [5 g/L extrato de levedura; 10 g/L Peptona; 1,7 g/L Yeast Synthetic Drop-out; 0,05 M hidrogenoftalato de potássio; 10 g/L de acetato de potássio; 5 g/L de sulfato de amónio] e o meio de esporulação SM [10 g/L acetato de potássio; e suplementação de aminoácidos necessários], como descrito por Borde e cols. (2009) [105]. Ensaios que envolveram tolerância a pH foram realizados em meio YEPD com pH ajustado mediante uso de ácido sulfúrico para os pH 2,0 (\pm 0,2), pH1,9 (\pm 0,2) e pH 1,75 (\pm 0,2). O cultivo de bactérias foi realizado em meio LB [10 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 10 g/L NaCl]. Quando necessário foi adicionado ágar (15-20 g/L) e antibióticos apropriados para seleção de transformantes (200 µg/mL de geneticina; 100 µg/mL de ampicilina).

5.3 Construção e validação de híbridos diploides

Células de ambas as linhagens haploides de interesse foram cultivadas em meio YEPD sólido. A partir de colônias isoladas, foi feita uma suspensão em aproximadamente 500 μ L de água destilada estéril contendo uma colônia de cada linhagem. Aproximadamente 10 μ L da suspensão foi depositada em meio YEPD sólido e incubada *overnight* a 30°C. Colônias foram isoladas a partir do *spot* de células e verificadas quanto ao *matting type* (MATa/ α) por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, do inglês – reação em cadeia da polimerase), conforme descrito por Huxley e cols. 1990 [106].

A reação de PCR foi conduzida com aproximadamente 200 ng de DNA genômico; 0,3 pmol do primer GSO_009 – comum ao MATa e ao MATa; 0,2 pmol do primer GSO_010 – específico para MATa; 0,2 pmol do primer GSO_011 – específico para MATa; 1X Buffer; 0,2mM de cada dNTP; 4 mM de MgCl₂ e 0,6 U de GoTaq DNA Polymerase (Promega). Em geral foi utilizado seguinte programa (95°C 1m; 35X 95°C 30s/ 55°C 30s / 72°C 30s; 72°C 10m): . O resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1,5%; sendo esperadas bandas de 544bp e 404bp referentes ao MATa e ao MATa respectivamente.

5.4 RTG convencional

5.4.1 Indução da meiose e shift nutricional

Tanto as padronizações do *RTG* convencional, quanto as análises de citometria de fluxo e de expressão gênica tiveram o cultivo e indução da esporulação realizados tal qual os procedimentos descritos por Laureau e cols. (2016) [24]. Em resumo, células foram propagadas em 5 mL de YEPD a 30°C e agitação vigorosa (250 rpm). Volume suficiente da cultura foi transferido para 2,2mL de meio SPS, de modo que a concentração final fosse de 10⁵ células/mL e cultivadas a 30°C (250rpm) até atingir concentração de 2-4x10⁷ células/mL. Por fim, as células foram lavadas com PBS 1X, transferidas para meio de esporulação (SM) e mantidas a 30°C (250rpm) pelo tempo necessário para cada experimento. Após o tempo de indução da esporulação inerente á cada experimento proposto, células foram submetidas ao *shift nutricional* sendo o volume necessário da cultura plaqueado em meio YEPD sólido (também referido como "meio rico").

A detecção do melhor tempo de indução foi aferido pela análise de dois fatores: (i) a taxa de diploides recombinantes recolhidos; e (ii) o número de marcas auxotróficas recombinandas em um mesmo indivíduo. Deste modo, era esperado identificar, por intermédio da seleção negativa de diploides recombinantes, o melhor tempo de indução à esporulação para o híbrido JGY 004.

5.4.2 Análise da eficiência do RTG para o híbrido hemizigoto prototrófico

Resumidamente, a linhagem hemizigota foi propagada em meio rico e depois foi induzida à esporulação por 6, 10, 12 e 24 horas, conforme explicado na sessão anterior e indicado na Figura 10A. Após a indução à esporulação, foi medida a absorbância da cultura em espectrofotômetro, e a cultura foi diluída para que fosse possível submeter aproximadamente 1000 indivíduos ao shift nutricional em meio YEPD sólido. Estes foram recuperados por 48 horas em estufa 30°C (Figura 10B). Quando possível, as colônias recuperadas foram classificadas quanto ao seu tamanho, sendo consideradas colônias pequenas as de até 1 mm de diâmetro e grandes as com ao menos 2 mm de diâmetro. Estas foram repicadas em placa de micro cultivo (96 well) contendo 150uL de meio YEPD e propagadas *overnight* a 30°C para que fossem realizadas as análises subsequentes (Figura 10C).

A taxa de diploides recombinantes foi analisada mediante identificação de indivíduos que perderam a capacidade de crescer em meio YNB sem a complementação de uracila, leucina, histidina e triptofano (indicado pelo termo *drop4*). Deste modo, as culturas propagadas em placa de micro cultivo na etapa anterior foram carimbadas em placa *drop4* e replicadas em placa contendo meio YEPD, esta utilizada como controle positivo de transferência de células (Figura 10D).

Das colônias analisadas na etapa anterior, as que se mostraram auxotróficas em meio *drop4* foram repicadas e propagadas em novas placas de micro cultivo para que pudessem ser analisadas individualmente quanto a cada um dos *loci*. Após propagadas as culturas foram analisadas em quatro versões do meio YNB sólido, cada uma destas versões sem a suplementação de um dos componentes analisados. A comparação de presença e ausência de crescimento para cada um dos aminoácidos foi contabilizada e as frequências de recombinação para cada um dos *loci* estabelecida.



Figura 10: Representação esquemática da análise de eficiência do RTG convencional para o híbrido prototrófico JGY_004. Após etapas de propagação (YEPD) e pré esporulação (SPS) a linhagem prototrófica para os quatro *loci* em análise foi induzida a esporulação em meio SM por 6, 10, 12, 24 horas (A). Ao fim do período de indução, é realizado o shift nutricional mediante dispersão de células em meio YEPD ágar (aproximadamente 1000 indivíduos) (B). Colônias geradas foram repicadas em placa 96 well e propagadas em meio YEPD por 16 horas a 30°C (C). Em ensaio de *replica plate* foi realizado o *screening* por linhagens que perderam a capacidade de crescer em meio mínimo sem suplementação de uracila, leucina, histidina e triptofano (D). As linhagens que se tornaram auxotróficas para ao menos um dos fatores foram propagadas em nova placa 96 well (E) e posteriormente analisadas para perda de auxotrofia para cada um dos *loci* (F). [Figura gerada com imagens da Servier licenciada sob os termos de "Creative Commons Attribution 3.0 Unported License" - https://smart.servier.com]

5.5 Implementação da abordagem via citometria de fluxo

5.5.1 Montagem dos vetores de expressão

5.5.1.1 Síntese de primers para construção dos vetores de expressão

Todos os primers foram construídos e/ou analisados utilizando o software *Primer3* plus (http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi). As sequências de referência dos genes repórteres *EGFP* e *CyOFP1* foram obtidas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) - U73901.1 e KU530233.1, respectivamente. A sequência de referência dos genes repórteres *yZsGreen* e *ymUkG1* foram obtidas no trabalho de Kashima e cols. (2016) [107]. A sequência dos promotores candidatos, bem como dos genes por eles regulados, foram obtidas no *Saccharomyces Genome Database* (SGD http://www.yeastgenome.org/).

5.5.1.2 Reações de amplificação de regiões promotoras, genes e backbones

Todas as reações de PCR relacionadas à montagem dos vetores de expressão foram realizadas com a enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase seguindo as intruções do fabriacante (NEB – New England Biotechs). As reações foram realizadas em 1X Phusion HF

Buffer; 0,2 - 0,5 μM primers, 200 μM dNTPs; 1U Phusion DNA Polymerase e 10-100 ng de DNA template. Em geral foi utilizado seguinte programa (98°C 30s; 35X 98°C 10s/ Tm 30s / 72°C 20s por Kb; 72°C 10m).

Como alternativas de padronização pode ter sido realizada: (i) adição de DMSO (concentração final máxima 3%); (ii) Redução do *ramp* de anelamento para até 15% em reações com baixo rendimento; (iii) redução na concentração final de enzima e *primers* e (iv) aumento da temperatura de anelamento para reações com amplificação de bandas inespecíficas. A Tabela I resume os DNA *templates* utilizados para cada amplificação realizada.

Amplicon	DNA template
Backbone	pMF_004 (FAPES P2016/12852-0)
EGFP*	pCLBC2 [22]
CyOFP1	pMF_004 (FAPES P2016/12852-0)
yZsGreen**	pGK416-yZsGreen [107]
ymUKG1**	pGK416-ymUkG1 [107]
Promotores	DNA genômico BY4741
Terminador CYC1	DNA genômico BY4741
Promotor SPS2 fusionado à CDS de SPS2*	pCLBC2 [22]
<i>CyOFP1</i> regulado pelo terminador IDP1	pMF_004 (FAPES P2016/12852-0)

Tabela I: DNA template utilizado para cada amplificação realizada.

*Gentilmente cedido pela Profa. Dra. Aimeé Dudley (Institute for Systems Biology, Seattle, Estados Unidos da América).

**Gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Jun Ishii (Kobe University, Japão).

5.5.1.3 Assemble de partes por Double Joint – PCR

A fusão das regiões promotoras e CDS foram realizados com base na técnica *Double Joint-PCR* [108]. Em resumo, o procedimento consiste de três etapas: (i) amplificação dos fragmentos de interesse, inserindo homologia entre eles [Round1]; (ii) fusão e extensão dos fragmentos de interesse mediante uma fase de anelamento [Round2] e (iii) amplificação do produto da montagem do Round 2 [Round3].

As reações de PCR do Round 1 foram realizadas conforme descrito na seção 5.5.1.2, sendo que aos *primers* reverso do primeiro fragmento foram acrescidos de uma região de aproximadamente 25bp (pares de base) de homologia a CDS do gene repórter. O Round 2 foi conduzido sem *primers* e com o seguinte ciclo (94°C 2m; 15X 94°C 30s/ 58°C 10m / 72°C 5m; 72°C 10m). O Round 3 foi feito por uma reação de PCR normal com os primers externos da montagem e em seguida foi realizada uma análise do produto de amplificação por elétroforese em gel de agarose sendo a banda de interesse excisada e purificada.

5.5.1.4 Montagem dos vetores por Gap-Repair em S. cerevisiae

A montagem dos *cassetes* foi feita de acordo com os procedimentos descritos por Ma e cols (1987) [109] e adaptado por Kuijipers e cols (2013) [110]. Em resumo, as partes foram amplificadas com *primers* apropriados contendo homologia ao fragmento subsequente. Após essa etapa, utilizou-se quantidades "equimolares" dos produtos de PCR e plasmídeos linearizados para transformação da linhagem JAY289, pelo método de transformação de leveduras com acetato de lítio (LiAc) – descrito por Bimboim e Doly (1979) [111] e descrito no método 5.5.2. Possíveis transformantes contendo o plasmídeo foram selecionados em meio YEPD sólido acrescido de 200mg/mL de geneticina. O DNA total foi então extraído de um *pool* de colônias e transformado em *E. coli* para posterior *screening* dos plasmídeos corretamente montados.

