



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Isabella Macedo Toni

**“Desenvolvimento de estratégia para extrusão de lipídios por
engenharia genética, subsequente à análise genética da via exocítica
da microalga *Neochloris oleoabundans*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Isabella Macedo Toni
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética de
Microorganismos.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
Co-orientadora: Laudiene Evangelista Meyer

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

T614d	<p>Toni, Isabella Macedo, 1986- Desenvolvimento de estratégia para extrusão de lipídios por engenharia genética, subsequente à análise genética da via exocítica da microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> / Isabella Macedo Toni. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. Coorientador: Laudiene Evangelista Meyer. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Oleosina. 2. Corpos lipídicos. 3. Microalga. 4. Biocombustíveis. 5. <i>Neochloris oleoabundans</i>. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Mayer, Laudiene Evangelista. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Development of genetic engineering strategy of lipids extrusion, following the genetic analysis of exocytic pathway from microalga *Neochloris oleoabundans*

Palavras-chave em Inglês:

Oleosin

Lipid bodies

Microalga

Biofuels

Neochloris oleoabundans

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Paulo Luiz de Andrade Coutinho

Jorge Maurício Costa Mondego

Data da defesa: 01-12-2011

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 16 de Dezembro de 2011

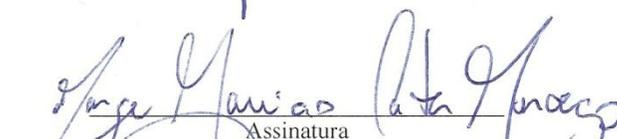
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)



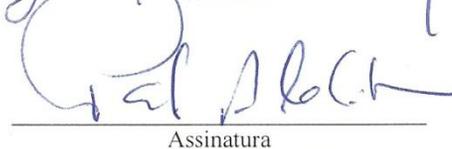
Assinatura

Dr. Jorge Mauricio Costa Mondego



Assinatura

Dr. Paulo Luiz de Andrade Coutinho



Assinatura

Prof. Dr. Fábio Papes

Assinatura

Dr^a. Ana Carolina Deckman

Assinatura

*"Experience is a brutal teacher, but
you learn. My God, do you learn."*

C.S. Lewis

*"Imagination is more important than
knowledge. Knowledge is limited.
Imagination encircles the world."*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Luiz e Marina, por todo amor e apoio. Fazem-me continuar sempre em frente.

À minha irmãzinha, Lívia, por todo amor, carinho e motivação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao professor Gonçalo, pela orientação e apoio nesses seis anos de convivência. Obrigada por todas as oportunidades e por me ajudar a enxergar que posso ir muito mais longe do que imagino.

Aos doutores Jorge Mondego e Paulo Coutinho, membros da banca examinadora, obrigada pela paciência e por aceitarem avaliar o meu trabalho. Suas sugestões e críticas contribuíram muito tanto com o aprimoramento deste trabalho quanto com meu próprio.

Agradeço aos doutores Ana Deckman e Tiburcio, pela paciência e aconselhamento na elaboração da tese.

Aos companheiros do grupo das algas, Raíssa, Bruna, Gustavo, recentemente Rodrigo e Laudiene, em memória. Obrigada pelo apoio, grande aprendizado e amizade. Entrar de cabeça nas algas não foi fácil, mas juntos chegamos longe!

Agradeço a CAPES e a Braskem-Ideom por viabilizarem financeiramente meu projeto.

Agradeço todos os muitos amigos do LGE e a tantos outros que passaram por lá, pela ajuda nos experimentos, por dividir pacientemente os equipamentos, pelos momentos descontraídos e apoio nas madrugadas de trabalho. Foram seis anos nesse laboratório que me deram alegrias e momentos bons com muitas pessoas maravilhosas!

Agradecimentos muito especiais:

Ao André GP, por toda a amizade e companheirismo. Passamos por momentos incríveis e momentos difíceis juntos. Não preciso falar muito porque você sabe o quanto é importante e querido!

Ao Joan, pela amizade e pelas importantes lições profissionais e de vida. Ajudou-me a compreender que posso buscar mais do mundo.

Ao Tchelo, que além da amizade preciosa, me apoiou e ajudou muito no desenvolvimento desse trabalho.

À querida amiga Flávia, por todas as conversas, risadas e todo o carinho! Também por me ensinar a mágica da organização e do cronograma...

Aos grandes amigos Edson, Filipy, Sulinha, Marcelo Meia! Agradeço pelo apoio, conversas e alegrias de tantos momentos. Mais recentemente, mas cada vez mais importante, agradeço também ao querido Benê Sou muito feliz por ter todos vocês como amigos!

À meus pais e irmã, por todo apoio nas horas difíceis, incentivo e compreensão. À minha família, tias, primos, avós, que desde sempre torceram muito por mim. Obrigada pelo apoio! Um obrigado enorme à querida vó Ina, por todo seu otimismo e carinho incondicionais. Amo muito vocês!

ÍNDICE

ÍNDICE	viii
LISTA DE ABREVIACÕES	x
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	xi
RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
1. Fontes fósseis de cadeias carbônicas: problema e alternativas.....	5
2. O uso de microalgas para produção de hidrocarbonetos em larga escala.....	8
3. Lipídios de microalgas para a indústria	9
4. Microalgas em nosso laboratório.....	10
OBJETIVOS	13
1. Compreensão dos mecanismos de secreção de microalga potencial comercial	13
2. Desenvolvimento de sistema de secreção	13
CAPÍTULO I	14
1. Introdução: Tráfego de vesículas em eucariotos	14
1.1. Papel das proteínas da família SNARE na fusão de vesículas	15
1.2. Proposição de estratégia de secreção para microalga.....	17
2. Materiais e métodos	18
2.1. Extração de DNA e seqüenciamento da microalga <i>Neochloris oleoabundans</i>	18
2.2. Montagem do genoma de <i>Neochloris oleoabundans</i>	19
2.3. Identificação das sequências da família SNARE de <i>Neochloris oleoabundans</i>	19
2.4. Caracterização dos membros da família SNARE e análise das sequências encontradas em <i>Neochloris oleoabundans</i>	22
3. Resultados e discussão.....	23

3.1. Caracterização dos membros da família SNARE baseada nos domínios conservados.....	23
3.2. Análise dos membros da família SNARE encontrados no genoma de <i>Neochloris oleoabundans</i>	27
4. Conclusões parciais	33
CAPÍTULO II.....	35
1. Introdução.....	35
1.1. A síntese de triacilglicerídeos e seu armazenamento nos <i>oilbodies</i>	35
1.2. Oleosinas, proteínas acessórias dos <i>oilbodies</i>	37
1.3. Oleosinas como transportadora de moléculas para <i>oilbodies</i>	39
1.4. Particularidades do organismo modelo para transgenia	40
2. Materiais e métodos	41
2.1. Microalga e condições de crescimento	41
2.2. Obtenção da Oleosina.....	42
2.3. Extração do DNA genômico de <i>Oryza sativa</i> e <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	43
2.4. Plasmídeos e <i>primers</i>	44
2.5. Reações de PCR	45
2.6. Outras técnicas de manipulação genética e biologia molecular	48
2.7. Transformação de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	49
3. Resultados e discussão.....	49
3.1. Obtenção da Oleosina.....	49
3.2. Construção do vetor de expressão de oleosina marcada.....	52
3.3. Tranformação de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	63
4. Conclusões parciais	64
CONCLUSÃO FINAL E PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACCCase	Acetil-CoA carboxilase
ACP	proteína carregadora de acil
CoA	Co-enzima A
DMSO	Dimetilsulfoxa
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	2'-desoxinucleotídeos 5'-trifosfato
DTM	Domínio transmembranar
eJ	exaJoule (10^{18} joules)
FAS	Fatty-Acid Synthase - proteína sintetizadora de ácidos graxos
GFP	Green fluorescent protein
Gt	gigatoneladas
kbase	kilobase
LGE	Laboratório de Genômica e Expressão
M	molar
MG	Modelos gênicos
mM	milimolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open reading frame
P	Prolina
pb	pares de base
PCR	Polymerase chain reaction
Pi	Pairwise sequence identity
RE	Retículo endoplasmático
R	Arginina
RNA	ácido ribonucleic
rpm	rotações por minuto
S	Serina
SNAP-25	proteína associada a sinaptossomos de 25-kDa
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
t-SNARE	SNARE de membrane alvo (target)
v-SNARE	SNARE de membrane vesicular
Stx	Sintaxina
TAG	Triacilglicerídeos
TAP	Tris-Acetato-Fosfato
TC	Transcobalamina
TML	Tomosyn-like
V	Volt
v	volume
μmol	micromol
μM	micromolar
VAMP	vesicle-associated membrane proteins
X	aminoácido qualquer

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figuras:

Figura 1: Oscilação do preço do petróleo por interferência de questões políticas dos países com as reservas mais expressivas.....	6
Figura 2: A proposta da nossa pesquisa envolvendo a divisão do processo de produção de lipídios em etapas.....	12
Figura 3: Organelas membranosas e as principais vias de tráfego de vesículas em uma célula eucariótica idealizada.....	14
Figura 4: SNAREs separados e localizados de acordo com os padrões conservados de seus motivos: Q _a -, Q _b -, Q _c - e R.....	16
Figura 5: Fluxograma desenvolvido para identificação <i>in silico</i> dos genes da família SNARE de <i>N. oleoabundans</i>	20
Figura 6: Estrutura geral dos membros da família SNARE, organizados de acordo os principais grupos conservados descritos em bibliografia.....	24
Figura 7: As cinco proteínas encontradas contendo o motivo Q _a -SNARE.	29
Figura 8: As quatro proteínas encontradas contendo o motivo Q _b -SNARE.....	30
Figura 9: As cinco proteínas encontradas contendo o motivo Q _c -SNAREs.....	31
Figura 10: As cinco proteínas encontradas contendo o motivo R-SNARE.....	32
Figura 11: Rota metabólica das microalgas para a produção de triacilglicerol e seu armazenamento em <i>oilbodies</i>	36
Figura 12: Estrutura conservada das oleosinas.....	38
Figura 13: Integração das oleosinas na monocamada lipídica do <i>oilbody</i>	38
Figura 14: Reação padrão de PCR.....	46
Figura 15: Reação padrão de PCR <i>double joint</i>	48
Figura 16: Análise da sequência protéica de oleosina de arroz utilizada no projeto.....	50
Figura 17: (A) Gel de agarose no qual foram aplicadas o Ladder de DNA, amostras do plasmídeo de um transformante positivo, e uma amostra deste tratado com <i>XhoI</i> . (B) Esquema do plasmídeo contendo a oleosina.	51
Figura 18: Sequência da oleosina sintética desenvolvida a partir da oleosina de arroz, com adaptações para <i>C. reinhardtii</i>	51
Figura 19: Montagem do plasmídeo pHsp70A/Rbc-S2-cGFP, a partir dos plasmídeos pKScGFP e pHsp70A/Rbc-S2-cgLuc.....	52
Figura 20: Esquema da obtenção do plasmídeo pBLucOleo-Ble.....	53

Figura 21: Esquema da obtenção do plasmídeo pCGFPoleo-Ble.....	54
Figura 22: Gel de agarose contendo amostras dos plasmídeos pSP124S, pKScGFP e pHsp70A/RbcS2-cgLuc para a realização das montagens propostas	54
Figura 23: (A) Representação do plasmídeo pHsp70A/RbcS2-LucOleo (B) gel de agarose no qual foram aplicadas amostras do plasmídeo pB57 e do plasmídeo pHsp70A/RbcS2-cgLuc tratadas ou não com diferentes enzimas de restrição. (C) Representação do plasmídeo pHsp70A/RbcS2-cgLuc.	55
Figura 24: Fragmentos utilizados para montagem do cassete, com indicação dos materiais a partir dos quais foram amplificados.	56
Figura 25: Geis de agarose contendo amostras da amplificação do Promotor, Oleosina, cGFP, Terminador e gene de resistência à bleomicina.	57
Figura 26: Os fragmentos, amplificados em uma etapa anterior, misturados para a reação de PCR <i>double-joint</i> , na presença de dNTP e polimerase.	58
Figura 27: Reação de PCR <i>double-joint</i> unindo os fragmentos Promotor, Oleosina, cGFP e 3'UTR. Uma segunda reação de PCR <i>double-joint</i> é preparada para unir este material purificado com o fragmento Ble.	58
Figura 28: Novo esquema proposto para a montagem do cassete..	59
Figura 29: Montagem do vetor à partir do plasmídeo pSP124S e do fragmento 2RA incorporado em pGEM-T	60
Figura 30: Géis de agarose contendo amostras dos plasmídeos pGEM-2RA e pSP124S tratados e não tratados com enzimas de restrição..	61
Figura 31: Gel de agarose contendo as amostras de um plasmídeo pOleoGFP-Ble confirmado, tratadas conforme indicado na Tabela 7.	62
Figura 32: C Colônias de <i>C. reinhardtii</i> com 10 dias de crescimento em meio TAP contendo diferentes concentrações de Zeomicina	63
Figura 33: Cultivo previsto de uma microalga modificada com a construção para secreção das reservas lipídicas.....	65
Figura 34: Esquema do dispositivo proposto para promover a secreção de reservas lipídicas.	66
Figura 35: Inserção do dispositivo na membrana e seu funcionamento ao se complexar com os outros SNAREs.....	67
Figura 36: Construção contendo oleosina ligada ao domínio SNARE, identificada com a marca visual GFP.....	68

Tabelas:

Tabela 1: Composição do meio Bold's Basal Medium	18
Tabela 2: Composição molecular dos meios Sueoka High Salt Medium e Tris-Acetato-Fosfato	41

Tabela 3: Plasmídeos com sequências adaptadas para expressão em <i>C. reinhardtii</i> utilizados no projeto.	44
Tabela 4: <i>Primers</i> utilizados nas ampliações dos fragmentos para clonagens e em outras análises.....	45
Tabela 5: Temperaturas de anelamento utilizadas para os pares de <i>primers</i> indicados	46
Tabela 6: Tm1 e Tm2 utilizadas nas reações de PCR <i>double joint</i> com indicação dos primers e fragmentos de DNA utilizados na reação	48
Tabela 7: Restrições e ampliações utilizadas para confirmar a construção pOleoGFP-Ble	62

RESUMO

Há no mundo um consenso sobre a necessidade de se encontrar fontes de carbono renováveis para a substituição do petróleo. O cultivo de microalgas tem sido considerado uma alternativa promissora para suprir essas cadeias carbônicas e biocombustíveis, visto que são microorganismos fotossintetizantes que podem acumular grandes quantidades de triacilglicerol (TAG) como reserva energética. A transesterificação desses TAG por alcoóis simples gera alquil-ésteres, cujas propriedades são muito próximas às encontradas na composição do biodiesel. O glicerol, subproduto da produção de biodiesel, pode ser convertido em propeno, bloco de construção fundamental para a indústria petroquímica. A obtenção de TAG de microalgas requer o cultivo do microorganismo, a recuperação da biomassa do meio líquido e o processamento dessa biomassa para separação da fração lipídica. As etapas de recuperação da biomassa e obtenção da fração lipídica são estágios realmente críticos, de modo que são considerados os principais obstáculos para a viabilidade econômica da produção. A indução artificial da secreção das reservas lipídicas é uma idéia promissora que pode viabilizar a produção de lipídios por microalgas em escala industrial. Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de bases metodológicas para a construção de um vetor que proporcione comprometimento de das reservas lipídicas com o processo de exocitose. Alguns membros da família SNARE são responsáveis por comprometer vesículas com a via exocítica. Propriedade que pode ser artificialmente introduzida nas reservas lipídicas por meio do domínio SNARE. A busca no genoma de *Neochloris oleoabundans*, microalga com alto teor lipídico sequenciada por nosso laboratório, indicou 19 sequências pertencentes à família SNARE. A análise dessas sequencias indicou o gene responsável pela via exocítica. A principal forma de reserva energética de microalga são vesículas de TAG chamadas de *oilbodies*. Em plantas é encontrada a proteína oleosina inserida nesses *oilbodies*, a cuja existência relaciona-se a um aumento de óleo nas sementes. A oleosina pode ser um bom candidato para carregar o motivo SNARE para as reservas lipídicas dos *oilbodies*, levando-os a se fundirem com a membrana plasmática. A necessidade de se confirmar a funcionalidade da oleosina em microalgas levou a construção de um plasmídeo contendo a ORF para oleosina fundida no mesmo quadro de leitura com uma marca visual. A construção foi adaptada para testes em *Chlamydomonas reinhardtii*, uma

microalga modelo. Uma marca de seleção por antibiótico foi adicionada a fim de se facilitar a busca por transformantes. Uma vez confirmado o funcionamento da oleosina, uma construção contendo a proteína ligada ao domínio SNARE de exocitose pode ser construída para *N. oleoabundans* ou qualquer microalga com potencial industrial. Uma tecnologia como essa permitiria a recuperação dos lipídios diretamente do meio de cultura, eliminando etapas críticas para a produção de hidrocarbonetos em larga escala a partir de microalgas e tem potencial de aumentar a taxa de conversão da energia capturada da biomassa em óleo.

ABSTRACT

It is worldwide accepted the vital need to find renewable carbon sources to replace the use of petrol. Microalgae can store triacylglycerol (TAG) as their major energy reservoir. Hence, culturing these photosynthetic microorganisms has been considered a promising alternative for renewable carbon sources and biofuels production. TAG transesterification produces alkyl-ester, which properties are very similar to those found in biodiesel. Furthermore, a byproduct of biodiesel production is glycerol, which can be easily converted to propene, the fundamental block for petro-chemistry industry. Algal TAG production requires the cultivation of the microorganism, followed by dewatering and processing of its biomass in order to obtain the lipid fraction. These last two processes are considered critical and may be regarded as one of the primary obstacles to economic viability of production. Thus, engineered organisms that actively secrete their triacylglycerol content would afford the production of lipids by microalgae in an industrial scale. The aim of this study, therefore, is to establish methodological basis for the development of a molecular device which commits lipid reserves in the exocytosis pathway. Some proteins of SNARE family have the ability to engage their associated vesicles to exocytosis. This property can be artificially introduced into the lipid reserves through the SNARE domain. The triacylglycerol is stored in vesicles called oilbodies, which are the main energy storage in microalgae. Seed plants oilbodies contain imbedded in their membranes proteins called Oleosins, which existence was related to increase in oil reservoir. The anchoring ability of oleosins may be used to carry the SNARE motif to oilbodies, causing them to fuse with the plasma membrane. The genome of *Neochloris oleoabundans*, a high lipid content microalga, was sequenced by our laboratory. Genome wide analysis revealed 19 SNAREs sequences. The probable SNARE required in the exocytosis pathway and the domains were identified and characterized. Aiming to confirm the functionality of oleosin in microalgae, a plasmid containing an oleosin fused in frame with a GFP reporter was built for *Chlamydomonas reinhardtii*, a model microalga. An antibiotic resistance marker was added to allow efficient screening of transformed cells. Once the oleosin function is confirmed in the model, a molecular device comprising the exocytic SNARE domain connected to an oleosin can be built. A device like this can be adapted not only for *N. oleoabundans*, but also to any microalgae with industrial use potential. Such

technology could enable the recovery of TAG lipids directly from the culture medium and would eliminate costly stages of high-scale hydrocarbon production from microalgae. Moreover, it could potentially improve the conversion rate of energy to lipids.

INTRODUÇÃO

1. Fontes fósseis de cadeias carbônicas: problema e alternativas

A longevidade das reservas de petróleo e de outras reservas fósseis preocupa a humanidade há mais de meio século, se tornando foco de inúmeras discussões e estudos. Em 1956 foi realizada uma das primeiras conjecturas sobre o princípio do declínio da produção de petróleo nos Estados Unidos, prevista para a década de 1970 (Hubbert, 1956), suposição realmente confirmada anos mais tarde (Deffeyes, 2005).

Mais grave que o esgotamento das reservas fósseis são as possíveis consequências de sua utilização. Neste sentido, pode-se dizer que o efeito estufa, o consumo de combustíveis e de outros compostos fósseis tem como agravante comum a presença do dióxido de carbono (CO₂) (Johnston et al. 2003; IPCC 2007, pg136).

Assim, levando em conta as emissões antropogênicas, o CO₂ corresponde a 77% da massa de gases estufa liberados, que significou cerca de 38 Gt do gás na atmosfera em 2004 (Bernstein et al., 2007; IPCC, 2007). Pode-se dizer que o quadro torna-se ainda mais assustador ao se constatar que a liberação do carbono de origem fóssil é cerca de 600 vezes maior que o retorno do elemento para reservas fósseis (Hughes & J.R. Benemann, 1997).

Considerando que nada seja feito, previsões indicam que em 2030 as emissões de gás carbônico oriundas de combustível serão 50-110% maiores que as observadas em 2000, estimadas em 25,5 Gt CO₂ (IPCC, 2000, 2007).

A preocupação com o tema deu origem a acordos globais, que delinearão como principal objetivo a necessidade de se estabilizar as concentrações de gases estufa na atmosfera a níveis que permitam prevenir danos ao sistema climático (United Nation, 1992).

A fragilidade de um sistema econômico baseado em derivados fósseis, energéticos ou não, se manifesta em crises mundiais há mais de 40 anos. Combustíveis fósseis fornecem mais de 90% da energia utilizada no mundo todo, mas as reservas são limitadas a algumas regiões (Boudghene Stambouli & Traversa, 2002). Assim sendo, as frequentes questões políticas nos países detentores

das maiores reservas repercute nos custos de produção de bens e serviços (Abbasi et al., 2011) (Figura 1).



Figura 1: Oscilação do preço do petróleo (óleo bruto), como exemplo de reserva fóssil, por interferência de questões políticas dos países com as reservas mais expressivas (Adaptado de WTRG Economics – www.wtrg.com, acesso em 20/10/2011).

O desenvolvimento de energias alternativas e fontes renováveis de esqueletos carbônicos pode ser desafiador, mas a dependência de reservas fósseis será cada vez mais restritiva para a economia global (IPCC, 2007; Nel & Cooper, 2009).

Sabe-se que dentre as alternativas viáveis, a utilização da energia solar é de longe a mais promissora: a superfície terrestre recebe 2.200.000 exaJoules (eJ, 10^{18} Joules) anualmente, considerando os comprimentos de onda disponíveis para fotossíntese. Essa quantia é suficiente para suprir cerca de 5.000 vezes a demanda suprida por combustíveis fósseis (500 eJ em 2005). (Goldemberg & Johansson, 2004; Larkum, 2010).

Neste sentido, pode-se afirmar que os organismos fotossintetizantes possuem sistemas eficientes de conversão de energia solar em química, especialmente na forma de cadeias carbônicas (Moheimani, 2005; Sheehan et al., 1998). Estas podem ser empregadas tanto para fins

energéticos quanto para síntese de plásticos, polímeros e outros produtos usualmente fabricados a partir do petróleo (Rittmann, 2008).

O termo biocombustíveis designa os combustíveis produzidos a partir de biomassa renovável, podendo englobar produtos de natureza bastante diversa (i.e. Etanol, biodiesel, metanol, hidrogênio), obtidos de matérias primas também diversas (i.e. açúcares, amido, óleos, lignocelulose) (Royal Society, 2008). Diversos países têm adotado programas de biocombustíveis baseados na utilização de plantas terrestres, como o etanol de cana-de-açúcar no Brasil, biodiesel de canola na Alemanha e etanol de milho nos Estados Unidos, iniciativas com bons resultados (Demirbas, 2008; Gavrilescu & Chisti, 2005).

Biodiesel é o biocombustível composto por ésteres obtidos de óleos e gorduras de origem renovável (Clements, 1992). A utilização comercial do biodiesel tem se mostrado muito promissora, já que seu desempenho é tão bom quanto o do diesel de petróleo, além de apresentar níveis de gases estufa 40% menores e menos poluentes de ar, em relação ao equivalente fóssil (Brown, 1993; Hill et al., 2006; Raymer & Dyne, 1992). A energia necessária para conversão da matéria prima (óleos e gorduras) em biodiesel é, atualmente, consideravelmente menor que a necessária para a produção de álcool a partir de açúcares (Hill et al., 2006). Hidrocarbonetos de cadeia longa, como encontrado no biodiesel, têm utilidade também como matriz renovável para a indústria petroquímica (Barbirato et al., 1997; Lee et al., 2004).

A importância da substituição das fontes de carbono de origem fóssil é inquestionável, mas os impactos ambientais, econômicos e sociais devem ser considerados no desenvolvimento de políticas para promoção de biocombustíveis. A substituição de fontes fósseis por fontes baseadas em plantas terrestres, principalmente para produção de energia, geraria uma enorme competição com cultivares voltados para alimentação (Cockerill & Martin, 2008; Rittmann, 2008). O aumento na produção de etanol de milho nos Estados Unidos, por exemplo, levou a mais de 50% de aumento nos preços de milho nos últimos anos (UNDP, 2007).

As opções baseadas no uso de microorganismos para a produção de biocombustíveis e matriz renovável para a indústria petroquímica têm se mostrado bastante promissoras, sem apresentar riscos de grandes impactos ambientais ou prejuízo às atividades humanas (Harwood & Guschina, 2009).

Seguindo essa lógica, as microalgas são opções excelentes ao combinarem a capacidade fotossintética com a comodidade e alto rendimento do cultivo controlado de microorganismos (Rosenberg et al., 2008). Os mecanismos moleculares de fotossíntese em microalgas são bastante similares aos de plantas superiores, porém, mais eficientes na disponibilização de energia solar dada a sua estrutura celular simplificada (Sheehan et al., 1998). A eficiência na conversão da energia solar apresentada pelas microalgas também colabora por sua utilização na geração de biomassa, já que, enquanto o máximo teórico para gramíneas C3 é de 2,4% e para as C4 é de 3,7%, a eficiência na conversão da energia solar por microalgas é de 3-9% (Rittmann, 2008; Zhukova & Aizdaicher, 1995).

