



Construção de um sistema de expressão sintética em *Aspergillus oryzae* para produção de proteínas recombinantes

Palavras-Chave: Promotor sintético, Albumina bovina, *Aspergillus oryzae*, proteínas recombinantes

Autores(as):

Maria Eduarda Tichauer da Rocha, IB – UNICAMP

Bruno Batista, IB - UNICAMP

Gabriela Souza Alves Picciarelli, IB - UNICAMP

Lana O'Hara Souza Silva, IB - UNICAMP

Paula Macedo Cunha, IB - UNICAMP

Prof. Dr. André Damasio (orientador), IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO

A tecnologia do DNA recombinante revolucionou a biotecnologia ao demonstrar a possibilidade de expressar genes de forma heteróloga, ou seja, em organismos que não os possuem naturalmente. Com essa ferramenta se tornou possível a produção de compostos de interesse em organismos com características mais adequadas, além de possibilitar a modificação eficiente dos atributos genéticos da fábrica celular para otimizar seu desempenho. Essa abordagem tem grande relevância para produção de proteínas devido ao interesse crescente em estratégias eficientes para sua produção, especialmente relacionado à sua ampla aplicação na indústria de fármacos, cosméticos, alimentos e biocombustíveis (GLICK; PATTEN, 2022; NTANA *et al.*, 2020).

Existe uma diversidade de fábricas celulares que podem atuar como sistemas de expressão heteróloga, sendo as principais: bactérias, leveduras, fungos filamentosos e células de mamíferos. Para escolha dessas plataformas é essencial considerar suas vantagens e desvantagens de acordo com o tipo de proteína a ser produzida e sua finalidade (DUMAN-ÖZDAMAR; BINAY, 2021; POURESMAEIL; AZIZI-DARGAHLU, 2023).

As células de mamíferos são muito utilizadas na produção de proteínas para a área farmacêutica devido à similaridade com proteínas humanas (NTANA *et al.*, 2020). As bactérias são interessantes para produção de proteínas devido ao seu rápido crescimento e fácil transformação, porém fatores como modificações pós-traducionais e a capacidade de secreção são limitantes para alta produção de proteínas recombinantes (DUMAN-ÖZDAMAR; BINAY, 2021). Por fim, fungos filamentosos são adequados para produção de proteínas mais complexas e apresentam maior eficiência na secreção de proteínas, devido sua atividade decompositora, modificações pós-traducionais, além do baixo custo de cultivo, sendo assim, estabelecidos como fábricas celulares na produção de proteínas recombinantes (MEYER *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2023).

Dentre os fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus* é responsável por 50% da produção de enzimas utilizadas na indústria alimentícia (LIU *et al.*, 2023). Dentre suas espécies, *Aspergillus oryzae* é muito utilizado por ser designado *Generally Recognized as Safe* (GRAS) concedido pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (He *et al.*, 2019). Uma das vantagens para o uso dessa espécie na produção de proteínas é a baixa produção de metabólitos secundários em contraste com a alta produção de enzimas em condições industriais controladas de crescimento (LIU *et al.*, 2023; FRISVAD *et al.*, 2018).

Entretanto, para o melhor rendimento de proteínas recombinantes, é necessário analisar as limitações biossintéticas da célula durante etapas como: transcrição, tradução, enovelamento, transporte, secreção e degradação (JIN *et al.*, 2021). Para superar tais limitações são utilizadas técnicas de engenharia genética para atingir um alto nível de expressão do gene, por exemplo otimização de códons, engenharia de glicosilação e uso de promotores, nativos ou sintéticos, sendo induzíveis ou constitutivos (NTANA *et al.*, 2020).

Promotores de genes que codificam enzimas hidrolíticas, especialmente amilases, são amplamente utilizados para promover altos níveis de expressão de proteínas recombinantes. Dentre eles, os mais aplicados são o promotor do gene da α -amilase (*PamyB*) e o promotor do gene da glucoamilase (*PglaA*) (JIN *et al.*, 2021; TANAKA;

GOMI, 2021). Esses apresentam como vantagem sua elevada expressão gênica, e sua natureza induzível, permitindo a separação entre a fase de crescimento e a fase de produção de proteínas de interesse por meio da adição do substrato indutor ao meio de cultivo (LIU *et al.*, 2023; TANAKA; GOMI, 2021).

