



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

Desenvolvimento de sistemas de regulação da expressão gênica em leveduras baseados em optogenética e no uso de serina integrases

Ana Laura Alfonso Pérez

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

Brasília, 2023

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

Desenvolvimento de sistemas de regulação da expressão gênica em leveduras baseados em optogenética e no uso de serina integrases

Ana Laura Alfonso Pérez

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Coorientadora: Dr^a Viviane Castelo Branco Reis

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular.

Brasília, 2023

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

Banca Examinadora

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

Professor Dr. Marcelo de Macedo Brígido
Universidade de Brasília
Membro titular

Professora Dra. Milca Rachel da Costa Ribeiro Lins
Universidade Federal do ABC
Membro titular

Dr. João Ricardo M. de Almeida
Embrapa Agroenergia
Membro titular

Professora Dra. Ildinete Silva-Pereira
Universidade de Brasília
Membro suplente

*Metas são como flechas. Quanto mais alto você mira,
mais longe você alcança.*

Fernando Angelo

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não foi fácil, mas eu sempre gosto de falar que no final “vai dar tudo certo”. Foram anos difíceis. Veio uma pandemia, ficamos em isolamento. Mas a pesquisa não parou. Hoje, eu quero deixar meu maior OBRIGADO a todos os que fizeram este trabalho virar uma realidade. Que possamos continuar fazendo ciência de qualidade!

À minha família pelo apoio durante todo este tempo, por me ensinarem o valor dos meus sonhos. À minha mãe Mary Tere e ao meu pai Mauro por ser meu exemplo de vida, minha meta. Por me ensinarem a ser independente, a nunca desistir e a acreditar que no final, vai dar tudo certo. Por serem os responsáveis de ser quem sou. Por me ensinar que cada desafio me faz crescer e ser melhor pessoa. Obrigada por tudo!

Ao meu esposo Alejandro, por me ajudar a cumprir este sonho. Em 2016, decidimos começar esta nova etapa juntos e tem sido meu apoio sempre. Porque não importa se é difícil, estamos juntos. À Adri (michi), pelas alegrias, minha companheira de casa, sempre feliz e carinhosa.

À Belkys, pelo carinho e pelos conselhos sempre bons, pelo amor incondicional.

Especialmente ao meu filho “Chuli” (Alejandro), meu maior motivo para fazer cada coisa nesta vida. Porque com só olhar para ele eu sei que tudo vale a pena.

Aos meus irmãos & company: a Alejandra, pela amizade, pelo amor, por ser tudo que preciso e estar sempre para mim. Por sem falar, saber o que preciso. Ao Armando pelo carinho. Ao meu Bolis, Fabián, alegria das nossas vidas (revoltoso como su primo).

Ao meu irmão Dani por estar sempre para mim. A Sabrina, por cuidar dele e por fazer de meus finais de semana mais divertidos.

Ao Mauri, pelo carinho, e a pesar da distância, me deu um dos melhores presentes da minha vida: as minhas sobrinhas, e agora meu sobrinho Sebas!

Ao Amauri pela disposição sempre a me ajudar, por ser a família que precisamos.

Ao professor Fernando Araripe, por me permitir entrar no laboratório. Por acreditar em mim. Por todos os ensinamentos e pela preocupação sempre. Por estar sempre para mim, até para ir no dentista. Agradeço muito a oportunidade de estar hoje no Brasil fazendo pesquisa de verdade num laboratório que foi a minha família.

Aos professores que me ajudaram em todo momento. À Vivis, pelo apoio e por colocar este projeto nas minhas mãos, e me ensinar a escutar as palavras mais baixas.

À Janice, pela ajuda e pela preocupação sempre, pelo carinho e amor.

À professora Lídia, pelos conselhos sempre úteis e pelo carinho.

Aos meus amigos no Lab 2 “Rainha” por compartilhar tantos momentos de alegrias e trabalho, tantas horas na copa falando de exatamente qualquer coisa: Roberta, Igor, Jacob, Flávia, Henrique, Gabriela, Myrna, Tiago, Carol, Chris. À Agatha, pela ajuda durante o trabalho e pelas conversas sempre engraçadas.

À Lu, pela ajuda em (nem sei por onde começar na verdade) TUDO, na correção da tese, pelas dúvidas a qualquer hora. Por ser uma amiga sempre presente. Hoje mais que amiga, comadre. Por estar sempre olhando com os olhos do coração. Amigas como você não se encontram com facilidade.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Sintética. Especialmente agradeço à professora Cíntia, pela ajuda durante todo o trabalho, pelas palavras de ânimo e pelas conversas descontraídas. Ao Matheus meu companheiro até altas horas, pela ajuda em todos os experimentos e pelas milhões de caronas.

Às minhas amigas “mijischurritis”: Gaby e Wendy por estar sempre para mim. Por tantos anos juntas, por tantas horas divertidas. Amigas como vocês fazem falta no Brasil.

Ao pessoal da Fiocruz-Brasília, por me fazerem sentir em família desde o primeiro dia.

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

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xviii
RESUMEN	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biologia sintética e sistemas de controle da regulação gênica	2
1.2 Leveduras como plataforma de expressão	3
1.2.1 <i>Komagataella phaffii</i>	3
1.2.1.1 Controle do promotor do gene <i>AOX1</i> (P_{AOX1}) na presença de metanol	4
1.2.1.2 Fatores de transcrição na regulação do P_{AOX1} : Mit1	5
1.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.3 Sistemas de controle baseados na luz: optogenética.....	8
1.3.1 Componentes de um circuito optogenético responsivo à luz vermelha.....	11
1.3.1.1 Ficocianobilina (PCB)	11
1.3.1.2 Proteínas que respondem à luz vermelha: PHYB e PIF3	12
1.4 Sistemas de controle baseados no uso de recombinases sítio-específicas: integrases ..	15
2. OBJETIVO	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. ESTRATÉGIA.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Material.....	24
4.1.1 Células	24

4.1.2	Meios de cultura para bactérias e leveduras	24
4.1.3	Soluções.....	25
4.1.4	Kits.....	28
4.1.5	Oligonucleotídeos (<i>primers</i>)	29
4.1.6	Marcadores de massa molecular para DNA	31
4.1.7	Vetores.....	31
4.2	Métodos	32
4.2.1	Células e meios de cultura	32
4.2.2	Amplificação por PCR (<i>primers</i>).....	33
4.2.3	Preparação de células bacterianas competentes.....	33
4.2.4	Manipulação do DNA.....	33
4.2.5	Construção de plasmídeos	34
4.2.6	Sequenciamento de plasmídeos	35
4.2.7	Preparação de DNA plasmidial.....	35
4.2.8	Preparação de células bacterianas competentes por choque térmico.....	36
4.2.9	Transformação de <i>K. phaffii</i> por eletroporação	36
4.2.10	Transformação de <i>S. cerevisiae</i> por eletroporação	37
4.2.11	Transformação de leveduras pelo protocolo One-Step.....	37
4.2.12	Extração de DNA total de leveduras.....	38
4.2.13	Extração de DNA genômico de leveduras para PCR	38
4.2.14	Extração de RNA e tratamento com DNase I.....	38
4.2.15	RT-PCR do RNA de levedura	38
4.2.16	Indução por galactose	38
4.2.17	Indução da expressão e detecção de EGFP em meio líquido	39
4.2.17.1	Indução por metanol.....	39
4.2.17.2	Indução por luz vermelha (660 nm)	39

4.2.18	Análise de fluorescência por citometria de fluxo	39
4.2.19	Análise por microscopia de fluorescência	40
4.2.20	Indução da expressão e detecção de ymUKG1 e Venus em meio sólido	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1	Capítulo 1: Construção de um sistema optogenético na levedura <i>Komagataella phaffii</i> 42	
5.1.1	Construção dos vetores de expressão.....	42
5.1.1.1	Construção do vetor pPICK3.....	42
5.1.1.2	Construção do vetor pPICK2-PHYBNT-MIT1	44
5.1.1.3	Construção do vetor pPICK3-VP16-PIF3	47
5.1.1.4	Construção do vetor pPICOPTORED	50
5.1.2	Construção do vetor para a expressão de PCB	53
5.1.3	Construção e confirmação das diferentes linhagens	55
5.1.4	Análise da expressão: extração de RNA, tratamento com DNase I e RT-PCR.....	62
5.1.5	Avaliação da atividade do gene repórter <i>EGFP</i>	63
5.1.5.1	Indução de <i>EGFP</i> na presença de metanol	64
5.1.5.1.1	Fluorescência de <i>EGFP</i> avaliada por citometria de fluxo	64
5.1.5.1.2	Fluorescência de <i>EGFP</i> avaliada por microscopia de fluorescência.....	64
5.1.5.2	Indução de <i>EGFP</i> na presença de luz vermelha.....	66
5.1.5.2.1	Testes iniciais da indução com luz vermelha	66
5.1.5.2.2	Indução na presença da PCB exógena.....	68
5.1.5.2.3	Indução na presença de PCB exógeno, em diferentes tempos de indução.....	70
5.1.5.2.4	Indução da linhagem Xhis23 pPICOPTORED nas diferentes condições	72
5.1.5.2.5	Indução de todas as linhagens nas diferentes condições	73
5.2	Capítulo 2: Construção de um sistema optogenético na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78
5.2.1	Construção do vetor contendo o gene repórter	78