5.5.1.5 Transformação de *E. coli* por eletroporação.

Para os procedimentos que envolveram a transformação de *E. coli* foi utilizada a linhagem eletrocompetente *DH10β*. Geralmente, 250 mL de cultura (OD600 0,35-0,4) – suficiente para dez preparações - foi centrifugado em tubos tipo falcon de 50 mL a 1.500x g por 15 min a 4°C. O pellete foi lavado com água *MilliQ* estéril duas vezes e, em seguida, ressuspendido em água *MilliQ* para um volume final de 500µL. Em um tubo eppendorf 1,5 mL o DNA de interesse foi adicionado a 50µL de suspensão de células. Para a eletroporação,

foram utilizadas cubetas de 2mm utilizando o Gene Pulser Xcell Electroporation System BioRad® com parâmetros ajustados para *E. coli* (C=25 μ F; PC=200ohm; V=2.5kV). Células foram recuperadas em 1 mL de meio LB e mantidas à 37°C por 1h. 50-200 μ L foram plaqueados em meio LB acrescido de Ampicilina e as placas foram incubadas à 37°C por 14-16h (*overnight*).

5.5.1.6 PCR de colônia

As verificações de montagem dos vetores pJG_001-011 e pJG_017-018 foram feitas por *PCR* de colônia com a enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) conforme as instruções do fabricante. Cada reação foi composta de 1X GoTaq Flexi Buffer, 1mM MgCl2, 0,2-0,5µM de cada primer, 200µM dNTPs e 1,25U DNA polimerase. Como *template* foi utilizado 10µL de uma suspenção de células com OD600 próxima de 0,5. Foi utilizado o seguinte ciclo (95°C 10m; 35X 95°C 30s/ 50-55°C 30s/ 72°C 1m por Kb; 72°C 10m). As análises de montagens foram realizadas em gel de agarose.

5.5.1.7 Extração de DNA plasmídial pelo método de lise alcalina

Plasmídeos propagados em *E. coli* foram extraídos utilizando os procedimentos de lise alcalina descritos por Birnboim e Doly (1979) [111]. 3 mL de culturas crescidas por 14 à 16 horas (*overnight*) foram centrifugadas em tubo tipo eppendorf de 1,5mL por 2 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, a lise e a precipitação de restos celulares foram realizadas pela adição de 300µL de solução P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 µg/mL RNase A), 300µL de solução P2 (1% SDS, 0,2 M NaOH) e 300µL de solução de cada solução. Após centrifugação por 10 min à 13000 rpm, o sobrenadante (aproximadamente 700µL) foi transferido para tubos novos e adicionou-se 700µL de isopropanol 100% e o DNA foi precipitado por centrifugação à 13000 rpm por 15minutos. O pellet foi lavado com 700µL de etanol 70% e ressuspendido com 30-50µL de H2O MiliQ. A cada extração o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

5.5.2 Construção de linhagens de S. Cerevisiae pelo método de Acetato de Lítio (LiAc)

A metodologia para transformação de S. cerevisiae foi realizada nas linhagens JAY289 (para montagem dos vetores por *gap-repair*) e JGY_004 e JGY_016 (para estabelecer as linhagens necessárias ao desenvolvimento da abordagem proposta). As transformações foram conduzidas conforme descrito por Gietz e Schiestl (2007) [112]. Em resumo, foram utilizados até 2 µg de DNA – em proporção equimolar de inserto e vetor; 0,1 mg de DNA carreador (Life Technologies); 100 µL de suspensão de leveduras competentes previamente preparadas e 600µL de PEG/LiAc (40% PEG 4000; 1X TE; 1X LiAc). Após homogeneização vigorosa as células foram mantidas em agitação (250 rpm) por 1h a 30°C. Em seguida, foram adicionados 70µL de DMSO, por fim, as células foram submetidas a um choque térmico – 15 min à 42°C e 2 min no gelo. Os transformantes foram recuperados em placas de meio YEPD *overnight* a 30°C e selecionados mediante *replica plate* em meio YEPD sólido acrescido de geneticina (200µg/mL).

5.5.3 Definição dos parâmetros de análise mediante citometria de fluxo

No intuito de estabelecer a abordagem proposta foram desenvolvidos três *FACS gatting* primordiais, sendo os dois primeiros baseados no emprego de apenas uma proteína repórter (GFP ou *CyOFP1*) e o terceiro na utilização de dois repórteres de modo simultâneo (*ymUkG1* e *CyOFP1*). No entanto, os três *FACS* se basearam nos mesmos princípios: (i) eliminar *doublets*; (ii) determinar os índices de emissão de autofluorescência e (iii) distinguir eventos classificados como tétrades de não tétrades.

As estratégias baseadas na expressão de apenas um vetor repórter foram estabelecidas mediante a comparação de culturas da linhagem diploide selvagem (JGY_004) ao longo da progressão da indução da meiose (1, 3, 5 e 96 horas). A esporulação foi conduzida conforme descrito na sessão 5.4.1 e para atender os princípios mensionados anteriormente foram utilizados os seguintes parâmetros:

- (i) FSC-A x FSC-H eliminar *doublets*;
- (ii) FITC-A x FSC-H (para padronizações baseadas na expressão de versões de GFP); *PerCP-Cy5-5A* x SSC-A (para padronizações baseadas na expressão do *CyOFP1*) determinar índices de emissão de autofluorescência;
- (iii) FSC-A SSC-A distinguir eventos classificados como tétrades de não tétrades.

A terceira abordagem de *FACS gatting* foi baseada na coexpressão do *ymUkG1* (para marcar o ponto de interesse no ciclo celular) e a *CyOFP1* (para eliminar falsos positivos - tétrades). Os parâmetros para (i) eliminar *doublets* e (ii) determinar os índices de emissão de autofluorescência, foram mantidos tal qual descrito acima. Já a distinção de eventos classificados como tétrades e não tétrades foi estabelecida como um sistema de duplo positivo (FITC-A x PE-A), de modo que, eventos expressando ambos os fluoróforos seriam considerados inadequados e eventos apresentando apenas o *ymUkG1* seriam tidos como potênciais diploides recombinantes.

5.6 Extração de RNA total

Culturas do híbrido diploide JGY_004 foram propagadas sob as condições de interesse. As células foram fixadas em fenol ácido gelado (5%), pelletadas por centrifugação a 1000g sob refrigeração (4°C) durante 10 minutos e armazenadas em Biofreezer a -70°C. A extração foi feita pelo método do fenol ácido em alta temperatura, tal qual descrito por Collart e Martine (1993) [113]. De modo resumido, a lise celular foi realizada pela adição de 400µL da solução TES (0,5M NaCl; 1mM Tris HCl, pH 7,5; 10mM EDTA) e 400µL de fenol ácido. Após vigorosa agitação em vortex a solução foi mantida por 1 hora em banho seco a 60°C e sob agitação de 900rpm. Em seguida foi realizado choque térmico por 10 minutos em gelo e a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 13400 rpm e a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e foram realizadas duas etapas de purificação, a primeira com fenol ácido (400µL) e a segunda com clorofórmio (400µL). Por fim, a fase aquosa proveniente da purificação com clorofórmio foi precipitada com 40µL de acetato de sódio 3M, pH 5,3, 1 mL de etanol absoluto gelado e incubado por 1 hora a -20°C. O pellette de RNA foi formado por centrifugação a 13400rpm por 15 minutos. O mesmo foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em água.

5.7 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o kit *SuperScript II (Thermo Fisher Scientific)*. Inicialmente 2µg do RNA total foi tratado com DNase RQ1 (Promega), a reação foi composta da amostra de RNA, acrescida de 1X RQ1 *Buffer* e 1U da enzima RQ1 (37°C 30 minutos e inativação a 65°C 10 minutos). A síntese foi conduzida em duas etapas, na primeira foi adicionado 1mM de dNTP mix e 2pmol de *Ramdom primers* (65°C 5 minutos e 0°C 5 minutos). Posteriormente, foi adicionado 1X *First Strand Buffer*, 10mM DTT, 40U RNaseOUT e 200u *SuperScript* II (25°C 10 minutos, 42°C 50 minutos, 70°C 15 minutos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 RTG convencional – Padronização da técnica

Apesar de bastante conhecido, a aplicabilidade do RTG para obtenção de diploides recombinantes depende do entendimento da progressão do ciclo celular de toda e cada linhagem estudada, inclusive dos híbridos gerados. Havendo a necessidade de adequar a etapa de indução da esporulação à cada novo trabalho.

Neste contexto, esta primeira etapa do processo de *RTG* é também um de seus gargalos pois afeta diretamente na eficiência de recuperação de diploides recombinantes. Isto porque o *shift* nutricional deve ser realizado o mais próximo possível do ponto de comprometimento, e se realizado muito antes reduz o número de recombinações ao longo do genoma. Em contrapartida, a realização do *shift* nutricional após o ponto de comprometimento não permite a retomada do ciclo mitótico, caracterizando uma tênue linha entre o tempo de se garantir uma alta variabilidade e a irreversibilidade do processo.

Assim, os tópicos 6.1.1 a 6.1.3 trazem resultados referentes a padronização e compreensão do processo de RTG para as linhagens inicialmente utilizadas no presente projeto.

6.1.1 Construção de híbridos diploides utilizados na padronização do método

Para realizar as padronizações iniciais, e de fato compreender a eficiência e o potencial da técnica, foram desenvolvidas duas linhagens. A linhagem JGY_004, hemizigota para quatro *loci* auxotróficos (*URA3/ura3-52; TRP1/trp1-289; LEU2/leu2-3,112* e *HIS3/his3* Δ 1) foi criada no intuito de compreender os melhores tempos de indução da esporulação para um híbrido com um *background* de PE-2 e CEN.PK, bem como mensurar a frequência de recombinação entre estes *loci*.

Como prova de conceito da aplicabilidade do RTG ao aprimoramento de linhagens com características de interesse industrial foi idealizado o híbrido JGY_016 (MATa/α; pH tolerante), tendo como *background* as linhagens ACY_503c (MATa; pH resistente) e CEN.PK2-1D (MATα; pH suscetível).

A Tabela II sumariza o *background* de cada linhagem montada para a presente sessão, bem como os motivos para sua idealização. Já a Figura 11 apresenta os resultados da confirmação de montagem dos dois diploides gerados.

Tabela II:	Caracterização	de linhagens	utilizadas na	padronização do	RTG	convencional
	,			. ,		

IDD	Background MATa	Background MATa	Objetivo
JGY_004	JAY 289 (Haploide de PE-2) URA3; TRP1; LEU2; HIS3	CEN.PK2-1D ura3-52; trp1-289; leu2- 3,112; his3⊿1	Realizar padronizações iniciais do <i>RTG</i> e análises da eficiência de recombinação
JGY_016	ACY_503c (Haploide de PE-2)	CEN.PK2-1D ura3-52; trp1-289; leu2- 3,112; his3⊿1	Prova de conceito da aplicabilidade do <i>RTG</i> ao aprimoramento de linhagens com <i>traits</i> de interesse industrial.



Figura 11: Screening por híbridos diploides gerados para padronização do RTG. (A) Triagem por híbridos resultantes do cruzamento de JAY289 x CEN.PK2-1D, agora denominado JGY_004, sendo a colônia 7 um diploide confirmado. (B) Triagem por híbridos resultantes do cruzamento de ACY_503c x CEN.PK2-1D. Indivíduos MAT α apresentam banda de 404bp e indivíduos MAT α banda de 544bp. De 1 a 10 tem-se as colônias analisadas. Como controle da reação foi feita análise do diploide JAY 270 e dos parentais CEN.PK2-1D (MAT α) e JAY289 ou ACY_503c (MAT α). M: marcador de peso molecular (1kb Thermo Fisher Scientific); C-: Controle negativo.

6.1.2 Implementação do RTG e avaliação da eficiência da técnica no híbrido hemizigoto prototrófico

Conforme relatado na sessão 5.4.2, as análises para o híbrido hemizigoto prototrófico dependem de três pontos primordiais, sendo eles: (i) tempo de indução da esporulação; (ii) análise da frequência de recombinantes para ao menos um *locus* e (iii) análise do número de *locus* recombinados para cada evento.