Certas espécies apresentam conteúdo de óleo que ultrapassam 80% do peso seco da biomassa e representam, portanto, um potencial valioso para a produção de biodiesel e aproveitamento desses esqueletos carbônicos para outros fins (Spolaore et al., 2006).

2. O uso de microalgas para produção de hidrocarbonetos em larga escala

As microalgas já são cultivadas há décadas em escala comercial, voltadas principalmente para indústria alimentícia e produção de metabólitos de valor agregado (Rosenberg et al., 2008). Mas a possibilidade de utilização de microalgas em escalas maiores, para produção de cadeias carbônicas de qualidade a custos baixos, expandiu a busca de tecnologias que tornem possível sua entrada no mercado de forma competitiva (Sheehan et al., 1998).

A biomassa algal apresenta vantagens consideráveis em relação à produção de biomassa a partir de plantas terrestres. A principal delas é que não há competição com culturas voltadas para a alimentação, visto que não há a necessidade de solos férteis. (Benemann, 2008). Possibilita poupar água potável, pois pode utilizar águas residuais ou salgadas para o cultivo, além de utilizar proporcionalmente volumes menores que culturas tradicionais (Chisti, 2007; Sheehan et al., 1998).

Considerando as principais estimativas em relação a cultivares terrestres, microalgas são capazes de produzir 20 a 30 vezes mais óleo por unidade de área, utilizando substratos de baixo custo (Rosenberg et al., 2008; Sheehan et al., 1998). Entretanto, essas estimativas se baseiam em

espécies altamente produtivas associadas a taxas de conversão de luz em biomassa próximas do ideal, fornecendo projeções possíveis, embora ainda não existentes (Stephens et al., 2010).

As prospecções acerca do cultivo em larga escala de microalgas para a produção de biodiesel demonstraram que as limitações não estão associadas a processos de engenharia, mas sim com limitações biotecnológicas dos microorganismos (Rosenberg et al., 2008).

3. Lipídios de microalgas para a indústria

Triacilglicerídeos (TAG) são armazenados em vesículas chamadas de *oilbodies* e constituem a principal forma de reserva energética de microalgas, que são capazes de produzir e estocar naturalmente grandes quantidades desse óleo (Griffiths & Harrison, 2008). Esses lipídios neutros são os precursores mais favoráveis na produção de biodiesel, podendo ser introduzidos na cadeia de produção através de metodologias já empregadas em plantas oleaginosas.

A transesterificação de TAG por alcoóis simples gera alquil-ésteres, cujas propriedades são muito próximas às encontradas na composição do biodiesel. O glicerol é gerado como subproduto da reação e tem emprego como matéria prima para produção de vários compostos químicos.

Alguns processos industriais podem converter com facilidade o glicerol em propeno, bloco de construção fundamental para a indústria petroquímica. A biomassa residual ainda pode ser vendida como ração animal, ou ser convertida a biogás para produção de energia (Benemann, 2008).

A obtenção de TAG de microalgas requer o cultivo do microorganismo, a recuperação da biomassa do meio líquido e o processamento dessa biomassa para separação da fração lipídica. As metodologias usuais para obtenção da fração lipídica envolvem prensas, solventes ou extração com fluidos supercríticos, as quais implicam na destruição das células. O pequeno tamanho celular das microalgas (3–30µm de diâmetro) constitui um problema importante na recuperação da biomassa (Stephens et al., 2010).

As etapas de recuperação da biomassa e obtenção da fração lipídica são estágios realmente críticos, de modo que são considerados os principais obstáculos para a viabilidade econômica da produção comercial de biodiesel de microalgas (Stephens et al., 2010). Juntos, esses processos

correspondem a uma porcentagem relevante do preço do óleo, podendo representar mais de 70% do custo final do óleo bruto (Grima et al., 2003; Pate, 2009; Vaswani, 2009).

Assim, elaborar um processo que permita a recuperação dos lipídios diretamente do meio de cultura, como é feito com o etanol nas usinas de produção de álcool, pode revolucionar a produção de lipídios por microalgas em escala industrial.

Algumas empresas e grupos de pesquisa vêm propondo diferentes tecnologias nesse sentido, como a produção e secreção de ácidos graxos por cianobactérias modificadas, proposta por Liu e colaboradores (2010), ou a extração de lipídios proposta pela empresa OriginOil (Liu et al., 2010; Roessler et al., 2008). Esta última permite a sobrevivências das células e sua reutilização em novos ciclos de acúmulo de lipídios, representando uma enorme economia no tempo necessário para replicação das células (<http://www.originoil.com>).

Estudos revelam que algumas espécies de algas, i.e. *Botryococcus braunii* e *zooxanthellae*, secretam ativamente seus lipídios no meio externo, sugerindo a possibilidade de utilizar processos semelhantes em culturas de microalgas visando a obtenção da fração lipídica (Patton & Burris, 1983; Wolf et al., 2004). Assim, empregando engenharia genética, reservas lipídicas poderiam ser artificialmente induzidas à secreção, de forma espontânea e não invasiva, permitindo a recuperação dos lipídios diretamente do meio de cultura.

4. Microalgas em nosso laboratório

Apesar do grande potencial de produção de lipídios, as microalgas poderão se tornar uma oportunidade viável desde que haja competitividade de custo de produção e visão estratégica de mercados (Benemann, 2008).

Os conhecimentos acerca da biologia desses organismos são imprescindíveis para o desenvolvimento de processos tecnológicos visando o barateamento do processo e o aumento da produção de lipídios.

Há três anos o LGE (Laboratório de Genômica e Expressão) vem adquirindo experiência no uso de manipulação genética e biologia sintética, mas um dos passos iniciais neste estudo consistiu na escolha da espécie de microalga a ser estudada. Com apoio da bibliografia, nosso

grupo de pesquisa se propôs a trabalhar com duas espécies com potencial biotecnológico: As microalgas *Dunaliella tertiolecta* e *Neochloris oleoabundans*.

Como se tratam de espécies pouco estudadas, a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foi escolhida para os experimentos envolvendo manipulação molecular fina, visto que é um organismo modelo para o estudo de vários processos biológicos e possui diversos protocolos de manipulação estabelecidos (Harris, 2009). Posteriormente os conhecimentos gerados serão aplicados para as outras microalgas com maior potencial para produção de biocombustíveis.

A grande atenção da indústria biotecnológica a microalgas pertencentes ao gênero *Dunaliella* se deve a diversos fatores, como a facilidade de cultivo das espécies do grupo; a adaptabilidade a faixas de temperaturas que variam de 0 a 40°C; e a enorme halotolerância, que abrange concentrações salinas de 50 mM a 5 M (Rosenberg et al., 2008). O conteúdo de óleo foi também um atrativo, já que espécies próximas do gênero *Dunaliella* podem apresentar até 57% do peso seco em óleo (Takagi et al., 2006).

Em nosso laboratório, ao contrário da robustez descrita em literatura, o cultivo de *D. tertiolecta* apresentou contaminações recorrentes, crescimento lento e produtividade baixa. Devido a esses e outros problemas apresentados nos estudos com a microalga, esta espécie foi relegada.

A microalga *N. oleoabundans*, por outro lado, apresentou progressiva melhora nas taxas de crescimento (Curado, 2011). Apesar de pouco estudada, foi mencionada em diversos trabalhos por seu teor lipídico alto, em torno de 35 a 54%, podendo apresentar valores próximos a 80% em condições de cultivo favoráveis (Thomas et al., 1984; Tornabene et al., 1983). Os experimentos de manejo realizados por nosso grupo de pesquisa comprovaram esses valores e mostraram que a espécie apresenta excelente resposta à privação de nitrogênio, aumentando em várias vezes seus teores de lipídeos apolares (Curado, 2011).

Sabe-se que em microalgas a duplicação celular e o acúmulo lipídico são metabolicamente divergentes. Enquanto no primeiro caso as cadeias carbônicas são desviadas para a síntese protéica, no segundo o objetivo é o armazenamento dessas cadeias (Rodolfi et al., 2008).

Desse modo, nosso grupo de pesquisa propôs um sistema de cultivo fracionado em duas etapas, a primeira em condições que favoreçam a proliferação celular e a segunda em condições que favoreçam o acúmulo de lipídios (Figura 2). A proposta acarretando a extrusão dessas

reservas lipídicas por exocitose foi incorporada ao sistema de cultivo anteriormente proposto, esta passou a nortear nosso grupo de pesquisa.

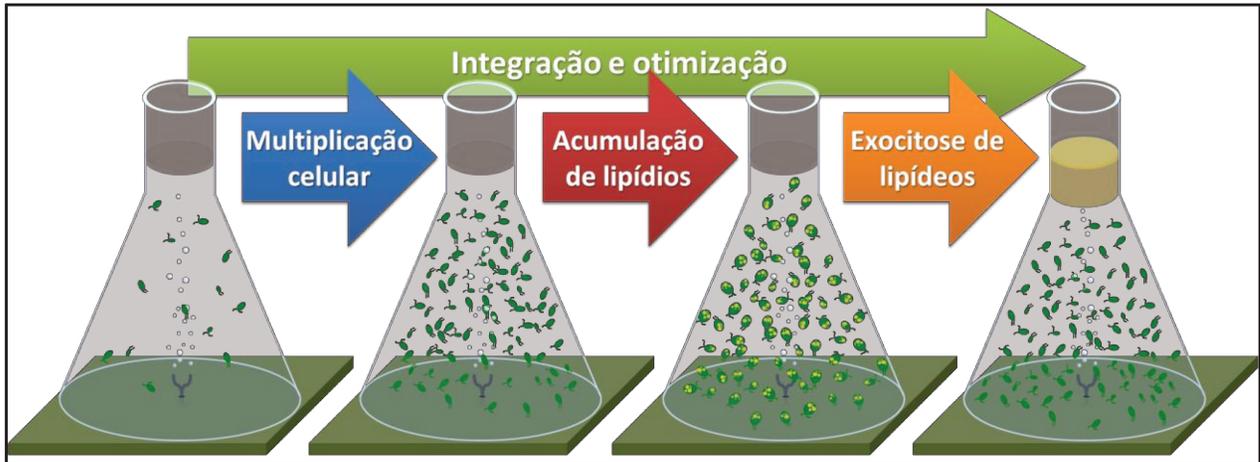


Figura 2: A proposta da nossa pesquisa envolve a divisão do processo de produção de lipídios em etapas: Multiplicação celular, seguida de uma fase de acumulação de lipídios e a indução da exocitose desses lipídios. Cada integrante do grupo se encarregou do estudo de uma etapa, visando sempre a maximização da produção dentro desse sistema de cultivo.

Melhorar a produtividade de microalgas tem sido o principal foco da maioria das pesquisas realizadas para viabilizar sua utilização na produção de combustíveis. Todavia, as etapas de recuperação da biomassa e obtenção da fração lipídica são grandes limitantes da produção de biocombustíveis a partir de microalgas. Uma tecnologia que permita a recuperação dos lipídios produzidos pelas microalgas, diretamente do meio de cultura, representa a eliminação de etapas que representam até 75% do custo final do biodiesel e tem potencial de aumentar a taxa de conversão da energia capturada da biomassa em óleo (Roessler et al., 2008; Stephens et al., 2010; Willson, 2008).

OBJETIVOS

Este trabalho visa à obtenção de bases metodológicas para se desenvolver uma construção que proporcione comprometimento das reservas lipídicas com o processo de exocitose em microalgas, mediante sinalização específica. A proteína oleosina foi identificada como possível candidato para levar o sinal de exocitose às reservas lipídicas.

1. Compreensão dos mecanismos de secreção de microalga potencial comercial

Compreensão dos mecanismos de secreção.

Análise genômica da viabilidade da estratégia em microalga com potencial comercial.

2. Desenvolvimento de sistema de secreção

Elaborar estratégias para comprometimento de *oilbodies* com o processo de exocitose em microalgas.

Montagem de vetor para introdução da oleosina na microalga modelo.

CAPÍTULO I

*Compreensão dos mecanismos de transporte vesicular para proposição de estratégia de secreção viável em microalga com potencial biotecnológico. Os principais genes relacionados à via que poderiam ser empregados na estratégia foram identificados no genoma recém sequenciado da microalga *Neochloris oleoabundans*.*

1. Introdução: Tráfego de vesículas em eucariotos

Células eucarióticas são divididas em compartimentos funcionalmente distintos delimitados por membranas. O tráfego entre os compartimentos membranosos, assim como através da membrana plasmática, é frequentemente mediado por carregadores membranosos, ou vesículas de transporte (Figura 3) (Ungar & Hughson, 2003).

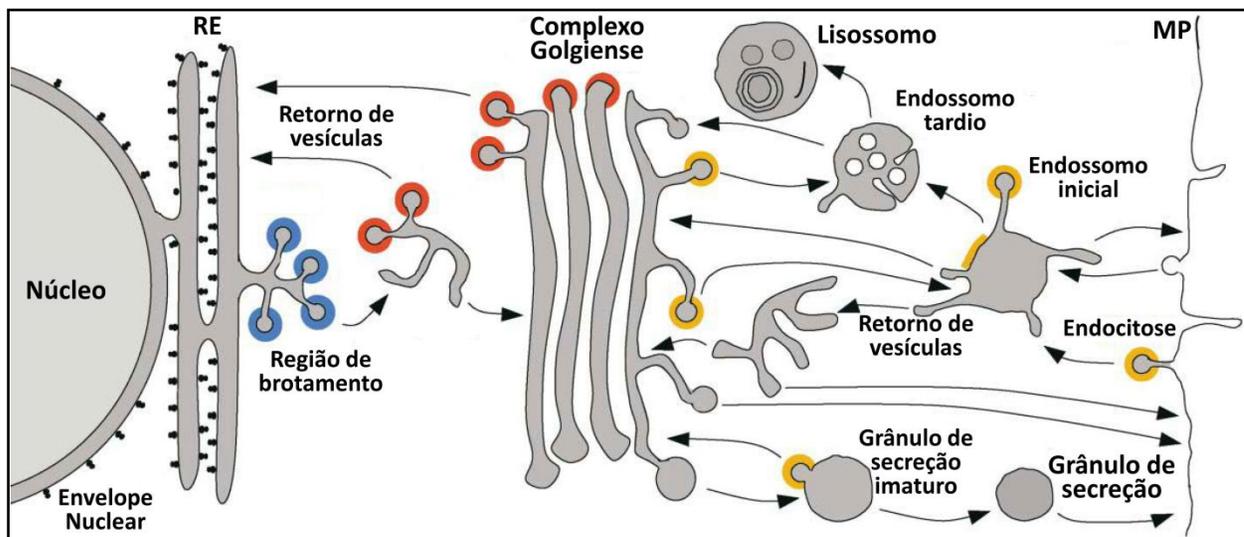


Figura 3: Organelas membranosas e as principais vias de tráfego de vesículas em uma célula eucariótica idealizada. A entrada das proteínas no sistema de endomembranas, na maior parte das vezes, se dá no retículo endoplasmático (RE), antes de serem encaminhadas por meio de vesículas para o complexo golgiense. Depois de atravessarem os compartimentos dessa organela, as proteínas distribuídas em vesículas de transporte são direcionadas para organelas como endossomos, vacúolos, pré-vacúolos, ou são encaminhadas para a membrana plasmática (MP) para exocitose (adaptado de Bonifacino & Glick 2004).

O transporte vesicular se inicia com o brotamento de uma vesícula de um compartimento doador, por meio de um processo que permite a incorporação seletiva de carga na vesícula em formação. Cada um dos compartimentos membranosos tem conteúdo protéico único e o trânsito de vesículas deve identificar corretamente os destinos para entrega. Depois de encontrar seu destino, a vesícula prossegue com o acoplamento e sua fusão com a membrana alvo, liberando seu conteúdo.

O endereçamento apropriado das vesículas é garantido por mecanismos seletivos de reconhecimento da membrana-alvo, proporcionados por famílias de moléculas bastante conservadas em eucariotos. A importância dessas moléculas é tão grande, que se considera o controle do tráfego de vesículas uma inovação chave para permitir o surgimento de organismos eucariotos (Cavalier-Smith, 2002; Jekely, 2003).

1.1. Papel das proteínas da família SNARE na fusão de vesículas

Proteínas cruciais no endereçamento e na fusão de vesículas de transporte intracelular são as pertencentes à família SNAREs (sigla para Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) (Jahn & Scheller, 2006).

Com base na localização e estrutura geral, SNAREs foram inicialmente classificados como t-SNAREs, localizados na membrana alvo, e v-SNAREs, localizados na membrana vesicular, mas são frequentemente identificados por seus correspondentes de vesículas sinápticas (Jahn & Südhof, 1999).

Proteínas pertencentes a esse grupo carregam o motivo helicoidal SNARE, de cerca de 60-65 aminoácidos, que são classificados em Q_a -, Q_b -, Q_c e R- de acordo com resíduos altamente conservados no trecho (Bock et al., 2001; Weimbs et al., 1997). De acordo com o modelo vigente, R-SNAREs na membrana de vesículas reconhecem Q_a -, Q_b - e Q_c -SNAREs cognatos na membrana alvo através de domínios característicos (Jahn & Scheller, 2006).

Os resíduos hidrofóbicos dos motivos SNARE tendem a se agrupar em uma tetra-hélice estável, cuja formação libera a energia necessária para a fusão das bicamadas lipídicas (Figura 4) (Waters & Hughson, 2000; Weber et al., 1998).

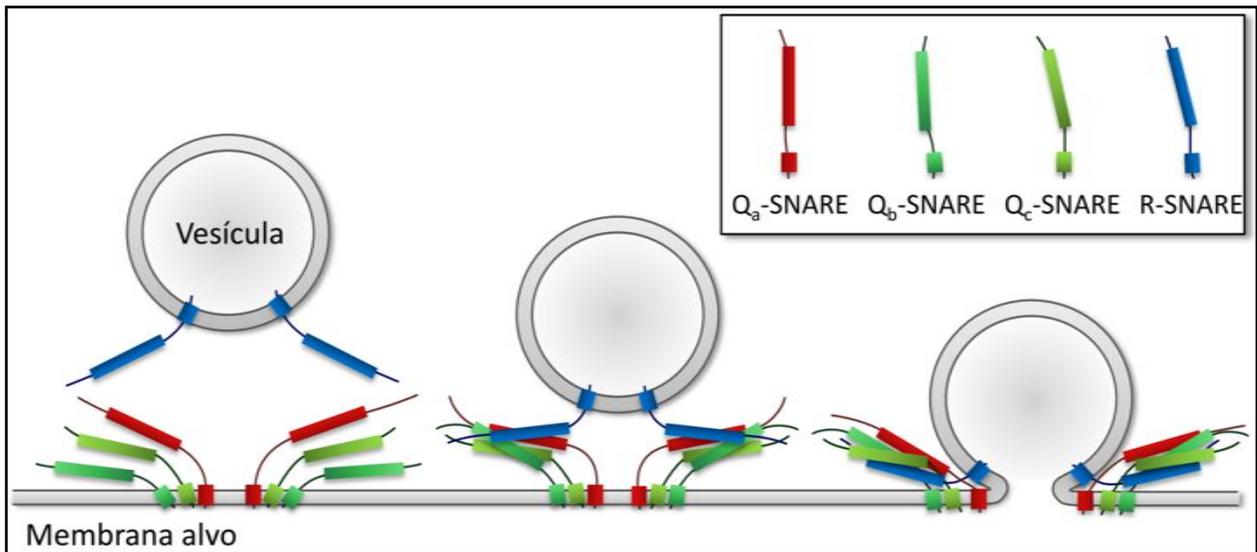


Figura 4: SNAREs separados e localizados de acordo com os padrões conservados de seus motivos: Qa-, Qb-, Qc- e R. O complexoceptor na membrana alvo, formado por motivos Q-SNAREs, interage com o motivo R-SNARE vesicular formando uma tetrahélice estável. O complexo trans-SNARE passa de frouxo para apertado, aproximando as membranas o suficiente para a formação do poro de fusão.

São necessários, portanto, quatro domínios SNARE para que ocorra a fusão das bicamadas lipídicas, um motivo R- fornecido pela vesícula (v-SNARE) e três motivos Q- encontrados na membrana alvo (t-SNAREs). Vesículas são endereçadas ao receberem o v-SNARE que reconhece os t- correspondentes na membrana a qual se destinam, de modo que cada trajeto da via de transporte vesicular é identificada por um conjunto específico (Uemura et al., 2004).

Estudos demonstraram que a propriedade de se complexar em uma tetrahélice e promover a fusão de membranas é mantida também *in vitro*, de forma mais lenta, mas com eficiência razoável, mesmo na ausência de qualquer outra proteína (Hu et al., 2003; McNew et al., 2000; Söllner et al., 1993; Weber et al., 1998).

Weber e colaboradores (Weber et al., 1998) demonstraram que vesículas sintéticas com v-SNARE são capazes de se fundir com outras incorporadas com t-SNAREs cognatos. Em um trabalho subsequente, células foram modificadas por Hu e colaboradores (Hu et al., 2003) para produzir SNAREs com sua porção citoplasmática voltados para o meio extracelular. Células expressando v-SNAREs nesta configuração fundiam-se com eficiência a outras expressando t-

SNAREs correspondentes, confirmando em membranas nativas que se trata de um evento independente de proteínas acessórias.

1.2. Proposição de estratégia de secreção para microalga

Conforme comentado anteriormente, as vesículas recebem o v-SNARE que reconhece os t-SNAREs da membrana a qual se destinam. Uma vesícula destinada à exocitose contém o v-SNARE que reconhece um conjunto de t-SNAREs na membrana plasmática. O reconhecimento é seguido pelo acoplamento, que progressivamente une os motivos SNAREs de sua porção N-terminal em direção aos pontos de ancoragem, acoplando as duas membranas.

Conhecendo o funcionamento da fusão de vesículas, o v-SNARE da via de exocitose poderia ser inserido nas membranas das reservas lipídicas, os *oilbodies*, levando-a a ser secretada?

Há diversas indicações que só a presença de SNAREs é suficiente para promover a fusão de membranas. Weber e colaboradores introduziram a fusão de vesículas sintéticas apenas introduzindo v- e t-SNAREs recombinantes correspondentes. Hu e colaboradores (Hu et al., 2003) inseriram SNAREs na superfície da membrana plasmática de células de mamíferos. Observaram que as células expressando v-SNARE se fundiam com aquelas que expressavam os t-SNAREs correspondentes.

O direcionamento para a membrana plasmática foi promovido pela fusão dos SNAREs com uma sequência sinal, indicando para a célula que a proteína deveria ser inserida na membrana plasmática. Com a possibilidade de se introduzir uma sinalização que direcione o v-SNARE de exocitose para as reservas lipídicas, tornou-se necessário conhecer com detalhes o funcionamento dessas proteínas. Como a intenção é montar um sistema de secreção para a microalga *N. oleoabundans*, realizou-se uma busca em seu genoma para os SNAREs conhecidos. Todos os SNAREs encontrados foram identificados e seus principais domínios foram anotados, visando a identificação dos envolvidos na exocitose.

2. Materiais e métodos

2.1. Extração de DNA e seqüenciamento da microalga *Neochloris oleoabundans*

A microalga *Neochloris oleoabundans* foi obtida da coleção de microalgas da Universidade do Texas (UTEX). Seu crescimento foi feito em bold's basal medium (Nichols & Bold, 1965), a aproximadamente 27°C de temperatura, regime integral de luz de cerca de 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de fótons e agitação de 100 rpm (Tabela 1). Células foram coletadas por centrifugação a 2000.g durante 30 minutos e congeladas em nitrogênio líquido.

Tabela 1: Composição do meio Bold's Basal Medium (Nichols & Bold, 1965).

Componente	Concentração final
NaNO ₃	2,9 mM
MgSO ₄	0,3 mM
NaCl	0,4 mM
KH ₂ PO ₄	1,3 mM
K ₂ HPO ₄	0,4 mM
CaCl ₂	0,17 mM
ZnSO ₄	30,7 μM
MnCl ₂	7,3 μM
MoO ₃	4,9 μM
CuSO ₄	6,3 μM
CoNO ₂	1,7 μM
H ₃ BO ₃	0,18 mM
EDTA	0,17 mM
KOH	0,18 mM
FeSO ₄	17,9 mM
Ácido Cítrico	10 mM

O material congelado foi macerado com cadinho e pistilo e submetido ao isolamento de DNA conforme descrito por Magneschi 2008. A qualidade dos ácidos nucléicos extraídos foi avaliada em gel de agarose (0,7% m.v⁻¹) e por meio de espectrofotometria (NanoDrop 2000c).

A preparação do material foi realizada pela aluna Raissa Estrela Curado, como parte do seu projeto de mestrado. O sequenciamento foi realizado através da plataforma Solexa™ (Illumina, EUA) na High Throughput Sequencing Core Facility da Universidade da Carolina do Norte, em Chapel Hill (Bennett, 2004). O protocolo de preparo das amostras deu-se de acordo com as recomendações do fabricante

2.2. Montagem do genoma de *Neochloris oleoabundans*

O genoma de *N. oleoabundans*, sequenciado utilizando a tecnologia Illumina/Solexa (Bennett, 2004), gerou uma calha de seqüências do tipo *paired-ends* com 2 x 75 pb e tamanho do inserto de 400 pb, e uma calha de seqüências do tipo *mate-pair* com 2 x 50 pb e tamanho do inserto de ~3500 pb.

A montagem foi realizada pela equipe de bioinformática do LGE. As seqüências *paired-end* foram montadas isoladamente. Os *contigs* obtidos foram em seguida montados em conjunto com as seqüências *mate-pair*, com o objetivo de formar *scaffolds*. Foi utilizado o aplicativo Velvet versão 1.0.04 (Zerbino & Birney, 2008).