Apesar das vantagens, a característica induzível desses promotores também pode representar uma limitação. O uso dos mesmos promotores que controlam a expressão das amilases leva à produção simultânea dessas enzimas e da proteína de interesse, o que pode gerar competição por recursos celulares durante a síntese proteica. Além disso, a utilização de substratos indutores pode elevar significativamente os custos de cultivo (DALVIE *et al.*, 2024; RANTASALO *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o uso de promotores sintéticos surge como uma alternativa promissora, especialmente aqueles cuja atividade é independente de indutores e que resultam em níveis de expressão gênica iguais ou superiores aos dos promotores convencionais. Essa abordagem permite o cultivo em meios mais econômicos e que não induzem a produção excessiva de proteínas endógenas, contribuindo para redução da sobrecarga metabólica e, potencialmente, para o aumento do rendimento da proteína de interesse, além de diminuir custos associados à sua purificação (DALVIE *et al.*, 2024; RANTASALO *et al.*, 2018). O sistema de expressão sintético (SES) desenvolvido por Rantasalo *et al.* (2018) apresenta essas características, obtendo sucesso na síntese de proteínas recombinantes nos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *A. oryzae* com níveis de expressão superiores aos alcançados por promotores nativos amplamente utilizados, como o promotor do gene *gpda* (*Pgpda*) e *PamyB*. Além disso, o sistema foi desenvolvido com o objetivo de ser universal, ou seja, aplicável a diversos microrganismos eucariotos sem a necessidade de otimização de acordo com o hospedeiro e para isso tem mínima interferência da regulação da expressão gênica endógena, alcançado pelo uso de fatores de transcrição sintéticos. (RANTASALO *et al.*, 2018; REKDAL *et al.*, 2024).

SES é composto por dois cassetes. O primeiro responsável pela síntese constitutiva do fator de transcrição sintético (sTF) por meio de um core promoter fraco universal. O segundo cassete é responsável por níveis altos e ajustáveis de expressão do gene alvo por meio de um promotor forte dependente do sTF. Este é composto por sítios de ligação para o fator de transcrição, sendo que a presença de oito sítios resulta no maior nível de transcrição (RANTASALO *et al.*, 2018; REKDAL *et al.*, 2024).

Diante desses resultados, a inserção do SES em *A. oryzae* se mostra uma estratégia promissora para aumentar a eficiência na produção de proteínas recombinantes, além de reduzir custos de cultivo. O atual trabalho tem como objetivo aplicar esse sistema para produção da proteína recombinante albumina bovina em *A. oryzae*.

METODOLOGIA

1. Desenho do cassete SES-BSA

O desenho do cassete foi feito como uma única molécula de DNA, na qual estavam presentes oito sítios de ligação específicos para o fator de transcrição associados ao core promoter *An_201cp*, formando um promotor constitutivo forte. Junto a eles está o gene responsável por codificar a *BSA* (GenBank: AF542068.1) contendo o peptídeo sinal *GlaA* e uma cauda de histidina, e o terminador *Sc_ADH1t*. Nessa mesma molécula está presente o core promoter *An_008cp*, o gene codificador do fator de transcrição *Bm3R1*, e o terminador *Tr_TEF1t* (RANTASALO *et al.*, 2018). Na região upstream dos sítios de ligação foram adicionados 500 pares de base de homologia ao sítio de integração *IS1* de *A. oryzae*, o mesmo foi feito downstream do terminador *Tr_TEF1t*, para possibilitar a inserção do cassete nessa região do genoma do fungo por reparo por recombinação homóloga (**Figura 1**) (JARCZYNSKA *et al.*, 2021).

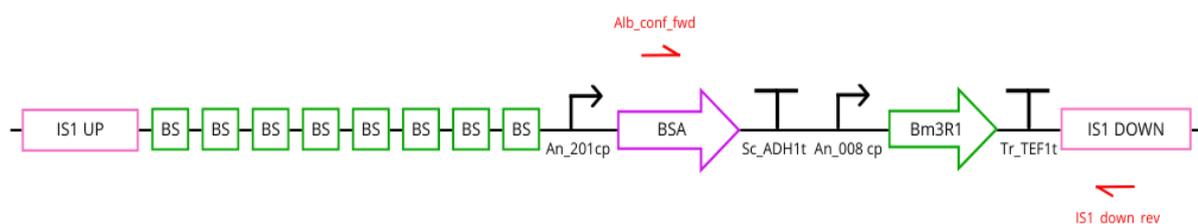


FIGURA 1. Representação esquemática do cassete SES-BSA. Sendo, IS1 UP/DOWN - região de homologia com o sítio de integração IS1 presente no genoma do *A. oryzae*; BS - sítios de ligação ao fator de transcrição; BSA - gene da albumina bovina com peptídeo sinal *GlaA* e cauda de histidina; Bm3R1 - gene do fator de transcrição Bm3R1; An_201 cp e An_008 cp - core promoters; Sc_ADH1t e Tr_TEF1t - terminadores. Alb_conf_fwd e IS1_down_rev – primers utilizados para confirmar a subclonagem de *bsa* no cassete.