5.2.2	Indução com galactose.....	80
5.2.3	Construção e confirmação da linhagem contendo os componentes do sistema optogenético em <i>S. cerevisiae</i>	81
5.2.4	Avaliação da atividade do gene repórter <i>Venus</i> na presença de luz vermelha (660 nm) 82	
5.2.4.1	Experimento 1.....	82
5.2.4.2	Experimento 2.....	84
5.3	Capítulo 3: Combinação do sistema de indução optogenético em <i>S. cerevisiae</i> com o sistema contendo integrases.....	87
5.3.1	Construção de um sistema contendo os componentes para a expressão e atividade da integrase 13.....	87
5.3.1.1	Construção do vetor centromérico contendo a integrase 13	89
5.3.1.2	Construção da linhagem contendo a Int 13 e o gene repórter <i>ymUkG1</i> com os sítios de reconhecimento para a integrase 13.....	92
5.3.1.3	Análise funcional da Int 13: análise em placas de meio mínimo e citometria de fluxo.....	93
5.3.2	Combinação do sistema optogenético com o sistema contendo as integrases 4 e 13 ...	98
5.3.2.1	Construção das linhagens.....	99
5.3.2.2	Avaliação do funcionamento do sistema integrases-optogenética	109
5.3.2.2.1	Experimento em placas para avaliar a fluorescência da <i>Venus</i>	109
5.3.2.2.2	Análise da orientação do gene repórter <i>Venus</i>	111
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	116
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
	ANEXOS	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sítios de ligação de Mit1, Prm1, e Mxr1 no P_{AOXI}	6
Figura 2. Modelo regulatório para a ativação do P_{AOXI} envolvendo os fatores de transcrição Mxr1, Prm1 e Mit1	6
Figura 3. Principais sistemas de indução optogenética usados em leveduras	10
Figura 4. Biossíntese do fitocromo em cianobactérias e plantas	12
Figura 5. Formação do complexo PHYB-PCB e do complexo PHYB-PIF3 na presença de luz vermelha	14
Figura 6. Resultados da recombinação sítio-específica: inserção, excisão ou inversão do DNA	16
Figura 7. Exemplos de rearranjos de DNA mediados por integrases e RDF	18
Figura 8. Estratégia de trabalho para a construção de um sistema optogenético ativado por luz vermelha	22
Figura 9. Estratégia de trabalho para a construção de um sistema optogenético induzível por luz vermelha e o sistema de regulação com a integrases 4 e 13 em <i>S. cerevisiae</i>	23
Figura 10. Estratégia para a construção do vetor pPICK3	42
Figura 11. Amplificação de P_{TEF1} e $TEF1$ tt do genoma de X-33.	43
Figura 12. Análise de restrição do vetor pPICK3.....	44
Figura 13. Estratégia para a montagem do vetor pPICK2-PhyBNT-ZFMIT1	45
Figura 14. Amplificação do ZFMIT1 e do PHYBNT do genoma de X-33 e do vetor obtido por doação, respectivamente	46
Figura 15. Análise da clonagem, perfil de restrição do vetor pPICK2-PHYBNT-ZFMIT1 ...	47
Figura 16. Estratégia para a montagem do vetor pPICK3-VP16-PIF3	48
Figura 17. Amplificação das sequências VP16 e PIF3 do vetor pPIC9 Δ BGAL4:VP16 e do vetor pGAD-PIF3, respectivamente	49
Figura 18. Análise da clonagem, perfil de restrição do vetor pPICK3-VP16-PIF3	49
Figura 19. Estratégia para a construção do vetor pPICOPTORED	51
Figura 20. Mapa contendo a região amplificada a partir do vetor pPICK2-PHYBNT-ZFMIT1	51
Figura 21. Construção do vetor pPICOPTORED.....	52
Figura 22. Confirmação da construção do vetor pPICOPTORED	53
Figura 23. Cassete de expressão para a síntese da PCB em <i>K. phaffii</i>	54
Figura 24. Análise da clonagem, perfil de restrição do vetor pGAPZB-PCB.....	54

Figura 25. Confirmação da linhagem Xhis23 pPICOPTORED	57
Figura 26. Confirmação das linhagens Xhis23 pPICK2 pGAPZB e Xhis23 pPICK2 pGAPZB-PCB.....	58
Figura 27. Confirmação da linhagem Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-PCB	59
Figura 28. Confirmação da linhagem Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB	60
Figura 29. Confirmação da presença do <i>EGFP</i> nas diferentes linhagens	60
Figura 30. Confirmação das linhagens Xhis23 pPICK2-PHYBNT-MIT1 e Xhis23 pPICK3-VP16-PIF3	61
Figura 31. Extração de RNA e tratamento do RNA com DNase I.....	62
Figura 32. Análise da expressão dos genes <i>PHYBNT</i> , <i>PIF3</i> e <i>mHyl</i> nas linhagens Xhis23 (1), Xhis23 pPICOPTORED (2) e Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-PCB (3,4).....	63
Figura 33. Expressão intracelular de EGFP nas diferentes linhagens	64
Figura 34. Expressão intracelular de EGFP nas diferentes linhagens	65
Figura 35. Expressão intracelular de EGFP após 24 h de indução contínua.....	67
Figura 36. Expressão intracelular de EGFP após 24 h de indução contínua.....	69
Figura 37. Expressão intracelular de EGFP após 48 h de indução contínua.....	70
Figura 38. Indução na presença da PCB exógena	71
Figura 39. Avaliação da linhagem Xhis23 pPICOPTORED em todas as condições	73
Figura 40. Indução de todas as linhagens nas diferentes condições	75
Figura 41. Construção do vetor pYVenus	79
Figura 42. Avaliação da fluorescência após 48 h de indução com galactose.....	81
Figura 44. Confirmação das linhagens	82
Figura 45. Expressão intracelular da proteína Venus após 48 h no escuro e 96 h de indução na presença de luz vermelha.....	84
Figura 46. Expressão intracelular da Venus após 24 h no escuro e 48 h de indução na presença de luz vermelha.....	85
Figura 47. Sistema de dos plasmídeos para testar a funcionalidade da integrase 13	88
Figura 48. Cassete de expressão do gene repórter <i>ymUkG1</i>	89
Figura 49. Construção do vetor YCINT13	90
Figura 50. Confirmação da construção do vetor centromérico contendo o cassete de expressão da integrase 13.....	91
Figura 51. Mapa físico do vetor YCINT13	92
Figura 52. Confirmação da linhagem RE1006 UKG13 YCINT13	93

Figura 53. Funcionalidade da integrase 13 em placas de meio mínimo.....	94
Figura 54. Funcionalidade da integrase 13 analisada por citometria de fluxo	96
Figura 55. Funcionalidade da integrase 13 analisada por citometria de fluxo em amostras selecionadas	97
Figura 56. Estratégia para a construção de um sistema de expressão regulado por optogenética e por integrases	99
Figura 57. Cassete de expressão do gene repórter <i>Venus</i>	100
Figura 58. Digestão do vetor HO-poly-KanMX4-HO.....	100
Figura 59. Digestão do vetor pEZclone-NRS-Amp-Blunt-HC-Venus-INT4_13.....	101
Figura 60. Construção do vetor HO-13-4-Venus-4-13.....	102
Figura 61. Confirmação das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 e RE1006 HO-poly- KanMX4-HO	103
Figura 62. Confirmação das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 e RE1006 HO- poly-KanMX4-HO pYINT4	104
Figura 63. Confirmação das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT13, RE1006 HO- poly-KanMX4-HO pYINT13 e RE1003 HO-13-4-Venus-4-13 pYES2.....	105
Figura 64. Confirmação das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT, RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT4 PHYBNT, RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT13 PHYBNT e RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT13 PHYBNT	106
Figura 65. Confirmação das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT PIF3, RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT4 PHYBNT PIF3, RE1006 HO-13-4- Venus-4-13 pYINT13 PHYBNT PIF3 e RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT13 PHYBNT PIF3	106
Figura 66. Construção do vetor YCVenus.....	107
Figura 67. Construção do vetor HO-Venus (controle positivo)	108
Figura 68. Expressão intracelular da proteína Venus após 48 h no escuro e 96 h de indução na presença de luz vermelha.....	110
Figura 69. Análise da orientação do gene repórter Venus nas diferentes condições.....	111
Figura 70. Análise da orientação do gene repórter nos controles do experimento.....	112
Figura 71. Análise da orientação do gene repórter na indução com luz vermelha.....	113
Figura 72. Análise da orientação do gene repórter nas diferentes condições de indução na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT PIF3 (c12).....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	29
Tabela 2. Vetores base utilizados	31
Tabela 3. Linhagens construídas neste trabalho (Parte I).....	55
Tabela 4. Linhagens construídas neste trabalho (Parte II).....	56
Tabela 5. Linhagens construídas	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α -MF	<i>alpha matting factor</i>
ATP	Adenosina Trisfosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Da	Dalton
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
<i>g</i>	força gravitacional
g	grama
G418	geneticina
GRAS	<i>Generally Regarded As Safe</i> (Geralmente reconhecido como seguro)
h	hora
Int	Integrase
kb	quilobase
LB	Luria-Bertani
MD	<i>Minimal Dextrose</i>
MTS	<i>Mitochondrial Targeting Signal</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
OD ₆₀₀	densidade celular óptica medida a 600 nm
pb	par de bases
PCB	Ficocianobilina