Os parâmetros iniciais para a definição do melhor tempo de indução à esporulação foi baseado no trabalho de Laureau e cols. 2016 [24], o qual estabelece de 7 à 8 horas como o

melhor intervalo de tempo para um híbrido SK-1 x s288c. Assim, foi decidido iniciar os testes com induções da esporulação por 6, 10, 12 e 24 horas e para cada um desses intervalos realizar as análises (ii) e (iii), acima referidas (resultados apresentados nas sessões 6.1.2.1 e 6.1.2.2 respectivamente)

6.1.2.1 Frequência de diploides recombinantes recuperados após shift nutricional

Inicialmente, a análise (ii) - frequência de recombinantes para ao menos um *locus*, foi aferida pela taxa de colônias amostradas que perdiam a capacidade de crescer em meio sintético sem a suplementação dos 4 aminoácidos em análise. No entanto, após a realização do *shift* nutricional foi possível observar um *range* relativamente amplo no tamanho das colônias; variando de 3 mm à menos de 1 mm de diâmetro (Figura 12), esta variação permitiu classificá-las como pequenas ou grandes, sendo colônias de até 1 mm consideradas pequenas e as com ao menos 2 mm grandes.



Figura 12: Colônias obtidas após 12 horas de indução à esporulação e 24 horas de recuperação em meio YEPD-ágar a 30°C. Notar a diversidade de tamanho das colônias recuperadas após *shift* nutricional. As colônias pequenas foram consideradas como potenciais diploides recombinantes para ao menos um dos *loci* de auxotrofia.

Sabe-se que culturas auxotróficas dispõem de *fitness* relativamente menor do que culturas prototróficas [114, 115]. Com base nesta informação foi levantada a hipótese de que

o tamanho das colônias poderiam ser um fenótipo de seleção para a ocorrência de recombinação nos *loci* que conferem auxotrofia (*ura3-52*; *trp1-289*; *leu2-3*,112 e *his3* Δ 1).

Ao se observar as placas após *shift* nutricional, foi possível perceber que com 6 horas de indução à esporulação não houve diferenciação de colônias no que tange o diâmetro delas. No entanto, conforme se progride na esporulação as colônias pequenas passaram a ser mais frequentes.

O aparente aumento do número de colônias pequenas ao longo da esporulação nos levou a considerar uma busca por diploides recombinantes auxotróficos tanto em função do fator tempo de indução da meiose, quanto em função do diâmetro das colônias recuperadas. Assim, foram avaliadas, aproximadamente 700 colônias, sendo ao menos 94 pequenas e 96 grandes para cada tempo de coleta, com exceção das análises para 6 horas de indução, a qual gerou apenas colônias grandes após o *shift* nutricional. A Figura 13 sumariza os resultados para este experimento, tanto em função do tempo quanto do tamanho das colônias.

Os resultados obtidos neste experimento, quando analisados apenas em função do tamanho da colônia permite identificar frequências de indivíduos auxotróficos bastante discrepantes; estabelecendo-se uma relação de ao menos 10 vezes mais eventos de recombinação em colônias pequenas, quando comparado com as grandes. Estes dados corroboram com a hipótese de que colônias pequenas podem ser utilizadas como marcador para indivíduos auxotróficos.

Ao adicionar a variável tempo nestas análises observa-se que a frequência de eventos de recombinação em ao menos um dos *loci* estudados aumenta conforme prolongamos o tempo de indução da esporulação. Nota-se que com 6 horas de indução ainda não existem eventos de recombinação e que a taxa de recombinantes aumenta nos três tempos subsequentes, 21,28%, passando a 62,11% e chegando a 89,58% nos três tempos subsequentes (10 horas, 12 horas e 24 horas).



Figura 13: Freqência de indivíduos recombinantes para ao menos um dos *loci* analisados em função do tempo de indução da esporulação e do tamanho da colônia. Para cada uma das combinações de variável (tempo e tamanho de colônia) foram analisados ao menos 94 eventos. As análises das colônias grandes são apresentados em azul e das colônias pequenas em laranja. Notar que: (i) as análises referentes às colônias grandes não geraram alterações significativas no que tange a ocorrência de combinação para os *loci* analisados; (ii) as frequências de recombinantes em colônias pequenas são aproximadamente dez vezes maiores do que em colônias grandes.

6.1.2.2 Frequência de interações ocorridas para cada evento analisado

A partir dos resultados obtidos na sessão anterior foram realizadas as análises para compreender o número de recombinações ocorridas para cada diploide recombinante recuperado, novamente em função tanto do tempo quanto do tamanho das colônias. Para tanto, as 181 colônias auxotróficas identificadas na primeira análise foram fenotipadas quanto à cada uma das quatro marcas de seleção.

Das aproximadamente 400 colônias grandes avaliadas no primeiro experimento apenas 5 foram identificadas como auxotróficas e com a exceção de um indivíduo que recombinou tanto no *locus leu2-3* quanto em *his3* $\Delta 1$, os demais recombinaram apenas em *his3* $\Delta 1$.

A Figura 14 resume os resultados para a frequência de eventos de recombinação em função do tempo de indução da esporulação. É pertinente notar que com até 10 horas de indução os eventos de recombinação ocorrem apenas entre 1 e 2 *loci* e que com 12 e 24 horas





Figura 14: Número de *loci* recombinados em função do tempo de indução da esporulação para colônias pequenas. As colônias auxotróficas identificadas na análise da sessão 6.1.2.1 foram exploradas, de modo individual, quanto a cada uma das marcas auxotróficas em análise. O eixo y traz a frequência para cada número de interações. No eixo x são apresentados os resultados para cada tempo de indução utilizado e para os números de recombinações ocorridas.

6.1.3 Uso do *RTG* convencional para obtenção de diploides recombinantes tolerantes a baixo pH

Após implementação da abordagem do *RTG* fez-se necessário gerar uma prova de conceito da aplicabilidade do uso da mesma na obtenção de linhagens com características de interesse industrial. Para tanto, foi gerado um híbrido cuja tolerância a baixo pH é intermediária a de seus parentais e, esperava-se que, ao submetê-lo ao RTG, fosse possível restaurar o fenótipo do parental tolerante a baixo pH (ACY 503c).

Inicialmente foi estabelecida uma caracterização do perfil de tolerância do híbrido diploide (JGY_016) e de seus parentais (ACY_503c e CEN.PK2-1D). Nota-se que o pH 1,9

 $(\pm 0,01)$ é uma condição inibitória para a linhagem laboratorial (CEN.PK2-1D) e permissiva para ambos, ACY_503c e JGY_016, permitindo diferenciá-los apenas por robustez. Quando analisados em pH 1,75 ($\pm 0,01$) apenas o parental ACY_503c é capaz de crescer, sendo esta uma condição inibitória para as demais linhagens (os resultados do perfil de tolerância são mostrados junto com a fenotipagem do diploide recombinante, na Figura 16).

Conforme resultados apresentados na Figura 13, a indução à esporulação por 24 horas se mostrou como a melhor condição para obtenção de diploides recombinantes para o híbrido JGY_004. No entanto, como não havia sido realizada nenhuma avaliação por maiores tempos de indução, a presente análise de *RTG* foi feita sob os seguintes tempos de desenvolvimento meiótico: 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Foi incluído ainda, um controle contendo apenas a cultura propagada de modo mitótico e depois plaqueada no meio YEPD com pH ajustado com ácido sulfúrico, no intuito de evidenciar que a retomada do fenótipo inerente ao parental (ACY_503c) não era em decorrência de mutações aleatórias.

A Figura 15 traz os resultados para estas análises. É interessante notar que, conforme esperado, o controle que não foi induzido à esporulação apresentou uma frequência de recuperação satisfatória apenas em meio YEPD pH 1,89, condição esta permissiva ao híbrido. Ainda mais interessante, é que existe uma maior taxa de diploides recuperados em pH 1,89 para a cultura controle (47,07%), quando comparado com as culturas que passaram por indução à esporulação por 6, 24, 36 e 48 horas (24,81%, 29,9%, 31,17% e 28,62%, respectivamente). Possivelmente este fato se deve à ocorrência de eventos de recombinação nas culturas que passaram pelo RTG, culminando na homozigoze dos alelos que não fornecem robustez frente à baixo pH, reduzindo assim, o número de indivíduos capazes de crescer nesta condição. Em contrapartida, as análises para eventos recolhidos em meio YEPD com pH 1,74 evidenciam a possibilidade de se realizar o shift nutricional em meio seletivo, e reduzir a laboriosidade de fenotipar os diploides recolhidos. Por fim, nota-se que não há aumento na frequência de diploides recombinantes nas análises feitas para induções por 36 e 48 horas, possivelmente em decorrência de uma maior frequência de células desta cultura já ter atingido o ponto de comprometimento e consequentemente reduzir o total de diploides recombinantes avaliados.



Figura 15: Frequência de diploides recombinantes recuperados por *RTG* **após** *shift* **nutricional em placa com pH controlado.** O RTG foi utilizado no híbrido JGY_016 crescendo por 6, 12, 24, 36 e 48 horas; além de um controle sob crescimento mitótico. Após indução da esporulação o *shifit* nutricional foi feito plaqueando de 1000 a 2000 células de cada cultura em placas contendo meio YEPD sólido com pH ajustado para 1,89 e 1,74, respectivamente. As frequências de diploides recombinantes observadas são oriundas da contabilização de colônias recuperadas, estas analisadas em razão do total de células plaqueadas.

Por fim, foi feita a caracterização fenotípica de 18 indivíduos recolhidos em meio YEPD pH 1,89. Estes, tiveram seu crescimento comparado com o híbrido JGY_016 e os haploides parentais CEN.PK2-1D e ACY_503c; tanto em pH 1,89 quanto em pH 1,75. A Figura 16 traz os resultados desta caracterização fenotípica. Tal qual o esperado, em pH 1,89 a linhagem laboratorial não cresce e tanto o híbrido quanto seu parental tolerante crescem, mas se diferem por robustez (Figura 16A). Supreendentemente, em pH 1,75, todos os diploides recombinantes analisados retomaram o fenótipo do haploide ACY_503c, alguns aparentemente menos robustos que a linhagem parental, mas ainda assim, com capacidade de crescer em condições inibitórias ao híbrido JGY_016 (Figura 16B).



Figura 16: Caracterização fenotípica dos diploides recombinantes (DRs) recolhidos após RTG. (A) Caracterização do híbrido JGY_016 e seus parentais ACY_503c e CEN.PK2-1D crescendo em meio YEPD pH1,89 a 30°C. Nota-se que esta condição é permissiva ao diploide, mas ainda assim permite diferenciá-lo do haploide ACY_503c por robustez. (B) Caracterização dos diploides recombinantes (DR) recolhidos após shift nutricional em placa YEPD pH 1,90. Estes diploides foram caracterizados quanto à sua capacidade de crescer em meio YEPD pH 1,75. Como controle foram utilizados o diploide JGY_016 e seus parentais haploides; notar que dentre os controles, apenas o parental MATa (ACY 503c) tem capacidade de crescer nestas condições e que os DRs recolhidos retomam o fenótipo do haploide. Em ambas as condições a análise foi iniciada com DO660 de 0,6 e foram realizadas diluições seriadas até 10⁻⁴.

6.2 Implementação da abordagem via citometria de fluxo

A sessão 6.2 tratará os resultados obtidos no que tange a tentativa de associar o processo do RTG com a citometria de fluxo, no intuito de implementar a abordagem do *RTGeasy*. Foram realizadas diversas tentativas e alterações ao planejamento inicial. Dentre elas, cita-se a tentativa de padronização do método com quatro proteínas repórter distintas, bem como um sistema de coexpressão de genes repórteres. Foi trabalhado também a otimização na escolha do promotor repórter, baseando-se na presença de transcritos ao longo da meiose.