Uma primeira versão de modelos de genes (banco MG) foi obtida com o auxílio do software Augustus versão 2.3.1, utilizando o pré-treinamento com a espécie *Chlamydomonas reinhardtii* (Stanke et al., 2008). Quando este trabalho foi desenvolvido, não havia treinamento baseado em outras algas e a predição baseada em *N. oleoabundans* ainda estava sendo desenvolvida.

2.3. Identificação das seqüências da família SNARE de *Neochloris oleoabundans*

As seqüências de *N. oleoabundans* foram identificadas pela comparação com as seqüências conhecidas de *S. cerevisiae* e *A. thaliana*, organismos modelos para estudo de trafego de vesículas e, portanto, melhor caracterizados (Novick et al., 1980; Sanderfoot et al., 2000; Uemura et al., 2004) (Figura 5).

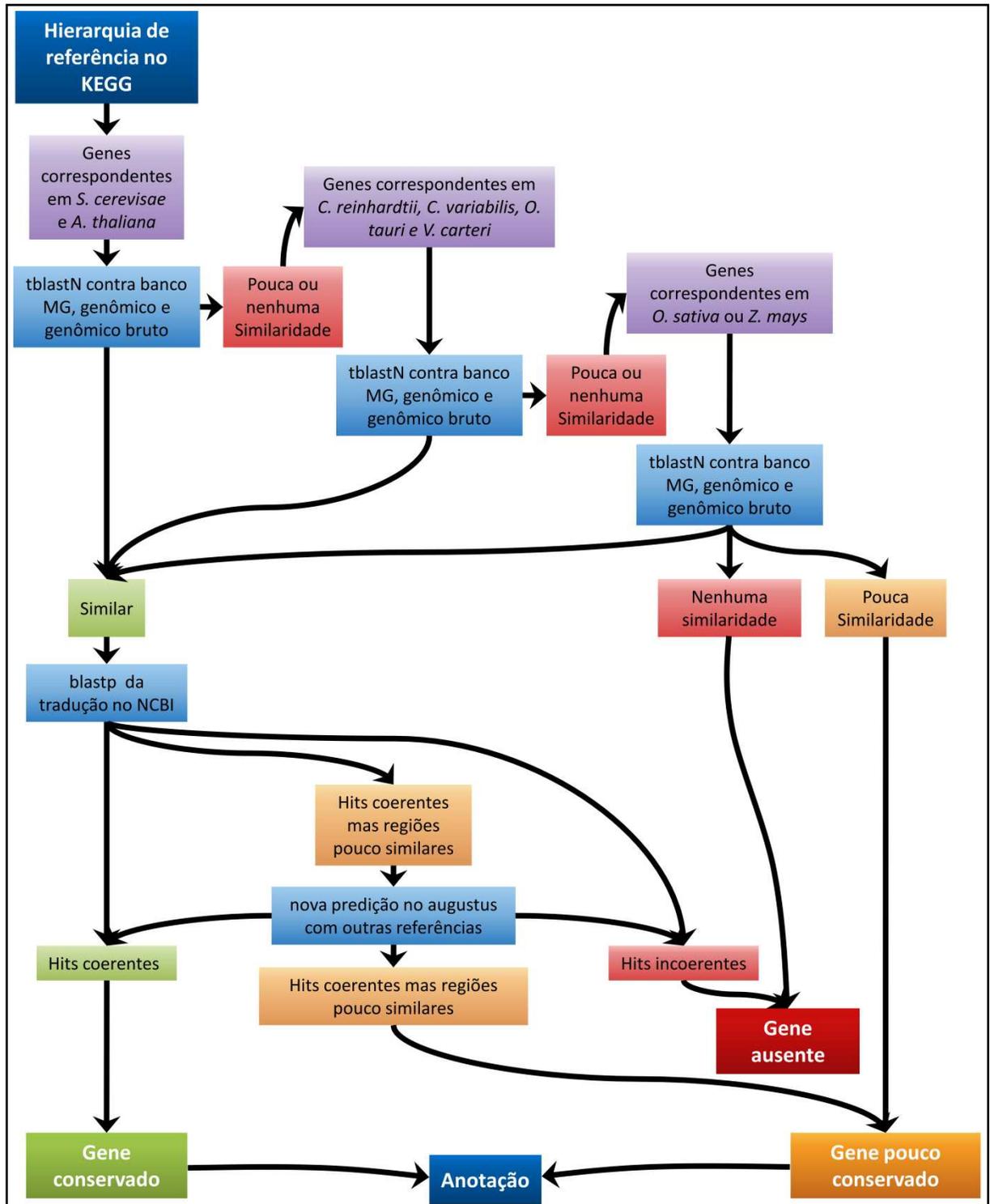


Figura 5: Fluxograma desenvolvido para identificação *in silico* dos genes da família SNARE de *N. oleoabundans*.

Quando as sequências similares não eram encontradas, ou eram pouco similares, buscavam-se os equivalentes de *C. reinhardtii*, *Chlorella variabilis*, *Ostreococcus tauri* e *Volvox carteri* para comparação com a microalga. Apesar de não serem organismos muito estudados, são as microalgas evolutivamente próximas de *N. oleoabundans* cujos genomas estão disponíveis e anotados.

Para o caso de se tratar de uma proteína ausente nas outras microalgas e cuja sequência é distante de *A. thaliana*, uma última busca no genoma de *N. oleoabundans* era feita utilizando as sequências de *O. sativa* ou *Z. mays*.

As buscas eram feitas por meio do algoritmo tblastn, utilizando as sequências protéicas conhecidas dos organismos anotados contra o banco MG de *N. oleoabundans*. Buscas adicionais eram feitas do mesmo modo contra o banco genômico da alga e contra o banco genômico bruto, que incluía sequências identificadas como possíveis contaminantes. A comparação era feita, portanto, entre uma sequência de aminoácidos conhecida com sequências de DNA da microalga *N. oleoabundans* traduzida nos seis quadros de leitura possíveis.

Se a busca no banco MG retornasse fragmentos com grande semelhança à proteína conhecida (i.e. Score de alinhamento maior que 50 e e-value menor que $1e^{-5}$), as análises prosseguiam. Caso não houvesse fragmentos semelhantes ou a identidade fosse baixa, observavam-se os alinhamentos obtidos contra os bancos genômicos da alga e bruto.

As sequências de nucleotídeos obtidas desse modo eram submetidas à comparação com o banco de proteínas do NCBI (National Center for Biotechnology Information), através do algoritmo blastx, a fim de se confirmar a identidade do fragmento.

Nesta comparação também era observada a cobertura do gene obtido de *N. oleoabundans*, i.e, se a este estava representado do início ao fim na microalga ou se faltavam fragmentos, exons ou ainda se apresentava fragmentos extras. Essa análise de cobertura era feita em relação ao conjunto de sequências obtidas no NCBI com maior identidade à da microalga, de modo que o padrão geral daquele gene nos organismos mais próximos à microalga servisse como guia para avaliação da cobertura.

Quando a sequência era incompleta ou discrepante, a região correspondente do genoma e 1.000 bases que a flanqueavam eram utilizada para uma nova predição com o programa Augustus utilizando pré-treinamento com *Z. mays*, disponível em rede aberta. A proteína predita era

novamente submetida à comparação com o banco de proteínas do NCBI através do algoritmo blastp, para confirmar a identidade da proteína e possível melhora nos alinhamentos.

Em último caso, se ainda assim a sequência gênica traduzida de *N. oleoabundans* apresentasse semelhanças com a proteína conhecida, mas a predição gênica destoasse, o primeiro hit de um blastx contra o NCBI era alinhado no genoma da microalga. Os alinhamentos coerentes com uma composição de introns e exons eram montados de forma a se obter uma sequência aproximada da proteína de *N. oleoabundans*.

2.4. Caracterização dos membros da família SNARE e análise das sequências encontradas em *Neochloris oleoabundans*

Inicialmente, foi feito um estudo abrangente da família SNARE e seus domínios, a fim de proporcionar a classificação correta e o reconhecimento de estruturas nas sequências encontradas em *N. oleoabundans*.

Grande parte do conhecimento do papel e estrutura dos SNAREs se deve ao uso de neurotoxinas clostridiais (*i.e.* botulínica e tetânica), que proteolizam SNAREs específicos em sinapses neuronais (Galli et al., 1998; Lang & Jahn, 2008; Sugita, 2008). Por esse motivo, os SNAREs recém descobertos eram denominados por meio de similaridades com os conhecidos em neurosinapses. Com mais estudos acerca da estrutura e funcionamento dessas proteínas, novas categorias foram criadas e novos padrões foram identificados nos vários genomas.

A nomenclatura originalmente proposta foi mantida em diversas revisões e classificações gênicas, mas é imprecisa quanto ao significado funcional das proteínas. Para compreensão das análises das sequências encontradas, foi elaborada uma divisão de SNAREs baseada na organização de seus domínios conservados e grupos descritos em bibliografia.

Os principais domínios e seus e-values foram anotados com base nas comparações com o banco de dados Pfam, usando o algoritmo HMM para realizar a busca (Finn et al., 2010; Mistry et al., 2007). Os domínios transmembranares foram preditos através do programa TMHMM, que também utiliza o algoritmo HMM adaptado para busca de domínios dessa natureza (Krogh et al., 2001; Sonnhammer et al., 1998).

O banco de dados integrativo InterPro foi utilizado para confirmar os domínios apresentados pelo Pfam (Hunter et al., 2009). A comparação com o gene homólogo de *A. thaliana* foi realizada com o programa ClustalW e os alinhamentos foram adaptados do programa Geneious (Drummond et al., 2011; Thompson et al., 1994).

Os integrantes da família SNARE foram definidos a partir da hierarquia funcional BRITE (BR:ko04131), fornecida pelo banco de dados Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Kanehisa & Goto 2000). Esses integrantes nortearam a busca dos integrantes da via em outros genomas por meio do próprio Kegg e com o banco de dados unificados UniProt (Universal Protein Resource, Uniprot Consortium 2011).

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização dos membros da família SNARE baseada nos domínios conservados

Apesar de usual, a distinção em v- ou t-SNAREs é um tanto limitada, já que subclasses particulares de SNAREs são encontradas de forma conservada em diversos eucariotos.

Todas as proteínas pertencentes à família contêm o motivo SNARE de 60–70 aminoácidos, mas podem variar no tipo e número de motivos e na presença ou ausência de outros domínios (Jahn & Scheller, 2006). A estrutura típica consiste em um motivo SNARE flanqueado por uma extensão N-terminal, conservada ou variada, e por uma âncora transmembrana C-terminal.

A subclasse das *Syntaxin1-like* é o único que carrega o motivo Q_a-SNARE e, portanto, é sempre encontrado um representante seu no complexo SNARE (Figura 6 – *Syntaxin1-like*) (Sanderfoot et al., 2001). É importante ressaltar que todos Q_a-SNARE são sintaxinas, mas algumas proteínas atribuídas ao grupo das sintaxinas, discutidas mais à frente, apresentam motivos Q_c-SNARE (Prekeris et al., 1999).

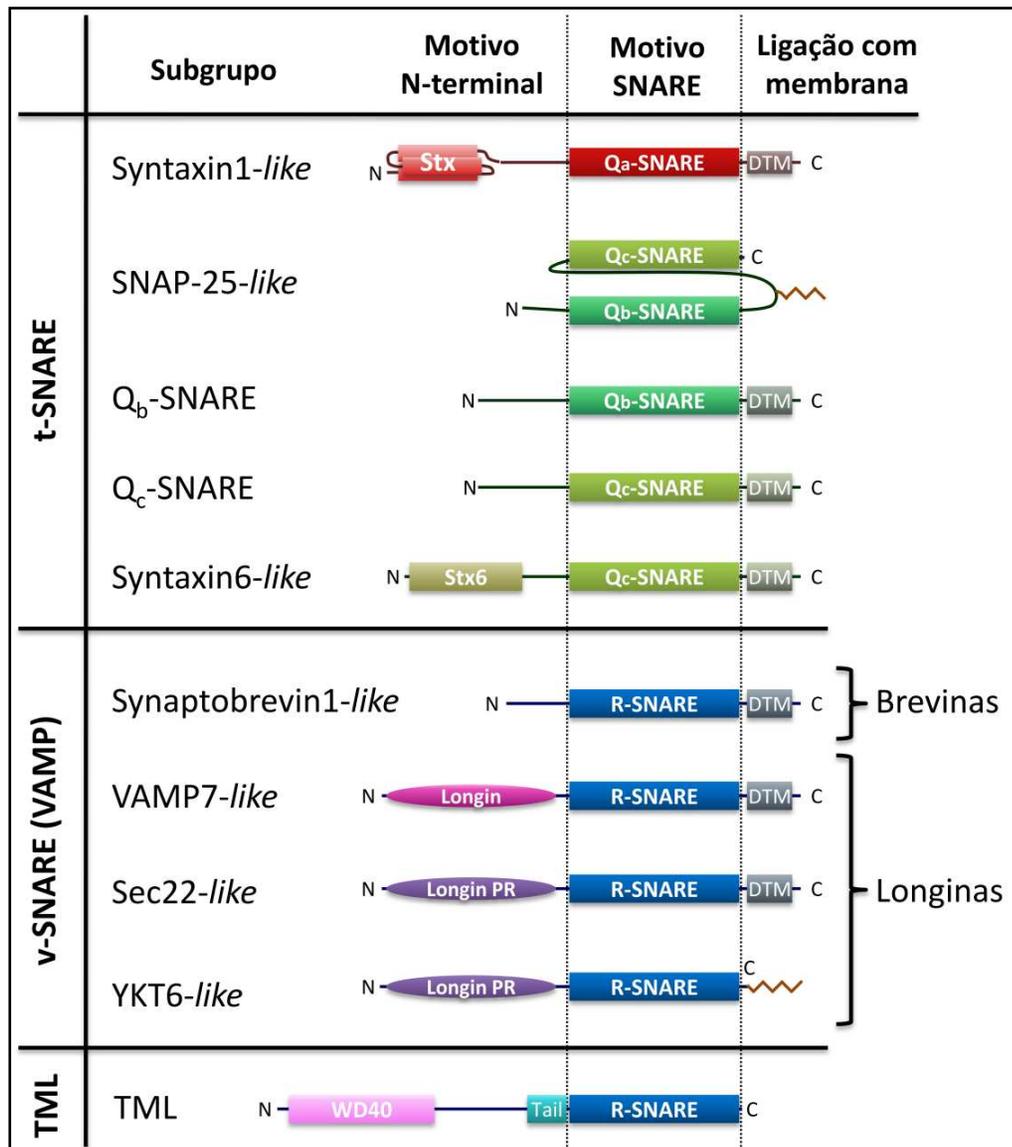


Figura 6: Estrutura geral dos membros da família SNARE, organizados de acordo os principais grupos conservados descritos em bibliografia. As regiões acinzentadas C-terminais correspondem a domínios transmembranares (DTM), enquanto o segmento em zig-zag (marrom) são fragmentos pós-traducionais para ancoragem na membrana. A tri-hélice das Syntaxin1-like está representada dobrada em sua conformação antiparalela (Stx). A região cor areia das Syntaxin6-like corresponde ao domínio helicoidal semelhante ao encontrado no subgrupo das Syntaxinas1-like. As elipses roxas correspondem a domínios *longin* ricos em prolinas (PR) e a elipse rosa escuro corresponde ao domínio *longin* adicional descrito por Filippini e colaboradores (2001). As TML estão representadas à parte dos t- e v-SNARE, pois apresentam função regulatória não-fusogênica, não se localizando em membranas. Seu motivo de repetições WD40 está representado em rosa claro e o domínio Tail em azul claro.

Aparentemente, todas as *Syntaxin1-like* são ancoradas à membrana por um domínio C-terminal transmembranar e suas extensões N-terminal consistem em uma tri-hélice antiparalela conectada ao motivo SNARE por um segmento flexível (Figura 6 – Stx). Essa extensão interage intramolecularmente com o motivo SNARE gerando uma conformação “fechada”, que dificulta a interação com os SNAREs conjugados e regula a formação do complexo (Misura et al., 1998).

Experimentos demonstraram que a exclusão da tri-hélice N-terminal não só forma complexos viáveis com os SNAREs cognatos, como o faz de forma mais rápida *in vitro* que a molécula selvagem (Nicholson et al., 1998). O genoma de *Arabidopsis thaliana* revelou 24 sintaxinas, enquanto *Saccharomyces cerevisiae* contém oito conhecidas, duas das quais são altamente similares e funcionalmente redundantes (Pelham, 1999).

A proteína SNAP-25 de sinapses de mamíferos é alvo de uma neurotoxina botulínica e foi o primeiro membro descrito do subgrupo SNAP-25-like (Figura 6). Os seus representantes possuem dois motivos em uma única proteína, um do tipo Q_b- e outro do tipo Q_c-, separados por um segmento conector onde provavelmente se dá a ligação com a membrana (McNew et al., 2000; Oyler et al., 1989).

Outra particularidade dos SNAP-25-like é a ausência do domínio transmembranar, se conectando à membrana geralmente através de motivos lipídicos covalentemente ligados, adicionados pós-traducionalmente (Waters & Hughson, 2000). Mamíferos possuem pelo menos três membros SNAP-25-like e leveduras possuem dois, mas estão ausentes em alguns eucariotos (Oyler et al., 1989; Ravichandran et al., 1996; Steegmaier et al., 1998).

Nos organismos e vias que não possuem proteínas SNAP-25-like, os motivos Q_b- Q_c-SNARE para formação do complexo são fornecidos por duas proteínas adicionais na membrana alvo, contendo cada um dos motivos (Figura 6 – Q_b- Q_c-SNARE) (Bao et al., 2008; McNew et al., 2000).

Alguns Q_c-SNAREs apresentaram homologia com membros da família das sintaxinas de mamíferos e foram classificadas como tais, mesmo apresentando um motivo do tipo Q_c (Figura 6 – Syntaxin6-like) (Bock et al., 1996). A estrutura secundária predita para estas sintaxinas é bastante semelhante à apresentada por pertencentes ao grupo *Syntaxin1-like*, mas a função dos motivos N-terminais não parece ser a mesma (Wendler & Tooze, 2001).

Os v-SNAREs, também chamados de VAMP (Vesicle-Associated Membrane Proteins), são os únicos normalmente encontrados na membrana vesicular e constituem um grupo bastante diverso. Inicialmente, podem ser divididos em duas subclasses de acordo com a presença (longinas) ou ausência (brevinas) de uma extensão N-terminal, chamada de domínio *longin* (Figura 6 – longinas) (Nicholson et al., 1998).

Os membros do grupo VAMP também podem ser chamados de sinaptobrevinas, mas essa denominação não será utilizada a fim de evitar confusão com a Sinaptobrevina1 de neurosinapses, que é da subclasse das brevinas. Esta última apresenta região N-terminal curta e pouco conservada e é restrita ao táxon bilatéria, enquanto as longinas são comuns e conservadas em todos eucariotos (Figura 6 – Synaptobrevin1-like/Brevinas) (Filippini et al., 2001; Rossi et al., 2004).

Aparentemente, domínio *longin* das longinas tem participação na regulação da fusão das membranas e atua no direcionamento do SNARE para a membrana vesicular (Grote et al., 1995; Rossi et al., 2004; Tochio et al., 2001). Experimentos com combinações quiméricas de domínios de diferentes longinas indicaram que o *longin* é crítico para a localização subcelular dessas proteínas (Uemura et al., 2005).

VAMP1, o R-SNARE específico de vesículas sinápticas, pertence ao subgrupo das longinas VAMP7-like e foi um dos primeiros a ser associado ao transporte vesicular, pois é alvo de uma neurotoxina tetânica (Figura 6 – VAMP7-like) (Trimble et al., 1988; Trimble, 1993).

Longinas VAMP7-like foram primeiramente agrupadas por Filippini e colaboradores (2001), que descreveram proteínas cujas regiões C-terminal e SNARE se assemelhavam às brevinas, mas com região N-terminal mais longa e altamente conservada (Figura 6 – Longin) (Filippini et al., 2001). A distribuição das VAMP7-like é limitada, sendo ausente em leveduras, enquanto os outros dois grupos de longinas, Sec22- e YKT6-like, ocorrem em todos os eucariotos estudados (Filippini et al., 2001; Rossi et al., 2004). Estes últimos apresentam domínios N-terminais característicos ricos em prolinas (PR), diferindo entre si apenas no modo como se prendem à membrana (Figura 6 – Longin PR).

As proteínas TML (sigla para Tomosyn-like) são incluídas na família SNARE na hierarquia funcional BRITE (Kegg) devido a presença do domínio do tipo R-SNARE em seus homólogos (Figura 6 – TML). Mas diferente dos v-SNARE, as TML estão relacionadas à

regulação negativa da fusão e a sua superexpressão tende a inibir a exocitose em diversos tipos celulares (Hatsuzawa et al., 2003; Yamamoto et al., 2009). O domínio R-SNARE dessas proteínas impede a de fusão de membranas, pois forma um complexo não-fusogênico com os t-SNAREs, competindo com o v-SNARE correspondente pela ligação.

Em geral, TMLs possuem três domínios principais: a região C-terminal contendo um R-SNARE, um domínio chamado de Tail e uma região N-terminal enriquecida com repetições WD40 (Williams et al., 2011). A função inibitória depende tanto do motivo WD40 quanto do R-SNARE, pois proteínas mutantes sem a região C-terminal também são capazes de inibir a fusão de vesículas em menor grau. Modelos recentes descrevem que a ligação do domínio Tail com o WD40 expõe o R-SNARE, levando a formação de um complexo bastante estável (Yamamoto et al., 2009).

3.2. Análise dos membros da família SNARE encontrados no genoma de *Neochloris oleoabundans*

Foram encontradas 19 sequências com grande similaridade à SNAREs no genoma de *N. oleoabundans*. Depois de confirmadas, a predição das proteínas foi apurada e os domínios encontrados foram anotados. As Figuras 7, 8, 9 e 10 apresentam essas proteínas e as respectivas anotações dos domínios, além do alinhamento a suas principais homólogas em *Arabidopsis thaliana*.

Esse organismo foi escolhido como referência, pois se trata de um modelo de estudo relativamente próximo à microalgas, cuja via de tráfego de vesículas está bem caracterizada (Merchant et al., 2007; Sanderfoot et al., 2000, 2001; Uemura et al., 2005, 2004).

Os grupos foram separados de acordo com os motivos Q_a- (Figura 7), Q_b- (Figura 8), Q_c- (Figura 9) e R- (Figura 10), indicando os subgrupos conforme os apresentados na Figura 6. Os homólogos de *A. thaliana* estão acima das sequências da microalga, com os nomes das proteínas indicados com um prefixo At (de *A. thaliana*). Os SNAREs são considerados proteínas muito conservadas nos eucariotos e por esse motivo o alinhamento com os homólogos de *A. thaliana* foi possível, com valores de *pairwise sequence identity* variando de 14 a 56%. A anotação das sequências foi incorporada em escala, na forma de um modelo da proteína da microalga com os

domínios e os respectivos e-values disponíveis. A denominação das proteínas encontradas foi feita da seguinte forma: No (*N. oleoabundans*), o número do contig onde foi encontrada, e o principal nome encontrado nos primeiros hits no BLAST.

A microalga *Chlorella variabilis* foi indicado como o organismo mais próximo nos alinhamentos com o banco de dados do NCBI em 16 das 19 proteínas encontradas. Os outros três organismos que apresentaram as maiores similaridades com os SNAREs de *N. oleoabundans* foram as microalgas *Volvox carteri* (No1696_Stx1) e *Chlamydomonas reinhardtii* (No1667_SYP7); e, curiosamente, a planta superior *Oryza sativa* (No918_YKT6).

O número de SNAREs varia muito entre organismos, compreendendo 25 elementos em leveduras, 36 em mamíferos e mais de 50 em plantas (Lang & Jahn, 2008). Observa-se um número semelhante de membros da família em leveduras, moscas e vermes, indicando que um conjunto de SNAREs-chave pode ser suficiente para mediar a maioria dos eventos de fusão (Bock et al., 2001). Mamíferos e principalmente plantas apresentam sistema de tráfego de membranas mais complexo que outros eucariotos, com uma numerosa família SNARE diferencialmente expressa nos tecidos (Bock et al., 2001).