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PHYB	Fitocromo B
PIF3	Fator de Interação do Fitocromo 3
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase A	Ribonuclease A
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
V	Volts
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

RESUMO

A levedura *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) tem sido utilizada como uma plataforma de produção de proteínas heterólogas há mais de 20 anos por apresentar níveis elevados de expressão gênica pelo uso do promotor do gene *AOXI* (P_{AOXI}) induzido por metanol, dentre outras vantagens. Entretanto, o metanol, indutor químico, é tóxico e inflamável. Nos últimos anos, a optogenética tornou-se uma ferramenta muito utilizada para a regulação de processos biológicos, como: expressão gênica, localização de proteínas, transdução de sinais e interações proteína-proteína. Baseia-se na utilização da luz, um indutor físico, para o desenvolvimento de sistemas reguláveis. A aplicação de um circuito optogenético em *K. phaffii* para a regulação da expressão gênica permite utilizar um sistema induzido que não afeta o metabolismo da levedura e nem sofre interferência do metabolismo celular. No presente projeto, buscamos pela primeira vez o desenvolvimento de um circuito optogenético na levedura *Komagataella phaffii* responsivo a luz vermelha utilizando o fator de transcrição Mit1, presente na regulação do promotor do *AOXI* como um dos componentes do sistema. Esse sistema foi baseado na interação responsiva à luz vermelha de proteínas de fusão que se ligam ao promotor P_{AOXI} . O sistema optogenético foi construído com sucesso requerendo, todavia, ajustes metodológicos para sua implementação. Outro sistema de regulação estudado neste trabalho foi baseado no uso de integrases, uma classe de proteínas virais que mediam a integração e a excisão dos fagos no genoma. Recentemente, foram caracterizadas 11 integrases ortogonais e não há relatos de sua utilização na construção de circuitos na levedura *Saccharomyces cerevisiae* até o momento. Esta levedura é reconhecida como modelo para o estudo da biologia dos organismos eucariotos, sendo um dos microrganismos mais estudados e caracterizados. Após análises de ortogonalidade, foi feita a análise funcional da integrase 13, junto com a integrase 4 sob o controle do promotor responsivo a galactose. Estas integrases apresentaram a capacidade de ativar o dispositivo genético abrindo caminho para sua utilização como novas ferramentas moleculares para o desenvolvimento e construção de circuitos sintéticos. Por último, foi combinado o sistema de regulação com as integrases com o sistema optogenético com o objetivo de ter um sistema duplamente regulado. O sistema final obtido apresentou-se funcional necessitando ainda ajustes nas condições de exposição à luz vermelha/escuridão.

ABSTRACT

The yeast *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) has been used as a platform for heterologous protein production for over 20 years because it has high levels of gene expression using the methanol-induced *AOX1* (P_{AOX1}) gene promoter, among other advantages. However, methanol, the chemical inducer, is a flammable solution. In recent years, optogenetics has become a widely used tool for the regulation of biological processes such as gene expression, protein localization, signal transduction and protein-protein interactions. Optogenetics is based on the use of light, a physical inducer, to construct regulable systems. The application of an optogenetic circuit in *K. phaffii* for the regulation of gene expression allows the use of an induced system that neither affects the yeast metabolism nor suffers interference from cellular metabolism. In the present project, we seek for the first time the development of an optogenetic circuit in the yeast *Komagataella phaffii* responsive to red light using the Mit1 transcription factor, present in the regulation of the *AOX1* promoter as one of the components of the system. The optogenetic system obtained is still under adjustment, but this first approach brings us closer to the study of optogenetics in our research group. Another regulatory system is based on the use of integrases, a class of viral proteins that mediate phage integration and excision into the genome during the lysogenic and lytic life cycle. Recently, 11 orthologous integrases have been characterized and there are no reports of their use in circuit construction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to date. This yeast is recognized as a model for studying the biology of eukaryotic organisms, and is one of the most studied and characterized microorganisms. After orthogonality analyses, functional analysis of integrase 13 was performed, along with integrase 4 under the control of the galactose responsive promoter. These integrases showed the ability to activate the genetic device paving the way for their use as new molecular tools for the development and construction of synthetic circuits. Finally, the regulation system with the integrases was combined with the optogenetic system in order to have a dual regulated system. The final system obtained was functional and still requires adjustments in the red light/dark light exposure conditions.

RESUMEN

La levadura *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) ha sido utilizada como plataforma para la producción de proteínas heterólogas durante más de 20 años debido, entre otras ventajas, por sus altos niveles de expresión génica mediante el uso del promotor del gen *AOXI* (P_{AOXI}), inducido por metanol. Sin embargo, el metanol, un inductor químico, es tóxico e inflamable. En los últimos años, la optogenética se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada para la regulación de procesos biológicos, como la expresión génica, la localización de proteínas, la transducción de señales y las interacciones proteína-proteína. Se basa en el uso de la luz, un inductor físico, para desarrollar sistemas regulables. La aplicación de un circuito optogenético en *K. phaffii* para la regulación de la expresión génica permite utilizar un sistema inducido que no afecta al metabolismo de la levadura ni sufre interferencias del metabolismo celular. En el presente proyecto, buscamos por primera vez el desarrollo de un circuito optogenético en la levadura *Komagataella phaffii* que responde a la luz roja e se basa en el factor de transcripción Mit1 presente en el mecanismo de regulación del promotor *AOXI*. Este sistema se basaba en la interacción sensible a la luz de proteínas de fusión que se unen al promotor P_{AOXI} . El sistema optogenético se construyó con éxito, pero requiere ajustes metodológicos para su aplicación. Otro sistema de regulación estudiado en este trabajo se basó en el uso de integrasas, una clase de proteínas virales que median la integración y escisión del fago en el genoma. Recientemente, se han caracterizado 11 integrasas ortólogas y, hasta la fecha, no existen informes sobre su uso en la construcción de circuitos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura es reconocida como modelo para el estudio de la biología de los organismos eucariotas, siendo uno de los microorganismos más estudiados y caracterizados. Se evaluó la integrasa 13, junto con la integrasa 4 bajo el control del promotor sensible a galactosa. Estas integrasas mostraron la capacidad de activar el dispositivo genético allanando el camino para su uso como nuevas herramientas moleculares para el desarrollo y construcción de circuitos sintéticos. Por último, el sistema de regulación con integrasas se combinó con el sistema optogenético para disponer de un sistema doblemente regulado. El sistema final obtenido era funcional y aún requiere ajustes en las condiciones de exposición a la luz roja/luz oscura.

1. INTRODUÇÃO

A biologia sintética é definida como a aplicação de um paradigma de engenharia de design de sistemas aos seres vivos visando aumentar a previsibilidade e robustez dos mesmos (Ho and Morsut, 2021). A biologia sintética — área interdisciplinar que engloba ciências biológicas, da computação, biotecnologia, matemática, engenharias, física e química — tem se desenvolvido cada vez mais no sentido de modificar organismos para gerar células que produzam de forma eficiente e com menor desvio metabólico um produto de interesse. A biologia sintética vem contribuir no sentido de ajustar de forma fina o fluxo metabólico.

Dentre as abordagens em biologia sintética podemos citar a engenharia de promotores — uso de promotores sintéticos e híbridos —, e o uso de circuitos genéticos para controle fino e preciso de pontos-chaves de vias metabólicas e até mesmo para a identificação de novas vias metabólicas (Medema et al., 2011). Visando um bom rendimento do produto de interesse, além de expressar os genes que codificam as enzimas da respectiva via, é necessária a regulação do nível de expressão de cada uma para que não haja acúmulo de produtos intermediários da via (Nielsen, 2013).

Um mecanismo de regulação bastante explorado atualmente baseia-se em estudos optogenéticos que começaram na área de neurociência quando a canalrodopsina-2, uma proteína presente em algas, foi utilizada para controlar a transmissão sináptica excitatória ou inibitória de neurônios de mamíferos pela luz (Boyden et al., 2005, Deisseroth et al., 2006). A partir desses primeiros estudos, aumentou o repertório de proteínas sensíveis à luz como, por exemplo, bacteriorrodopsina e halorrodopsina. Enquanto essas proteínas sensíveis às luzes azul e verde, respectivamente, têm servido como base para vários sistemas optogenéticos, estes raramente têm sido utilizados em leveduras (Gautier et al., 2014). Inicialmente, os principais sistemas optogenéticos eram baseados em luz UV, vermelha e azul, mas o uso da luz tem se expandido a outros comprimentos de onda.