Com a finalidade de facilitar a leitura, a presente sessão divide os resultados em duas frentes primordiais. As sessões 6.2.1 e 6.2.2 compreendem as etapas de seleção de promotores candidatos e montagem de vetores de expressão, bem como das linhagens a serem utilizadas no projeto. Já a sessão 6.2.3 trata das análises de citometria de fluxo e de transcritos ao longo da meiose para identificar o melhor sistema de repórter, e também compreender qual o promotor candidato melhor se aplica aos critérios do projeto.

6.2.1 Seleção de promotores candidatos

A seleção de regiões promotoras figurou entre um dos maiores gargalos da abordagem proposta, dado que a precisão do momento que o gene repórter será expresso é crucial para que não se recolha, por citometria de fluxo, eventos que já passaram pelo ponto de comprometimento. Assim sendo, a seleção dos promotores foi feita com base em ao menos dois estudos sobre genes que participam exclusivamente da meiose em *S. cerevisiae*: (i) Neiman, 2011 [85], o qual revisa os mecanismos moleculares que regulam a esporulação, e (ii) Primig e cols 2000 [102] que apresenta um transcriptoma com os principais *clusters* de genes presentes no processo de esporulação. Optou-se por promotores cujo gene: (i) é transcrito durante a Prófase I; (ii) é relatado como meiose específico, não sendo transcrito durante a mitose, e (iii) codifica para uma proteína preferencialmente relacionada ao mecanismo de recombinação homóloga (Tabela III).

ID	Função do gene
Prom1	Helicase responsável pela dissociação da dupla fita de DNA (dsDNA) e possívelmente associado à resolução das duplas junções de Holliday que se resolvem em <i>crossover</i> .
Prom2	Quinase responsável pela fosforilação da Serina 1 da subunidade H4 das histonas. Sua ação ajuda a aumentar o grau de compactação dos cromossomos quando comparado com a compactação ao longo da mitose.
Prom3	Maturação do prospore.
Prom4	Parte integrante de um SNARE e consequentemente relacionado à formação da membrana do prospore.
Prom5	Atua como c <i>heck point</i> do paquiteno, modulando a formação dos eixos do complexo sinaptonémico e prevenindo a segregação dos cromossomos homologos quando ha má formação das recombinações e sinapses.
Prom6	Quinase que atua na fosforilação da proteína Zip1 e possívelmente esta relacionada à formação de <i>crossovers</i> .

Tabela III: Relação dos promotores candidatos e a função de seus respectivos genes.

6.2.2 Construção de vetores de expressão e das linhagens utilizadas nas análises por citometria de fluxo

Após definição dos promotores candidatos a serem utilizados, foi iniciada a montagem dos vetores de expressão do gene repórter. Conforme será abordado na sessão 6.2.3, foram realizados testes de citometria de fluxo com ao menos quatros proteínas repórteres e/ou combinação delas. Para cada um destes testes foi idealizado um controle de expressão basal, compreendendo apena a CDS do gene repórter, sem regulação de promotor. A Tabela IV resume a composição dos *cassetes* de expressão dos vetores pJG_001-013 e pJG_017-018.

ID	Promotor	Gene repórter	ID da linhagem gerada (<i>background</i>)
pJG_001	prom1	EGFP	JGY_001 (JGY_004)
pJG_002	prom2	EGFP	JGY_002 (JGY_004)
pJG_003	prom3	EGFP	JGY_003 (JGY_004)
pJG_004	prom4	EGFP	JGY_005 (JGY_004)
pJG_005	prom5	EGFP	JGY_006 (JGY_004)
pJG_006	prom6	EGFP	JGY_007 (JGY_004)
pJG_007	-	EGFP	JGY_008 (JGY_004)
pJG_008	prom2	CyOFP1	JGY_010 (JGY_004)
pJG_009	-	CyOFP1	JGY_012(JGY_004)
pJG_010	prom2	yZsGreen	JGY_017 (JGY_016)
pJG_011	-	yZsGreen	JGY_018 (JGY_016)
pJG_012	prom2	ymUKG1	JGY_019 (JGY_016)
pJG_013	-	ymUKG1	JGY_020 (JGY_016)
pJG_017	prom2	ymUKG1; CyOFP1_SPS2	JGY_024 (JGY_016)
pJG_018	prom2	ymUKG1; (neg) CyOFP1_SPS2	JGY_025 (JGY_016)

Tabela IV. Descrição dos vetores de expressão idealizados no presente projeto.

(neg) controle negativo para a expressão do gene CyOFP1, utilizado para identificação de tétrades.

As montagens aconteceram conforme descrito na metodologia 5.5.1 e 5.5.2, sendo as partes necessárias obtidas por PCR e analisadas por eletroforese em gel de agarose quanto à especificidade e integridade e, quando necessário purificadas com o kit *Wizard sv Gel and PCR Clean-up System* (Promega©). A montagem final dos veores foi realizada por *Gaprepair* e a confirmação foi realizada por PCR ou, quando necessário, mediante uso de enzimas de restrição. As Figuras 17-21 resumem as confirmações de montagem dos vetores de expressão idealizados ao longo deste projeto, elas estão organizadas conforme as proteínas repórteres envolvidas (*EGFP*, *CyOFP1*, *yZsGreen* ou *ymUkG1* e *ymUkG1* coexpresso com *CyOFP1*).



Figura 17: Confirmação de montagem dos vetores de expressão contendo o gene repórter *EGFP*. (A-C) Representação da estratégia de montagem utilizada para construir os vetores pJG_001-003, pJG_004-006 e pJG_007, respectivamente. As setas pretas indicam os *primers* utilizados para amplificação dos insertos e as homologias inseridas. Setas coloridas (vermelhas e azuis) indicam os pares de *primers* utilizados para confirmação das montagens. (D-K) Verificações da correta montagem dos vetores de expressão pJG_001-007, analisadas em gel de agarose.



Figura 18: Confirmação da montagem dos vetores de expressão contendo o gene repórter *CyOFP1.* (A-B) Representação da estratégia de montagem utilizada para construir os vetores pJG_008 e pJG_009 respectivamente. Setas pretas indicam os *primers* utilizados para amplificação dos insertos e as homologias inseridas. Setas vermelhas indicam os pares de *primers* utilizados nas confirmações das montagens. (C-D) Verificação da correta montagem dos vetores de expressão pJG_008 e pJG_009, analisadas em gel de agarose.



Figura 19: Confirmação de montagem dos vetores contendo os genes repórteres *yZsGreen* **e** *ymUkG1.* (A) Representação da estratégia de montagem utilizada para construir os vetores pJG_0010 e pJG_012, contendo os genes repórteres *yZsGreen* e *ymUkG1* regulados pelo promotor candidato 2, respectivamente. A verificação de ambas as montagens foi realizada por intermédio de enzimas de restrição (XhoI e SphI – indicadas em vermelho no esquema). (B) Representação da estratégia de montagem utilizada para construir os vetores pJG_011 e pJG_013, contendo os genes repórteres *yZsGreen* e *ymUkG1* respectivamente. As setas pretas indicam os *primers* utilizados na amplificação do inserto e as homologias inseridas. Setas vermelhas indicam o par de *primers* utilizado para confirmação da montagem. (C-D) Confirmação da montagem dos vetores pJG_010 e pJG_012, respectivamente. Para cada montagem foram realizadas ao menos duas tentativas de confirmação. O gel de agarose apresenta a dupla digestão (D) seguida das digestões controle realizadas com as enzimas separadamente: XhoI (X) e SphI (S), além da minipreparação de DNA plasmídial (M). (E) Análise por PCR da montagem dos vetores de controle de expressão basal pJG 011 e pJG 013.



Figura 20: Confirmações de montagem dos vetores contendo o sistema de coexpressão do *ymUkG1* e da *CyOFP1* fusionada à proteína de parede de tétrades SPS2. (A-B) Representação esquemática da montagem dos vetores de expressão pJG_017 e pJG_018. Setas pretas indicam os *primers* utilizados para amplificação dos insertos e as homologias inseridas. Setas vermelhas indicam os *primers* utilizados para confirmação das montagens. (C-D) Análise em gel de agarose da montagem dos vetores pJG_017 e pJG_018, respectivamente.

Após confirmação de montagem dos vetores de expressão os mesmos foram utilizados para transformar linhagens hemizigotas de interesse, nomeadamente os híbridos JGY_004 (CEN.PK2-1D x JAY289) e JGY 016 (ACY 503c x CEN.PK2-1D).

6.2.3 Análises por citometria de fluxo

6.2.3.1 Determinação dos parâmetros da análise por citometria de fluxo para vetores de expressão contendo apenas uma variedade de GFP

A estratégia de análise de expressão do GFP foi desenhada de modo a: (i) eliminar *doublets*; (ii) determinar os índices de emissão oriundos tanto da proteína repórter quanto de autofluorescência e (iii) distinguir eventos classificados como tétrades de não tétrades. Estes *5gates* foram obtidos com base nas análises do diploide selvagem JGY_004 ao longo de diferentes tempos de indução da meiose (1, 3, 5 e 96 horas).

Seguindo os princípios delineados para esta estratégia de *gates* foi definido, inicialmente, a população "*singlets*" (P6), a qual foi gerada pela análise de todos os eventos quanto aos parâmetros FSC-A x FSC-H (Figura 21 A-D). A partir dos eventos da população de "*singlets*" foram feitas duas análises: FITC-A x FSC-H e FSC-A x SSC-A. Na primeira determinou-se a autofluorescência de modo que apenas os eventos que ocorreram na população "*GFP positivo*" (P5) seriam considerados positivos para a expressão de uma das variantes de *GFP* (Figura 21 E-H). Em seguida, a diferenciação entre tétrades e não tétrades baseou-se na análise de "*singlets*" quanto ao tamanho e complexidade citoplasmática (FSC-A x SSC-A). Esta análise foi feita em quatro pontos após o início da indução da esporulação, sendo possível identificar o aumento de eventos dentro da população "tétrades" ao longo da indução da esporulação (0,1%, 0,3%, 0,6% e 33,9% da população total - dados não apresentados). Dessa forma, considerou-se apropriado atribuir eventos com baixo valor de SSC-A e elevado valor de FSC-A como "não tétrades" (P7) e eventos com maior valor de SSC-A e menor valor de FSC-A como possíveis tétrades (Figura 21 I-L).



Figura 21: Determinação dos FACS *gatting* **para identificação e coleta de diploides recombinantes. A** – **D** Triagem padrão para seleção de singlets em análises de citometria de fluxo - FSC-A x FSC-H. **E-H** *Gate* para confirmação da detecção do EGFP - FITC-A x FSC-H. O diploide heterozigoto JGY_004 foi análisado após 4 tempos de indução da esporulação (1, 3, 5 e 96 horas), a demarcação verde delimita P5, sendo estes indivíduos com maior emissão de fluorescência do que o background. I-L Determinação de populações de prováveis tétrades e não tétrades (populações P4 e P7, respectivamente) – FSC-A x SSC-A. Notar que a população tende a migrar à P4, conforme se aumenta o tempo de indução da meiose. A partir da estratégia de gate sugerida, seriam considerados eventos de interesse aqueles que estivessem representados concomitantemente em "gfp positivo" e "não tetrade", aqui representado como eventos marcados em roxo dentro da população "não tetrade" (P7).

6.2.3.2 Análise por citometria de fluxo para uso do EGFP como repórter.

O híbrido JGY_004 previamente transformado com cada um dos vetores (pJG_001-007) foi submetido ao protocolo de indução da meiose e as culturas foram analisadas após 1, 3 e 5 horas. Como controle foram utilizados: (i) o diploide selvagem (JGY_004 não transformado) e (ii) um controle de expressão basal (JGY_008 – contendo o gene repórter não regulado por promotor). Para confirmar que a expressão do gene repórter se da exclusivamente na meiose, todas as culturas foram analisadas também em crescimento mitótico.