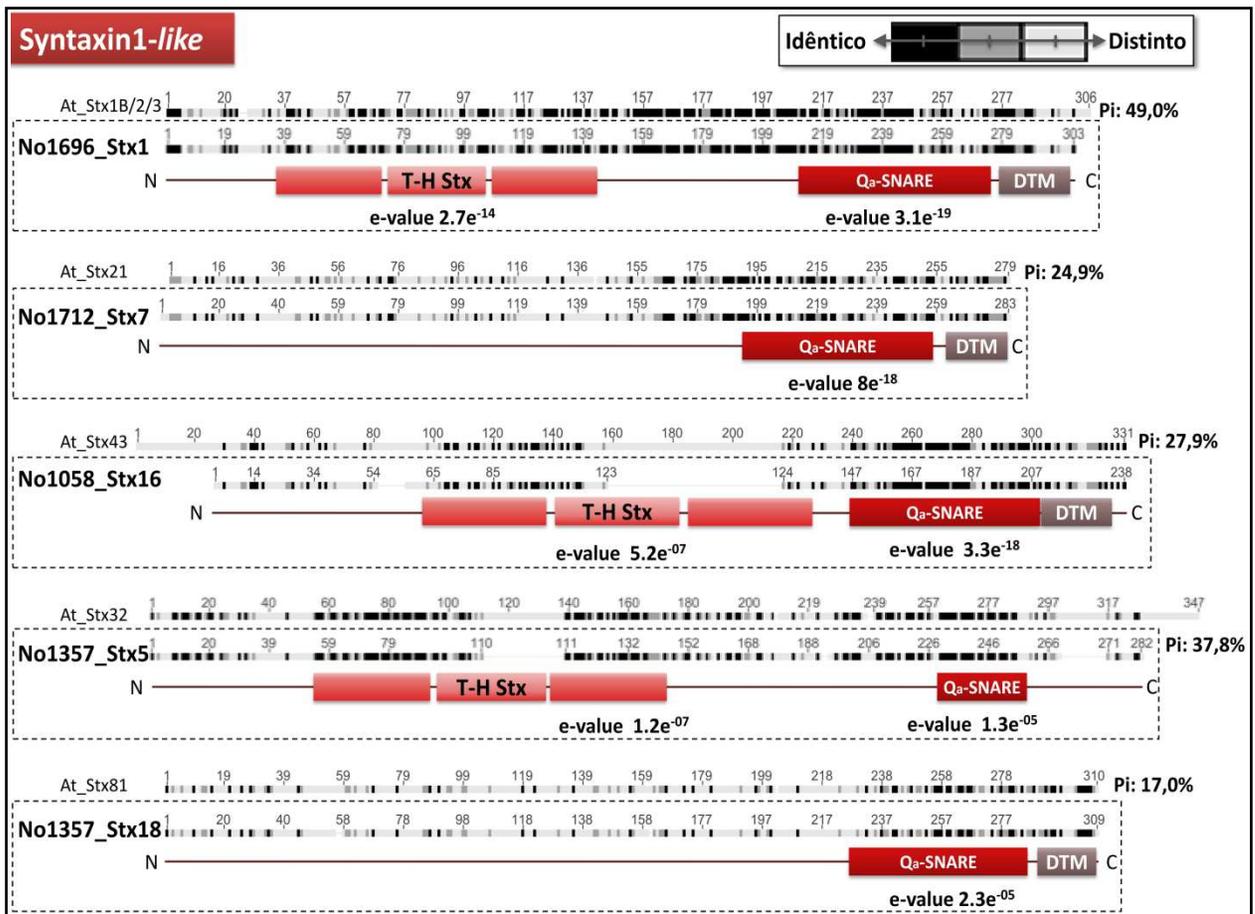


Figura 7: As cinco proteínas encontradas contendo o motivo Q_a -SNARE, pertencentes ao subgrupo das Syntaxin1-like. As regiões acinzentadas C-terminais correspondem aos domínios transmembranares (DTM) previstos pelo TMHMM. A região provavelmente responsável pela formação da tri-hélice antiparalela está representada como três retângulos vermelhos em sequência (T-H Stx). Pi expressa a porcentagem de *Pairwise sequence identity* do alinhamento com a sequência de *A. thaliana* (Figura desenvolvida a partir de alinhamentos gerados pelo programa Geneious, domínios fornecidos pelo programa InterProScan e domínios transmembranares previstos pelo TMHMM).

As syntaxinas com motivo Q_a - são chamadas como Syntaxin1-like devido a sua proximidade com a Syntaxin1 de sinapses, uma das primeiras identificadas e caracterizadas. Entretanto, a identificação com syntaxina1 é normalmente atribuída ao Q_a -SNARE encontrado na membrana plasmática, assim como a Syntaxin1 de sinapses (Dun et al., 2010).

A No1696_Stx1 apresentou maior similaridade com proteínas preditas como syntaxinas1, de membrana plasmática. A comparação com a proteína de *A. thaliana* apoiou essa possibilidade, visto que apontou uma grande identidade (Pi: 49%) com a Sintaxina 123 (Stx1B23, no NCBI),

encontrada exclusivamente associada à membrana plasmática (Uemura et al., 2004). Existe uma grande possibilidade, portanto, da No1696_Stx1 ser a syntaxina responsável pela via exocítica.

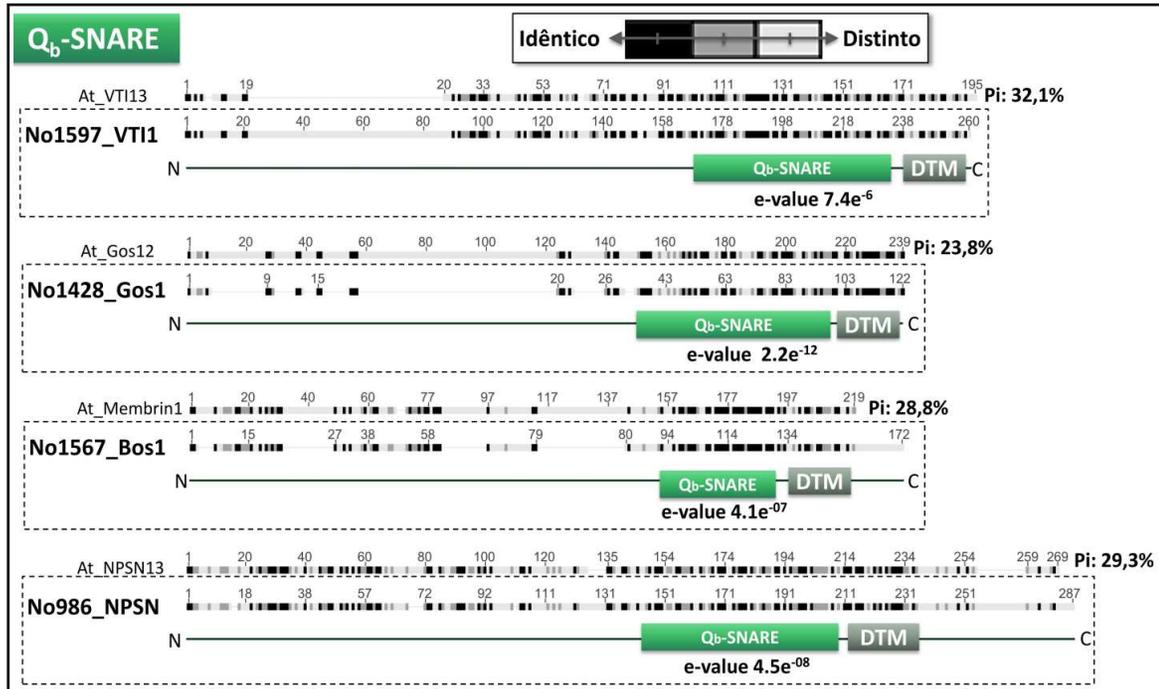


Figura 8: As quatro proteínas encontradas contendo o motivo Q_b-SNARE. As regiões acinzentadas C-terminais correspondem aos domínios transmembranares (DTM) previstos pelo TMHMM. Pi expressa a porcentagem de *Pairwise sequence identity* do alinhamento com a sequência de *A. thaliana* (Figura desenvolvida a partir de alinhamentos gerados pelo programa Geneious, domínios fornecidos pelo programa InterProScan e domínios transmembranares previstos pelo TMHMM).

Em mamíferos, leveduras e plantas, os motivos Q_b- e Q_c-SNARE de excitose são fornecidos por uma proteína *SNAP-25-like*, mas não foram identificadas similares em *N. oleoabundans*. *SNAP25-like* podem estar ausentes em alguns eucariotos e a busca nos genomas de outras microalgas não apontou nenhum homólogo à proteína. Não foi possível, portanto, identificar qual das proteínas encontradas contribui com os motivos Q_b- e Q_c-SNARE na excitose.

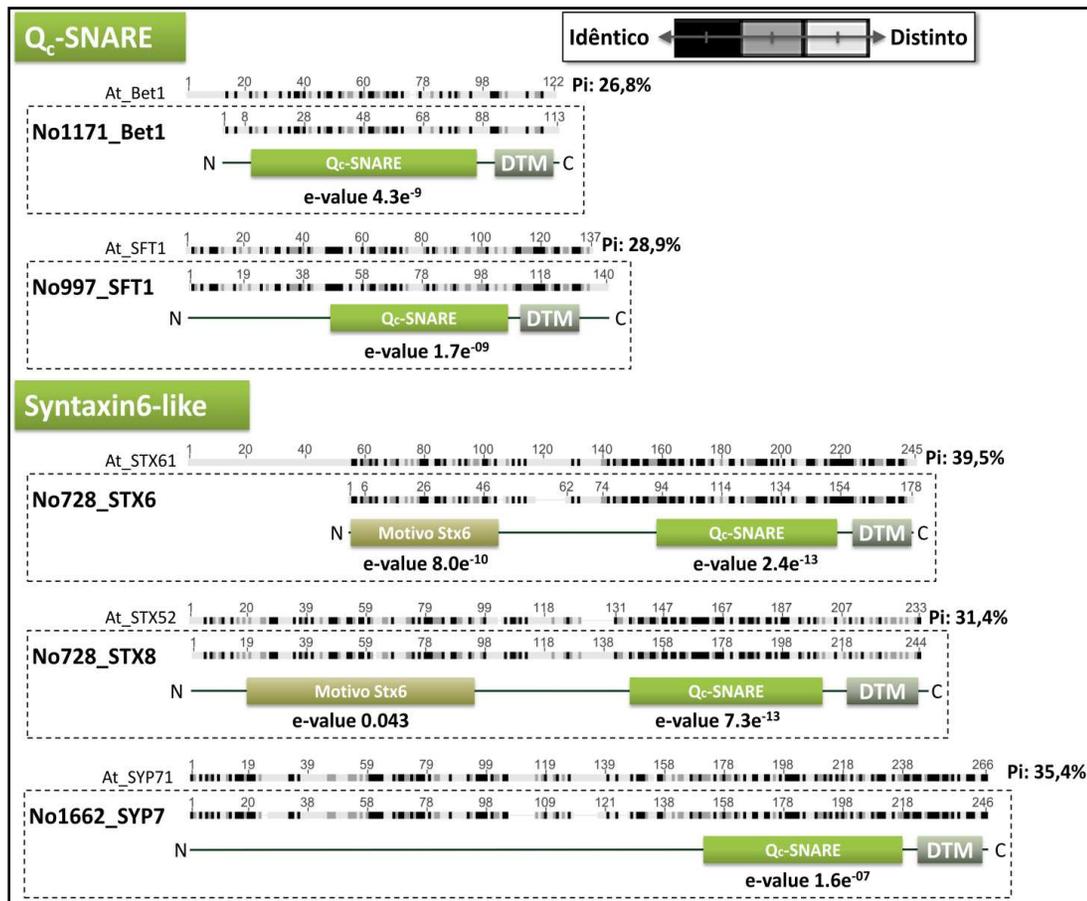


Figura 9: As cinco proteínas encontradas contendo o motivo Q_c-SNAREs. As regiões acinzentadas C-terminais correspondem a domínios transmembranares (DTM) previstos pelo TMHMM. A região cor areia das Syntaxin6-like corresponde ao provável domínio helicoidal semelhante ao encontrado no subgrupo das Syntaxinas1-like pela formação hélice antiparalela está representada como três retângulos vermelhos em sequência (T-H Stx). Pi expressa a porcentagem de *Pairwise sequence identity* do alinhamento com a sequência de *A. thaliana* (Figura desenvolvida a partir de alinhamentos gerados pelo programa Geneious, domínios fornecidos pelo programa InterProScan e domínios transmembranares previstos pelo TMHMM).

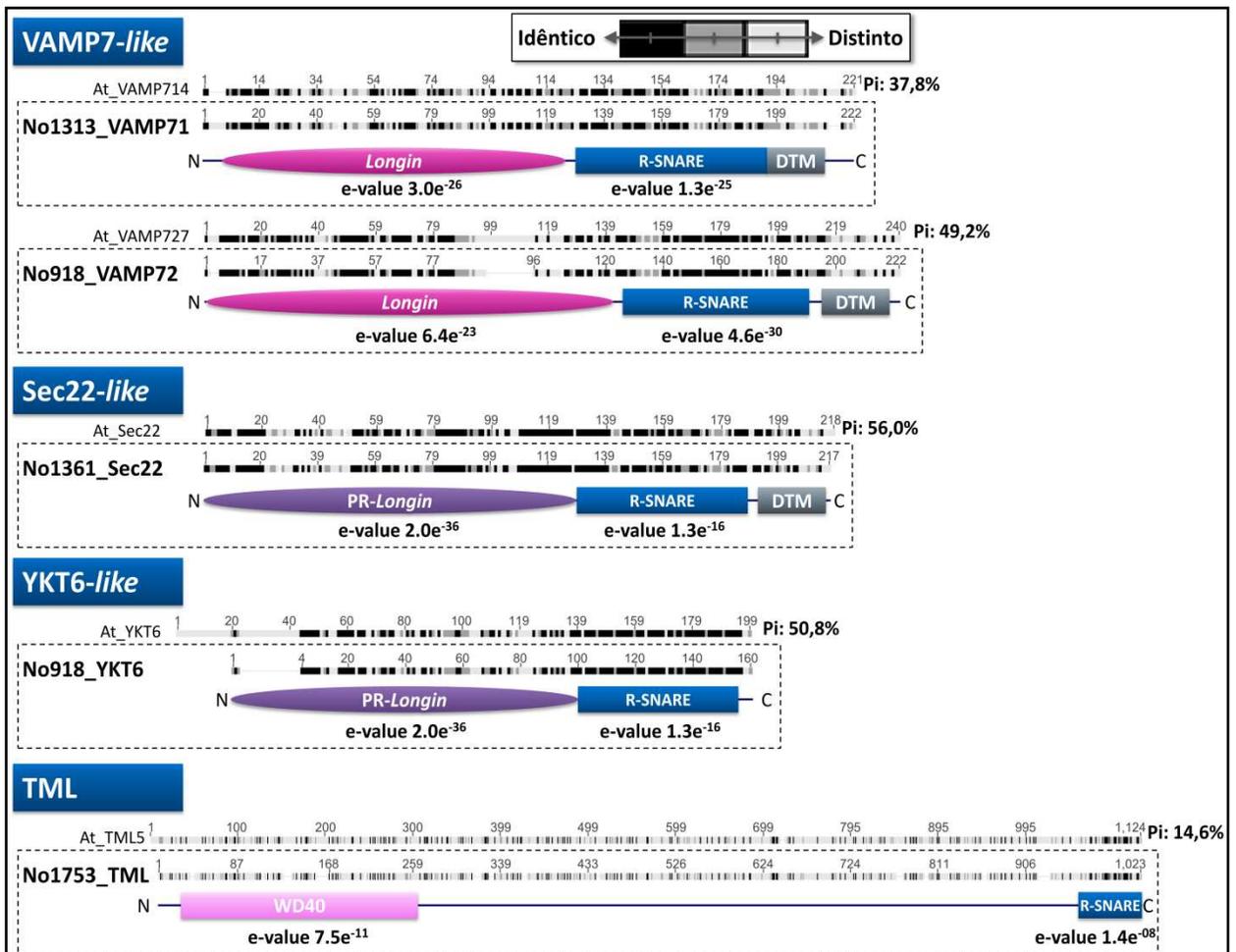


Figura 10: As cinco proteínas encontradas contendo o motivo R-SNARE. Quatro das quais são consideradas SNARE de vesículas (VAMP71, VAMP72, Sec22 e YKT6) e uma apresentou similaridade com o grupo das tomosinas (TML). As regiões acinzentadas C-terminais correspondem a domínios transmembranares (DTM) previstos pelo TMHMM. As elipses roxas correspondem a domínios previstos como *longin* ricos em prolina (PR-Longin) e a elipse rosa escuro foram previstas como o domínio *longin* adicional descrito por Filippini e colaboradores (2001). O motivo de repetições WD40, típico das TML, está representado em rosa claro. Pi expressa a porcentagem de *Pairwise sequence identity* do alinhamento com a sequência de *A. thaliana*. A microalga não apresentou nenhum R-SNARE do tipo brevina, assim como plantas também não apresentam (Figura desenvolvida a partir de alinhamentos gerados pelo programa Geneious, domínios fornecidos pelo programa InterProScan e domínios transmembranares previstos pelo TMHMM).

As proteínas identificadas como v-SNARE consistiram nas mais próximas a *A. thaliana*, com valores de *Pairwise sequence identity* variando de 37,8% a 56%.

As TML estão relacionadas à regulação negativa da fusão e, apesar de possuírem um domínio R-SNARE, não podem ser consideradas v-SNAREs. A sequência No1753_TML apresentou um Pi mais baixo que o observado para os outros R-SNAREs quando comparado com a sequência de *A. thaliana*.

Curiosamente, TML parecem ser extremamente conservadas na maioria dos eucariotos, com exceção das algas verdes. A maior homologia encontrada com a proteína No1753_TML foi uma proteína hipotética de *C. variabilis*, com e-value = 0 e cobertura de 84% da sequência. Entretanto, a segunda proteína mais próxima apresentava um e-value = $1e^{-12}$ e cobertura de 33% da sequência, correspondendo a um R-SNARE Tomosyn-like de *C. heinhardtii*.

Essa diferença em proteínas de organismos filogeneticamente próximos pode ser um indicativo de perda de função, que passou a sofrer pressões evolutivas menores e a acumular mais mutações.

A comparação dos v-SNAREs encontrados na microalga com as proteínas de *A. thaliana* indicou que a proteína No918_VAMP72 apresenta maior similaridade com a VAMP727 de *A. thaliana*, responsável pelo tráfego endossomal na planta. Mas a segunda e a terceira proteínas mais similares foram a VAMP726 e VAMP722, que identificam vesículas exocíticas.

Observa-se um número maior de SNAREs em eucariotos pluricelulares, em relação aos unicelulares, sendo que plantas superiores tendem a apresentar sistema de tráfego de membranas mais complexo que outros eucariotos (Bock et al., 2001). Nos organismos com menos representantes SNARE, algumas vias próximas, como a endocítica e a exocítica, tendem a apresentar complexos redundantes. A proteína No918_VAMP72, portanto, pode ser a responsável pela identificação das vesículas pertencentes à via exocítica.

4. Conclusões parciais

A comparação dos v-SNAREs encontrados na microalga com as proteínas de *A. thaliana* indicou No918_VAMP72 como um candidato bastante provável a R-SNARE de vesículas de secreção. Uma vez confirmada sua participação na exocitose, sua sequência poderia ser utilizada para comprometer os *oilbodies* com a via exocítica.

Os domínios *longins* dos v-SNAREs foram relacionados com o encaminhamento dessas proteínas para as respectivas membranas (Grote et al., 1995). Constatou-se também que podem ter um efeito negativo na fusão das membranas, visto que há um aumento da conjugação dos R-SNAREs cujo domínio *longin* foi retirado.

A exclusão do domínio *longin* deve ser considerada para a utilização da proteína No918_VAMP72 em *oilbodies*, pensando tanto em evitar possíveis conflitos entre sinais de encaminhamento, quanto em aumentar a taxa exocítica das vesículas de reserva lipídica.

CAPÍTULO II

Proposição da oleosina para o transporte da sinalização para secreção de vesículas e montagem de um vetor para comprovar seu funcionamento em microalga modelo.

1. Introdução

1.1. A síntese de triacilglicerídeos e seu armazenamento nos *oilbodies*

A síntese de lipídios se dá no plastídio, quando um grupo carboxila é transferido para o acetil-CoA para formar o malonil-CoA, pela ação da enzima ACCase (Acetyl-CoA Carboxylase). As unidades de malonil são inseridas no complexo multienzimático FAS (Fatty-Acid Synthase), associado à subunidade ACP (Acyl carrier protein) através de uma ligação tioéster (Nelson & Cox, 1993) (Figura 11). O complexo FAS catalisa a fusão do malonil com um grupo acil previamente ligado, utilizando a energia fornecida pela liberação do grupo carboxila. O ácido graxo em formação é transferido para o sítio de ligação do grupo acil e submetido a novos ciclos de fusão com malonil. A elongação da cadeia é interrompida pelas enzimas tioesterases do organismo, que reconhecem o tamanho do ácido graxo e cliva a ligação tioéster, liberando a molécula do complexo FAS.

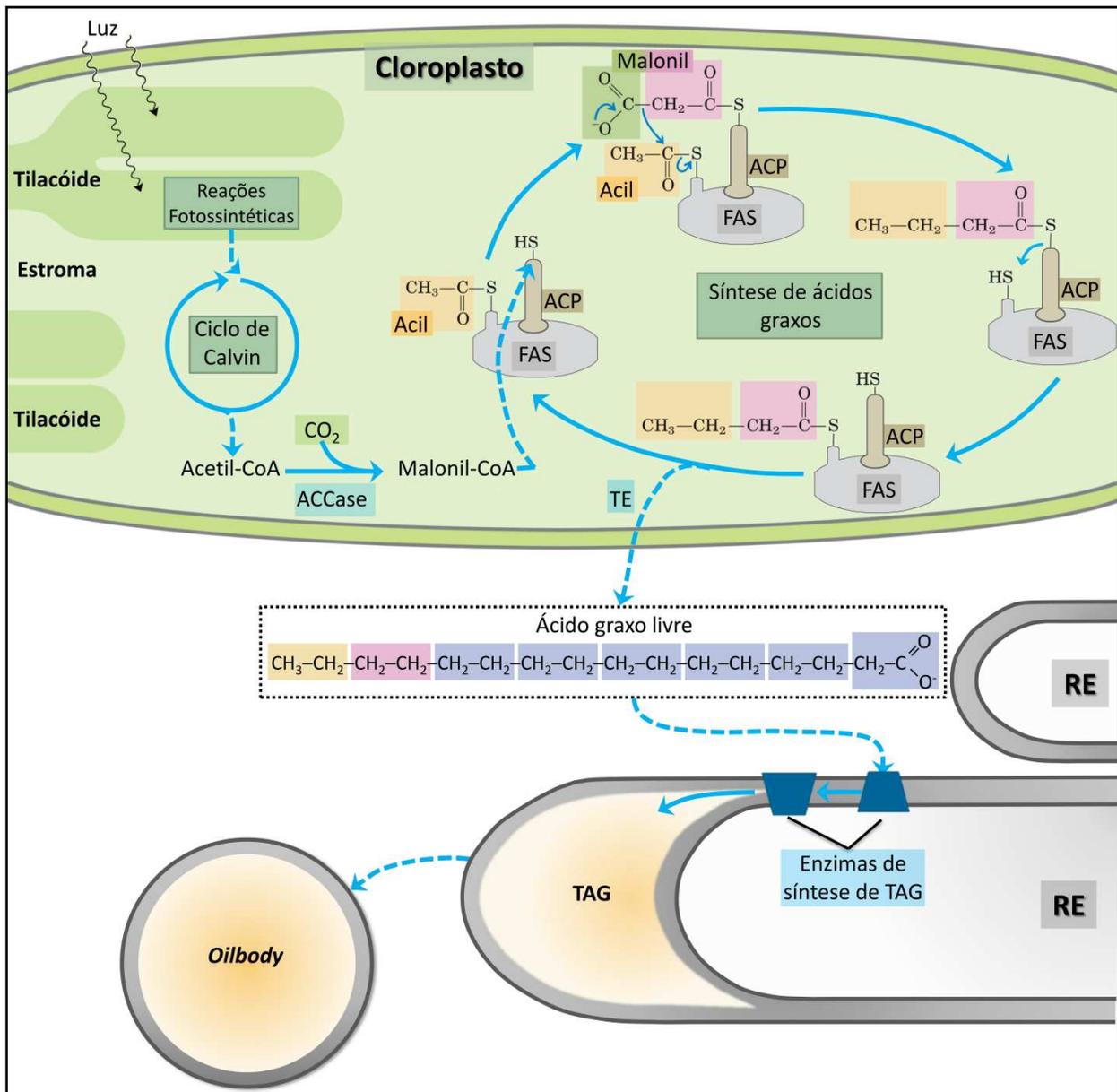


Figura 11: Rota metabólica das microalgas para a produção de triacilglicerol e seu armazenamento em *oilbodies*. RE: Retículo endoplasmático; TE: tioesterase; TAG: triacilglicerol. (Desenvolvido à partir de Nelson & Cox 1993; e Radakovits et al. 2010).

Os ácidos graxos livres são transferidos para o retículo endoplasmático (RE) onde sofrem as modificações necessárias para formação de membranas ou outros componentes celulares, ou

são incorporados a moléculas de glicerol para reserva energética. O triacilglicerol, formado desse modo, é acumulado entre a bicamada lipídica do RE, formando vesículas denominadas *oilbodies*.

As principais reservas lipídicas das células consistem em TAG encapsulados nesses *oilbodies*, organelas relativamente simples encontradas em uma grande diversidade de organismos (Graham, 2008; Tzen and Huang, 1992). Estes *oilbodies* brotam do retículo endoplasmático, à medida que os TAG são acumulados no interior hidrofóbico de sua bicamada lipídica, e contém um grupo particular de proteínas embebidos na membrana que o delimita (Frandsen et al., 2001; Wanner et al., 1981). A oleosina é uma dessas proteínas, encontradas na maioria das plantas superiores e preferencialmente expressas durante o desenvolvimento das sementes e em pólen.

1.2. Oleosinas, proteínas acessórias dos *oilbodies*

O papel da oleosina não é totalmente conhecido, mas acredita-se que estabilizam os *oilbodies*, protegendo-os contra a dessecação da semente ou pólen, além de possivelmente facilitar o acesso à reserva energética no momento da germinação (Huang, 1992; Murphy, 2004). Possivelmente favorece o armazenamento de TAG, já que plantas cujas oleosinas foram excluídas apresentam reservas lipídicas menores e parecem aumentar o acúmulo de proteínas totais, quase de maneira compensatória (Siloto et al., 2006).

As sequências variam muito entre os organismos, mas a estrutura das oleosinas é bastante conservada. É composta por uma região central de 50 a 70 aminoácidos predominantemente hidrofóbicos, flanqueada por duas regiões hidrofílicas N- e C-terminais (Hsieh & Huang, 2004) (Figura 12). Todas apresentam, no centro da região hidrofóbica, um único motivo conservado chamado *Proline knot* (nó de prolina), cuja sequência de aminoácidos -PX₅SPX₃P- dobra a proteína na forma de um grampo (Abell et al., 2004; Abell et al., 1997).