A optogenética é uma técnica que usa luz para controlar proteínas e funções celulares. As diferentes vantagens da luz como agente indutor favorecem o uso da optogenética em diferentes sistemas biológicos (Wegner et al., 2022). Atualmente, a optogenética já foi utilizada em vários estudos para controlar a expressão gênica, crescimento, dinâmica cooperativa, e vias metabólicas (Wegner et al., 2022).

Desde o início dos anos 2000, os sistemas optogenéticos responsivos ao vermelho, verde, azul (Nagel et al., 2002, Shimizu-Sato et al., 2002, Boyden et al., 2005, Deisseroth et al., 2006), bem como infravermelho próximo e ultravioleta (UV) (Shimizu-Sato et al., 2002, Crefcoeur et al., 2013, Pathak et al., 2014, Chernov et al., 2017) foram desenvolvidos usando diferentes proteínas que respondem à luz sendo aplicados em vários campos de pesquisa. Especificamente, no presente trabalho abordaremos o desenvolvimento de um sistema optogenético baseado na ativação por luz vermelha, que a diferença de sistemas optogenéticos responsivos a luz de outros comprimentos de onda, apresenta um comprimento de onda diferente para desligar o sistema.

Outro sistema de regulação é baseado no uso de integrases, uma classe de proteínas virais que mediam a integração e a excisão de fagos no genoma bacteriano durante o ciclo de vida lisogênico e lítico (Smith and Thorpe, 2002). As integrases reconhecem dois sítios: *attB* (*Attachment Bacteria* ou sítio de ligação de bactéria) e *attP* (*Attachment Phage* ou sítio de ligação do fago) e, dependendo da orientação dos mesmos, é possível realizar integração, excisão ou inversão da orientação do segmento de DNA (Grindley et al., 2006).

As leveduras *Komagataella phaffii* e *Saccharomyces cerevisiae* são conhecidas por serem organismos modelo para o estudo de sistemas de regulação. Neste trabalho usaremos estes organismos para o estudo de sistemas optogenéticos responsivos a luz vermelha e sistemas de regulação baseados na utilização de integrases.

1.1 Biologia sintética e sistemas de controle da regulação gênica

Recentes avanços nas áreas de engenharia metabólica, biologia de sistemas e biologia sintética facilitaram a compreensão de sistemas biológicos como um todo e tornaram possível a construção e regulação de vias metabólicas em diversos organismos (Krivoruchko et al., 2011).

Os sistemas de regulação permitem que os organismos sejam capazes de responder a condições ambientais transientes e podem promover respostas em uma célula de acordo com as condições do biorreator; gerar células terapêuticas que respondam a determinado estímulo relacionado a uma doença no corpo humano e serem usados no desenvolvimento de biosensores para monitoramento de condições ambientais e produção de kits de diagnósticos, dentre outros (Nielsen, 2013).

A montagem de sistemas biológicos capazes de produzir metabólitos como fármacos e biocombustíveis de maneira sustentável é cada vez mais uma exigência do mercado no contexto dos processos biotecnológicos (Ho and Morsut, 2021). Com as ferramentas adequadas de biologia sintética e computacional é possível realizar a regulação fina do metabolismo de um organismo para a produção dos compostos de interesse, a inserção de genes para complementação de uma via metabólica existente e até a construção de novas vias.

Um avanço na área de biologia sintética foi o desenvolvimento de vias de sinalização sintéticas, muitas vezes baseadas em dispositivos de entrada-saída que são controláveis pelo usuário: de ferramentas optogenéticas a receptores sintéticos (Ho and Morsut, 2021).

1.2 Leveduras como plataforma de expressão

A biologia sintética é uma ferramenta para a construção de sistemas e o estudo de leveduras (Tullio, 2022). As leveduras são amplamente usadas e a levedura *Komagataella phaffii* apresenta uma série de vantagens que a tornam uma ótima escolha como plataforma para diferentes aplicações de biologia sintética. Dentre estas, destacam-se a capacidade de realizar montagem de fragmentos de DNA in vivo (Gibson 2009), a produção de metabólitos de alto valor agregado (Dai, Liu et al. 2015, Li and Borodina 2015), assim como de proteínas para fins terapêuticos (Vogl, Hartner et al. 2013), biocombustíveis (Tsai, Kwak et al. 2015), além de diversas aplicações na engenharia metabólica (Salinas, Rojas et al. 2017).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é reconhecida como modelo para o estudo da biologia dos organismos eucariotos, sendo um dos microrganismos mais estudados e caracterizados. É amplamente utilizada para produzir um amplo espectro de produtos de valor agregado, por exemplo ácidos orgânicos (Borodina et al., 2015), ácidos graxos (Yazawa et al., 2009), biocombustíveis avançados (Buijs et al., 2013), farmacêuticos (Paddon et al., 2013, Galanie et al., 2015), biofarmacêuticos (Wang et al., 2017), alcaloides (Li et al., 2018), carotenoides (Verwaal et al., 2007) e sabores (Tippmann et al., 2013)

1.2.1 *Komagataella phaffii*

K. phaffii é uma das leveduras mais utilizadas na atualidade no contexto da biotecnologia industrial. Nas últimas duas décadas, essa levedura tornou-se uma importante alternativa a *E. coli* ou linhas celulares de mamífero para a produção de proteínas recombinantes. Dentre suas principais vantagens destacam-se a habilidade de realizar modificações pós-

tradicionais como clivagem proteolítica, glicosilação e formação de ligações dissulfeto, além da ausência do padrão de hiperglicosilação presente em *S. cerevisiae* (Weinacker et al., 2013). Já foi descrito o uso do sistema CRISPR/cas9 em *K. phaffii* como ferramenta para realizar modificações genéticas específicas: mutação gênica e integração de cassetes de DNA homólogo (Weninger et al., 2016). Esta levedura tem a capacidade de crescer em meio contendo metanol, o que inibe o crescimento de contaminantes. É um sistema barato para o estabelecimento e manutenção de escala industrial. *K. phaffii* tem rápido crescimento celular, podendo chegar até altas densidades celulares (200 g/L) durante uma fermentação em batelada alimentada com limitação de glicose (Heyland et al., 2010). A secreção de poucas proteínas endógenas é outra importante vantagem, pois facilita a purificação de proteínas que sejam exportadas ao meio extracelular. Por último, a fácil manipulação genética faz com que as técnicas moleculares desenvolvidas para *S. cerevisiae*, um dos sistemas experimentais mais bem caracterizados, sejam facilmente aplicáveis em *K. phaffii* (Cereghino and Cregg, 2000).

Os vetores de expressão para *K. phaffii* são, geralmente, plasmídeos integrativos. Estes são desenhados para conter elementos genéticos para manipulação e propagação em *E. coli*; sequências regulatórias (promotores), induzíveis ou constitutivas, que são reconhecidas pela célula hospedeira; sequências terminadoras de transcrição de levedura (como por exemplo *AOX1tt*), marcas de seleção auxotrófica ou dominante e sítios múltiplos de restrição para clonagem (Cereghino and Cregg, 2000, Damasceno et al., 2012, Logez et al., 2012). Para a secreção de proteínas recombinantes ao meio extracelular, os vetores de expressão contêm um sinal de secreção, que é uma sequência que codifica um peptídeo sinalizador que direciona a exportação da proteína heteróloga para o meio extracelular, como é o caso do fator alfa (α -MF) de *S. cerevisiae* (Wang et al., 2016). Alguns vetores ainda podem conter sequências *tag* (*HIS6* ou *c-myc*), que facilitam a identificação e purificação da proteína heteróloga (Cereghino and Cregg, 2000). Sinais de localização nuclear (NLS - *nuclear localization signal or sequence*) estão presentes em alguns sistemas de expressão em *K. phaffii*, e são necessários para o transporte ativo de proteínas através de complexos de poros nucleares (Fahrenkrog and Aebi, 2003).

1.2.1.1 Controle do promotor do gene *AOX1* (P_{AOX1}) na presença de metanol

Para a expressão de genes heterólogos, diferentes promotores endógenos, com diferentes forças, podem ser utilizados, de acordo com o objetivo a ser alcançado. Os

promotores utilizados nos vetores de expressão podem ser induzíveis ou constitutivos (Mokdad-Gargouri et al., 2012). Dentre os promotores induzíveis, em *K. phaffii* o mais usado é o promotor do gene *AOXI* (P_{AOXI}).

O gene *AOXI* codifica a primeira enzima na via de utilização de metanol. O metanol é o agente indutor do P_{AOXI} e, apesar de ser o promotor mais estudado e, como consequência, o mais utilizado, nem sempre representa a melhor solução. Seu emprego na indústria biofarmacêutica é desaconselhado, uma vez que resíduos de metanol no produto final podem ter efeitos tóxicos em humanos. Seu uso em biorreatores de larga escala também pode ser problemático, já que o metanol é altamente inflamável e o armazenamento de grandes quantidades desse combustível é perigoso (Cereghino and Cregg, 2000, Deiters, 2010, Salinas et al., 2017). A atividade deste promotor é firmemente controlada em nível transcricional por um mecanismo de repressão/desrepressão mediado pela presença do agente indutor, o metanol (Wang et al., 2016). Ao mesmo tempo, é fortemente reprimido na presença de glicose ou glicerol, que são fontes de carbono preferenciais da levedura (Wang et al., 2017).