A análise foi feita com base na estratégia de *gate* descrita na sessão anterior com objetivo de identificar células fluorescentes ("*GFP positivo*") dentro da população estabelecida como "*não tétrade*" (Figura 21 E-H e I-L, respectivamente). O resultado desta análise é resumidamente apresentado na Figura 22, a qual apresenta apenas os *dotplots* de FSC-A x SSC-A. Como esperado, as linhagens controle JGY_004 e JGY_008 (selvagem e controle de expressão basal) apresentaram apenas sinais de autofluorescência (A 1-4 e B 1-4). Já os vetores contedo o repórter regulado pelos promotores 3 e 4 expressaram o *EGFP* ao longo da meiose (Figura 22 E2-4 e F2-4, respectivamente). No entanto, mesmo que a seleção dos promotores tenha sido baseada em candidatos descritos como expressos exclusivamente na meiose, também foi possível observar expressão dos mesmos ao longo da mitose (Figura 22 E1 e F1). As linhagens contendo o *EGFP* regulado pelos promotores 1, 2, 5 e 6 não evidenciaram a expressão do gene repórter, (Figura 22 B1-4, C1-4, G1-4 e H1-4, respectivamente).



Figura 22: Análise da funcionalidade dos promotores candidatos por citometria de fluxo. A análise foi conduzida com as linhagens selvagem e transformadas com os vetores pJG_001-007 no intuito de identificar candidatos apropriados à abordagem proposta. A coluna 1 apresenta as linhagens crescendo em mitose e as colunas 2-4 mostram o desenvolvimento meiótico após diferentes tempos de indução da esporulação. Os controles da linhagem selvagem e de expressão basal do EGFP estão dispostas nas linhas A e B, respectivamente. As linhas C-H apresentam as análises realizadas para cada promotor candidato.

A partir destes resultados foi decidido: (i) excluir os promotores 3 e 4 devido à detecção da expressão do *EGFP* durante a mitose (Figura E 1-4 e F 1-4); e (ii) validar se a transcrição dos genes controlados pelos promotores selecionados, de fato, ocorrem ao longo da meiose.

6.2.3.3 Verificação da expressão dos genes controlados pelos promotores selecionados

A detecção de transcritos dos genes endógenos da linhagem JGY_004 foi avaliada durante o crescimento mitótico e ao longo da indução da esporulação, sendo precedida por uma etapa de pré-esporulação em meio SPS, utilizada para sincronizar a progressão do ciclo celular [24]. Com isso espera-se que haja uma alta frequência de células em um mesmo estágio de progressão da meiose, aumentando a probabilidade de detecção de transcritos.

A Figura 23traz o resultado da verificação da integridade do RNA total extraído, submetido à uma eletroforese em gel desnaturante. É possível notar que se aplicada a mesma quantidade de RNA total (1µg) observa-se uma redução da intensidade das bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal ao longo da indução da esporulação. O mesmo é observado com o rendimento de RNA total extraído. Possivelmente isto ocorre devido ao aumento significativo do número de tétrades observado ao final de 72 horas (dados não mostrados).



Figura 23: Verificação da integridade e qualidade da extração de RNA total da linhagem JGY_004 para os diferentes tempos de análise. Foi aplicado no gel 1ug de RNA total para cada cultura analisada. É possível visualizar as bandas de RNA ribossomal quando em crescimento mitótico e o gradativo desaparecimento da mesma conformer se avança na indução da meiose.

Após confirmação de integridade do RNA total, este foi utilizado como *template* para síntese de cDNA e subsequente reação de PCR com *primers* para os genes endógenos no intuito de identificar a presença de transcritos dos mesmos. A Figura 24 apresenta os resultados de identificação dos candidatos 1, 2, 5 e 6 sob crescimento mitótico (YEPD e SPS) e meiótico (SM induzido por 0h, 5h, 10h, 24h e 72h). Foi também, realizado um controle positivo para as amplificações usando como DNA *template* o DNA genômico da linhagem selvagem.



Figura 24: Validação da expressão dos genes candidatos ao longo do ciclo celular mediante análise do RNA total. As colunas numeradas referem-se à análise dos genes candidatos (1, 2, 5 e 6 respectivamente). Nas linhas são apresentados os resultados para cada uma das condições análisadas (i) controle positivo - gDNA; (ii e iii) crescimento mitótico – YEPD e SPS; (iv-viii) indução à esporulação em SM por 0h, 5h, 10h, 24h e 72h, respectivamente. As setas brancas indicam a presença de transcritos. A. Promotor candidato 6 em crescimento mitótico. B - C. Promotor candidato 2 após 0 e 24 horas de indução a esporulação, respectivamente . M: DNA Ladder 100bp Promega.

Como já demonstrado na sessão anterior, os promotores 3 e 4 foram desconsiderados devido à expressão ao longo da mitose. Os promotores 1 e 5, por sua vez, não apresentaram atividade em nenhuma das duas análises (citometria de fluxo e identificação de transcritos a partir do RNA total), por isso também foram considerados como inadequados ao propósito da abordagem. Já o candidato 6, apesar de não ser forte o suficiente para evidenciar a expressão do *EGFP* por citometria de fluxo, quando analisado por PCR, deixou evidente a presença de transcritos de seu gene ao longo da meiose (0 hora e 5 horas), mas também ao longo da mitose – invalidando sua aplicabilidade à abordagem (Figura 24, seta A). Em contrapartida, o gene regulado pelo promotor candidato 2 se mostrou expresso exclusivamente após a indução do ciclo meiótico (Figura 24, setas B e C - indução por 0h e 24h, respectivamente). Assim, decidiu-se por uma nova análise de citometria de fluxo utilizando a linhagem transformada com o promotor 2.

6.2.3.4 Análise por citometria de fluxo para o uso do EGFP como repórter

Com base nas análises de expressão dos transcritos de genes endógenos (apresentados na sessão anterior) foi possível selecionar o melhor promotor candidato, bem como sua melhor condição de cultivo e assim redesenhar o experimento de citometria de fluxo. Deste modo, foram sugeridas duas alterações nas condições de cultivos anteriormente utilizadas, sendo elas: (i) realizar uma etapa de pré-esporulação (meio SPS) e (ii) aumentar o tempo de indução à esporulação de 5 para 24 horas (SM). As análises por citometria de fluxo seguiram os mesmos *gates* delineados na sessão 6.2.3.1. Mas ainda assim, não foi evidenciada a expressão do gene repórter.

Mediante as dificuldades de se identificar o *EGFP* mesmo que por citometria de fluxo, optou-se por trocar o fluoróforo utilizado. Levando em consideração trabalhos passados do grupo, foi decidido utilizar a proteína repórter *CyOFP1*. Esta, foi expressa em *S. cerevisiae* pela primeira vez em trabalhos do nosso grupo e resultou na patente BR 10 2017 021326 9 [116], em uma adaptação da técnica de separação de haploides mediante uso de citometria de fluxo proposta por Treusch e col. (2015) [23]
6.2.3.5 Análise por citometria de fluxo para uso do CyOFP1 como repórter

Apesar do *EGFP* e do *CyOFP1* terem padrões de excitação similares, e poderem ser excitados com o *laser* 488nm, as faixas de emissão de ambos são distintas. Por esta razão foi necessário alterar o filtro utilizado para determinação da fluorescência. Ao considerar que o *EGFP* emite em 507nm, no espectro verde [107, 117] e a *CyOFP1* emite em 589nm, no espectro laranja [118], fez-se necessário alterar o *gate* utilizado na detecção de fluorescência de SSC-A x FITC para SSC-A x Per-CP-Cy5-5-A. Mesmo com a alteração do filtro utilizado, o desenho racional da análise se manteve o mesmo, ou seja, indivíduos presentes tanto no *gate* "OFP positivo" quanto no *gate* "não tétrade" seriam considerados eventos de interesse para realização de *cell sorter*.

Os padrões de cultivo continuaram sendo realizados com base nos resultados de identificação de transcritos (sessão 6.2.3.3). Os resultados para a análise de citometria de fluxo foram resumidamente apresentados na Figura 25, a qual traz as análises para determinação dos padrões de emissão da proteína repórter no gráfico SSC-A x Per-CP-Cy5-5-A.

As determinações do que correspondia a autofluorescência foram estabelecidas com o uso das linhagens JGY_010 e JGY_012 crescendo em mitose. Desta forma, tudo que emitisse maior intensidade de fluorescência do que células controle, seria considerado uma população expressando o gene repórter (Figura 25 A e D, respectivamente). Conforme o esperado, tanto a linhagem JGY_010 (*CyOFP1* regulado pelo promotor 2) quanto a JGY_012 (controle de expressão basal) não acusaram maior intensidade na emissão do que o esperado para autofluorescência ao longo da pré esporulação (Figura 25 B e E, respectivamente). Quando se tenta identificar a expressão do repórter ao longo da indução à esporulação, é possível identificar a população migrando para o *gate "OFP positivo*", ainda assim, não o suficiente para determinar duas populações distintas (Figura 25 C e F, respectivamente).

Como controle positivo da expressão do *CyOFP1* foi utilizado o haploide JAY290 (MATα) transformado com o plasmídeo pMF_005, o qual tem a CDS do *CyOFP1* regulado por um promotor MATα específico, permitindo que esta linhagem o expresse ao longo da mitose. No entanto, ao contrário do que se esperava, não foi possível identificar uma população de eventos expressando o *CyOFP1*, evidenciando apenas um rastro de indivíduos

que passam do *gate* de autofluorescência para o *gate* de organismos expressando a proteína repórter (Figura 25 G). Hoje, acreditamos ser uma questão de bioacumulação da proteína repórter, dado que, com base em resultados do nosso grupo, obtemos melhores resultados de visualização da *CyOFP1* conforme se aumenta o tempo de cultivo de uma linhagem o expressando (dados não publicados oriundos do projeto de iniciação científica da aluna Monique Furlan que resultou na publicação da patente BR 10 2017 021326 9 [116]).



Figura 25: Análise da funcionalidade do promotor candidato 2 regulando a expressão da proteína repórter *CyOFP1* mediante citometria de fluxo. As colunas dispões resultados para cada condição de cultivo analisada (mitose, pré-esporulação e meiose). Nas linhas são dispostas as análises realizadas para cada linhagem. (A-C) Diploide transformado com o plasmídeo pJG_008, contendo o promotor 2 regulando o gene repórter (JGY_010). (D-F) Linhagem controle de expressão basal do *CyOFP1*, transformado com o plasmídeo pJG_009 (JGY_012). (G) Controle positivo de expressão do gene repórter *CyOFP1* – linhagem JAY290 (MATα) transformada com o plasmídeo pMF_005.

A impossibilidade de identificar a presença de ambas as proteínas repórteres (tanto o *EGFP* quanto a *CyOFP1*) nos levou a considerar duas possíveis hipóteses para a ausencia de detecção das mesmas. A primeira, contemplou a possibilidade de que o gene endógeno, possívelmente fosse pouco transcrito no momento da análise e assim o sinal do reporter fosse muito baixo. A segunda hipótese considerou que possívelmente as proteínas repórteres utilizadas até então apresentavam baixa emissão de fluorescencia e assim seriam menos eficientes.

Ambas as possibilidades, seja de modo individual ou associadas uma à outra, poderiam atuar como um impeditivo na detecção de indivíduos expressando a proteína repórter. No inuito de superar a baixa intensidade do sinal gerado, foi realizado um levantamento bibliográfico a partir do qual foram selecionadas outras duas versões de GFP, estas, com otimização de códon e com cerca de 30 vezes mais intensidade média de fluorescência (quando comparado com o *EGFP* selvagem) [107]. As versões de GFP, foram gentilmente doadas pelo Dr. Jun Ishii da Universidade de Kobe e foram utilizados nas análises subsequentes.