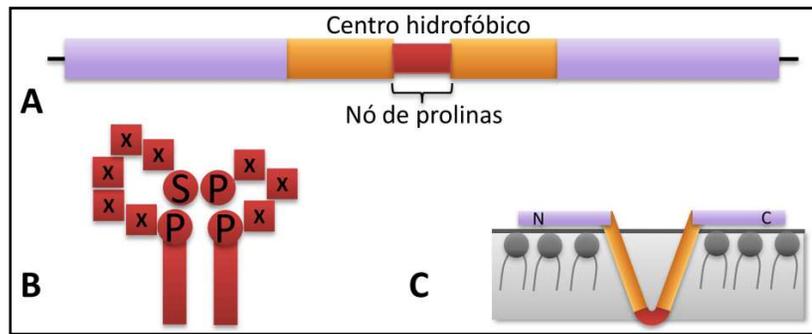


Figura 12: Estrutura conservada das oleosinas. (A) As três regiões da proteína: os domínios hidrofílicos N- e C-terminal (roxo), flanqueando um domínio bastante hidrofóbico (laranja) contendo o nó de prolinas no centro (vermelho). (B) Um modelo da estrutura assumida pelo nó de prolinas, contendo a sequência $-PX_5SPX_3P-$ conservada. (C) Esquema de uma oleosina, com sua estrutura em grupo proporcionada pelo nó de prolinas, inserida em uma monocamada lipídica por seu domínio hidrofóbico. Adaptado de Hsieh & Huang (Hsieh & Huang, 2004).

Complexos ribossomo-mRNA sintetizando oleosinas são prontamente encaminhados para o RE por intermédio de uma sinalização presente numa região da porção hidrofóbica do polipeptídeo. As oleosinas recém-sintetizadas e os TAG acumulados no RE encontram maior estabilidade no meio hidrofóbico e tendem a se difundir para o *oilbody* em formação. O domínio central da oleosina se insere na região igualmente hidrofóbica dos fosfolipídios da membrana, mas somente a matriz do *oilbody* fornece um excesso hidrofóbico, necessário para conformação mais estável da proteína (Abell et al., 2002; Abell et al., 1997; Beaudoin & Napier, 2002).

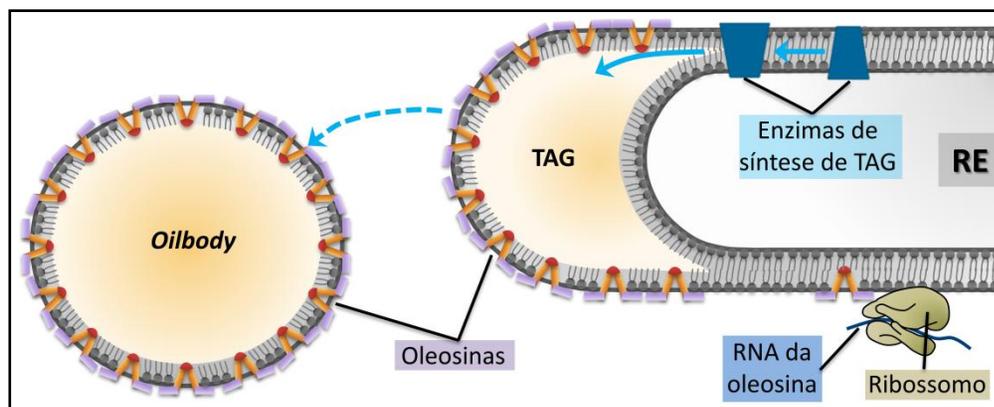


Figura 13: Integração das oleosinas na monocamada lipídica do *oilbody*, logo após sua tradução por ribossomos associados ao retículo endoplasmático. RE: retículo endoplasmático; TAG: triacilglicerídeos.

As porções N- e C- terminais são anfipáticas e se mantêm na face citoplasmática da membrana, possivelmente interagindo com a superfície do *oilbody*. Apesar de serem pouco conservados, esses domínios são tão essenciais quanto o centro hidrofóbico para a localização das oleosinas nos *oilbodies*, visto que mutações reduzindo o tamanho dos domínios hidrofílicos restringem consideravelmente o direcionamento da proteína para os *oilbodies* (Abell et al., 2004).

1.3. Oleosinas como transportadora de moléculas para *oilbodies*

Apesar de serem encontradas apenas em plantas, o padrão de localização das oleosinas é conservado mesmo na expressão heteróloga e a proteína pode ser utilizada em organismos distantes. Ting e colaboradores (Ting et al., 1997) mostraram que a oleosina de milho é corretamente direcionada para *oilbodies* de *S. cerevisiae*, organismo que não possui a proteína. Pons e colaboradores (Pons et al., 2009) expressaram a oleosina de amendoim em diversas linhagens celulares de mamíferos.

Devido à propriedade das oleosinas de se encaminhar e se inserir com grande afinidade na membrana de *oilbodies*, sua fusão com outras proteínas foi proposta para o transporte e ancoragem destas na membrana dos *oilbodies* (Rooijen & Moloney, 1995).

Diversos experimentos comprovam que, mesmo associada a outras proteínas, sua funcionalidade é mantida (Abell et al., 2004; Pons et al., 2009; Rooijen et al., 1993). Rooijen e colaboradores (1993) mostraram que o gene *oleosina* de *Arabidopsis* fusionado com o gene que codifica a P-glucuronidase (GUS) produz uma proteína quimérica que é corretamente direcionada para *oilbodies* de *Brassica napus*.

O trabalho de Pons e colaboradores (Pons et al., 2009) foi mais longe, expressando em células de mamíferos uma proteína quimera composta por um GFP e uma transcobalamina (TC) ligados à oleosina de amendoim. Para que a expressão fosse bem-sucedida, foi necessário confeccionar uma sequência de DNA que codificasse o GFP no mesmo quadro de leitura com a transcobalamina, sem os respectivos códons de parada, seguido pela sequência da oleosina também no mesmo quadro de leitura.

A transcobalamina é um carregador para vitamina B12 normalmente secretado no meio extracelular, assim, a sequência de sinalização de secreção dessa proteína também foi retirada para seu reposicionamento com a oleosina.

A exemplo do que foi feito com a transcobalamina em células de mamífero, a oleosina pode ser um bom candidato para carregar um motivo SNARE para as reservas lipídicas dos *oilbodies*, levando-os a se fundirem com a membrana plasmática. Há a necessidade, entretanto, de confirmar a funcionalidade da oleosina em microalgas.

1.4. Particularidades do organismo modelo para transgenia

A microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foi escolhida para a execução dos experimentos envolvendo manipulação molecular, visto que é um organismo modelo para o qual diversos protocolos e ferramentas moleculares já foram desenvolvidos.

Apresenta um ciclo de vida simples, rápido crescimento, pode ser cultivada em condições foto-, mixo-, e heterotrofia (Harris, 2009). Seu genoma já foi sequenciado e anotado, informações disponíveis em uma ampla base de dados *on-line*, que facilita o planejamento *in silico* (Merchant et al., 2007). Diversos métodos moleculares têm sido desenvolvidos nos últimos anos para esta alga, inclusive técnicas de transformação do DNA de diferentes compartimentos celulares (núcleo, cloroplasto e mitocôndria).

No entanto, apesar dos protocolos já desenvolvidos, a transformação gênica de *C. reinhardtii* tem eficiência baixa e apresenta diversos empecilhos, que devem ser considerados no planejamento da transgenia (Weisheit et al., 2009). A recombinação homóloga é rara na microalga, que também não reconhece DNAs plasmidiais, como fazem leveduras. A tendência nas células de *C. reinhardtii* é a incorporação aleatória no genoma do material genético introduzido, que frequentemente resulta em expressões indetectáveis ou instáveis (Cerutti et al., 1997; Stevens et al., 1996).

A expressão genética heteróloga é bastante limitada, possivelmente devido à supressão epigenética, dificuldade no reconhecimento dos elementos de controle ou uso de códons restrito (Harris, 2001; Kindle, 1990). Desse modo, o uso de promotores e terminadores homólogos é descrito como decisivo para a expressão de qualquer gene (Mayfield & Kindle, 1990).

O padrão de códons utilizados na sequência transgênica deve ser semelhante ao utilizado por *C. reinhardtii*, para proporcionar o reconhecimento e tradução pelo organismo (Stevens et al., 1996). A taxa de transcrição pode ser influenciada também por elementos acentuadores ou repressores localizados em introns de algumas sequências (Lumbreras et al., 1998).

O primeiro intron do gene *Rubisco*, de *C. reinhardtii*, é um exemplo de acentuadores muito utilizado para melhorar a expressão de transgenes, podendo aumentar consideravelmente a eficiência da transformação genética (Fuhrmann et al., 2004; Fuhrmann et al., 1999; Lumbreras et al., 1998).

2. Materiais e métodos

2.1. Microalga e condições de crescimento

A linhagem selvagem de *Chlamydomonas reinhardtii* CC-1009 (wild type MT-) foi obtida da coleção de culturas da UTEX (The Culture Collection of Algae, University of Texas, TX - USA) e amostras das linhagens CC-400 (cw15 mt+) e CC-1690 (wild type mt+) foram obtidas do Chlamy Center (www.chlamy.org, Duke university, NC - USA).

O meio de manutenção das culturas consiste em uma adaptação do meio Sueoka High Salt Medium, HS (Sueoka, 1960), no qual foram acrescentados 1,5% de agar e 0,4% de extrato de leveduras (Tabela 2). Mensalmente as culturas eram repicadas em novo meio de manutenção e mantidas sob iluminação constante de c.a. $50 \mu\text{M} \text{ fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a 25°C .

Tabela 2: Composição molecular dos meios Sueoka High Salt Medium (HS) e Tris-Acetato-Fosfato (TAP).

Componente	HS	TAP
HCOOCH ₃ (mM)	-	17,4
NH ₄ Cl (mM)	9,35	7,48
K ₂ HPO ₄ (mM)	8,27	0,60
KH ₂ PO ₄ (mM)	5,29	0,40
H ₃ BO ₃ (μM)	184	184
EDTA(μM)	149	149
Mg(II)(μM)	81,1	406

Componente	HS	TAP
Zn(II)(μM)	76,5	76,5
CaCl ₂ (μM)	45,6	228
MnCl ₂ (μM)	25,6	25,8
Fe(II)(μM)	17,9	18,0
CoCl ₂ (μM)	6,77	0,67
Cu(II)(μM)	6,29	0,64
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (μM)	0,89	0,59

O cultivo para experimentação foi feito em meio Tris-Acetato-Fosfato (TAP, Tabela 2) líquido a 100 rpm, 28°C e fotoperíodo claro:escuro de 12:12h (100 μM fótons. $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Harris, 2009).

2.2. Obtenção da Oleosina

Foram propostas duas possíveis formas de se obter um gene da oleosina compatível com a microalga. A primeira consiste na busca por um organismo cuja oleosina apresente sequência com um padrão de códons semelhante ao utilizado pela *C. reinhardtii* e a segunda consiste na síntese *de novo* de um gene com o padrão adaptado.

A filogenia das algas verdes em relação às plantas superiores foi observada no NCBI, a fim de se identificar os organismos evolutivamente mais próximos das microalgas que continham oleosinas. As análises do uso de códons das sequências gênicas de oleosinas foram feitas com o programa Gcua (Graphical Codon Usage Analyser - <http://gcua.schoedl.de/>), utilizando a tabela de preferência de códons de *C. reinhardtii*.

Sementes de arroz (*Oryza sativa*) da variedade japônica, cedidas pelo Prof. Michel Vincentz, foram semeadas em solo composto por humus e vermiculita (1:1). Utilizaram-se folhas coletadas com duas semanas de crescimento para a extração de DNA, descrita no item 2.3 deste capítulo. O DNA foi utilizado para a amplificação do gene da Oleosina com os *primers* apropriados para cada estratégia de montagem.

O desenho do gene sintético de oleosina com padrão de códons adaptados para *C. reinhardtii* foi feito através do programa Gene designer, com base nas informações de uso de códons fornecidas pelo programa Gcua (Villalobos et al., 2006).

2.3. Extração do DNA genômico de *Oryza sativa* e *Chlamydomonas reinhardtii*

Para a extração de DNA genômico de *O. sativa*, foi utilizado uma adaptação do protocolo de extração de DNA descrito por Aljanabi e Martinez (1997).

Adicionou-se 500µl de tampão de extração (0,4M NaCl; 10mM trisHCl pH 8,0; e 2mM EDTA pH 8,0) em cerca de 100 mg de folhas. A mistura foi congelada com nitrogênio líquido e macerada com cadinho e pistilo, mantendo-se a refrigeração. Adicionou-se 40µl de SDS 20% e 60 µg.ml⁻¹ de proteinase K ao material processado, misturando em vortex por 10 segundos antes de se aquecer a 55°C por uma hora. Terminado o tempo, foram adicionados 300µl de NaCl 6M a mistura, que foi agitada por 30 segundos em vortex e centrifugada por 30 minutos à velocidade de 10.000 x g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e seus ácidos nucléicos foram precipitados com 2 volumes de etanol absoluto e centrifugação por 20 minutos, à 10.000 x g e 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuscitado em 50µl de água MilliQ depois de seco. A qualidade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose 1%.

Para a extração de DNA genômico de *C. reinhardtii*, foi utilizado uma adaptação do protocolo de extração de DNA sugerido no Chlamy Center (www.chlamy.org, Duke university, NC - USA).

Células cultivadas em meio TAP líquido por dez dias foram precipitadas, separadas do meio de cultura e submetidas a cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho úmido a 30°C. Cerca de 500µl desse material foi misturado a 750µl de SDS-EB (1% SDS; 200mM NaCl, 20mM EDTA pH 8,0; e 50mM Tris-HCl pH8,0). Foram adicionados 750µl da mistura fenol:clorofórmio (1:1) e o resultante foi misturado em vortex por 30 segundos. Depois de centrifugação a 12.000 x g por cinco minutos a 4°C, o sobrenadante foi misturado à um volume de clorofórmio e submetido à nova centrifugação nas mesmas condições. Foi adicionado um volume de isopropanol ao novo sobrenadante que foi reservado por 1 hora à -20°C, depois de delicadamente misturado. Findo esse tempo, o DNA foi separado do meio

líquido através de centrifugação a 13.000 x g por 20 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com 500µl de etanol 70% e ressuspensionado em 50µl de água MilliQ depois de seco. Novamente, a qualidade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose 1%.

2.4. Plasmídeos e *primers*

Uma vez que o desenvolvimento de ferramentas moleculares não é o objetivo principal desse projeto, procurou-se opções de promotores, terminadores e marcadores gênicos já adaptados e testados em *C. reinhardtii*.

A proposta para montagem do vetor contendo a oleosina foi planejada, a partir das opções fornecidas pelo Chlamy Center, um centro norte americano da Universidade de Duke, que mantém e distribui um acervo de ferramentas moleculares em estudos da microalga. (Tabela 3).

Tabela 3: Plasmídeos com sequências adaptadas para expressão em *C. reinhardtii* utilizados no projeto. Todos obtidos no Chlamy Center. Todos os plasmídeos possuem uma origem de replicação e resistência a antibiótico para replicação e seleção em *Escherichia coli*.

Plasmídeo	Características	Referência
pKScGFP	Gene repórter GFP sintético otimizado para o uso de códons de <i>C. reinhardtii</i> sob controle das regiões flanqueadoras do gene <i>RBCS</i> . Resistência à ampicilina para <i>E.coli</i> (<i>Amp^R</i>).	(Fuhrmann et al., 1999)
pHsp70A/RBCS2-cgLuc	Luciferase de <i>Gaussia princeps</i> , adaptada para o uso de códons de <i>C. reinhardtii</i> sob controle dos promotores <i>HSP70A</i> e <i>RBCS2</i> . Resistência à kanamicina para <i>E. coli</i> (<i>Kan^R</i>).	(Fuhrmann et al., 2004)
pSP124S	Contém o gene <i>ble</i> adaptado, no qual foram inseridas duas cópias do intron1 do gene <i>RBCS2</i> , sob controle das regiões promotora e terminadora também do <i>RBCS2</i> . Resistência à ampicilina para <i>E.coli</i> (<i>Amp^R</i>).	(Lumbreras et al., 1998)

Os *primers* utilizados nas clonagens foram desenhados no programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), analisados no programa Gene Runner (Hastings Software, Inc.) e confeccionado pela empresa Prodimol (Tabela 4).

Tabela 4: *Primers* utilizados nas ampliações dos fragmentos para clonagens e em outras análises. Estão indicados as respectivas sequências e material genético alvo. Os sítios de restrição *XhoI* estão sublinhados nas sequências de Oleosin_FWD e Oleosin_REV.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Material
Oleosin_FWD	AGGTGTG <u>CTCGAGT</u> CCCATG	DNA Arroz
Oleosin_REV	GAC <u>CTCGAG</u> AGACGCCTGCGCCTG	DNA Arroz
Prom_FWD	CGCTGAGGCTTGACATGATT	pHsp70A/RbcS2-cgLuc
Prom_REV	CTGCAAATGGAAACGGCGAC	pHsp70A/RbcS2-cgLuc
Oleo2_FWD	GTCGCCGTTTCCATTTGCAGCATGGCTGATCAGCACAGAG	DNA Arroz
Oleo2_REV	AGACGCCTGCGCCTGGTCGA	DNA Arroz
GFP2_FWD	TCGACCAGGCGCAGGCGTCTGCCAAGGGCGAGGAGCTGTT	pKScGFP
GFP_REV	TTACTTGTACAGCTCGTCCA	pKScGFP
Term_FWD	TGGACGAGCTGTACAAGTAACCGACGTCGACCCACTCTAG	pSP124S
Term_REV	TTCAGGCTGCGCAACTGTTG	pSP124S
Ble_FWD	CAACAGTTGCGCAGCCTGAAGCCAGAAGGAGCGCAGCCAA	pSP124S
Ble_REV	GCTTACAATTTCCATTTCGCC	pSP124S

2.5. Reações de PCR

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50µl, contendo o tampão de reação (50 mM KCl e 10 mM de Tris-HCl pH 9,0), 250µM de cada dNTP, 0,1 µM de cada *primer*, 0,04 unidades de Taq DNA Polimerase [Invitrogen], DNA e MgCl₂. A quantidade de DNA adicionado à reação variou de 0,01 a 0,9 ng, conforme a natureza do material amplificado, i.e. DNA genômico, plasmidial, previamente amplificado ou purificado. A quantidade de MgCl₂ variou de 1.0 a 4.0mM, de acordo com o conteúdo de GC dos primers, tamanho do fragmento e presença de anelamentos inespecíficos. Nesses últimos casos, a adição de 5% de DMSO e/ou 2% de glicerol foi também testada.

As ampliações consistiram em um ciclo de desnaturação à 95°C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 20 segundos à temperatura de anelamento

do par de *primers* e extensão do fragmento por 1 minuto a 72°C (Figura 14 e Tabela 5). A reação de amplificação é finalizada por um ciclo de extensão por 5 minutos.

	Temperatura	Tempo (mm:ss)
1x	95°C	01:00
30x	95°C	00:30
	T_m	00:20
	72°C	01:00
1x	72°C	02:00

Figura 14: Reação padrão de PCR. Os ciclos estão representados de forma ordenada, com indicação do número de vezes que o ciclo é repetido, sua temperatura e o tempo de permanência da amostra nessas condições. As temperaturas de anelamento (T_m) dos pares de *primers* estão indicadas na Tabela 5

Tabela 5: Temperaturas de anelamento (T_m) utilizadas para os pares de *primer*. Cada par de *primer* teve sua temperatura de anelamento inferida com auxílio do programa Clone Manager Professional Suite, mas um *screening* com diferentes condições foi realizado quando necessário para determinação da temperatura de anelamento mais adequada.

Par de <i>primer</i>	T_m
Oleosin_FWD Oleosin_REV	60°C
Prom_FWD Prom_REV	55°C
Oleo2_FWD Oleo2_REV	60°C
GFP2_FWD GFP_REV	60°C
Term_FWD Term_REV	55°C
Ble_FWD Ble_REV	56°C
Prom_FWD Term_REV	60°C

As reações de PCR *double-joint* foram realizadas em um volume final de 100µl, contendo o tampão de reação (50 mM KCl e 10 mM de Tris-HCl pH 9,0), 250µM de cada dNTP, 0,04 unidades de Taq DNA Polimerase [Invitrogen], MgCl₂ e c.a. de 0,5 ng de cada amostra de DNA por µl de reação. A quantidade de DNA adicionado à reação variou de 0,01 a 0,9 ng, conforme a natureza do material amplificado, i.e. DNA genômico, plasmidial, previamente amplificado ou purificado. A quantidade de MgCl₂ variou de 1.0 a 4.0mM, de acordo com o conteúdo de GC dos primers, tamanho do fragmento e presença de anelamentos inespecíficos. Nesses últimos casos, a adição de 5% de DMSO e/ou 2% de glicerol foi também testada.

A reação de PCR *double-joint* é utilizada para a fusão de diferentes fragmentos introduzindo-se uma pequena região de sobreposição entre eles (Yu et al., 2004). A reação apresenta uma etapa de junção dos fragmentos e uma etapa de amplificação do sinal dos fragmentos amplificados (Chen & Janes, 2002). Essas duas etapas foram separadas em duas rodadas de reação, a primeira das quais era feita sem os primers e consistia em um ciclo de 95°C por 2 minutos, seguido por sete ciclos de 45 segundos a 95°C, 20 segundos à temperatura T_{m1} e 72°C por aproximadamente 2 minutos (Figura 15). Depois de um ciclo de extensão por 2 minutos, eram adicionados 0,1 µM de cada *primer* e mais 0,04 unidades de Taq DNA Polimerase. Esse material era submetido à segunda rodada, que consistia em um ciclo de 95°C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 15 segundos à T_{m2} dos *primers*, a 72°C por aproximadamente 2 minutos de DNA e um ciclo final de 5 minutos a 72°C (Figura 15 e Tabela 6). A montagem de fragmentos através de PCR *double-joint* será explicada com mais detalhes no item 3.2 deste capítulo.

		Temperatura		Tempo (mm:ss)			Temperatura		Tempo (mm:ss)
1ª Rodada	1x	95°C	02:00	2ª Rodada	1x	95°C	01:00		
	7x	95°C	00:45		30x	95°C	00:30		
		Tm 1	00:20			Tm 2	00:15		
		72°C	02:00			72°C	02:00		
	1x	72°C	02:00		1x	72°C	05:00		

Figura 15: Reação padrão de PCR *double joint*. Os ciclos estão representados de forma ordenada, com indicação do número de vezes que o ciclo é repetido, sua temperatura e o tempo de permanência da amostra nessas condições. As Tm1 e Tm2 estão relacionadas na Tabela 6.

Tabela 6: Tm1 e Tm2 utilizadas nas reações de PCR *double joint* com indicação dos primers e fragmentos de DNA utilizados na reação. A Tm1 corresponde à temperatura média de anelamento dos fragmentos entre si e a Tm2 corresponde à temperatura de anelamento do par de *primers* utilizados na amplificação do sinal, ambas inferidas com auxílio do programa Clone Manager Professional Suite.

Fragmentos	Tm1	Primers	Tm2
Promotor Oleosin cGFP 3'UTR Ble	70°C	Prom_FWD Ble_REV	62°C
Promotor Oleosin cGFP 3'UTR	65°C	Prom_FWD Term_REV	60°C
2RA Ble	65°C	Prom_FWD Ble_REV	60°C
3'UTR Ble	65°C	Term_FWD Ble_REV	63°C

2.6. Outras técnicas de manipulação genética e biologia molecular

Técnicas básicas de manipulação de ácidos nucleicos, i.e. digestões enzimáticas, ligação de fragmentos com ligase, transformação de *Escherichia coli* (DH10-β) e minipreparações de

DNA plasmídial foram realizados conforme descrito por Sambrook e colaboradores (Sambrook et al., 1989).

Fragmentos de DNA foram purificados a partir de gel de agarose 1% por meio de *kits* purelink, Invitrogen, conforme descrito pelos fabricantes. O planejamento e simulação de todas as clonagens foram feitas *in silico* nos programas Clone Manager Suite (Sci Ed Central) e Geneious.

2.7. Transformação de *Chlamydomonas reinhardtii*

O plasmídeo pSP124S, contendo o gene de resistência a Zeomicina (*ble*), foi utilizado nos testes do protocolo de transformação gênica de *C. reinhardtii*. A eficácia da transformação e expressão dos genes será confirmada pela sobrevivência de colônias da microalga em meio contendo o antibiótico Zeomicina.

Variações em diversos parâmetros foram testadas, mas o ponto de partida foi o protocolo estabelecido por Shimogawara e colaboradores (Shimogawara et al., 1998), que se baseia na eletroporação das células para proporcionar a incorporação do DNA. Esse protocolo foi satisfatoriamente empregado na obtenção de 16.000 mutantes por inserção no trabalho desenvolvido por Matsuo e colaboradores (Matsuo et al., 2008).

3. Resultados e discussão

3.1. Obtenção da Oleosina

A Oleosina de *O. sativa* (NP_001053473.1) apresentou a menor diferença significativa com uso de códons de *C. reinhardtii* (18,48%), dentre as sequências analisadas. Além de ser a mais próxima estatisticamente, o material apresenta uma sequência bastante curta, com 447 nucleotídeos do códon de início ao códon de parada. Considerou-se também que é um material de fácil cultivo além de ter muitos estudos que discutem e analisam suas propriedades de direcionamento e expressão (Chuang et al., 1996; Tzen et al., 1998; Wu et al., 1998).

As principais divergências encontradas foram nas trincas de dois resíduos de arginina (R): uma na posição 6 (AGA) e outra na posição 126 (AGG). São códons raros, mas não estão

ausentes na microalga, que possibilita sua utilização esporádica na sequência. A análise da sequência com o programa TMHMM indicou os domínios N- e C- terminais hidrofílicos e o centro hidrofóbico (Figura 16).