1.2.1.2 Fatores de transcrição na regulação do P_{AOXI} : Mit1

Diferentes reguladores de transcrição são essenciais para expressar os genes envolvidos na via de utilização do metanol em *K. phaffii*. Dentre eles encontram-se Mxr1 (Lin-Cereghino et al., 2006), Prm1 (Sasano et al., 2008, Sahu et al., 2014) e Mit1 (Wang et al., 2016). Mxr1 desempenha um papel importante, induzindo a transcrição do *AOXI* e de outros genes envolvidos na via de utilização do metanol, assim como genes envolvidos na biossíntese do peroxissomo (Ohsawa et al., 2022). Este fator de transcrição liga-se especificamente a seis sítios no P_{AOXI} (Wang et al., 2016). Prm1, por sua vez, funciona como um regulador positivo dos genes envolvidos na via de utilização do metanol (Sasano et al., 2008, Sahu et al., 2014). Estudos demonstraram que em cepas com deleção deste fator de transcrição Prm1 ($\Delta prm1$) a expressão dos genes envolvidos na via de utilização do metanol *AOXI*, *DHAS* (dihidroxiacetona sintase), *FDH* (formato desidrogenase), *FLD* (formaldeído desidrogenase), *PEX8*, *PEX5* e *PEX14* (peroxinas 8, 5 e 14, respectivamente) foi severamente afetada (Sahu et al., 2014). Já Mit1 pertence à família de fatores de transcrição com domínios $Zn(II)_2Cys_6$ e desempenha um papel crítico no metabolismo do metanol (Wang et al., 2016, Camara et al., 2019, Liu et al., 2022). Dessa forma, cada um desses reguladores da transcrição desempenha uma função na

ativação do P_{AOXI} na levedura *K. phaffii*. Entretanto, suas interações e funções sinérgicas não estão bem esclarecidas.

Um estudo feito por Wang e colaboradores mostrou em um ensaio *in vivo* que a ligação de Mit1 e Prm1 ao P_{AOXI} era dependente da fonte de carbono e que a força dessa ligação é fraca (ou nula) na presença de glicose, leve na presença de glicerol, e era mais forte na presença de metanol. A ligação de Prm1 ao P_{AOXI} pode ser reprimida por repressores relacionados à glicose ou por modificações pós-transcricionais de Prm1 por quinases ou fosfatases (Wang et al., 2016). A Figura 1 mostra os sítios de ligação dos fatores de transcrição Mxr1, Prm1 e Mit1 ao P_{AOXI} (Figura 1).

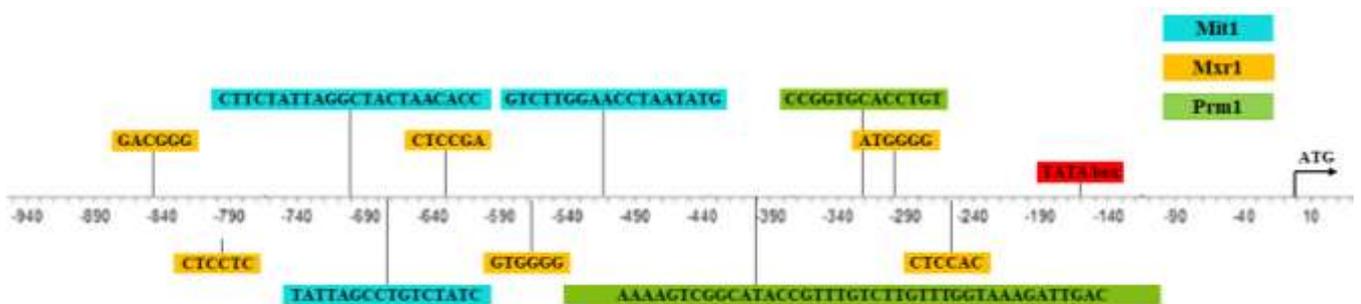


Figura 1. Sítios de ligação de Mit1, Prm1, e Mxr1 no P_{AOXI} . Representação esquemática do P_{AOXI} mostrando os diferentes sítios de ligação dos fatores de transcrição Mxr1 (amarelo) (Kranthi et al., 2009), Prm1 (verde) (Wang et al., 2016) e Mit1 (azul) (Wang et al., 2016).

Até agora, o modelo descrito para a ativação/regulação do P_{AOXI} envolve uma cascata de sinalização (Figura 2) (Wang et al., 2016).

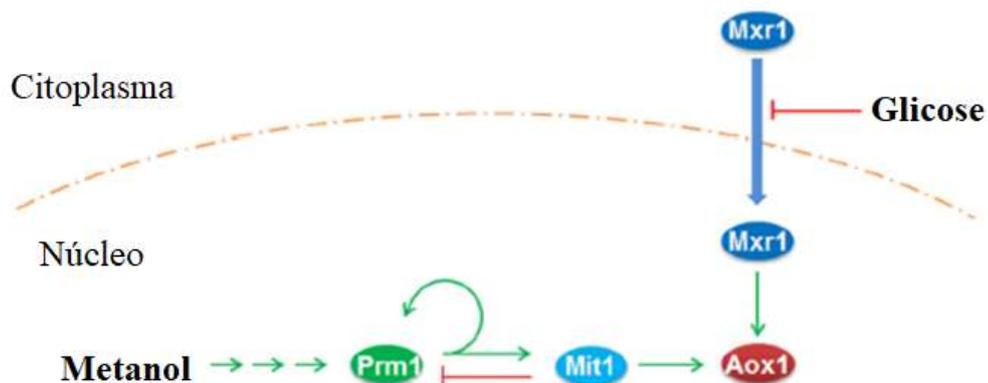


Figura 2. Modelo regulatório para a ativação do P_{AOXI} envolvendo os fatores de transcrição Mxr1, Prm1 e Mit1. Na presença de glicose, o promotor é reprimido porque Mxr1 fica no citoplasma. Na presença de metanol, Mxr1 é transportado para o núcleo. O sinal de indução do metanol é transmitido

de Prm1 a Mit1 e, em seguida, grandes quantidades de Mit1 induzem uma forte expressão do promotor (Wang et al., 2016).

Em células crescidas na presença de glicose, Mxr1 localiza-se no citoplasma e é translocado ao núcleo na presença de glicerol, etanol e metanol como fontes de carbono (Lin-Cereghino et al., 2006). Esse dado indica que a repressão induzida pela glicose pode ser regulada pela variação da localização de Mxr1 dentro da célula. Os resultados apresentados por Wang e colaboradores indicam que Mxr1 é essencial para a desrepressão do P_{AOXI} , diferentemente de Mit1 e Prm1, os quais respondem principalmente à indução por metanol (Wang et al., 2016). A deleção do gene *MXR1* bloqueou o sinal de indução por metanol devido à falha do mecanismo de desrepressão. Consequentemente, a superexpressão de Mit1 ou Prm1 não melhoraram a expressão do *AOXI* (Sahu et al., 2014, Wang et al., 2016).

Durante a indução com metanol, o sinal foi transmitido do metanol para P_{MIT1} , resultando em uma forte expressão de Mit1. Estudos adicionais indicaram que Prm1 transmitiu o sinal de indução de metanol para P_{MIT1} . Visto que as células expostas a glicose, glicerol e metanol mostraram expressão sustentada de Prm1, é possível que Prm1 transmitisse o sinal de indução do metanol alterando sua estrutura ao invés de alterar a dose do sinal (Wang et al., 2016).

Mit1 é um fator de transcrição crítico na regulação do P_{AOXI} que apresenta estrutura e função que diferem de outros homólogos como Mpp1 de *Hansenula polymorpha* (Leao-Helder et al., 2003, Wang et al., 2016, Liu et al., 2022). Os estudos envolvendo esses fatores de transcrição, particularmente Mit1, podem ser muito importantes para elucidar o circuito de indução por metanol e ainda desenvolver sistemas de expressão livres de metanol em *K. phaffii* para a expressão de proteínas de interesse tanto na indústria farmacêutica com na indústria de alimentos. Já que o MIT1 atua diretamente sob a ativação do promotor, e não depende de entrada/saída da célula, é um fator interessante para estudar isoladamente e analisar se é capaz de formar parte de um sistema para ativar o P_{AOXI} independentemente do agente indutor (metanol).

1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* é amplamente usada como um organismo modelo em pesquisas científicas e largamente empregado na indústria. Esta levedura é reconhecida como modelo para o estudo da biologia dos organismos eucariotos, sendo um dos microrganismos mais

estudados e caracterizados (Ostergaard et al., 2000). A alta eficiência de transformação, além da disponibilidade da sequência completa do genoma da levedura, tem facilitado a manipulação genética desse microrganismo, e novas abordagens estão sendo constantemente adotadas para a engenharia metabólica desse organismo para atender necessidades específicas (Ostergaard et al., 2000).