6.2.3.6 Análise por citometria de fluxo das proteínas repórter yZsGreen e ymUkG1

A ZsGreen é uma GFP isolada de Zoanthus sp. a qual, apesar de ser expressa como monômeros, mantém a tendência das proteínas fluorescentes de formar oligômeros (revisado por [48, 119]), sendo, a yZsGreen, essencialmente tetrâmera [107, 117, 120]. Já a ymUkG1 foi isolada do coral Sarcophyton sp. (em japonês <u>Umi-kinoko</u>) e além de ter seus códons otimizados para expressão em S. cerevisiae, também acumulou mutações na interface de contato entre os monômeros, tronando-se uma versão monomérica de UKG1 [121].

A CDS de ambos genes repórteres foram utilizadas para montar novos vetores de expressão (confirmações de montagem apresentadas na sessão 6.2.2). E assim como nos demais experimentos, foi idealizado tanto um vetor de expressão contendo o gene repórter controlado pelo promotor candidato quanto um controle de expressão basal. Estes foram transformados no *background* JGY_016 e as linhagens resultantes foram induzidas à esporulação (tal qual estabelecido na sessão 6.2.3.3) e analisadas por citometria de fluxo sob os mesmos parâmetros estabelecidos anteriormente (sessão 6.2.3.1).

Para evidenciar a melhoria ao empregar as versões de GFP propostas nesta sessão, foi utilizado como controle adicional, a linhagem transformada com o gene repórter *EGFP*. A Figura 26 resume os resultados de citometria de fluxo destas análises. Eventos marcados em verde dentro da população "não tétrade" (P2) seriam considerados potenciais diploides recombinantes. Foram utilizados como controle neste experimento a linhagem selvagem (JGY_016) e os controles de expressão basal para cada uma das proteínas repórter em análise (JGY_018, 020 e 008; controles para a *yZsGreen, ymUKG1* e *EGFP*, respectivamente).

Como esperado, tanto a linhagem selvagem, quanto os controles de expressão basal, apresentaram apenas sinais de autofluorescência em todas as condições avaliadas (mitose, pré-esporulação e meiose) (Figura 26 A–L). Ainda conforme esperado, a linhagem contendo o *EGFP* regulado pelo promotor 2 não permitiu evidenciar a expressão do gene repórter, fosse ao longo da mitose, meiose ou pré-esporulação (Figura 26 M-O).

Como suposto, a maior intensidade de fluorescência inerente às novas proteínas candidatas permitiu detecção de eventos às expressando (Figura 26 R e U). No entanto, apesar da proteína repórter *yZsGreen* ser detectável ao longo da meiose (Figura 26 R), ela também foi identificada na mitose e na pré-esporulação, o que nos levou a desconsiderá-la como uma boa candidata para a abordagem proposta (Figura 26 P e Q).

Por fim, os testes para a proteína repórter *ymUKG1* mostram que ela é, de fato, expressa apenas ao longo da indução da esporulação (Figura 26 U) e não é possível evidenciar sua expressão ao longo da mitose ou pré-esporulação (Figura 26 S e T). Este fato, por si, classificaria a *ymUKG1* como um bom candidato para a abordagem do *RTGeasy*. No entanto, apesar de identificar a expressão do *ymUKG1* apenas na meiose, os eventos não se encontram agrupados exclusivamente no *gate* de "não tétrades" (Figura 27) e sugerem a existência de diferentes populações.



Figura 26: Resumo dos resultados obtidos por citometria de fluxo para análise das proteínas repórteres candidatas. É apresentado apenas as análises que compreendem FSC-A x SSC-A, sendo eventos marcados em magenta correspondentes à detecção de autofluorescência e eventos verdes, aqueles que expressam a proteína repórter. Cada coluna representa uma das condições de cultivo (mitose, pré-esporulação e meiose), para cada linha uma linhagem analisada. (A-C) JGY_016 – diploide selvagem utilizado para determinar parâmetros de autofluorescência, (D-F) JGY_018 – controle de expressão basal para o gene repórter *yZsGreen*, (G-I) JGY_020 – controle de expressão basal para o gene repórter *yMUKG1*, (J-L) JGY_008 – controle de expressão basal para o gene repórter *EGFP*, (M-O) JGY_002 – *EGFP* controlado pelo promotor candidato 2, (P-R). JGY_021 – *yZsGreen* controlado pelo promotor candidato 2, (S-U) JGY_019 – *ymUKG1* controlado pelo promotor candidato 2.



Figura 27: Resultados obtidos por citometria de fluxo para definir se a proteína repórter ymUKG1 se adequa as necessidades da abordagem proposta. Ambas as imagens apresentam o resultado da análise para a linhagem JGY_019 após 24 horas de indução da esporulação, levando em consideração tamanho celular e complexidade citoplasmático (FSC-A x SSC-A). (A) Dotplot apresentado na Figura 26 U, no qual é evidenciado o *gate* de "não tétrades" e apresentam-se em verde os eventos que expressam ymUkG1. (B) Análise para o mesmo gráfico em (A), porém agrupando os eventos em possíveis populações mediante densidade de ocorrência dos eventos. Notar que, aparentemente, existem quatro populações que expressam o ymUkG1 e que a população indicada pela seta A encontrasse dentro do *gate* de "não tétrades".

O espalhamento dos eventos expressando a proteína repórter para fora do *gate* "não tétrades", pode corresponder tanto as mudanças na complexidade citoplasmática das células que iniciaram a meiose como indivíduos que passaram pelo ponto de comprometimento e acumularam a proteína repórter até a formação das possíveis tétrades. Para minimizar ao máximo possíveis falsos positivos ao recolher eventos por *cell sorter* acoplado à citometria de fluxo é proposto na próxima sessão um sistema de coexpressão de duas proteínas repórteres, sendo uma delas utilizadas para marcar exclusivamente a presença de tétrades.

6.2.3.7 Implementação de um sistema baseado na coexpressão de duas proteínas repórteres para citometria de fluxo.

O sistema de coexpressão idealizado para minimizar o recolhimento de falsos positivos ao realizar o *cell sorter* é baseado em um vetor de expressão contendo dois *cassetes*. O primeiro compreende a CDS do gene *ymUKG1* regulada pelo promotor candidato 2, o segundo consiste na proteína de parede SPS2 fusionada à proteína repórter laranja *CyOFP1* (Figura 28). Deste modo, esperasse que eventos expressando apenas o *ymUKG1* representem células com potencial de passar pelo RTG e células coexpressando, tanto o *ymUKG1* quanto o *CyOFP1* indiquem células que já completaram a esporulação e não devem ser recolhidas.



Figura 28: Ilustração do cassete de expressão para o sistema de coexpressão de duas proteínas repórteres. O primeiro cassete de expressão é constituído da CDS da proteína repórter *ymUkG1* regulado pelo promotor candidato 2 e pelo terminador CYC1. Já o segundo *cassete* consiste na *CDS* da proteína repórter *CyOFP1* fusionada a *CDS* da proteína de parede de esporos SPS2, ambas reguladas pelo promotor SPS2 e pelo terminador IDP. Deste modo, a expressão da proteína repórter laranja indicará eventos que já terminaram a meiose e, consequentemente não devem ser recolhidos. [Imagem gerada com o programa SnapGene Viewer].

Assim, a nova estratégia de *gate* se baseia em (i) eliminar *doublets*; (ii) determinar eventos expressando a proteína repórter e (iii) distinguir tétrades de não tétrades. Os dois primeiros *gates* se mantiveram tal qual proposto na sessão 6.2.3.1. Já o terceiro *gate* foi desenhado com base nos princípios de duplo positivo.

A partir da população "*singlets*" determinada com base nos parâmetros FSC-A x FSC-H (Figura 29 A-C) foram realizadas duas análises. A primeira (FITC-A x FSC-H) foi aplicada para definir padrões de autofluorescência, assim, eventos dentro da população "*GFP* positivo" (P3) seriam considerados indivíduos expressando a proteína verde fluorescente (Figura 29 D-F). Com base na segunda análise (FITC-A x PE-A) foi realizada a distinção entre tétrades e não tétrades. Diferente do que foi apresentado na sessão 6.2.3.1, esta análise se baseou no padrão de emissão para duas proteínas repórteres. Assim, tanto eventos expressando o *CyOFP1* (Q1), quanto eventos coexpressando ambos os repórteres (Q2) seriam considerados indesejáveis. Já eventos que evidenciam apenas a expressão do repórter *ymUKG1* (Q3) seriam considerados de interesse à abordagem do *RTGeasy* (Figura 29 G - I).



Figura 29: Determinação dos FACS gatting para identificação e coleta de diploides recombinantes. (A-C) Triagem padrão para seleção de singlets em análises de citometria de fluxo – bFSC-A x FSC-H. (D–F) Gate para confirmação da detecção do ymUKG1 – FITC-A x FSC-A. A determinação de sinais de autofluorescência foi realizada com base na comparação dos sinais obtidos para diploide selvagem JGY_016 em crescimento mitótico (D) e para o controle positivo de expressão do ymUkG1, a JGY_024 com 24 horas de indução a esporulação (E). (G–I) Discriminação entre eventos que expressam o ymUkG1 e que possivelmente ainda não passaram pelo ponto de comprometimento (Q4), dos eventos que já finalizaram a meiose (Q3 – coexpressão das proteínas repórter ymUKG1 e CyOFP1) – FITC-A x PE-A.

Com base na análise preliminar dos *FACs gatting* à ser implementado fica evidente que 24 horas de indução à esporulação reduz muito a possibilidade de encontrar células que ainda não passaram pelo ponto de comprometimento (Figura 29 I), assim, levando em consideração os resultados de identificação de transcritos (apresentado na sessão 6.2.3.3), no qual indica pico de expressão do gene endógeno após 24 horas, o experimento de *cell sorting* foi idealizado com uma cultura induzida por 20 horas em meio SM, além da cultura esporulando por 24 horas, a qual foi mantida com finalidade de comparar se a diferença de quatro horas seria suficiente para reduzir a frequência de tétrades já formadas.

A aquisição dos 1000 eventos foi feita diretamente em 200µL de meio YEPD líquido e depois plaqueados em YEPD pH 1,9 (\pm 0,01). Como tentativa adicional de se confirmar que o *gate* estabelecido de fato exclui tétrades, foram adquiridos 100 eventos em tampão fosfato (PBS1X) para que estes fossem analisados por microscopia. Apesar de nenhum dos indivíduos avaliados ser tétrade, só foi possível analisar 5% da cultura induzida por 20 horas e 2% da cultura induzida por 24 horas, sendo altamente recomendável uma nova avaliação da abordagem sugerida. Quanto aos indivíduos que passaram pelo *shift* nutricional, eles foram cultivados em meio YEPD sólido com pH ajustado para 1,89. Após o crescimento forma recuperados aproximadamente 15% indivíduos plaqueados.

7 CONCLUSÕES

Ao fim do projeto conseguimos padronizar e estabelecer o uso da abordagem do RTG convencional para o possível desenvolvimento de leveduras industriais, técnica esta que até então estava bem estabelecida para a resolução de QTLs. Sendo demonstrado o uso desta metodologia para reestabelecer o fenótipo de tolerância a baixo pH em um diploide que o havia perdido.

Adicional ao estabelecimento e padronização do RTG convencional, evidenciamos que fenótipos selecionáveis, tal qual a auxotrofia e a tolerância a baixo pH, podem gerar elevada eficiência de recolhimento de diploides recombinantes uma vez que o *screening* pode tanto ser direcionado pelos fenótipos de interesse, quanto mediante presença de uma seleção positiva. Ainda mais interessante, é o fato de conseguirmos, por seleção positiva, recolher 100% de eventos com fenótipo de interesse.