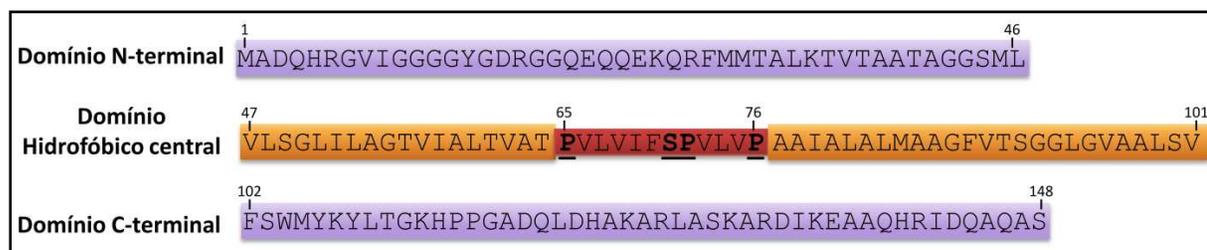


Figura 16: Análise da sequência proteica de oleosina de arroz utilizada no projeto com seus aminoácidos numerados acima da sequência. Os domínios hidrofílicos estão marcados em roxo e o centro hidrofóbico corresponde à região laranja. O nó de prolina (vermelho) contém os motivos conservados (sublinhados) responsáveis pelo dobramento da proteína.

As oleosinas são expressas durante o processo de maturação das sementes e do pólen, como parte da formação dos *oilbodies* (Tzen et al., 1998). Como o gene da oleosina não apresenta *introns*, a sequência pôde ser amplificada diretamente do DNA genômico da planta, não havendo necessidade de se utilizar os tecidos onde o gene é expresso.

O fragmento de *olesina* amplificado do genoma de arroz foi ligado em pGEM-T e transformada em *E. coli* DH10 β e a presença do fragmento de oleosina foi confirmada por análise de restrição (Figura 17).

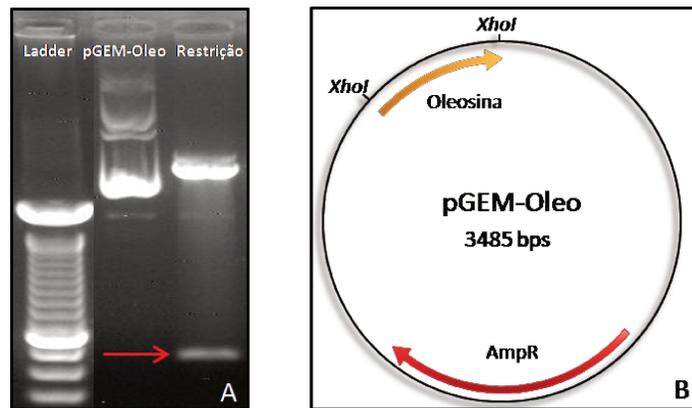


Figura 17: (A) Gel de agarose 1% no qual foram aplicadas o Ladder de DNA TrackIt™ 100 bp da Invitrogen, amostras do plasmídeo de um transformante positivo (pGEM-Oleo), e uma amostra deste tratado com *XhoI* (restrição). (B) Esquema do plasmídeo contendo a oleosina e os sítios de restrição *XhoI* indicados. A restrição do material gerou, de acordo com o padrão de peso molecular, um fragmento de cerca de 500pb (seta vermelha), que corresponde ao esperado para Oleosina retirada do pGEM nos sítios *XhoI* (470pb).

A sequência da oleosina de arroz foi utilizada como base para o desenho de uma oleosina sintética, corrigindo todas as discrepâncias no uso de códons e inserindo dois sítios de restrição *XhoI*, um no início e outro no fim, para ser inserido no sítio correspondente do plasmídeo pHsp70A/Rbcs2-cgLuc (Figura 18).

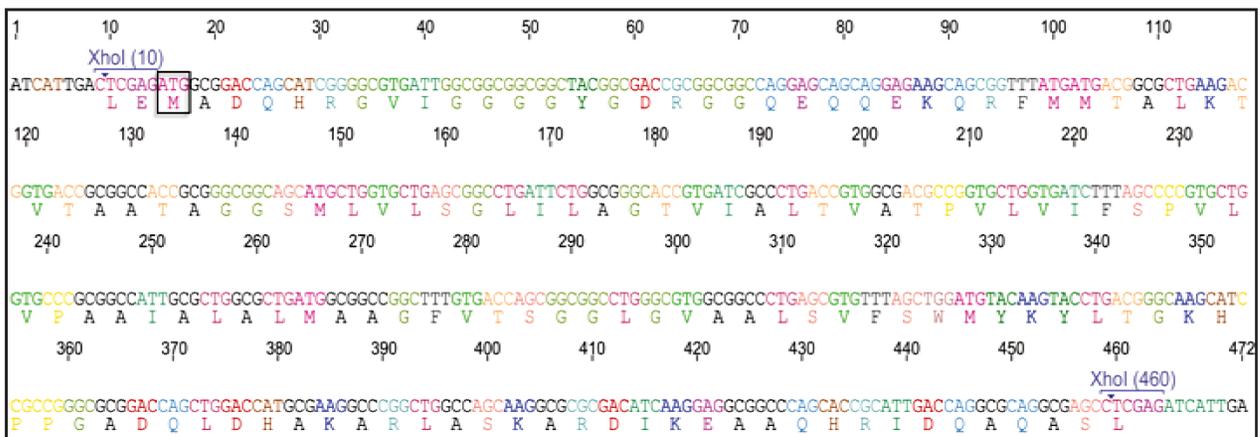


Figura 18: Sequência da oleosina sintética desenvolvida a partir da oleosina de arroz, com adaptações para *C. reinhardtii*. As trincas estão marcadas com as cores correspondentes aos aminoácidos que codificam, o códon de início foi destacado no retângulo preto e os sítios de restrição *XhoI* estão indicados acima da sequência.

3.2. Construção do vetor de expressão de oleosina marcada

A proposta para o vetor de expressão da oleosina consiste em uma construção contendo a ORF para oleosina fundida no mesmo quadro de leitura com a sequência de uma marca visual, como a luciferase ou GFP. Além da oleosina marcada, o vetor contém uma marca de seleção que permite uma triagem eficiente das células transformadas.

Essas duas sequências são controladas por promotores e terminadores (3'UTR) homólogos de *C. reinhardtii*. A marca de seleção escolhida foi um gene que confere resistência à antibióticos da família das Zeomicinas/bleomicinas (*ble*), encontrada no plasmídeo pSP124S, fornecido pelo Chlamy Center (Tabela 3).

Para a montagem desse vetor, primeiramente foram propostas duas estratégias com metodologias de clonagem clássica. Ambas envolvem a introdução do gene *Ble* no arcabouço do plasmídeo pHsp70A/RbcS2-cgLuc, através de extremidades geradas por duas enzimas diferentes. A primeira estratégia utiliza diretamente o pHsp70A/RbcS2-cgLuc e a segunda substitui a ORF da Luciferase (cgLuc) por uma ORF de GFP adaptada para *C. reinhardtii* (cGFP), obtendo-se o plasmídeo pHsp70A/RbcS2-cGFP (Figura 19). Essa substituição seria uma alternativa para o caso de mau-funcionamento da Luciferase como marcador posicional dos *oilbodies*.

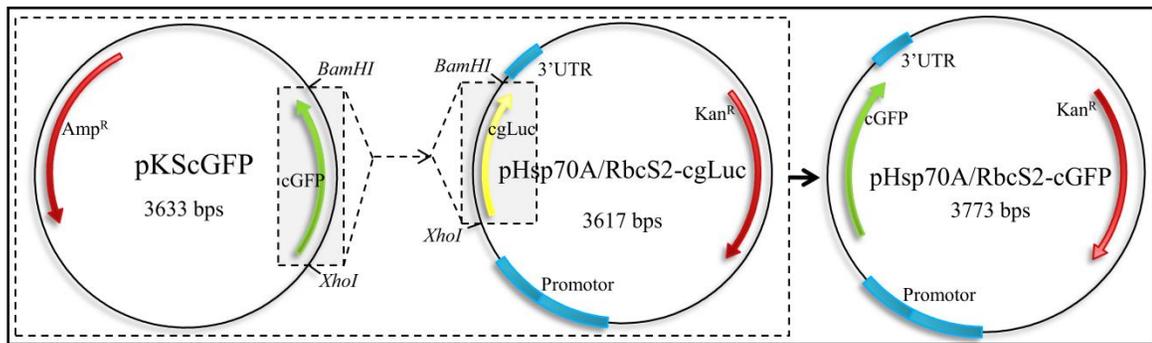


Figura 19: Montagem do plasmídeo pHsp70A/Rbc-S2-cGFP, a partir dos plasmídeos pKScGFP e pHsp70A/Rbc-S2-cgLuc. Ambos foram separadamente cortados com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I e os fragmentos gerados foram separados em gel de agarose. As bandas correspondentes ao cGFP e ao arcabouço do pHsp70A/Rbc-S2-cgLuc foram cortadas, purificadas e ligadas para gerar o plasmídeo pHsp70A/Rbc-S2-cGFP. A ligação foi transformada em células de *E. coli* para seleção dos clones contendo a montagem correta. Vale ressaltar que a ligação dos dois fragmentos restituiu o sítio *Xho*I, necessário para introduzir o fragmento contendo a oleosina.

A ORF de *oleosina* foi amplificada a partir do DNA de *O. sativa*, com os *primers* Oleosin_FWD e Oleosin_REV (Tabela 4), que incluem sítios de restrição *XhoI* nas extremidades do gene e excluem o códon de parada.

A utilização de uma enzima de restrição para ambas as extremidades não é a mais adequada, pois pode permitir tanto a auto-circularização de fragmentos quanto a ligação anti-senso, além de aumentar a possibilidade de ligação de múltiplos fragmentos. Todavia, a ausência de outros sítios de restrição em posições apropriados impossibilitou a utilização de extremidades coesivas diferentes para a integração da *oleosina*.

Uma vez obtido um vetor no qual a *oleosina* foi corretamente incorporada, este seria tratado com as enzimas de restrição *SmaI* e *SacI*, que criariam extremidades compatíveis com o fragmento *Ble*, obtido da restrição do plasmídeo pSP124S com as enzimas *PvuII* e *SacI* (Figura 20). O mesmo procedimento seria feito com o plasmídeo pHsp70A/Rbc-S2-cGFP (Figura 21).

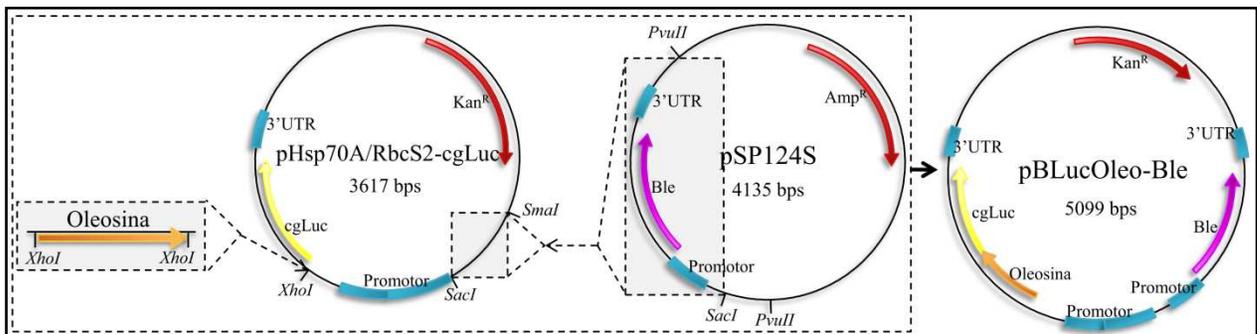


Figura 20: Esquema da obtenção do plasmídeo pBLucOleo-Ble. A *oleosina* tratada com a enzima de restrição *XhoI* é ligada com o plasmídeo pHsp70A/RbcS2-cgLuc tratado com a mesma enzima. Depois de selecionados plasmídios contendo a ligação correta, estes são tratados com as enzimas *SmaI* e *SacI*, que criam extremidades compatíveis para ligação com o fragmento *Ble* retirado do plasmídeo pSP124S com as enzimas *PvuII* e *SacI*. Os plasmídeos pBLucOleo-Ble são selecionados a partir dessa ligação.

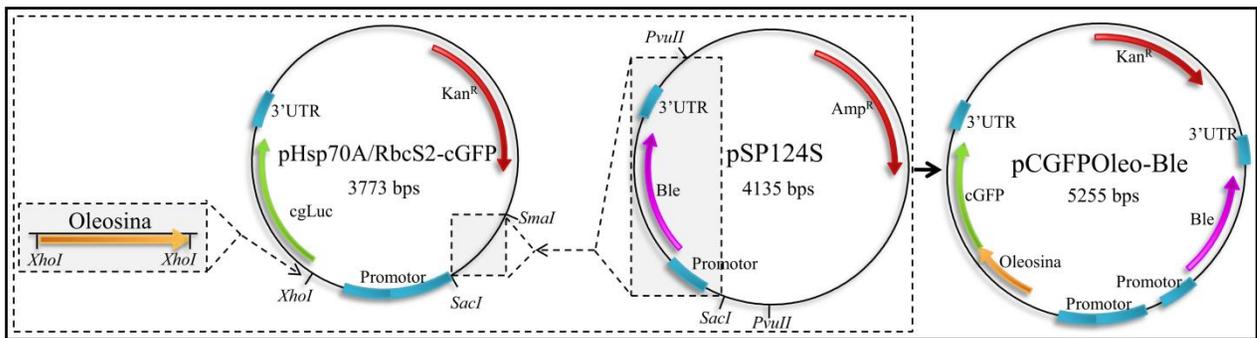


Figura 21: Esquema da obtenção do plasmídeo pCGFPoleo-Ble. O plasmídeo pHsp70A/RbcS2-cGFP é obtido conforme indicado na Figura . A oleosina tratada com a enzima de restrição *XhoI* é ligada no plasmídeo tratado com a mesma enzima. Depois de selecionados plasmídios contendo a ligação correta, estes são tratados com as enzimas *SmaI* e *SacI*, que criam extremidades compatíveis para ligação com o fragmento Ble retirado do plasmídeo pSP124S com as enzimas *PvuII* e *SacI*.

Todos os materiais foram cortados separadamente com as enzimas de restrição propostas e os fragmentos desejados foram purificados em gel de agarose (Figura 22).

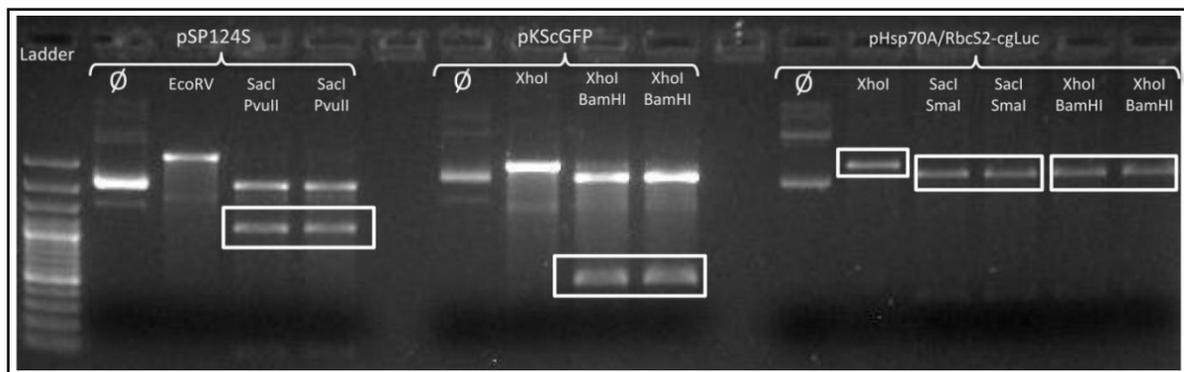


Figura 22: Gel de agarose 1% contendo amostras dos plasmídeos pSP124S, pKScGFP e pHsp70A/RbcS2-cgLuc para a realização das montagens propostas. As amostras indicadas por \emptyset correspondem ao plasmídeo sem tratamento, seguidas por amostras tratadas com enzima de corte único (*EcoRV* e *XhoI*). As amostras para utilização na montagem estão marcadas com um quadrado branco: A banda menor de pSP124S cortado com *SacI* e *PvuII* para ligação com pHsp70A/RbcS2-cgLuc aberto com *SacI* e *SmaI*; a banda menor do pKScGFP cortado com *XhoI* e *BamHI* para ligação com pHsp70A/RbcS2-cgLuc coratdo com as mesmas enzimas; e o pHsp70A/RbcS2-cgLuc aberto para ligação com o fragmento de oleosina.

Uma vez dispendo de todos os fragmentos necessários, iniciou-se a montagem conforme descrito nas Figuras 15, 16 e 17. Primeiramente, o fragmento cortado contendo a oleosina foi

ligado com o plasmídeo pHsp70A/Rbc-S2-cgLuc e transformado em *E. coli* DH10 β para seleção de ligações corretas. Análises de restrição foram feitas para verificar o direcionamento da sequência, senso ou anti-senso.

Foram avaliadas 76 colônias de *E. coli* com prováveis aquisições de produtos da ligação, quanto à presença do fragmento de *oleosina* através de PCR com *primers* específicos para sua sequência. Uma colônia dentre as 76 apresentou o fragmento integrado (pB57), mas análises de padrão de restrição indicaram que o *backbone* não correspondia ao esperado para o plasmídeo pHsp70A/RbcS2-cgLuc (Figura 23).



Figura 23: (A) Representação do plasmídeo pHsp70A/RbcS2-LucOleo, resultante esperado da ligação senso da *oleosina* com pHsp70A/RbcS2-cgLuc, e os sítios de restrição das enzimas testadas (B) gel de agarose 1% no qual foram aplicadas amostras do plasmídeo pB57 (lado esquerdo) e do plasmídeo pHsp70A/RbcS2-cgLuc (lado direito), tratadas ou não com diferentes enzimas de restrição. (C) Representação do plasmídeo pHsp70A/RbcS2-cgLuc e os sítios de restrição das enzimas testadas. A escala em pares de base está indicada nas duas representações (A e C). Quando pB57 é tratado com *XhoI* é gerado o fragmento possivelmente correspondente à *oleosina* (seta vermelha), mas este encontra-se incluído em uma estrutura de cerca de 8.000pb, enquanto o esperado eram 3.617pb. Adicionalmente, a enzima *HindIII* apresenta um único sítio nessa estrutura, que contraria a possibilidade de ligações de múltiplos pHsp70A/RbcS2-cgLuc.

A ligação da *oleosina* com o plasmídeo era um passo crítico na montagem do vetor e o número limitado de sítios de restrição restringia as estratégias possíveis para a montagem. Optou-se, então, por alterar a metodologia de montagem do vetor para o PCR *double-joint*, que é mais rápida, além de oferecer alternativas aos sítios de restrição (Figura 15).

Nessa técnica, são introduzidas pequenas extremidades homólogas nos diferentes fragmentos que se deseja unir, por meio de extensões nos *primers* utilizados para amplificar esses fragmentos. Na primeira rodada de amplificação, ocasionalmente a extremidade de um fragmento se anela com a extremidade homóloga do fragmento seguinte. A polimerase reconhece o grupo hidroxila-3' livre do anelamento, como ocorre com um *primer*, e gera uma fita que corresponde à ligação dos dois fragmentos.

No final da primeira rodada têm-se um pool de fragmentos no qual alguns correspondem ao produto esperado, assim adicionam-se os *primers* extremos e mais polimerase, submetendo a mistura a mais ciclos de desnaturação, anelamento e extensão para amplificar a sequência correta.

Os fragmentos da reação de PCR *double-joint* foram planejados de que o produto final contenha a *oleosina* ligada ao *GFP* no mesmo quadro de leitura, controlada por um promotor e um terminador homólogo (3'UTR), além da marca de resistência (*ble*).

Para a montagem do cassete, os fragmentos foram isolados de diferentes origens, por meio de uma amplificação com *primers* que introduzem 20pb de homologia com o fragmento anterior na sequência (Figura 24).

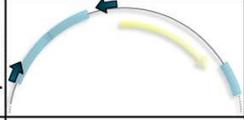
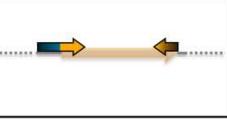
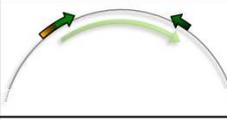
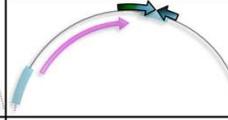
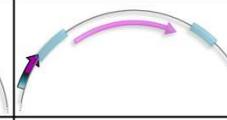
Material	pHsp70A/RbcS2-cgLuc	DNA genômico <i>Oryza sativa</i>	pKScGFP	pSP124S	pSP124S
Primers	Prom_FWD Prom_REV	Oleo2_FWD Oleo2_REV	GFP2_FWD GFP_REV	Term_FWD Term_REV	Ble_FWD Ble_REV
Posição dos primers					
Fragmento amplificado					

Figura 24: Fragmentos utilizados para montagem do cassete na ordem correta, com indicação dos materiais a partir dos quais foram amplificados. Os nomes dos *primers* estão indicados e há uma representação com setas pequenas (azul escuro, mostarda, verde escuro, azul claro e roxo), em suas posições aproximadas nos esquemas dos plasmídeos/genoma. Os *primers* forward, além de 20 pb de homologia com o fragmento a ser amplificado, contém 20pb adicionais não homólogos, que são introduzidos para a ligação com o fragmento anterior na sequência (cores correspondentes nos retângulos).

As reações de amplificação foram testadas a um gradiente de temperaturas, variando 2°C no intervalo de $\pm 5^\circ\text{C}$ da temperatura de anelamento para os primers, indicada pelo programa Clone Manager Professional Suite. Como algumas regiões apresentavam alto conteúdo de Citosina/Guanina, foram adicionado 5% DMSO e 2% de glicerol quando necessário. Uma vez que as melhores condições de amplificação foram determinadas, foi utilizada uma DNA polimerase de alta fidelidade nas reações para obtenção dos fragmentos desejados (PrimeSTAR®, TAKARA Bio INC) (Figura 25).

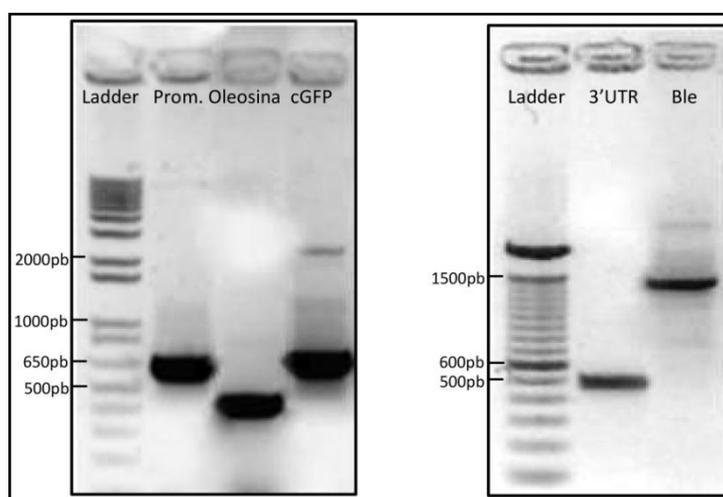


Figura 25: Geis de agarose 1% contendo amostras da amplificação do Promotor (Prom. – 648pb), Oleosina (464pb), cGFP (734pb), Terminador (3'UTR – 496pb) e gene de resistência à bleomicina (Ble – 1405pb). Os pesos moleculares de referência estão indicados.

Os *primers* precisavam ser desenhados em regiões bastante restritas para garantir a sequência correta do cassete, que raramente proporcionavam *primers* com boas características. Apesar da otimização das reações de PCR, ainda ocorriam amplificações inespecíficas em menor quantidade.

A fim de se evitar montagens incorretas, os fragmentos de tamanho esperado foram isolados de gel de agarose e purificados. Os fragmentos purificados foram proporcionalmente misturados e submetidos à reação de PCR *double-joint* (Figura 26).

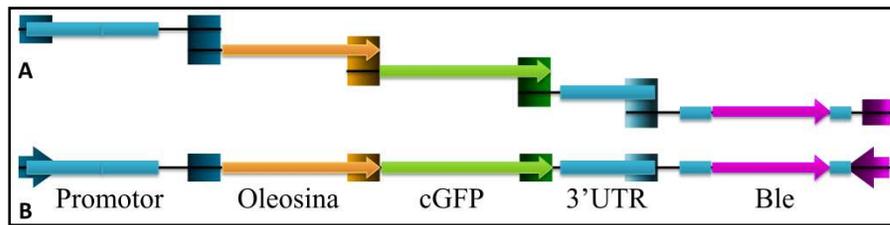


Figura 26: Os fragmentos amplificados em uma etapa anterior são misturados para a reação de PCR *double-joint*, na presença de dNTP e polimerase. (A) Ocasionalmente, as extremidades homólogas dos fragmentos se anelam e a extensão da polimerase gera uma fita que é produto da conexão entre os fragmentos. (B) Adicionam-se os *primers* externos (setas azul e roxa) para amplificar o produto final produto.

O produto final foi avaliado em gel de agarose, mas não houve amplificação específica no tamanho esperado. Outras temperaturas de anelamento e tempos diferentes para os ciclos foram testados, mas sem resultado. Devido as opções limitadas de ferramentas moleculares, as regiões promotoras e terminadoras das duas ORFs possuem trechos coincidentes.

Possivelmente essa homologia interferiu nos anelamentos, prejudicando a geração da sequência correta. Optou-se, portanto, por realizar montagem do cassete em duas fases: a primeira conectando os fragmentos promotor, Oleosina, cGFP e 3'UTR e a segunda conectando esse produto com o fragmento de Resistência à Bleomicina (Figura 27).