S. cerevisiae tem sido amplamente utilizada na biotecnologia industrial já que seu status GRAS é adequado para operação em grande escala, ou seja, não há restrição para o consumo humano, nem animal. Como um sistema eucariótico modelo, a biologia molecular e celular desta levedura tem sido estudada em profundidade com amplas ferramentas de engenharia disponíveis. Ao contrário dos procariontes, *S. cerevisiae* possui múltiplas organelas proporcionando diferentes ambientes e compartimentos para biossíntese. Além disso, *S. cerevisiae* apresenta alta tolerância a condições industriais adversas (Ostergaard et al., 2000, Hong and Nielsen, 2012). Portanto, *S. cerevisiae* tem sido desenvolvida como um microrganismo plataforma para engenharia metabólica.

Dentre outras características esta que possui um rápido crescimento celular com tempo de geração de aproximadamente 90 minutos, facilidade de obtenção de réplicas e isolamento de mutantes, uma genética e fisiologia bem conhecida, permite que modificações genéticas robustas sejam realizadas, além de ser viável com diversos marcadores de seleção, seja por auxotrofia ou por resistência à drogas (Sherman, 2002). Além disso, os estudos nas áreas de transcriptômica, metabolômica, por exemplo, geraram dados que permitiram a construção de modelos computadorizados para realizar previsões do comportamento *in vivo* da célula (Siddiqui et al., 2012).

1.3 Sistemas de controle baseados na luz: optogenética

Na última década, a optogenética tornou-se uma ferramenta muito utilizada na regulação e manipulação de processos biológicos. O termo optogenética é utilizado para descrever a combinação de métodos genéticos e ópticos para a ativação ou repressão de processos celulares pela luz (Deisseroth, 2011, Salinas et al., 2017). A optogenética é um método que usa a luz para modular eventos moleculares de maneira direcionada em células ou organismos vivos. Baseia-se no uso de proteínas geneticamente codificadas que mudam de conformação na presença de luz para alterar o comportamento celular, por exemplo, modificando o potencial de voltagem da membrana das células excitáveis (Guru et al., 2015).

A optogenética desenvolveu-se inicialmente na área de neurociência, porém agora é usada para estudar processos em diversas áreas da biologia, incluindo imunologia, biologia sintética, regulação gênica, desenvolvimento e motilidade celular (McCue and Kuhlman, 2022). Com relação à indução da expressão gênica, a optogenética provou ser um eficiente sistema de controle porque a luz pode ser rápida e facilmente aplicada ou removida do meio de cultura (Quail, 2002, Salinas et al., 2017, Perez et al., 2022). Além disso, é barata e altamente ajustável, e permite um controle espaço-temporal fino da expressão gênica (Drepper et al., 2011, Wang et al., 2012, Figueroa et al., 2021). Enquanto outros estímulos tais como pH, temperatura e agentes químicos podem variar nas condições de cultura, a luz proporciona um ajuste mais controlado e compatível com diversos sistemas; também não há resíduos de produtos químicos e o meio de cultura não precisa ser alterado, o que é mais econômico e minimiza o desperdício (Kumar et al., 2022).

No entanto, a luz em si pode influenciar o crescimento de leveduras, causando danos no citocromo mediante um aumento na espécies reativas de oxigênio e a regulação positiva da oxidação como resposta ao estresse (Robertson et al., 2013). Apesar desses efeitos, a luz demonstrou ser uma ferramenta ortogonal e conveniente para superar o uso de indutores químicos no controle de processos celulares e da expressão gênica em células de levedura (Pathak et al., 2014).

Em termos gerais, a utilização da luz para controlar a expressão gênica é possível pelo uso de fotorreceptores, ou seja, proteínas que percebem a luz através de domínios especializados que após a estimulação na presença da luz, sofrem uma mudança conformacional passando para um estado ativo (Schmidt and Cho, 2015). Essa capacidade natural dos fotorreceptores impulsionou o desenvolvimento de um novo conjunto de sistemas sintéticos ativados pela luz, denominados sistemas optogenéticos (Pathak et al., 2014).

Até o presente, vários sistemas de dimerização óptica foram descritos e utilizados em leveduras (Figura 3) com base em diferentes domínios sensores de luz presentes em plantas como por exemplo fitocromos, criptocromos, domínios LOV (*Light, Oxygen, Voltage*) e UVR8 (Pathak et al., 2014). Dois sistemas diferentes baseados no fitocromo B (PHYB) de *Arabidopsis* já foram desenvolvidos: PHYB-PIF3 (Shimizu-Sato et al., 2002) e PHYB-PIF6 (Levskeya et al., 2009).

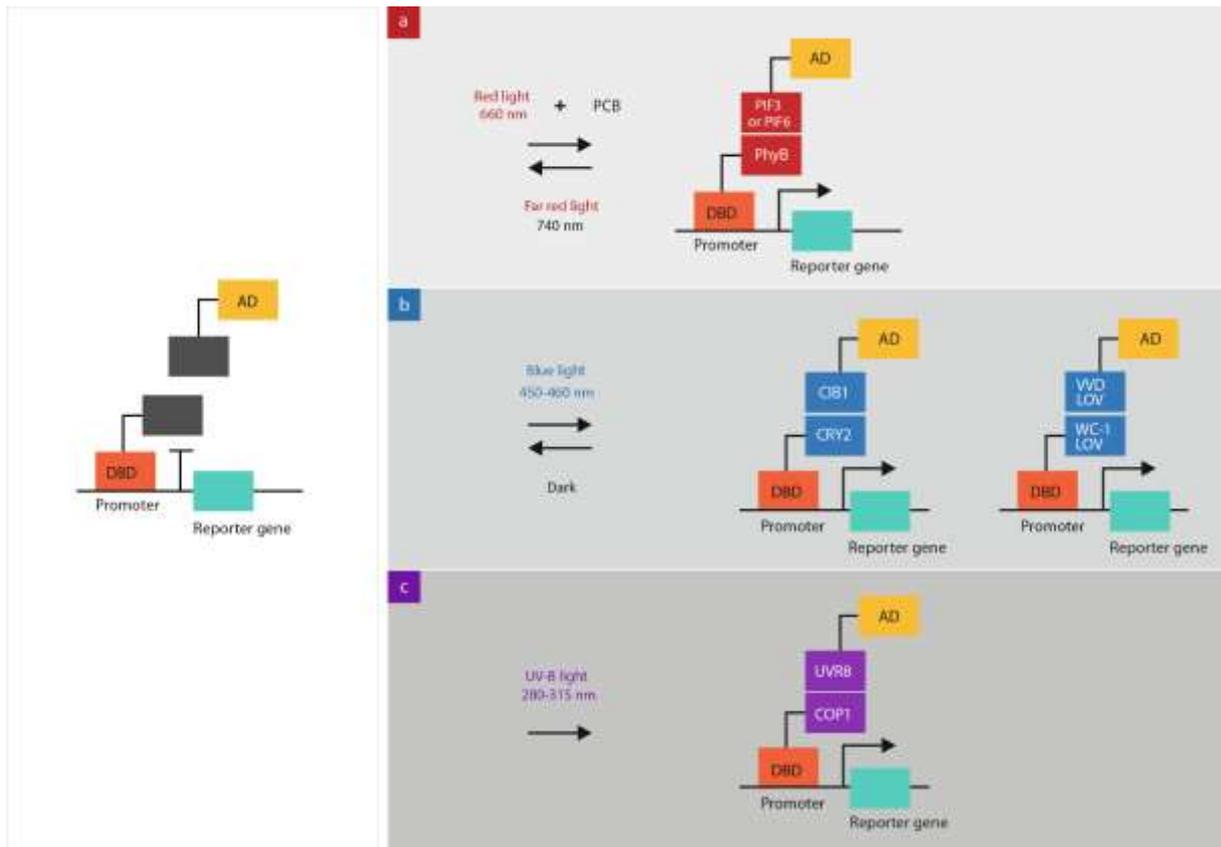


Figura 3. Principais sistemas de indução optogenética usados em leveduras. A. Os circuitos optogenéticos baseados em luz vermelha/vermelho distante são baseados na interação entre os fotorreceptores fitocromo B (PhyB) e uma proteína da família PIF (como PIF3 ou PIF6) de *Arabidopsis thaliana*. Através de uma ligação covalente com o cromóforo ficocianobilina (PCB), PhyB muda de conformação quando exposto à luz vermelha (660 nm), reunindo os domínios de ligação e ativação de DNA (DBD e AD, respectivamente). A luz vermelho distante (740 nm) causa uma mudança de conformação que desmonta o complexo. B. O circuito optogenético baseado em luz azul (450–460 nm) pode usar o criptocromo 2 de *Arabidopsis thaliana* (CRY2) e seu parceiro de interação CIB1 ou o VVD LOV junto com WC-1 LOV de *Neurospora crassa*. C. O circuito optogenético baseado em luz UV-B utiliza a interação entre o fotorreceptor ultravioleta-B de *Arabidopsis thaliana* UVR8, que uma vez estimulado com luz UV (280–315 nm), forma monômeros que podem interagir com a proteína constitutiva da fotomorfogênese 1 (COP1). Fonte: (Perez et al., 2022)

Em comparação com as técnicas convencionais, as abordagens com técnicas que apresentam indução com luz são muito superiores em termos de controle espaço-temporal, ajuste, rápida penetração nos tecidos e pelo fato de ser uma técnica não invasiva (Kawano et al., 2016, Salinas et al., 2017, Perez et al., 2022). É um agente físico não incorporado ao organismo ou ao ambiente (Figueroa et al., 2021).