2. Síntese do cassete SES-BSA

O cassete foi sintetizado quimicamente e inserido em um plasmídeo pUC57 pela empresa FastBio (*pSES*), exceto o gene *bsa* com o códon otimizado para expressão em *A. oryzae*. A partir do plasmídeo pUC57ALB já disponível em laboratório, esse gene foi amplificado por PCR pelos primers SES002 e SES003 e foi subclonado no *pSES* linearizado por PCR a partir dos primers SES004 e SES005 (**Figura 2**).

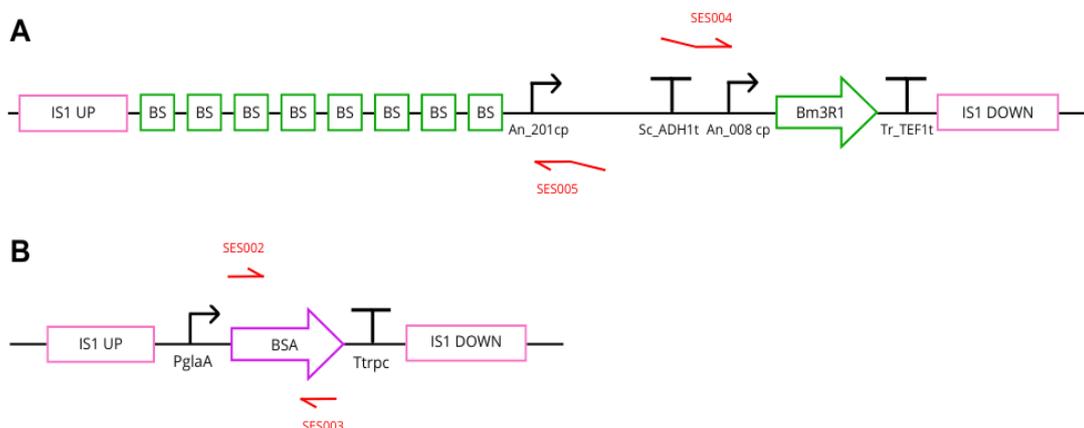


FIGURA 2. (A) Representação esquemática do cassete presente em *pSES*. Para subclonagem de *bsa* otimizada para expressão em *A. oryzae* esse vetor foi amplificado a partir dos primers SES004 e SES005, ambos contêm uma região de homologia com o gene *bsa* possibilitando a fusão por homologia. (B) Representação esquemática do cassete presente em *pUC57ALB*. Para subclonagem de *bsa* o gene foi amplificado pelos primers SES002 e SES003.

3. Clonagem

As ampliações dos fragmentos foram feitas via PCR com DNA polimerase X7 e CloneAMP, os primers utilizados estão indicados na **Tabela 1** e **Figuras 2 e 4**. Para visualização dos fragmentos foi feita eletroforese com gel agarose 0,8 a 2% corado com UniSafe. Adição de gel load 6x nas amostras e uso do marcador O'Gene Ruler 1 kb e 1 kb Plus DNA Ladder Invitrogen. Os fragmentos foram purificados pelo *Kit Monarch PCR & DNA Cleanup* seguindo o protocolo do fabricante e quantificados por Nanodrop. A junção dos fragmentos foi feita com *NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit 2x* com a proporção de 1:1 de vetor e inserto para concentrações entre 70 a 130 ng/μl e incubação a 50°C overnight. Após a construção foi feita a reação do plasmídeo com 1ul de dnp1 e 1ul de Tango a 37°C por 2 horas, a enzima foi desativada a 80°C por 20 minutos após a reação. Todos os plasmídeos foram propagados em *Escherichia coli* DH5α por choque térmico e cultivo em LB com 0,1% de ampicilina a 37°C overnight (170 rpm). Extração de plasmídeos pelo *Monarch Plasmid Miniprep Kit* com os seguintes ajustes ao protocolo: metade do volume dos buffers 1, 2 e 3 quando o cultivo da bactéria era feito em 1 ml, eluição em 30 ul de *Elution Buffer* a 60°C com tempo de reação de 15 minutos. Para confirmação da clonagem foram feitos PCR, restrição enzimática e sequenciamento. Para PCR foi utilizada a mistura para PCR NEX TUPAM TAQ e a DNA polimerase X7, e os primers indicados na **Tabela 1** e **Figura 1**. Para restrição enzimática foi utilizada a enzima NheI a 37°C por 40 minutos. O sequenciamento foi feito pelo laboratório Lactad.