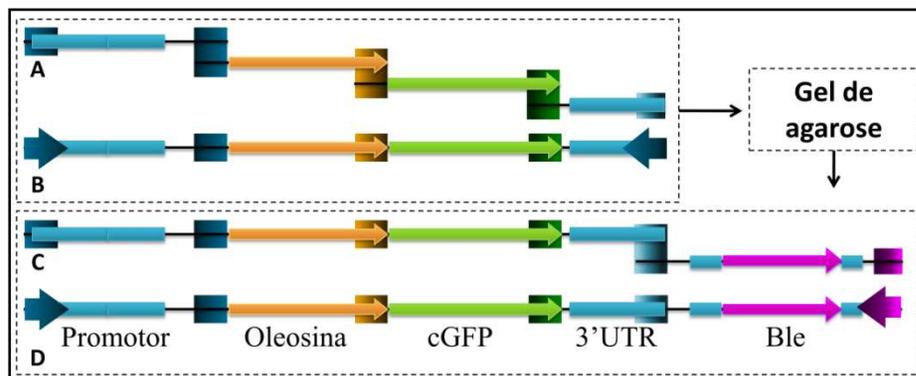


Figura 27: (A) Uma primeira reação de PCR *double-joint* une os fragmentos Promotor, Oleosina, cGFP e 3'UTR. (B) Adicionam-se os *primers* externos para amplificação da montagem correta. Os fragmentos gerados são separados em gel de agarose e a banda correspondente à montagem é isolada e purificada. (C) Uma segunda reação de PCR *double-joint* é preparada para unir este material purificado com o fragmento Ble. (D) Novamente, adicionam-se os *primers* externos para amplificação do cassete final, que é purificado em gel de agarose.

A primeira reação de montagem foi bem sucedida, unificando os fragmentos Promotor, Oleosina, cGFP e 3'UTR em um fragmento de 2282pb, chamado de 2RA, que foi isolado em gel de agarose e purificado. A segunda reação de montagem, que deveria gerar o cassete completo, não produziu nenhuma banda específica do tamanho esperado, apenas ampliações de arranjos diversos.

Os fragmentos Promotor, Oleosina, cGFP e 3'UTR não apresentam regiões homólogas entre si, mas, como mencionado anteriormente, os fragmentos Promotor e 3'UTR tem homologia com regiões do fragmento Ble. O fato da primeira reação de montagem ter funcionado confirma que o problema não é da técnica, e corrobora com a possibilidade dessas regiões homólogas estarem interferindo nos alinhamentos corretos.

Propôs-se, então, ligar o 3'UTR também com o Ble para aumentar a região de homologia da segunda reação de PCR *double joint*. Ou seja, uma primeira reação geraria o fragmento 2RA, uma segunda reação ligaria o 3'UTR com o Ble.

Os produtos dessas duas reações seriam ligados em uma terceira reação. Desse modo, além dos 20pb de homologia introduzidos pelo *primer*, toda a extensão do fragmento 3'UTR seria coincidente, que aumentaria a afinidade da ligação entre esses dois fragmentos para a amplificação do produto correto (Figura 28).

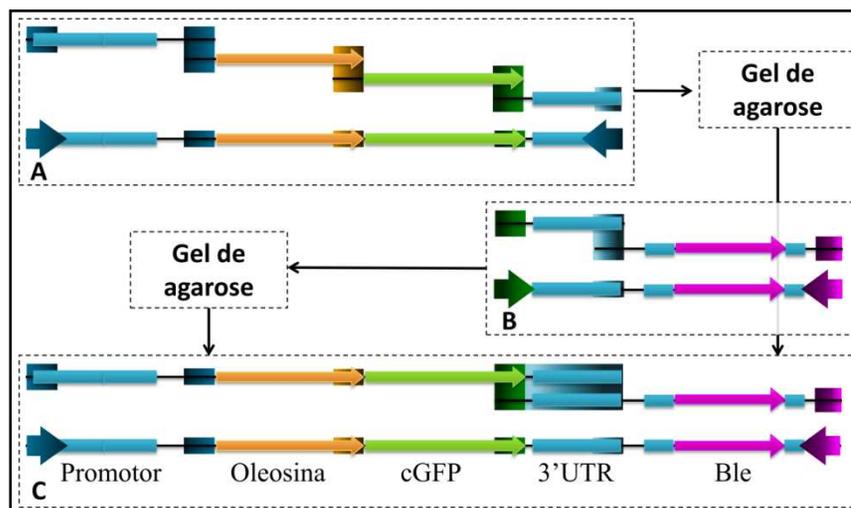


Figura 28: Novo esquema proposto para a montagem do cassete. (A) Uma reação de PCR *double-joint* une os fragmentos Promotor, Oleosina, cGFP e 3'UTR; (B) outra une os fragmentos 3'UTR e Ble. Os fragmentos são separados e purificados em gel de agarose; (C) e utilizados em uma terceira reação de PCR *double-joint*.

A reação de montagem dos fragmentos 3'UTR e Ble também produziu apenas ampliações de tamanhos incorretos em todas as condições testadas.

A técnica de PCR *double-joint* foi eficiente para unificar os fragmentos Promotor, Oleosina, cGFP e 3'UTR, mas ainda era necessário introduzir a resistência ao antibiótico para concluir a montagem do vetor. Como a dificuldade era incorporar com o fragmento Ble, propôs-se utilizar metodologias de clonagem clássica, paralelamente com a técnica de PCR *double-joint*.

Algumas DNAs polimerases termoestáveis, como a Taq, introduzem uma extensão de um único nucleotídeo na extremidade 3' do DNA, geralmente uma Adenina, de modo independente do molde. Essa particularidade é aproveitada na clonagem em vetores-T, como o pGEM-T, que contém uma Timina pendente na extremidade 3', que pareia com a Adenina 3' do DNA amplificado.

Assim, o fragmento 2RA foi obtido utilizando a enzima Taq DNA polimerase na reação de montagem, ao invés da polimerase PrimeSTAR, e desse modo foi ligado no plasmídeo pGEM-T. A reação de ligação foi transformada em *E. coli* DH10 β para seleção de clones contendo o plasmídeo correto, chamado de pGEM-2RA.

O fragmento 2RA passou a ser flanqueado por diversas opções de sítios de restrição, fornecidos pelo pGEM-T. Buscou-se, então, sítios compatíveis no plasmídeo pSP124S, que continha a resistência a Zeomicina (Figura 29).

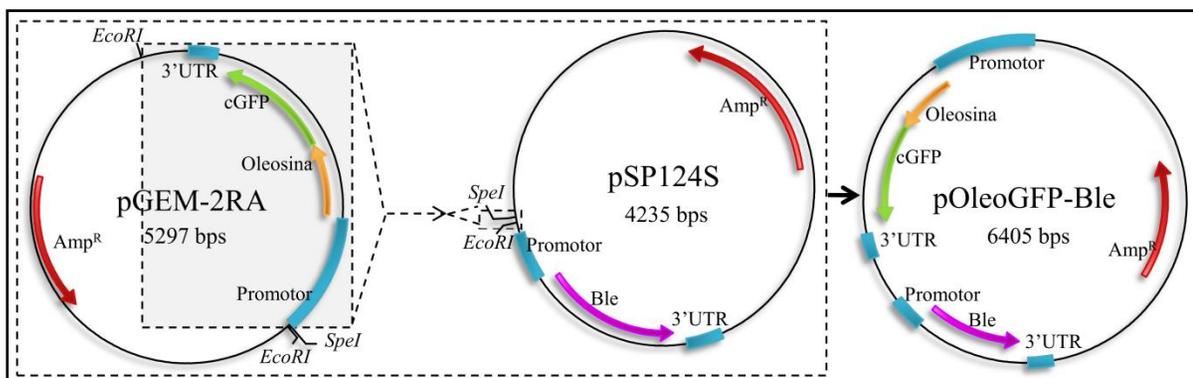


Figura 29: Montagem do vetor à partir do plasmídeo pSP124S e do fragmento 2RA incorporado em pGEM-T. A restrição com as enzimas *EcoRI* e *SpeI* liberam o fragmento 2RA com sítios compatíveis para a ligação com o plasmídeo pSP124S cortado com as mesmas enzimas.

A amostra de pGEM-2RA foi simultaneamente tratada as enzimas *EcoRI* e *SpeI*, assim como a amostra de pSP124S (Figura 30). Os fragmentos desejados foram purificados a partir de um gel de agarose, ligados e transformados em *E. coli* DH10 β .

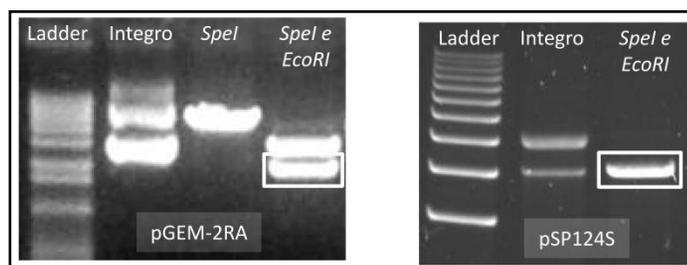


Figura 30: Géis de agarose 1% contendo amostras dos plasmídeos pGEM-2RA e pSP124S tratados e não tratados com enzimas de restrição. O fragmento menor de pGEM-2RA, gerado pela restrição com as enzimas de restrição *SpeI* e *EcoRI*, foi purificado do gel e ligado com a amostra de pSP124S tratada com as mesmas enzimas (retângulos brancos).

Os plasmídeos obtidos de 33 transformantes de *E. coli* foram analisados com enzimas de restrição e PCR quando à presença do vetor final pOleoGFP-Ble, que continham a *oleosina* ligada ao *GFP* no mesmo quadro de leitura, controlada por um promotor e um terminador homólogo, além da marca de resistência Ble.

Foram observados os padrões de restrição gerados pelas enzimas *EcoRI*, *SacII*, *ApaI* e *NcoI* e os produtos de amplificação com os pares de primers *Oleo2_FWD/Oleo2_REV*, *GFP2_FWD/GFP_REV*, *Ble_FWD/Ble_REV* e *Prom_FWD/Term_REV* (Tabela 7). Dos 33 transformantes analisados, 21 foram positivos para a construção pOleoGFP-Ble. A Figura 31 apresenta a análise de um desses transformantes positivos. O vetor de um desses transformantes foi confirmado mais tarde por seqüenciamento.

Tabela 7: Restrições e ampliações utilizadas para confirmar a construção pOleoGFP-Ble. Os tamanhos esperados dos fragmentos gerados com o tratamento estão indicados, assim como as enzimas e os primers utilizados.

	Tratamento	Tamanhos esperados dos produtos
Restrição	EcoRI	6405 pb
	SacII	4846 e 1559 pb
	ApaI	3312 e 3093 pb
	NcoI	3222 e 3183 pb
Amplificação	Oleo2_FWD/Oleo2_REV	464 pb
	GFP2_FWD/GFP_REV	734 pb
	Ble_FWD/Ble_REV	1405 pb
	Prom_FWD/Term_REV	2282 pb

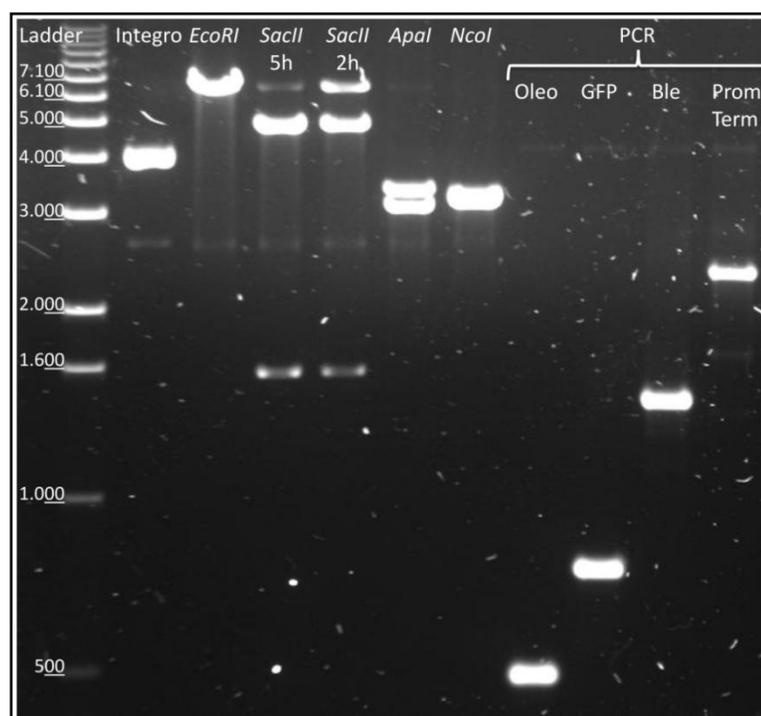


Figura 31: Gel de agarose 1% contendo as amostras de um plasmídeo pOleoGFP-Ble confirmado, tratadas conforme indicado na Tabela. A enzima *SacII* apresentou uma banda não esperada entre 6.100 e 7.100pb. Quando utilizada para restrição de dois sítios de uma mesma sequência, a enzima *SacII* pode gerar restrições incompletas. Esse efeito foi comprovado prolongando-se o tratamento do material de 2h para 5h, pois nota-se que intensidade da banda não esperada diminui.

3.3. Transformação de *Chlamydomonas reinhardtii*

Os testes preliminares do protocolo de transformação celular de *C. reinhardtii* foram feitos com o plasmídeo pSP124S, que continha o gene de resistência a bleomicina (ble), flanqueado por regiões reguladoras e terminadoras de *C. reinhardtii*. O protocolo testado foi estabelecido por Shimogawara e colaboradores (Shimogawara et al., 1998) que tem como base a eletroporação das células.

Conforme indicado do Chlamy Center, a sensibilidade ao antibiótico Zeomicina pode variar com a linhagem utilizada. Por esse motivo, diferentes concentrações do antibiótico foram testadas, a fim de se avaliar seu efeito nas células da linhagem CC-1690, mais utilizadas nos experimentos de transformação (Figura 32).

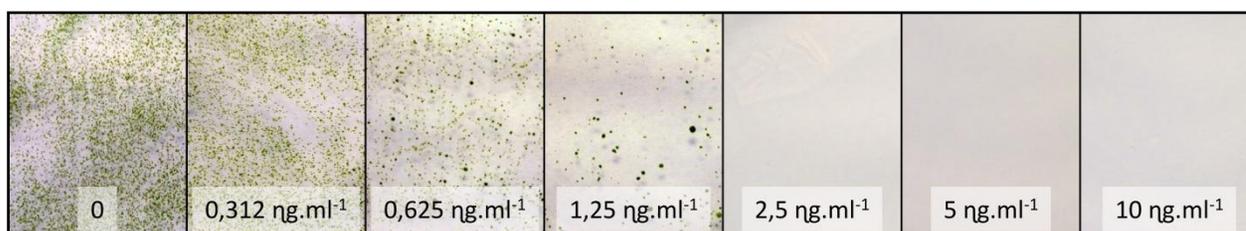


Figura 32: Colônias de *C. reinhardtii* com 10 dias de crescimento em meio TAP contendo diferentes concentrações de Zeomicina: 0,312 ng.ml⁻¹; 0,625 ng.ml⁻¹; 1,25 ng.ml⁻¹; 2,5 ng.ml⁻¹; 5 ng.ml⁻¹; 10 ng.ml⁻¹; e sem antibiótico (0). A presença de 2,5 ng.ml⁻¹ de antibiótico já inibe qualquer crescimento celular, mesmo depois de 30 dias. Mesmo assim, optou-se por utilizar 5 ng.ml⁻¹ nos testes de transformação, para se evitar possíveis falsos-positivos.

Para determinar a voltagem mais adequada para o experimento, considerando o eletroporador disponível (Eletroporador MicroPulser™ Bio-Rad), foram testadas as voltagens 700V, 1.000V, 1.300V, 1.600V, 1.900V, 2.200V e 2.500V, aplicadas de forma exponencial sem resistor de Shunt.

O experimento não produziu colônias transformantes de microalga, mas serviu para avaliar o efeito da voltagem sobre as células, cuja viabilidade em meio sem antibiótico caiu progressivamente até 2.500V. A densidade celular era alta de mais para permitir a contagem das células, mas comparando-se com uma amostra não eletroporada, estimou-se a taxa de sobrevivência das amostras em relação a voltagem: (i) 700V ~98%; (ii) 1.000V ~90%; (iii)

1.300V ~80%; (iv) 1.600V ~70%; (v) 1.900V ~50%; (vi) 2.200V ~25%; e (vii) 2.500V ~5%. Optou-se por utilizar 1.600V nos testes seguintes.

O protocolo foi repetido variando-se diversos parâmetros: (i) com diferentes quantidades de plasmídeo pSP124S linearizado ($5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e $15\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). (ii) diferentes tempos de incubação das células sem antibiótico, após a transformação (2h, 4h, 12h e 24h). (iii) Pré-tratando as células com enzimas de sensibilização da parede celular (Kinoshita et al., 1992). Em todas as condições foram feitos controles de sobrevivência das células com e sem tratamento, na presença e ausência do antibiótico

Até a conclusão desse trabalho, infelizmente não se obteve nenhum transformante. Discussões de pesquisadores da microalga em fóruns de *C. reinhardtii* indicaram que dificuldades com o protocolo de transformação são frequentes (<http://www.bio.net/hypermil/chlamydomonas/>). O sucesso da técnica depende da otimização de diversas variáveis que são influenciadas pela linhagem utilizada, condições de cultivo, marca de produtos e equipamentos.

4. Conclusões parciais

O vetor para expressão da oleosina fundida com GFP, contendo a marca de seleção Ble, foi montado a fim de se confirmar o funcionamento da oleosina em microalgas. Optou-se por utilizar *C. reinhardtii* como modelo de microalga, já que a espécie é considerada modelo para diversos estudos e possui diversos protocolos de biologia molecular estabelecidos.

A análise da oleosina de *O. sativa* indicou que a sequência é adequada para *C. reinhardtii*, de forma que há grande possibilidade de ser reconhecida expressada pela microalga. A ligação da oleosina com o plasmídeo foi um passo crítico na montagem do vetor e o número limitado de sítios de restrição restringia as estratégias possíveis para a montagem. Por esse motivo, foi necessária a utilização da técnica de PCR *double-joint* para se obter o vetor contendo oleosina fundida com GFP, contendo a marca de seleção Ble, adaptados para expressão em *C. reinhardtii*.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A grande concentração de hidrocarbonetos lipídicos em algas motiva investigação da sua utilização como matéria prima para obtenção de biocombustíveis entre outros produtos.

A recuperação da biomassa e obtenção da fração lipídica de uma cultura de microalga corresponde a uma porcentagem relevante do preço do óleo, podendo representar mais de 70% do custo final do óleo bruto. Prospecção científica neste sentido indica a necessidade de se elaborar um processo que permita a recuperação dos lipídios diretamente do meio de cultura, como é feito com o etanol nas usinas sucro-alcooleira.

A secreção das reservas lipídicas de forma espontânea e não invasiva pode ser artificialmente introduzido nas microalgas por meio de engenharia genética. Uma tecnologia como essa permitiria a recuperação dos lipídios diretamente do meio de cultura, eliminando etapas críticas para a produção de hidrocarbonetos em larga escala a partir de microalgas e tem potencial de aumentar a taxa de conversão da energia capturada da biomassa em óleo.

Com a intenção de desenvolver um sistema de secreção para as reservas lipídicas de microalgas, propôs-se inserir um fragmento de SNARE nas membranas dos *oilbodies*, levando-os à fusão com a membrana plasmática e extrusão de seu conteúdo.

Uma vesícula destinada à secreção contém o v-SNARE que reconhece um conjunto de t-SNAREs na membrana plasmática. Essa interação não só identifica a via exocítica, como também proporciona a fusão das membranas. As reservas lipídicas da microalga, desse modo, seriam comprometidas com a via de secreção e excretadas. A fração lipídica seria recuperada diretamente da cultura, sem a necessidade de outros processamentos da biomassa (Figura 33).

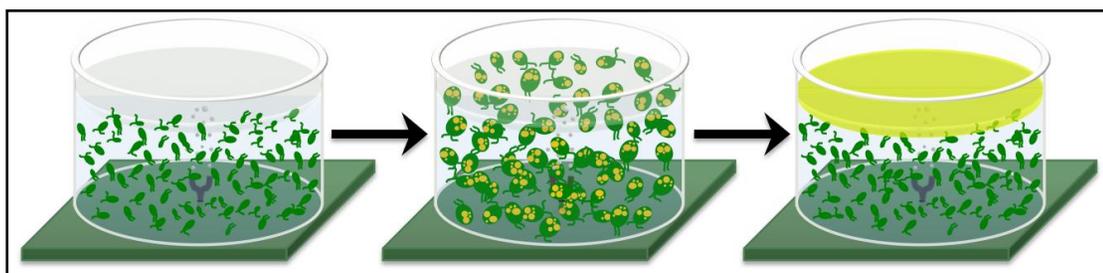


Figura 33: Cultivo previsto de uma microalga modificada com a construção para secreção das reservas lipídicas.

Devido à tendência a ocuparem a membrana de *oilbodies*, as oleosinas já foram consideradas para o transporte de diversas moléculas para essas vesículas. Esse trabalho, então propôs a utilização de oleosinas como carregadores do domínio SNARE para *oilbodies* de microalgas

Conhecendo a estrutura e o funcionamento das proteínas SNAREs, a utilização apenas do segmento que contém o domínio SNARE parece ser mais adequada (Figura 34). A exclusão do domínio *longin* foi considerada pensando tanto em evitar possíveis conflitos entre sinais de encaminhamento, quanto em aumentar a taxa exocítica das vesículas de reserva lipídica.

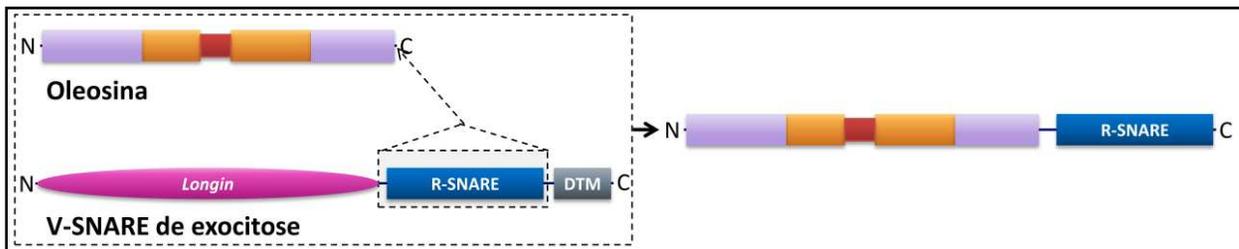


Figura 34: Esquema do dispositivo proposto para promover a secreção de reservas lipídicas. O domínio SNARE seria clonado e ligado à sequência de uma oleosina. A montagem inserida na microalga seria encaminhada para a membrana dos *oilbodies*, comprometendo-os com a excitose.

Diversos trabalhos demonstraram que a afinidade com a qual os SNAREs se inserem nas membranas é determinante para proporcionar a fusão, em detrimento da sequência que proporciona essa afinidade (Fdez et al., 2010; Mcnew et al., 2000). A grande afinidade com a qual a oleosina se insere na membrana dos *oilbodies*, mesmo associada a outras proteínas, pode ser suficiente para a substituição do domínio transmembranar do SNARE (Figura 35).

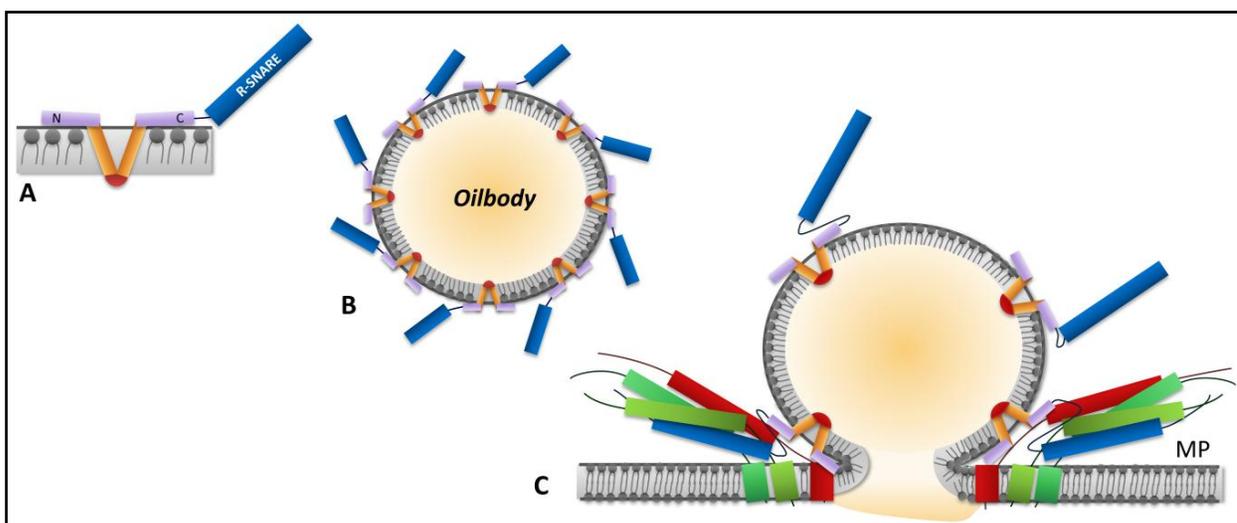


Figura 35: Inserção do dispositivo na membrana e seu funcionamento ao se complexar com os outros SNAREs. (A) Detalhe do dispositivo inserido em uma monocamada lipídica; (B) *Oilbody* em cuja membrana se encontra diversos dispositivos inseridos. O domínio SNARE seria encontrado na face citoplasmática da membrana; (C) Fusão do *oilbody* com a membrana plasmática, mediado pelo domínio SNARE do dispositivo. (MP – membrana plasmática)

Trabalhos já comprovaram que as características da oleosina que promovem seu direcionamento para oil-bodies funcionam independente de outros mecanismos celulares. Beaudoin e Napier (2002) introduziram uma oleosina de girassol em *Saccharomyces cerevisiae*, que não possui oleosinas, que foi expressa e encaminhada para os oilbodies do microorganismo. A introdução da proteína em microalgas, que originalmente não possui oleosinas, possivelmente não seria um limitante.