Neste trabalho, abordaremos o estudo da optogenética a partir de sistemas baseados em luz vermelha, especificamente no sistema formado pela região N-terminal do PHYB (PHYBNT) e o PIF3 (PHYNT-PIF3). Para isso nos próximos tópicos será falado de cada um

destes componentes necessários para o correto desenvolvimento desta ferramenta baseada na luz vermelha.

1.3.1 Componentes de um circuito optogenético responsivo à luz vermelha

1.3.1.1 Ficocianobilina (PCB)

Os circuitos optogenéticos que se ativam por luz vermelha são baseados na presença dos fitocromos, proteínas que requerem o cromóforo ficocianobilina (PCB) para sua atividade. Este cromóforo está presente em plantas (fitocromobilina) e em cianobactérias (ficocianobilina) (Muller et al., 2013, Rockwell et al., 2017). Assim para utilização do sistema optogenético em outros organismos é necessário a síntese endógena de PCB ou sua suplementação exógena.

A PCB é cara e altamente fotolábil, limitando, portanto, as aplicações biotecnológicas dos circuitos optogenéticos ativados por luz vermelha (Ge et al., 2013, Uda et al., 2017). O processo de extração e purificação da PCB envolve metanólise a elevada temperatura (70 °C) a partir da microalga *Spirulina* (Carra, 1970, Ge et al., 2013).

Em cianobactérias, a PCB é sintetizada a partir do grupo heme em uma reação enzimática de duas etapas que compreende a oxidação do heme a biliverdina IXa pela ação da enzima heme oxigenase 1 (HO1) e a redução desse intermediário para 3Z-ficocianobilina pela enzima PCB: ferredoxina oxidoreductase (PcyA) (Muller et al., 2013). Em plantas, a PCB é sintetizada pela ação das enzimas heme oxigenase (Hy1) e fitocromobilina:ferredoxina oxidoreductase (Hy2) (Shin et al., 2014) (Figura 4).

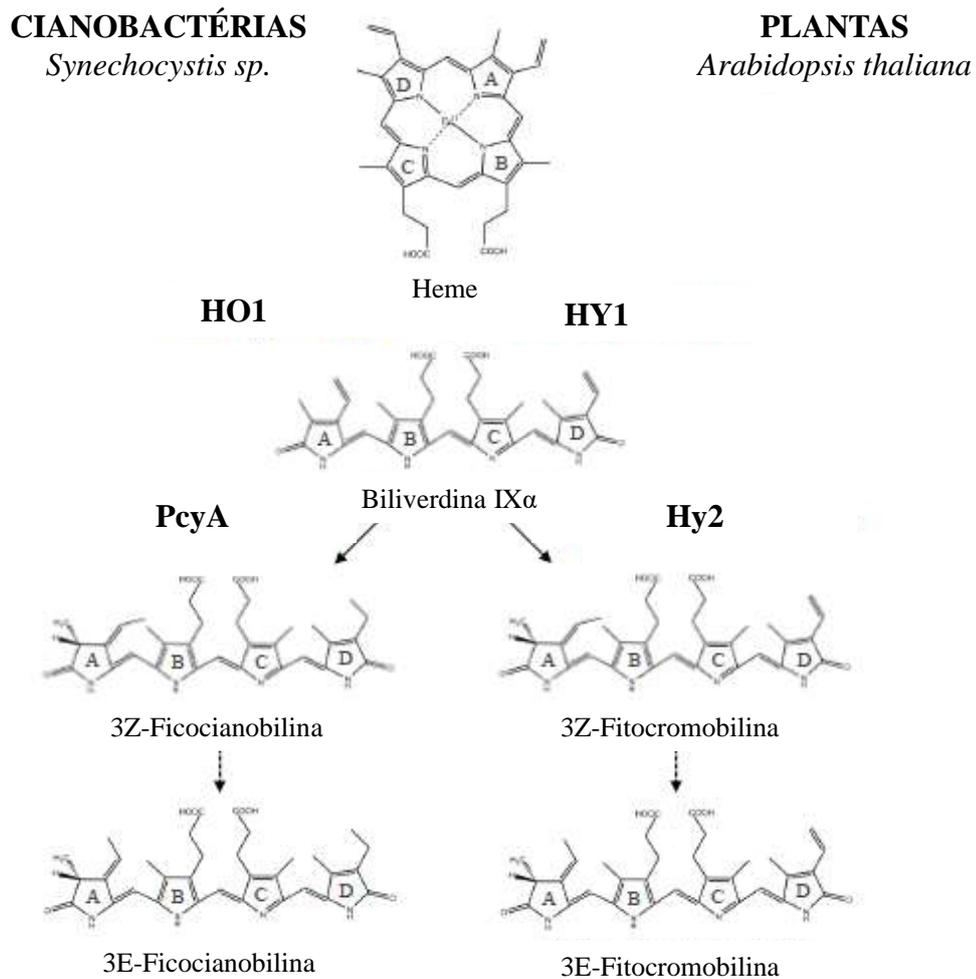


Figura 4. Biossíntese do fitocromo em cianobactérias e plantas. HO1 ou HY1: heme oxigenase. PcyA: PCB: ferredoxina oxidoreductase e Hy2: fitocromobilina ferredoxina redutase. (Shin et al., 2014)

No entanto, a exigência do cromóforo PCB foi superada através da engenharia desta via metabólica em células de mamíferos (Muller et al., 2013, Uda et al., 2017), bactérias (Ge et al., 2009, Ge et al., 2013, Horner et al., 2019) e até leveduras (Wu and Lagarias, 1996, Shin et al., 2014, Hochrein et al., 2017). Um estudo feito em *K. phaffii* demonstrou que as enzimas Hy1 e Hy2 de plantas foram mais eficazes na biossíntese da PCB do que as enzimas presentes em cianobactérias. Esses resultados sugerem que as enzimas procarióticas HO1 e PcyA são menos ativas em *K. phaffii* do que as enzimas eucarióticas Hy1 e Hy2, possivelmente devido a diferentes dobramentos de proteínas nas células (Shin et al., 2014).

1.3.1.2 Proteínas que respondem à luz vermelha: PHYB e PIF3

Os fitocromos (PHY), encontrados em bactérias, cianobactérias e plantas, são uma família de fotorreceptores (desde PHYA até PHYE) que regulam o crescimento e

desenvolvimento das plantas em resposta a sinais mediadas pela luz (Quail, 2002, Shimizu-Sato et al., 2002, Ni et al., 2013, Kumar et al., 2016, Krueger et al., 2019). Eles detectam luz vermelha e vermelho distante através da fotoisomerização de um cromóforo de tetrapirrol covalentemente ligado à PCB. Esse evento de fotoisomerização é acoplado a uma transição alostérica no fitocromo entre dois estados conformacionais chamados Pr (absorção de vermelho) e Pfr (absorção de vermelho distante) (Levskaya et al., 2009).

PHYA é abundante em mudas jovens cultivadas no escuro e desempenha papéis importantes na desetiolação de plântulas induzida pela luz (Tepperman et al., 2006). PHYA é rapidamente degradado para níveis muito baixos na presença de luz contínua. PHYB é mais estável à luz e desempenha um papel importante na mediação da inibição do hipocótilo sob luz vermelha (660 nm) contínua a longo prazo. Os fitocromos alternam reversivelmente entre sua forma Pr, biologicamente inativa e sua forma Pfr, ativa (Tepperman et al., 2006, Levskaya et al., 2009, Ni et al., 2013).

O fator de transcrição PIF3 (Fator de Interação do Fitocromo 3) é o membro fundador que faz parte de um conjunto de fatores, denominados fatores de interação do fitocromo (PIF), que interagem de maneira reversível e dependente da luz com a forma Pfr ativa de PHYB (Ni et al., 1999). Todas as proteínas PIF têm um motivo no domínio N-terminal, chamado de ligação ao PHYB, que se liga ao PHYB com elevada afinidade (Khanna et al., 2004).

O fitocromo existe normalmente na forma Pr inativa e predominantemente no citosol. A exposição à luz vermelha (660 nm) converte o fotorreceptor em sua forma Pfr ativa e essa forma transloca-se para o núcleo, seguida pela rápida formação do complexo PHYB-PIF (Horner et al., 2019). Induzido pela luz, a translocação nuclear é necessária para a maioria das funções biológicas de PHYB. No núcleo, os fitocromos iniciam mudanças na expressão de aproximadamente 10% dos genes do genoma de *Arabidopsis* (Tepperman et al., 2006) (Figura 5).