No entanto, fenótipos não selecionáveis, como por exemplo a eficiência no processo fermentativo demandam o *screening* de grande número de indivíduos. Para enriquecer o recolhimeno de possíveis diploides recombinantes e também, para eliminar a variável tempo de indução à esporulação, propusemos associar a abordagem do RTG à citometria de fluxo.

As tentativas de estabelecer a abordagem do *RTGeasy* mostraram que tanto a proteína *EGFP* (sem otimização de códon para *S. cerevisiae*) quanto a *CyOFP1* não são repórteres eficientes quando regulados pelos promotores propostos. Possivelmente devido ao reduzido nível de transcrição gênica durante a meiose e/ou por demandarem bioacumulação. Também foi possível descartar o uso da proteína repórter *yZsGreen* regulada pelo promotor 2, pois a mesma foi expressa ao longo da mitose.

Por fim, conseguimos evidenciar a potencial funcionalidade da abordagem proposta, ao desenvolver um vetor de expressão baseado na coexpressão das proteínas repórter *ymUkG1* e *CyOFP1*. Sendo a primeira regulada pelo promotor candidato 2 e a *CyOFP1* expressa em fusão com a proteína de parede de tétrades SPS2, esta utilizada como marcadora de indivíduos que já encerraram o ciclo celular meiótico.

Apesar de termos conseguido recolher por citometria de fluxo indivíduos que retomaram a capacidade de crescer em pH 1,75 ($\pm 0,01$), ainda se faz necessário validar a frequência de não-tétrades recolhidas, dado que por microscopia só foram observados 5% do total de eventos recolhido.

Mesmo sendo promissora, a abordagem ainda pode ser aprimorada e são propostas duas medidas: (i) ampliar a busca por promotores com o intuito de encontrar um candidato que seja expresso com menor tempo de indução à esporulação e assim reduzir a frequência de tétrades na cultura e (ii) implementar uma sinalização para a via da ubiquitinação na proteína repórter *ymUkG1*, no intuito de reduzir sua meia vida.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

 Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:11206–10.

2. Della-Bianca BE, Basso TO, Stambuk BU, Basso LC, Gombert AK. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? Applied Microbiology and Biotechnology. 2013;97:979–91.

3. Energia M de M e, EPE. Plano Decenal de Expansão de Energia 2027. 2018.

4. Botstein D, Fink GR. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. Genetics. 2011;189:695–704.

5. Duina A a., Miller ME, Keeney JB. Budding yeast for budding geneticists: A primer on the Saccharomyces cerevisiae model system. Genetics. 2014;197:33–48.

6. Cai Z, Zhang B, Li Y. Engineering Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic xylose fermentation: reflections and perspectives. Biotechnol J. 2012;7:34–46.

Laluce C, Schenberg CG, Gallardo JCM, Coradello LFC, Pombeiro-Sponchiado SR.
 Advances and developments in strategies to improve strains of Saccharomyces cerevisiae and processes to obtain the lignocellulosic ethanol - a review. Appl Biochem Biotechnol.
 2012;166:1908–26.

8. Paulova L, Patakova P, Branska B, Rychtera M, Melzoch K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. Biotechnol Adv. 2015;33:1091–107.

9. Zymanczyk-Duda E, Brzezinska-Rodak M, Zerka A. Yeast as a versatile tool in biotechnology. In: Yeast - Industrial Applications. 2017. p. 13.

10. Ardiani A, Higgins JP, Hodge JW. Vaccines based on whole recombinant Saccharomyces cerevisiae cells. FEMS Yeast Res. 2010;10:1060–9.

 Zhang T, Sun L, Xin Y, Ma L, Zhang Y, Wang X, et al. A vaccine grade of yeast Saccharomyces cerevisiae expressing mammalian myostatin. BMC Biotechnol. 2012;12:1. doi:10.1186/1472-6750-12-97.

12. Fontes GC, Amaral PFF, Coelho MAZ. Biosurfactants production by yeasts. Quim Nova. 2008;31:2091–9.

 Krivoruchko A, Nielsen J. Production of natural products through metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae. Curr Opin Biotechnol. 2015;35:7–15. doi:10.1016/j.copbio.2014.12.004.

14. Geva P, Kahta R, Nakonechny F, Aronov S, Nisnevitch M. Increased copper bioremediation ability of new transgenic and adapted Saccharomyces cerevisiae strains.
Environ Sci Pollut Res. 2016;23:19613–25. doi:10.1007/s11356-016-7157-4.

15. Argueso JL, Carazzolle MF, Mieczkowski PA, Duarte F, Netto OVC, Missawa SK, et al. Genome structure of a Saccharomyces cerevisiae strain widely used in bioethanol production. Genome Res. 2009;19:2258–70.

16. Della-Bianca BE, Gombert a K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. Antonie Van Leeuwenhoek. 2013;104:1083–95.

17. Steensels J, Snoek T, Meersman E, Nicolino MP, Voordeckers K, Verstrepen KJ.Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. FEMS Microbiol Rev. 2014;38:947–95.

18. McDonald MJ, Rice DP, Desai MM. Sex speeds adaptation by altering the dynamics of molecular evolution. Nature. 2016;531:233–6.

19. Ausubel FM, Brent R., Kingston RE., Moore DD., Seidman JG., Smith AJ., et al. Current Protocols in Molecular Biology. New York - USA: John Wiley & Sons Inc; 1998.

20. Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN. Random spore analysis in yeast. CSH Protoc. 2006.

21. Tong A, Evangelista M, Parsons A, Xu H, Bader G, Pagé N, et al. Systematic Genetic Analysis with Ordered Arrays of Yeast Deletion Mutants. Science. 2001;294:2364–8.

22. Ludlow CL, Scott AC, Cromie GA, Jeffery EW, Sirr A, May P, et al. High-throughput tetrad analysis. Nat Methods. 2013;10:671–5.

23. Treusch S, Albert FW, Bloom JS, Kotenko IE, Kruglyak L. Genetic Mapping of MAPK-Mediated Complex Traits Across S. cerevisiae. PLoS Genet. 2015;11:e1004913.

24. Laureau R, Loeillet S, Salinas F, Bergström A. Extensive Recombination of a Yeast Diploid Hybrid through Meiotic Reversion. 2016;:1–30.

25. Li GW, Xie XS. Central dogma at the single-molecule level in living cells. Nature. 2011;475:308–15.

26. Pukkila PJ. Molecular Biology: The Central Dogma. Encycl Life Sci. 2001;:1–5.

27. Pierce BA. Capítulo 13: Transcrição. In: Genética: um enfoque conceitual. 2014. p. 321–
42.

28. Lubliner S, Regev I, Lotan-Pompan M, Edelheit S, Weinberger A, Segal E. Core promoter sequence in yeast is a major determinant of expression level. Genome Res. 2015;25:1008–17.

29. Butler JEF, Kadonaga JT. Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. Genes Dev. 2001;15:2515–9.

30. Lubliner S, Keren L, Segal E. Sequence features of yeast and human core promoters that are predictive of maximal promoter activity. Nucleic Acids Res. 2013;41:5569–81.

31. Nevoigt E, Kohnke J, Fischer CR, Alper H, Stahl U, Stephanopoulos G. Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in Saccharomyces cerevisiae. Appl Environ Microbiol. 2006;72:5266–73.

32. Da Silva NA, Srikrishnan S. Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Res. 2012;12:197–214.

33. Partow S, Siewers V, Bjorn S, Nielsen J, Maury J. Characterization of different promoters

for designing a new expression vector in Saccharomyces cerevisiae. Yeast. 2010;:955-64.

34. Redden H, Morse N, Alper HS. The synthetic biology toolbox for tuning gene expression in yeast. FEMS Yeast Res. 2015;15:1–10.

35. Alper H, Fischer C, Nevoigt E, Stephanopoulos G, Demasi J, Huh K, et al. uning genetic control through promoter engineering," by Hal Alper, Curt Fischer, Elke Nevoigt, and Gregory Stephanopoulos, which appeared in issue 36, September 6, 2005, of. Pnas. 2006;103:3006–7. doi:10.1073/pnas.0507062103.

36. Tirosh I, Berman J, Barkai N. The pattern and evolution of yeast promoter bendability --Supplementary Material. Trends Genet. 2007;23:318–21.
http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCY-4NF2N9R-1/2/97f118caebdbecf1c80a6a81cb795b01.

37. Tora L, Timmers HTM. The TATA box regulates TATA-binding protein (TBP) dynamics in vivo. Trends Biochem Sci. 2010;35:309–14. doi:10.1016/j.tibs.2010.01.007.

38. Rostad CA, Currier MC, Moore ML. Fluorescent and bioluminescent reporter Myxoviruses. Viruses. 2016;8:1–13.

39. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. J Cell Comp Physiol. 1962;59:223–39. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13911999.

40. Shimomura O. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. FEBS Lett. 1979;104:220–2.

41. Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW. Chemical Structure of the Hexapeptide Chromophore of the Aequorea Green-Fluorescent Protein. Biochemistry. 1993;32:1212–8.

42. Chudakov DM, Matz M V., Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. Physiol Rev. 2010;90:1103–63.

43. Tsien RY. The green fluorescent protein. 1998.

44. Nolles A, Westphal AH, Kleijn JM, van Berkel WJH, Borst JW. Colorful packages:Encapsulation of fluorescent proteins in complex coacervate core micelles. Int J Mol Sci.2017;18.

45. Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein. Science (80-). 1996;273:1392–5.

46. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. PNAS. 2000;97:11984–9.

47. Verkhusha V V., Akovbian NA, Efremenko EN, Varfolomeyev SD, Vrzheshch P V. Kinetic analysis of maturation and denaturation of DsRed, a coral-derived red fluorescent protein. Biochem. 2001;66:1342–51.

48. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, et al. A monomeric red fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:7877–82. doi:10.1073/pnas.082243699.

49. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein (Bioluminescence; Cnidaria; aequorin; energy transfer; chromophore; cloning). Biochem Mol Biol Mayo Found. 1992;111:284–2065. https://journals.scholarsportal.info/pdf/03781119/v111i0002/229_psotavgp.xml.

50. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science (80-). 1994;263:802–5.

51. Bothma JP, Norstad MR, Alamos S, Garcia HG. LlamaTags: A Versatile Tool to Image Transcription Factor Dynamics in Live Embryos. Cell. 2018;173:1810-1822.e16. doi:10.1016/j.cell.2018.03.069.

52. Picco A, Irastorza-Azcarate I, Specht T, Böke D, Pazos I, Rivier-Cordey AS, et al. The In Vivo Architecture of the Exocyst Provides Structural Basis for Exocytosis. Cell. 2017;168:400-412.e18.

53. Patel SG, Sayers EJ, He L, Narayan R, Williams TL, Mills EM, et al. Cell-penetrating peptide sequence and modification dependent uptake and subcellular distribution of green

florescent protein in different cell lines. Sci Rep. 2019;9:6298. doi:10.1038/s41598-019-42456-8.

54. Peskett TR, Rau F, O'Driscoll J, Patani R, Lowe AR, Saibil HR. A Liquid to Solid Phase Transition Underlying Pathological Huntingtin Exon1 Aggregation. Mol Cell. 2018;70:588-601.e6.

55. Macey MG. Flow Cytometry: Principles and Applications. 1st edition. Humana Press; 2007.

56. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. Crit Rev Biotechnol. 2017;37:163–76. doi:10.3109/07388551.2015.1128876.

57. Bio-Rad. Flow Cytometry Basics Guide. doi:10.1002/ejoc.201200111.

58. Watson J V. The early fluidic and optical physics of cytometry. Communications in Clinical Cytometry. 1999.

59. Shapiro HM, Telford WG. Lasers for Flow Cytometry ARE NEEDED AS LIGHT SOURCES. Curr Protoc Cytom. 2009;:1–17.

60. Wilkerson MJ. Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2012;42:53–71. doi:10.1016/j.cvsm.2011.09.012.

61. Vrána J, Šimková H, Kubaláková M, Číhalíková J, Doležel J. Flow cytometric chromosome sorting in plants: The next generation. Methods. 2012;57:331–7.