Tabela 1. Primers utilizados no estudo.

| Identificação | Tipo | Sequência | Cauda de homologia |
|---------------|---------|---|--------------------|
| Alb_conf_fwd | Foward | TGTGGACAAATGCTGCGCAG | Ausente |
| IS1_down_rev | Reverse | GCACCGGGTCAATGTGCGCAA | Ausente |
| SES_002 | Foward | ATGTCGTTCCGATCTCTACT | Ausente |
| SES_003 | Reverse | TAGTGGTGATGATGGTG | Ausente |
| SES_004 | Foward | ACCATCATCACCACCACTAACGAATTTCTTATGATTTATG | <i>bsa</i> |
| SES_005 | Reverse | AGTAGAGATCGGAACGACATTTTAAATTAATAATTGTAGTA | <i>bsa</i> |
| SES_012 | Foward | AGGGTTGATATTGCGTTCTCTTTCTTAAGAATATG | Ausente |
| SES_009 | Reverse | CATATGTTCCGAGGCAAGTAG | Ausente |
| SES_010 | Foward | CTACTTGCCTCGAACATATGTTTCGGGGTACCCCGTAATGC | IS1UP |
| SES_011 | Reverse | CATATTCTTAAGAAAAGAGAACGCAATATCAACCCTCGGAATGAACC | Ausente |

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Clonagem da BSA

Para a subclonagem de *bsa* no plasmídeo contendo os componentes do *SES* os fragmentos foram amplificados por PCR (**Figura 3A e 3B**) e fusionados por *NEBuilder Assembly*. Após a transformação da construção em bactéria, uma colônia foi confirmada por PCR (**Figura 3C**) e por digestão enzimática com *NheI* (**Figura 3D**). Esse plasmídeo

foi sequenciado por Sanger e contém a sequência de *bsa* correta.

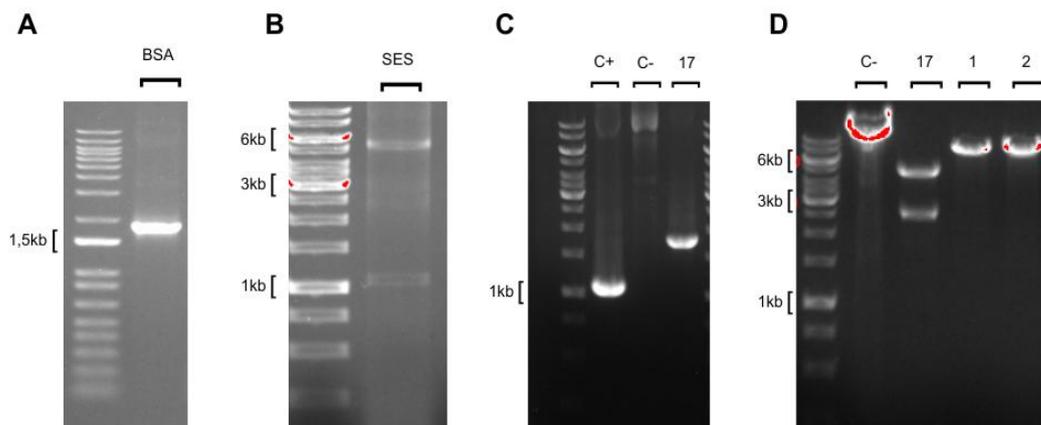


FIGURA 3. Gel de agarose 1% corado com Unisafe. **(A)** Fragmento de *bsa* amplificado por PCR a partir dos primers SES002 e SES003 (1856 bp). **(B)** *pSES* (*pSES*-*BSA* sem o gene *bsa*) amplificado por PCR com os primers SES004 e SES005 (5514 pb). **(C)** Confirmação por PCR da bactéria transformada com *pSES*-*BSA* (colônia 17). Controle positivo (C+) = pUC57ALB (1 kb). Controle negativo (C-): *pSES* (sem amplificação). Para a colônia transformada com *pSES*-*BSA* obtivemos um fragmento de 1780 pb como esperado, foram utilizados os primers Alb_conf_fwd e IS1_down_rev. **(D)** Confirmação da bactéria transformada com *pSES*-*BSA* (colônia 17) por restrição com *NheI*. Controle negativo (C-): *pSES* (digestão em um único sítio de restrição). As colônias 1 e 2 apresentaram padrão semelhante ao controle negativo. A colônia 17 apresentou fragmentos (5 kb e 2,5 kb) conforme esperado para *pSES*-*BSA*.