A fim de se confirmar o funcionamento da oleosina em microalgas, montou-se um vetor para expressão da oleosina em *C. reinhardtii*, como modelo de microalga, já que a espécie possui diversos protocolos de biologia molecular estabelecidos. A transformação das células de *C. reinhardtii* foi um empecilho, mas dificuldades com o protocolo de transformação são frequentes entre outros grupos de pesquisa de *C. reinhardtii*. Foi feito contato com Elizabeth Harris, da Duke university, NC – USA, para maiores detalhes dos passos críticos no protocolo de transformação. Está sendo avaliado o envio do material para centros de pesquisa já familiarizados com a metodologia de transformação.

Uma vez confirmado o funcionamento da oleosina, uma construção contendo a proteína ligada ao domínio SNARE de exocitose seria construída também para a expressão em *C.*

reinhardtii. A microalga modelo seria novamente empregada a fim de se confirmar o conceito proposto. A nova construção seria baseada no plasmídeo desenvolvido nesse projeto, introduzindo-se o motivo SNARE entre a oleosina e o GFP (Figura 36).

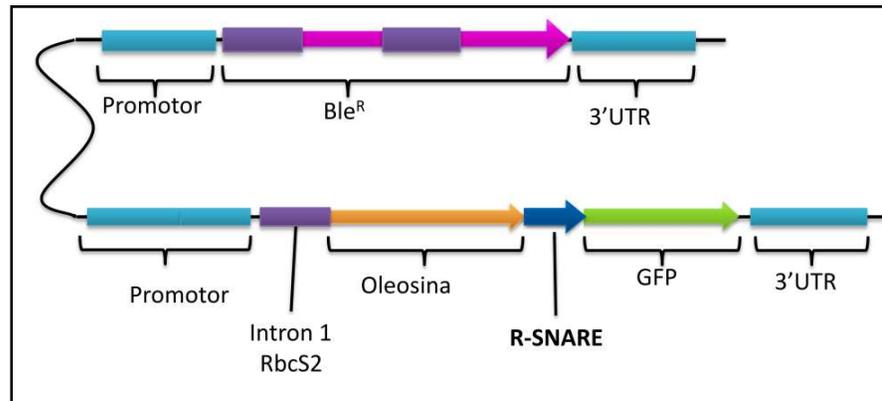


Figura 36: Construção contendo oleosina ligada ao domínio SNARE, identificada com a marca visual GFP. O vetor contém uma marca de seleção que permite uma triagem eficiente das células transformadas, Ble, que confere resistência aos antibióticos da família das Zeomicinas/bleomicinas.

A fusão da oleosina com o domínio SNARE seria posteriormente adaptada para a microalga *N. oleoabundans*, a fim de se avaliar possíveis consequências da expressão da oleosina nesse organismo. No entanto, tal construção pode ser adaptada para expressão em qualquer microalga com potencial para utilização industrial. Um processo como esse proposto, que permite a recuperação dos lipídios diretamente do meio de cultura, representa uma enorme economia para a produção de cadeias carbônicas a partir de microalgas, em escala industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, T., Premalatha, M., & Abbasi, S. A. (2011). The return to renewables: Will it help in global warming control? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *15*(1), 891-894.
- Abell, B., Hahn, M., Holbrook, L. A., & Moloney, M. M. (2004). Membrane topology and sequence requirements for oil body targeting of oleosin. *The Plant Journal*, *37*(4), 461-470.
- Abell, B., High, S., & Moloney, M. M. (2002). Membrane protein topology of oleosin is constrained by its long hydrophobic domain. *The Journal of biological chemistry*, *277*(10), 8602-10.
- Abell, B., Holbrook, L., Abenes, M., Murphy, D., Hills, M., & Moloney, M. (1997). Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting. *The Plant Cell*, *9*(8), 1481-1493.
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, *25*(22), 4692-4693.
- Bao, Y.-M., Wang, J.-F., Huang, J., & Zhang, H.-S. (2008). Cloning and characterization of three genes encoding Qb-SNARE proteins in rice. *Molecular genetics and genomics*, *279*(3), 291-301.
- Barbirato, F., Chedaille, D., & Bories, A. (1997). Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *47*, 441-44.
- Beaudoin, F., & Napier, J. A. (2002). Targeting and membrane-insertion of a sunflower oleosin in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*: the central hydrophobic domain contains more than one signal sequence, and directs oleosin insertion into the endoplasmic reticulum membrane using a signal anchor sequence mechanism. *Planta*, *215*, 293-303.
- Benemann, John R. (2008). Opportunities and Challenges in Algae Biofuel Production. *Algae World 2008* (p. 15). Singapore.
- Bennett, S. (2004). Solexa Ltd. *Pharmacogenomics*, *5*(4), 433-438.
- Bernstein, L., Bosch, P., Canziani, O., Chen, Z., Christ, R., Davidson, O., Hare, W., et al. (2007). *Climate Change 2007: An Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Change (p. 52). Valencia, Spain.
- Bock, J. B., Lin, R. C., & Scheller, R. H. (1996). A new syntaxin family member implicated in targeting of intracellular transport vesicles. *The Journal of biological chemistry*, *271*(30), 17961-5.
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, a a, & Scheller, R. H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*, *409*(6822), 839-41.
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, *116*(2), 153-66.
- Boudghene Stambouli, A., & Traversa, E. (2002). Fuel cells, an alternative to standard sources of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *6*(3), 295-304.
- Brown, L. M. (1993). Biodiesel from microalgae: complementarity in a fuel development strategy. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*. Vol II, 902-908. Golden, CO.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal Syst Evolutionary Microbiology*, *52*, 297-354.

- Cerutti, H., Johnson, M. M., Gillham, N. W., & Boynton, J. E. (1997). A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: Integration into the nuclear genome and gene expression. *Genetics*, *145*, 97-110.
- Chen, B.-Y., & Janes, H. W. (2002). *PCR Cloning Protocols. Electrophoresis* (2nd ed., p. 439). Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, *25*, 294 - 306.
- Chuang, R. L. C., Chen, J. C. F., Chu, J., & Tzen, J. T. C. (1996). Characterization of Seed Oil Bodies and Their Surface Oleosin Isoforms from Rice Embryos. *Journal of Biochemistry*, *120*, 74-81.
- Clements, D. (1992). "Biodiesel Working Group." *Technology for Expanding the Biofuels Industry, April 21-22* (p. V-1-V-3). Chicago Ill.: U. S. Department of Energy, US Department of Agriculture, Renewable Fuels Association.
- Cockerill, S., & Martin, C. (2008). Are biofuels sustainable? The EU perspective. *Biotechnology for Biofuels*, *1*(9), 6.
- Curado, R. E. (2011). *Análise dos efeitos da privação de nitrogênio na microalga Neochloris oleoabundans, visando a produção de cadeias carbônicas lipídicas*. UNICAMP.
- Deffeyes, K. S. (2005). *Beyond Oil: The View from Hubbert's Peak* (1st ed.). New York, NY: Hill & Wang.
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, *49*, 2106-2116.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., et al. (2011). Geneious v4.8.
- Dun, A. R., Rickman, C., & Duncan, R. R. (2010). The t-SNARE complex: a close up. *Cellular and molecular neurobiology*, *30*(8), 1321-6.
- Fdez, E., Martínez-Salvador, M., Beard, M., Woodman, P., & Hilfiker, S. (2010). Transmembrane-domain determinants for SNARE-mediated membrane fusion. *Journal of cell science*, *123*(Pt 14), 2473-2480.
- Filippini, F., Rossi, V., Galli, T., Budillon, A., D'Urso, M., & D'Esposito, M. (2001). Longins: a new evolutionary conserved VAMP family sharing a novel SNARE domain. *Trends in biochemical sciences*, *26*(7), 407-9.
- Filippini, Francesco, Rossi, V., Galli, T., Budillon, A., D'Urso, M., & D'Esposito, M. (2001). Longins: a new evolutionary conserved VAMP family sharing a novel SNARE domain. *Trends in biochemical sciences*, *26*(7), 407-409.
- Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., et al. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, *38*(Database issue), D211-22.
- Frandsen, G. I., Mundy, J., & Tzen, J. T. C. (2001). Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiologia Plantarum*, *112*, 301-307.
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Scho, T., & Hegemann, P. (2004). Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Molecular Biology*, 869-881.
- Fuhrmann, M., Oertel, W., & Hegemann, P. (1999). A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, *19*(3), 356-361.

- Galli, Thierry, Zahraoui, A., Vaidyanathan, V. V., Raposo, G., Tian, J. M., Karin, M., Niemann, H., et al. (1998). A Novel Tetanus Neurotoxin-insensitive Vesicle-associated Membrane Protein in SNARE Complexes of the Apical Plasma Membrane of Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9(June), 1437-1448.
- Gavrilescu, M., & Chisti, Y. (2005). Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, 23, 471-499.
- Goldemberg, J., & Johansson, T. (2004). World Energy Assessment Overview: 2004 Update. *United Nations Development Programme*.
- Griffiths, M. J., & Harrison, S. T. L. (2008). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493-507.
- Grima, E. M., Belarbi, E. H., Fernández, F. G. A., Medina, A. R., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20, 491 - 515.
- Grote, E., Hao, J. C., Bennett, M. K., & Kelly, R. B. (1995). A targeting signal in VAMP regulating transport to synaptic vesicles. *Cell*, 81(4), 581-9.
- Harris, E. H. (2001). Chlamydomonas As a Model Organism. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 52, 363-406.
- Harris, E. H. (2009). *The Chlamydomonas Sourcebook* (2nd ed., p. 2032). Elsevier Inc.
- Harwood, J. L., & Guschina, I. A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91(6), 679-684.
- Hatsuzawa, K., Lang, T., Fasshauer, D., Bruns, D., & Jahn, R. (2003). The R-SNARE Motif of Tomosyn Forms SNARE Core Complexes with Syntaxin 1 and SNAP-25 and Down-regulates Exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 278(33), 31159 -31166.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., & Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11206-10.
- Hsieh, K., & Huang, A. (2004). Endoplasmic Reticulum , Oleosins , and Oils in Seeds and Tapetum Cells. *Plant Physiology*, 136, 3427-3434.
- Hu, C., Ahmed, M., Melia, T. J., Söllner, T. H., Mayer, T., & Rothman, J. E. (2003). Fusion of cells by flipped SNAREs. *Science*, 300, 1745–1749.
- Huang, A. H. C. (1992). Oil bodies and oleosins in seeds. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 43, 177-200.
- Hubbert, M. K. (1956). Nuclear Energy and the Fossil Fuels. Spring Meeting of the Southern District, N. 95(p. 40). American Petroleum Institute - Plaza Hotel, San Antonio, Texas.
- Hughes, E., & Benemann, J. R. (1997). Biological fossil CO₂ mitigation. *Proceedings of the 3rd International Conference on CO₂ Capture, Disposal and Reuse Utilization (ICCDR-3)*. Mass. Inst. Tech.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., et al. (2009). InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research*, 37(October 2008), 211-215.
- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change (2000). *Emissions Scenarios - Special Report* (p. 570). Cambridge.

- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change (2007). *Climate change 2007: mitigation. Contribution of working group 3 to the Fourth Assessment Report*. Paris.
- Jahn, R., & Scheller, R. (2006). SNAREs-engines for membrane fusion. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(9), 631-43.
- Jahn, R., & Südhof, T. C. (1999). Membrane Fusion and Exocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 863-911.
- Jekely, G. (2003). Small GTPases and the evolution of the eukaryotic cell. *Bioessays*, 25, 1129-1138.
- Johnston, N. A. C., Blake, D. R., Rowland, F. S., Elliott, S., Lackner, K. S., Ziock, H. J., Dubey, M. K., et al. (2003). Chemical transport modeling of potential atmospheric CO₂ sinks. *Energy Conversion and Management*, 44, 681-689.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
- Kindle, K. L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*, 87(February), 1228-1232.
- Kinoshita, T., Fukuzawa, H., Shimada, T., Saito, T., & Matsuda, Y. (1992). Primary Structure and Expression of a Gamete Lytic Enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*: Similarity of Functional Domains to Matrix Metalloproteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 4693-4697.
- Krogh, a, Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3), 567-80.
- Lang, T., & Jahn, R. (2008). Core proteins of the secretory machinery. *Handbook of experimental pharmacology*, (184), 107-27.
- Larkum, A. (2010). Limitations and prospects of natural photosynthesis for bioenergy production. *Current opinion in biotechnology*, 21(3), 271-276.
- Lee, S. Y., Hong, S. H., Lee, S. H., & Park, S. J. (2004). Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis. *Macromolecular Bioscience*, 4, 157-164.
- Liu, X., Brune, D., Vermaas, W., & Curtiss, R. (2010). Production and secretion of fatty acids in genetically engineered cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6803(19), 2-7.
- Lumbreras, V., Stevens, D. R., & Purton, S. (1998). Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Science*, 14(February), 441-447.
- Magneschi, L. (2008). *Chlamydomonas* RNA and DNA extraction. Retrieved June 11, 2011, from <http://www.plantlab.sssup.it/chlamydomonas-protocols>
- Matsuo, T., Okamoto, K., Onai, K., Niwa, Y., & Shimogawara, K. (2008). A systematic forward genetic analysis identified components of the *Chlamydomonas* circadian system. *Genes & Development*, 22(7), 918-930.
- Mayfield, S. P., & Kindle, K. L. (1990). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker, 87(March), 2087-2091.
- McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, J., Paz, K., Paumet, F., Söllner, T. H., et al. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*, 407, 153-159.

- McNew, James A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Söllner, T. H., et al. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*, *407*, 153-159.
- Mcnew, J. A., Weber, T., Parlati, F., Johnston, R. J., Melia, T. J., Söllner, T. H., & Rothman, J. E. (2000). Close Is Not Enough: SNARE-dependent Membrane Fusion Requires an Active Mechanism that Transduces Force to Membrane Anchors. *The Journal of cell biology*, *150*(1), 105-117.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., et al. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, *318*(5848), 245-50.
- Mistry, J., Bateman, A., & Finn, R. D. (2007). Predicting active site residue annotations in the Pfam database. *BMC Bioinformatics*, *14*, 1-14.
- Misura, K., Scheller, R., & Weis, W. (2001). Self-association of the H3 region of syntaxin 1A. Implications for intermediates in SNARE complex assembly. *Journal of Biological Chemistry*, *276*, 13273-82.
- Moheimani, N. R. (2005). *The Culture of Coccolithophorid Algae for Carbon*. Murdoch University.
- Murphy, D. J. (2004). The roles of lipid bodies and lipid-body proteins in the assembly and trafficking of lipid bodies in plant cells. (p. 8). *16th International Plant Lipid Symposium, Budapest*.
- Nel, W. P., & Cooper, C. J. (2009). Implications of fossil fuel constraints on economic growth and global warming. *Energy Policy*, *37*, 166-180.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (1993). *Lehninger - Principles of Biochemistry*. (4th, Ed.)
- Nichols, H. W., & Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *Journal of Phycology*, *1*(1), 34-38.
- Nicholson, K. L., Munson, M., Miller, R. B., Filip, T. J., Fairman, R., & Hughson, F. M. (1998). Regulation of SNARE complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p. *Nature structural biology*, *5*(9), 793-802.
- Novick, P., Field, C., & Schekman, R. (1980). Identification of 23 Complementation Groups Required for Post-translational Events in the Yeast Secretory Pathway. *Cell*, *21*(August), 205-215.
- Oyler, G. A., Higgins, G. A., Hart, R. A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F. E., & Wilson, M. C. (1989). The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations.pdf. *The Journal of Cell Biology*, *109*, 3039-3052.
- Pate, R. (2009). *Techno-Economics, Siting, and Resource Use Challenges for Onshore Algal Biofuel Production*. Energy. Maribo, Denmark.
- Patton, J. S., & Burris, J. E. (1983). Lipid synthesis and extrusion by freshly isolated zooxanthellae (symbiotic algae). *Marine Biology*, *75*, 131-136.
- Pelham, H. (1999). SNAREs and the Secretory Pathway—Lessons from Yeast. *Experimental Cell Research*, *247*(1), 1-8.
- Pons, L., Battaglia-Hsu, S.-F., Orozco-Barrios, C. E., Ortiou, S., Chery, C., Alberto, J.-M., Arango-Rodriguez, M. L., et al. (2009). Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. *PloS one*, *4*(7), e6325.
- Prekeris, R., Yang, B., Oorschot, V., Klumperman, J., & Scheller, R. H. (1999). Differential roles of syntaxin 7 and syntaxin 8 in endosomal trafficking. *Molecular biology of the cell*, *10*(11), 3891-908.

- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Darzins, A., & Posewitz, M. C. (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic cell*, 9(4), 486-501.
- Ravichandran, V., Chawla, A., & Roche, P. A. (1996). Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 13300–13303.
- Raymer, P. L., & Dyne, D. L. V. (1992). *Biodiesel production potential from industrial rapeseed in the Southeastern U.S.* (p. 20). Muscle Shoals, AL.
- Rittmann, B. E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and bioengineering*, 100(2), 203-12. doi:10.1002/bit.21875
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2008). Microalgae for Oil : Strain Selection , Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, xxx(xxx), 1-13.
- Roessler, P. G., Chen, Y., Liu, B., & Dodge, C. N. (2008). Secretion Of Fatty Acids By Photosynthetic Microorganisms. *United States Patent Application 20090298143*.
- Rooijen, C. J. H. V., & Moloney, M. M. (1995). Plant Seed Oil-bodies as Carriers for Foreign Proteins. *Nature Biotechnology*, 13, 72-77.
- Rooijen, C. J. H. V., Moloney, M. M., & N, C. T. N. (1993). Structural Requirements of Oleosin Domains for Subcellular Targeting to the Oil Body. *Engineering*, (1 995), 1353-1361.
- Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Wilkinson, L., & Betenbaugh, M. J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 430-436.
- Rossi, V., Banfield, D. K., Vacca, M., Dietrich, L. E., Ungermann, C. D'Esposito, M., Galli, T., & Filippini, F. (2004). Longins and their longin domains: regulated SNAREs and multifunctional SNARE regulators. *Trends in biochemical sciences*, 29, 682-688.
- Rossi, Valeria, Picco, R., Vacca, M., D'Esposito, M., D'Urso, M., Galli, T., & Filippini, F. (2004). VAMP subfamilies identified by specific R-SNARE motifs. 2004, *Biology of the cell* (96), 251–256.
- Royal Society, T. (2008). *Sustainable biofuels: prospects and challenges*. Policy (p. 90). London.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor.
- Sanderfoot, a a, Assaad, F. F., & Raikhel, N. V. (2000). The Arabidopsis genome. An abundance of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors. *Plant physiology*, 124(4), 1558-69.
- Sanderfoot, a a, Kovaleva, V., Bassham, D. C., & Raikhel, N. V. (2001). Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/prevacuolar system of the Arabidopsis cell. *Molecular biology of the cell*, 12(12), 3733-43.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (1998). *A Look Back at the U . S . Department of Energy' s Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae*. Renewable Energy (p. 328). Golden, Colorado - U.S.
- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., & Usuda, H. (1998). High-Efficiency Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation. *Genetics*, 148, 1821-1828.

- Siloto, R. M. P., Findlay, K., Lopez-villalobos, A., Yeung, E. C., Nykiforuk, C. L., & Moloney, M. M. (2006). The Accumulation of Oleosins Determines the Size of Seed Oilbodies in Arabidopsis. *Chemical Analysis*, 18(August), 1961-1974.
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., & Krogh, a. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 6, 175-82.
- Spolaore, P., Joannis-cassan, C., Duran, E., Isambert, A., Génie, L. D., & Paris, E. C. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Stanke, M., Diekhans, M., Baertsch, R., & Haussler, D. (2008). Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(5), 637-44.
- Steggmaier, M., Yang, B., Yoo, J., Huang, B., Shen, M., Yu, S., Luo, Y., et al. (1998). Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 34171–34179.
- Stephens, E., Ross, I. L., King, Z., Mussgnug, J. H., Kruse, O., Posten, C., Borowitzka, M. , et al. (2010). An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nature biotechnology*, 28(2), 126-8.
- Stevens, D.R., Rochaix, J. D., & Purton, S. (1996). The bacterial phleomycin resistance gene ble as a dominant selectable marker in Chlamydomonas. *Molecular Genomics and Genetics*, 251, 23-30.
- Sueoka, N. (1960). Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(1), 83-91.
- Sugita, S. (2008). Mechanisms of exocytosis. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 192(2), 185-93.
- Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., & Rothman, J. E. (1993). A protein assembly-dissassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 75, 409-418.
- Takagi, M., Karseno, & Yoshida, T. (2006). Effect of Salt Concentration on Intracellular Accumulation of Lipids and Triacylglyceride in Marine Microalgae Dunaliella Cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(3), 223-226.
- Thomas, W. H., Tornabene, T. G., & Weissman, J. (1984). *Screening for Lipid Yielding Microalgae: Activities for 1983 (Final Subcontract Report)*. Contract (p. 57). Golden, Colorado - U.S.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Ting, G., Balsamo, R., Ratnayake, C., & Huang, A. (1997). Oleosin of plant seed oil bodies is correctly target to the lipid bodies of transformed yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 3699-3706.
- Tochio, H., Tsui, M. M., Banfield, D. K., & Zhang, M. (2001). An autoinhibitory mechanism for nonsyntaxin SNARE proteins revealed by the structure of Ykt6p. *Science*, 293, 698-702.
- Tornabene, T. G., Holzer, G., Lien, S., & Burris, N. (1983). Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 5(6), 435-440.
- Trimble, W S, Cowan, D. M., & Scheller, R. H. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), 4538-42.

- Trimble, W.S. (1993). Analysis of the structure and expression of the VAMP family of synaptic vesicle proteins. *Journal of Physiology-Paris*, 87(2), 107-115.
- Tzen, J. T. C., Chuang, R. L. C., Chen, J. C. F., & Wu, L. S. H. (1998). Coexistence of Both Oleosin Isoforms on the Surface of Seed Oil Bodies and Their Individual Stabilization to the Organelles. *Journal of Biochemistry*, 123, 318-323.
- UNDP, U. N. D. P. (2007). *Human Development Report 2007/2008*. New York, NY.
- Uemura, T., Sato, M. H., & Takeyasu, K. (2005). The longin domain regulates subcellular targeting of VAMP7 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 579(13), 2842-6.
- Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R. L., Nakano, A., Takeyasu, K., & Sato, M. H. (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell structure and function*, 29(2), 49-65.
- Ungar, D., & Hughson, F. M. (2003). SNARE protein structure and function. *Annual review of cell and developmental biology*, 19, 493-517.
- Uniprot Consortium, T. (2011). Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), D214-9.
- United Nation. (1992). United Nations Framework Convention on Climate Change. Retrieved February 2010, from <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/conveng.pdf>
- Vaswani, S. (2009). *Process Economics Program - Biodiesel from Algae. Review Literature And Arts Of The Americas* (p. 62). California.
- Villalobos, A., Ness, J. E., Gustafsson, C., Minshull, J., & Govindarajan, S. (2006). Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC bioinformatics*, 7, 285.
- Wanner, G., Formanek, H., & Theimer, R. R. (1981). The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells. Ultrastructural evidence. *Planta*, 151, 109-123.
- Waters, M. G., & Hughson, F. M. (2000). Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 1(8), 588-97.
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. a, Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T. H., et al. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92(6), 759-72.
- Weimbs, T., Low, S. H., Chapin, S. J., Mostov, K. E., Bucher, P., & Hofmann, K. (1997). A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3046-51.
- Weisheit, A. E.-stahlberg W., Ruecker, O., & Heitzer, M. (2009). Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 229, 873-883.
- Wendler, F., & Tooze, S. (2001). Syntaxin 6: The Promiscuous Behaviour of a SNARE Protein. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(9), 606-611.
- Williams, A. L., Bielopolski, N., Meroz, D., Lam, A. D., Passmore, D. R., Ben-tal, N., Ernst, S. A., et al. (2011). Structural and Functional Analysis of Tomosyn Identifies Domains Important in Exocytotic Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(16), 14542-14553.
- Willson, B. (2008). *Solix-Low Cost Photobioreactors for Algal Biofuel Production & Carbon Capture*.
- Wolf, F. R., Nonomura, A. M., & Bassham, J. A. (2004). Growth and Branches hydrocarbon Production in a Strain of *Botryococcus Braunii* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 21, 388-396.

- Wu, L. S. H., Wang, L.-du, Chen, P.-wen, Chen, L.-jwu, & Tzen, J. T. C. (1998). Genomic Cloning of 18 kDa Oleosin and Detection of Triacylglycerols and Oleosin Isoforms in Maturing Rice and Postgerminative Seedlings, *123*, 386-391.
- Yamamoto, Y., Mochida, S., Kurooka, T., & Sakisaka, T. (2009). Reciprocal Intramolecular Interactions of Tomosyn Control Its Inhibitory Activity on SNARE Complex Formation. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(18), 12480 -12490.
- Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, *41*(11), 973-81.
- Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, *18*, 821-829.
- Zhukova, N. V., & Aizdaicher, N. A. (1995). Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Science*, *39*(2), 351-356.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Desenvolvimento de estratégia para extrusão de lipídios por engenharia genética, subsequente à análise genética da via exocítica da microalga *Neochloris oleoabundans*":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

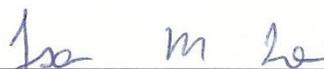
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. 2011/03, Instituição: UNICAMP - IB.

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. _____, Instituição:

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



 Aluno: Isabella Macedo Toni



 Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
 Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
 Instituto de Biologia - UNICAMP