62. Kanegane H, Hoshino A, Okano T, Yasumi T, Wada T, Takada H, et al. Flow cytometrybased diagnosis of primary immunodeficiency diseases. Allergol Int. 2018;67:43–54. doi:10.1016/j.alit.2017.06.003.

63. Ikoma MRV, Beltrame MP, Ferreira SIACP, Souto EX, Malvezzi M, Yamamoto M, et al. Proposal for the standardization of flow cytometry protocols to detect minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Rev Bras Hematol Hemoter. 2015;37:406–13.

64. Kanegane H, Futatani T, Wang Y, Nomura K, Shinozaki K, Matsukura H, et al. Clinical

and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. J Allergy Clin Immunol. 2001;108:1012–20.

65. Marsh RA, Villanueva J, Zhang K, Snow AL, Su HC, Madden L, et al. A rapid flow cytometric screening test for X-linked lymphoproliferative disease due to XIAP deficiency. Cytom Part B - Clin Cytom. 2009;76:334–44.

66. Mage PL, Csordas AT, Brown T, Klinger D, Eisenstein M, Mitragotri S, et al. Shapebased separation of synthetic microparticles. Nat Mater. 2019;18:82–9. doi:10.1038/s41563-018-0244-9.

67. Cortez LAB, Cruz CH de B, Souza GM, Cantarella H, Marie-Anne van S, Filho RM.Universidades e empresas: 40 anos de ciência e tecnologia para o etanol brasileiro. São Paulo;2016.

68. Souza GM, Victoria RL, Joly CA, Verdade LM. Bioenergy & Sustainability: 2015.

69. Hideki Ohashi F. O advento, crescimento, crise e abandono do Proálcool. 2008. www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?down=000438155.

70. Macedo I de C. Sugar Cane's Energy - Twelve studies on Brasilian sugar cane agribusiness and its sustainability. Berlendis Editores Ltda.; 2005.

71. EPE. Plano Decenal de Expansão de Energia (PDE) - Sumário Executivo. 2018;:30. http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/Documents/Sumario Executivo PDE 2027.pdf.

72. EPE. Cenários de oferta de etanol e demanda de ciclo Otto 2018-2030. 2017;:41. http://www.epe.gov.br.

73. Basso LC, De Amorim H V., De Oliveira AJ, Lopes ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. FEMS Yeast Res. 2008;8:1155–63.

74. Amorim H V, Lopes ML, de Castro Oliveira JV, Buckeridge MS, Goldman GH. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;91:1267–75.

doi:10.1007/s00253-011-3437-6.

75. Lucena BTL, Santos BM, Moreira JLS, Moreira APB, Nunes AC, Azevedo V, et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. BMC Microbiol. 2010;10:298. doi:10.1186/1471-2180-10-298.

76. Lopes ML, Paulillo SC de L, Godoy A, Cherubin RA, Lorenzi MS, Giometti FHC, et al.
Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. Brazilian J Microbiol.
2016;47:64–76. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.003.

77. Lee SC, Ni M, Li W, Shertz C, Heitman J. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74:298–340.

78. Weismann A. The Evolution Theory. Edward Arnold, London. 1904;1.

79. Raynes Y, Gazzara MR, Sniegowski PD. Mutator dynamics in sexual and asexual experimental populations of yeast. BMC Evol Biol. 2011;11:158.

80. Kao KC, Sherlock G. Molecular Characterization of Clonal Interference during Adaptive Evolution in Asexual Populations of Saccharomyces cerevisiae. Nat Genet. 2008;40:1499–504.

81. Lang GI, Botstein D, Desai MM. Genetic variation and the fate of beneficial mutations in asexual populations. Genetics. 2011;188:647–61.

82. Caspeta L, Nielsen J. Thermotolerant Yeast Strains Adapted by Laboratory Evolution Show Trade-Off at Ancestral Temperatures and Preadaptation to Other Stresses. MBio. 2015;6:1–9.

83. Lang GI, Rice DP, Hickman MJ, Sodergren E, Weinstock GM, Botstein D, et al. Pervasive Genetic Hitchhiking and Clonal Interference in 40 Evolving Yeast Populations. Nature. 2013;500:571–4.

84. Goddard MR, Charles H, Godfray J, Burt A. Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. Nature. 2005;434:636–40.

85. Neiman AM. Sporulation in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae. Genetics.

2011;189:737-65.

86. Mancera E, Bourgon R, Brozzi A, Huber W, Steinmetz LM. High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast. Nature. 2008;454:479–85.

87. Esposito RE, Esposito MS. Genetic recombination and commitment to meiosis in Saccharomyces. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974;71:3172–6.

88. Pan J, Sasaki M, Kniewel R, Murakami H, Blitzblau HG, Tischfield SE, et al. A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. Cell. 2011.

89. Humphryes N, Hochwagen A. A non-sister act: Recombination template choice during meiosis. Experimental Cell Research. 2014;329:53–60.

90. Youds JL, Boulton SJ, Adamo A, Montemauri P, Silva N, Ward JD, et al. The choice in meiosis - defining the factors that influence crossover or non-crossover formation. J Cell Sci. 2011;124 Pt 4:501–13.

91. Sjogren C, Nasmyth K, Sjögren C. Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in Saccharomyces cerevisiae. Curr Biol. 2001;11 March:991–5.

92. Symington LS, Rothstein R, Lisby M. Mechanisms and regulation of mitotic recombination in saccharomyces cerevisiae. Genetics. 2014;198:795–835.

93. Dayani Y, Simchen G, Lichten M. Meiotic recombination intermediates are resolved with minimal crossover formation during return-to-growth, an analogue of the mitotic cell cycle. PLoS Genet. 2011;7:1–14.

94. Tsuchiya D, Lacefield S. Cdk1 modulation ensures the coordination of cell-cycle events during the switch from meiotic prophase to mitosis. Curr Biol. 2013;23.

95. Liu H, Wang Y. The Function and Regulation of Budding Yeast in Response to Interrupted DNA Synthesis. Mol Biol Cell. 2006;17:2746–56.

96. Sherman F, Roman H. Evidence for two types of allelic recombination in yeast. Genetics.

1963;48 February:255-61.

97. Zenvirth D, Loidl J, Klein S, Arbel A, Shemesh R, Simchen G. Switching yeast from meiosis to mitosis : double-strand break repair , recombination and synaptonemal complex. 1997;:487–98.

 98. Alexandrino N, Basso LC. Melhoramento de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa Piracicaba. Universidade de São Paulo;
 2012.

99. Liti G, Louis EJ. Advances in quantitative trait analysis in yeast. PLoS Genet. 2012;8:e1002912.

100. Steinmetz LM, Sinha H, Richards DR, Spiegelman JI, Oefner PJ, McCusker JH, et al. Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. Nature. 2002;416:326–30.

101. Pierce BA. Chapter 22: Quantitative genetics. In: Genetic: A conceptual approach. 2°.W. H. Freeman; 2002. p. 711.

102. Primig M, Williams RM, Winzeler EA, Tevzadze GG, Conway AR, Hwang SY, et al. The core meiotic transcriptome in budding yeasts. Nat Genet. 2000;26:415–23.

103. Gerke JP, Chen CTL, Cohen BA. Natural isolates of Saccharomyces cerevisiae display complex genetic variation in sporulation efficiency. Genetics. 2006;174:985–97.

104. Tomar P, Bhatia A, Ramdas S, Diao L, Bhanot G, Sinha H. Sporulation Genes Associated with Sporulation Efficiency in Natural Isolates of Yeast. PLoS One. 2013;8:6–11.

105. Borde V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Géli V, Nicolas A. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. EMBO J. 2009;28:99–111.

106. Huxley C, Green ED, Dunbam I. Rapid assessment of S. cerevisiae mating type by PCR. Tech Tips. 1990;6:236.

107. Kaishima M, Ishii J, Matsuno T, Fukuda N, Kondo A. Expression of varied GFPs in Saccharomyces cerevisiae: Codon optimization yields stronger than expected expression and fluorescence intensity. Sci Rep. 2016;6 October:1–15. doi:10.1038/srep35932.

108. Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Dominguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. Fungal Genet Biol. 2004;41:973–81.

109. Ma H, Kunes S, Schatz PJ, Bostein D. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. Gene. 1987;58:201–16.

110. Kuijipers NG, Pronk JT, van den Broek M, Daran-Lapujade P, Daran J-M, Bosman L, et al. A versatile, efficient strategy for assembly of multi-fragment expression vectors in Saccharomyces cerevisiae using 60 bp synthetic recombination sequences. Microb Cell Fact. 2013;12:47. doi:10.1186/1475-2859-12-47.

111. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979;7:1513–23.

112. Gietz D, Schiestl R. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat Protoc. 2007;2:31–4.

113. Collart, Martine; Oliviero S. Preparation of yeast RNA by extraction with hot acidic phenol. Curr Protoc Mol Biol. 1993; 13.12.1-5.

114. Mülleder M, Capuano F, Pir P, Christen S, Sauer U, Oliver SG, et al. A prototrophic deletion mutant collection for yeast metabolomics and systems biology. Nat Biotechnol. 2012;30:1176–8.

115. Pronk JT. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. Appl Environ Microbiol. 2002;68:2095–100. doi:10.1128/AEM.68.5.2095.

116. Teixeira GS, Furlan M, Farias A dos S, Pereira GGA. Vetor para expressar proteínas fluorescentes em células haplóides, cassetes de expressão e métodos de obtenção de haplóides de Saccharomyces cerevisiae em escala high-throughput. Inpi. 2017;:1–65.

117. Nakamura Y, Ishii J, Kondo A. Bright fluorescence monitoring system utilizing zoanthus sp. green fluorescent protein (ZsGreen) for human g-protein-coupled receptor signaling in microbial yeast cells. PLoS One. 2013;8:1–18.

118. Chu J, Oh Y, Sens A, Ataie N, Dana H, Macklin JJ, et al. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging in vivo. Nat Biotechnol. 2016;34.

119. Costantini LM, Baloban M, Markwardt ML, Rizzo M, Guo F, Verkhusha V V, et al. A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. Nat Commun. 2015;6 May:7670. doi:10.1038/ncomms8670.

120. Matz M V., Fradkov, Arkady F, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nat Biotechnol. 1999;17:969–73. http://dx.doi.org/.

121. Tsutsui H, Karasawa S, Okamura Y, Miyawaki A. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. 2008;:683–5.

ANEXO A - Bioética



INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto CIBio/IB No. 2011/03 - Genômica e Biotecnologia, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, sub-projeto Desenvolvimento de uma abordagom de evolução sexuaça de Seccharomyces corevisica baseada em citometria de fluxo, da pós-graduanda Juliana Pimentel Galhardo, encontra-se devidamente aprovaço e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

> Cidade Universitària "Zeferino Vaz", 03 de julho de 2018.

Prof. Dr. JOSE LUIZ PROENÇA MÓDENA Presidente da CIBio Instituto de Biologia - UNICAMP

GIBIol® Unicamp Gemissio Interne de Fleesogurança Institute de Bieleg a - Unicamp Calis Fleesi 6100 - 13033-070 Campinas 8P Te., (19; 3521-5359 – exasil: comsib@unics rp.br

ANEXO B – Direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Desenvolvimento de uma abordagem de evolução sexuada em Saccharomyces cerevisiae baseada na seleção de diploides recombinantes por citometria de fluxo**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06 de Setembro de 2019

Assinatura: Juliana P. Galhas

Nome do(a) autor(a): Juliana Pimentel Galhardo RG n.° 48.697,858-8

Assinatura : ___

Nome do(a) orientador(a): **Gonçalo Amarante Guimarães Pereira** RG n.º 56.797.320-7