2. Modificação dos sítios de ligação

Por conter muitas sequências repetitivas a síntese química da região contendo os sítios de ligação não foi possível, mesmo após a reorganização da sua ordem e redução para seis sítios. Diante dessa dificuldade decidimos modificar o cassete inserindo espaçadores diferentes entre cada sítio de ligação, como foi feito por Rekdal *et al.* (2024) (Figura 4). A região dos sítios de ligação contendo os espaçadores, homologia com o promotor *An_201cp* e uma região de sequência aleatória para anelamento de primer, foi sintetizado quimicamente em um plasmídeo pUC57 pela empresa FastBio, e será subclonada no cassete. Para isso os fragmentos foram amplificados por PCR (Figura 5) e serão fusionados por *NEBuilder Assembly*.

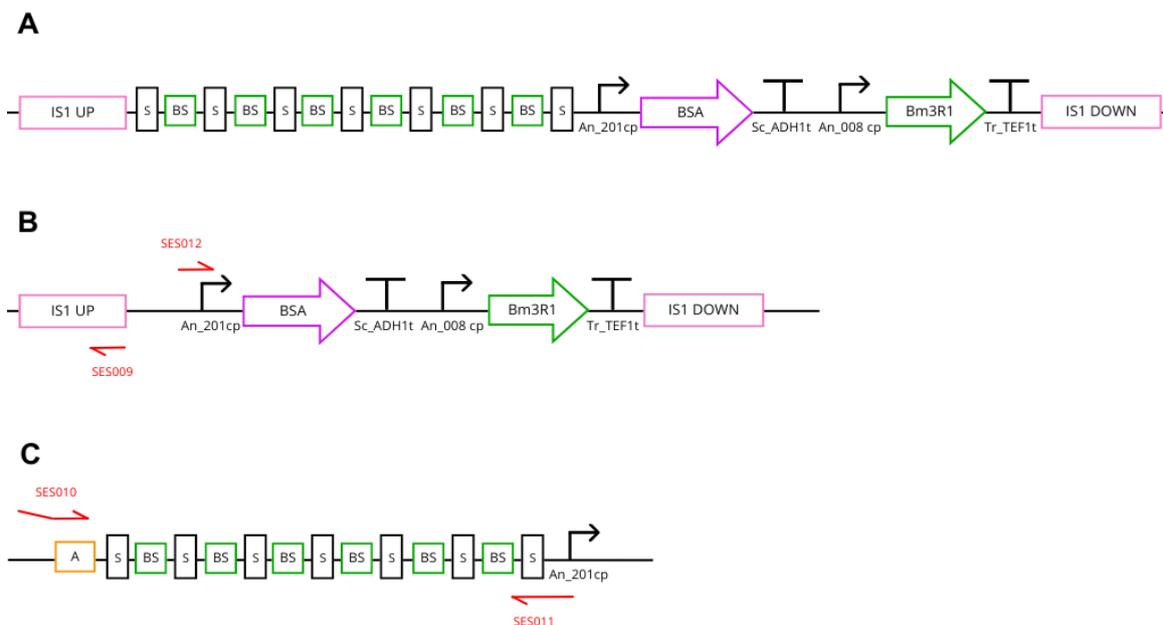


FIGURA 4. **(A)** Representação esquemática do cassete SES-*BSA* com a alteração na região dos sítios de ligação (SES-*BSA*-ES). Houve a redução para seis sítios e a adição de diferentes sequências espaçadoras entre cada um deles. **(B)** Representação esquemática do cassete SES-*BSA* sem região dos sítios de ligação devido a dificuldade de síntese dessa região. Para subclonagem dos sítios de ligação com espaçadores o vetor foi amplificado a partir dos primers SES012 e SES009. **(C)** Representação esquemática da região do sítio de ligação com espaçadores, região de homologia com promotor *An_201cp* e região aleatória para anelamento de primers (A). Para amplificação deste fragmento e subsequente clonagem no vetor *pSES*-*BSA* foram utilizados o primer SES010 (contém homologia a IS1UP) e o primer SES011.

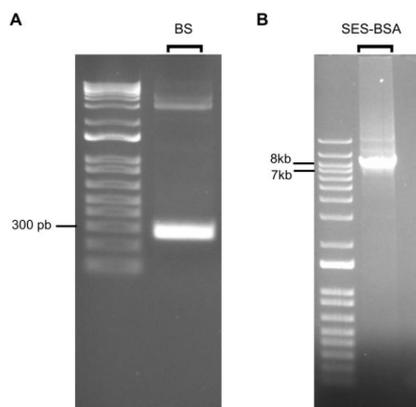


FIGURA 5. (A) Gel de agarose 2% corado com Unisafe. Amplificação por PCR do fragmento BS contendo o sítio de ligação, espaçadores e regiões de homologia ao vetor SES-BSA (286 pb), foram utilizados os primers SES010 e SES011. **(B)** Gel de agarose 0,8% corado com Unisafe. pSES-BSA amplificado por PCR com os primers SES009 e SES012 (7186 pb).

CONCLUSÕES

Até o presente momento a síntese do cassete para expressão de *bsa* a partir do SES não foi concluída, portanto ainda não foi possível testar o sistema. Essa etapa permanece em execução devido a complexidade da região dos sítios de ligação, que apresenta muitas sequências repetitivas. Diante dessa dificuldade a redução e reorganização desses sítios foi testada, contudo essas estratégias não foram eficientes. Atualmente uma abordagem alternativa está sendo desenvolvida, baseada na inserção de espaçadores diferentes entre cada sítio de ligação. Essa se revelou extremamente promissora, uma vez que possibilitou a síntese química da região e a amplificação do fragmento para subclonagem no vetor contendo os componentes SES e o gene *bsa*. Demais experimentos estão sendo conduzidos no momento para finalizar a síntese do cassete.

BIBLIOGRAFIA

- DALVIE, Neil C. *et al.* CRISPR-Cas9 knockout screen informs efficient reduction of the *Komagataella phaffii* secretome. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 23, n. 1, 31 jul. 2024.
- DUMAN-ÖZDAMAR, Zeynep Efsun; BINAY, Barış. Production of Industrial Enzymes via *Pichia pastoris* as a Cell Factory in Bioreactor: current status and future aspects. **The Protein Journal**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 367-376, 15 fev. 2021.
- FRISVAD, Jens C. *et al.* Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 102, n. 22, p. 9481-9515, 6 out. 2018.
- GLICK, Bernard R.; PATTEN, Cheryl L.. **Molecular Biotechnology**: principles and applications of recombinant DNA. 6. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2022. 896 p.
- HE, Bin *et al.* Functional Genomics of *Aspergillus oryzae*: strategies and progress. **Microorganisms**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 103, 10 abr. 2019.
- JARCZYNSKA, Zofia D. *et al.* DIVERSIFY: a fungal multispecies gene expression platform. **Acs Synthetic Biology**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 579-588, 2 mar. 2021.
- JIN, Feng-Jie *et al.* Advances in Genetic Engineering Technology and Its Application in the Industrial Fungus *Aspergillus oryzae*. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, 23 fev. 2021.
- LIU, Dujuan; GARRIGUES, Sandra; VRIES, Ronald P. de. Heterologous protein production in filamentous fungi. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 107, n. 16, p. 5019-5033, 5 jul. 2023.
- MEYER, Vera *et al.* Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. **Fungal Biology And Biotechnology**, [S.L.], v. 7, n. 1, 2 abr. 2020.
- NTANA, Fani *et al.* *Aspergillus*: a powerful protein production platform. **Catalysts**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1064, 16 set. 2020.
- POURESMAEIL, Mahin; AZIZI-DARGAHLU, Shahnam. Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 205, n. 5, 29 abr. 2023.
- RANTASALO, Anssi *et al.* A universal gene expression system for fungi. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 46, n. 18, p. 111, 19 jun. 2018.
- REKDAL, Vayu Maini *et al.* Edible mycelium bioengineered for enhanced nutritional value and sensory appeal using a modular synthetic biology toolkit. **Nature Communications**, [S.L.], v. 15, n. 1, 14 mar. 2024.
- TANAKA, Mizuki; GOMI, Katsuya. Induction and Repression of Hydrolase Genes in *Aspergillus oryzae*. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, 24 maio 2021.