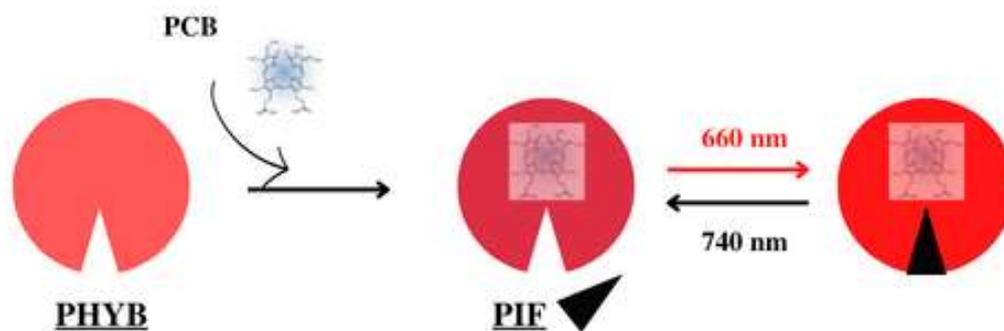


Figura 5. Formação do complexo PHYB-PCB e do complexo PHYB-PIF3 na presença de luz vermelha. Formação do complexo a 660 nm e separação a 740 nm.

PIF3 se liga apenas à forma exposta a luz vermelha do fitocromo, Pfr, e não mostra afinidade de ligação mensurável para o estado Pr exposto ao escuro ou ao vermelho distante. Assim, essa interação pode ser revertida pela luz vermelho distante (740 nm) (Levskeya et al., 2009). Essa interação sensível à luz foi mapeada para o núcleo fotossensorial N-terminal de 650 resíduos de PHYB e para um domínio de ligação de fitocromo ativado (APB) de 100 resíduos N-terminal conservado de PIF3 (Ni et al., 1999, Ni et al., 2013). Também em outros estudos foi demonstrado que essa região N-terminal da proteína PHYB (PHYBNT) é suficiente para sua atividade e ligação ao cromóforo e posteriormente ao PIF3 (Levskeya et al., 2009, Pathak et al., 2014). Ainda, estudos feitos por Pathak *et al.* demonstraram que atividade da β -galactosidase foi muito maior num sistema optogenético com PHYBNT quando comparado com PHYB (Pathak et al., 2014).

De forma geral, a interação PHY-PIF pode ser funcionalmente acoplada a uma ampla variedade de processos de sinalização através da construção de proteínas de fusão. A ausência de fotorreceptores no genoma de leveduras faz com que seja possível a implementação de diferentes circuitos optogenéticos nesse tipo de organismos (Salinas et al., 2017). A profunda caracterização do sistema PHYB e PIF3 de *A. thaliana* permitiu o desenvolvimento do primeiro sistema em leveduras capaz de controlar a expressão gênica a partir de um promotor na presença de luz (Shimizu-Sato et al., 2002). Estudos feitos pelo grupo de Peter Quail (Professor, Research Director, PGEC, Albany, NY, EUA), utilizando um sistema com o domínio de ligação ao DNA de Gal4 fusionado ao PHYBNT (PHYBNT-GBD) e o domínio de ativação de Gal4 fusionado ao PIF3 (PIF3-GAD) em *S. cerevisiae* demonstraram que o gene repórter *lacZ*, foi inativado na ausência do cromóforo PCB, e a PCB foi inativa na ausência de luz (Quail, 2002). Em estudos

em células de mamíferos, em células NIH3T3, foi observada fluorescência após 30 minutos de exposição a 5 μ M de PCB, o que mostrou a rápida autoligação em condições fisiológicas (Levskaya et al., 2009).

A fotorreversibilidade única do sistema do PHYB faz possível o uso do fotorreceptor como um interruptor molecular. A interação induzida pela luz vermelha entre o PHYB-PIF3 *in vitro* é rapidamente revertida pela luz vermelho distante (Ni et al., 1999).

O uso de circuitos optogenéticos para controlar fenótipos biotecnologicamente relevantes com impacto direto nos processos industriais ainda é pouco explorado em leveduras. Por exemplo, a aplicação de circuitos optogenéticos só foi reportado em um trabalho em *K. phaffii* especificamente sob o controle da luz azul (Wang et al., 2022). O controle da expressão de genes pela luz certamente proporcionará uma valiosa ferramenta para expressão heteróloga e engenharia metabólica de leveduras podendo colaborar com a dissecação molecular de fenótipos associados ao processo de fermentação. No presente projeto buscaremos pela primeira vez a construção no nosso laboratório de um circuito optogenético baseado na luz vermelha para *K. phaffii* capaz de regular a atividade do promotor P_{AOX1} , independente de metanol.

1.4 Sistemas de controle baseados no uso de recombinases sítio-específicas: integrases

Os rearranjos do DNA mediante recombinação sítio-específica são necessários para os processos de replicação, diferenciação e patogênese do genoma bacteriano, e desempenham um papel essencial no movimento de elementos genéticos tais como *transposons*, plasmídeos, bacteriófagos e *integrans* (Nash, 1996) (Grindley et al., 2006). A recombinação sítio-específica envolve (a) duas moléculas de DNA, (b) uma proteína recombinase especializada que é responsável pelo reconhecimento dos sítios e pela quebra e junção do DNA, e (c) um mecanismo que envolve a quebra do DNA e junção com a conservação da energia da ligação fosfodiéster (Grindley et al., 2006).

Recombinases sítio-específicas são proteínas que realizam a recombinação de determinada sequência de DNA por um mecanismo de reconhecimento de sítio, que são sequências nucleotídicas curtas e específicas. Esse processo pode desencadear inserção, excisão ou inversão do DNA dependendo do arranjo inicial dos sítios (Figura 6) (Smith and Thorpe, 2002, Grindley et al., 2006).

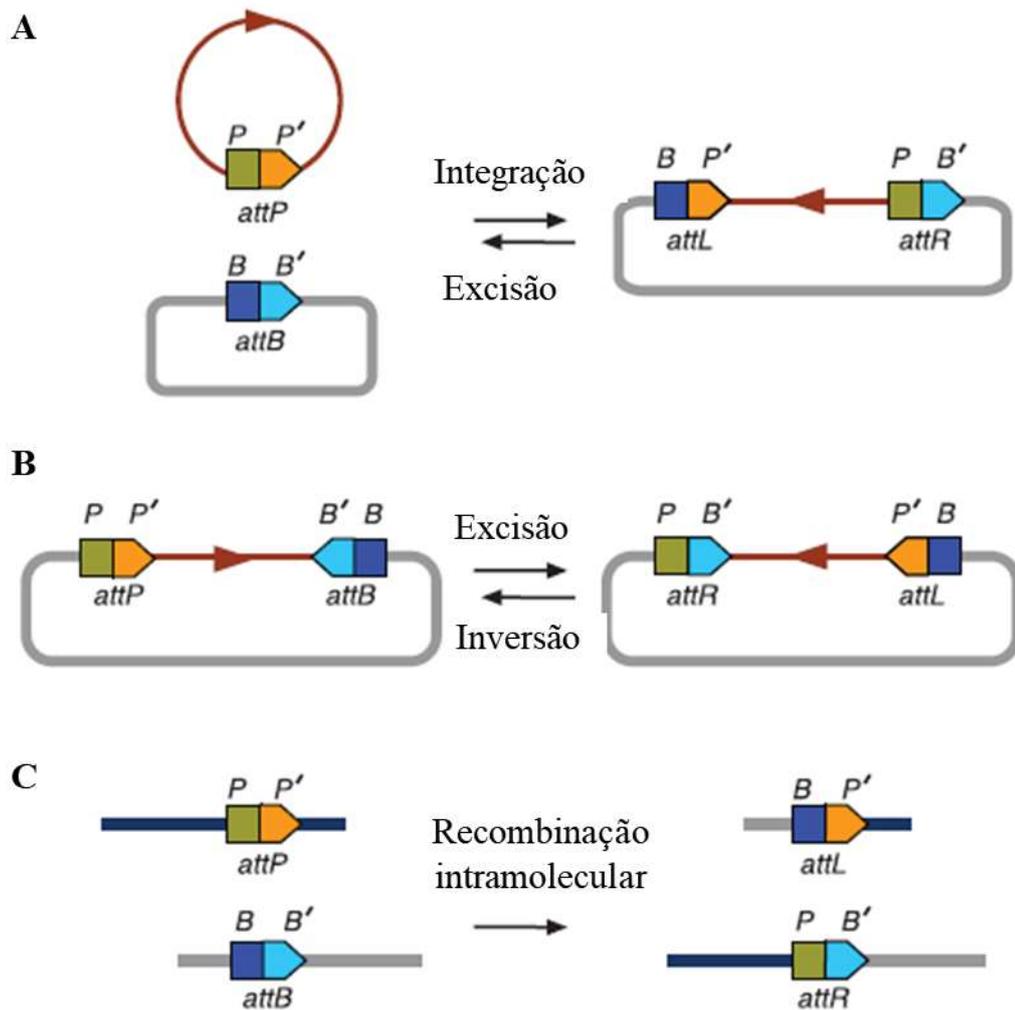


Figura 6. Resultados da recombinação sítio-específica: inserção, excisão ou inversão do DNA. A. A recombinação intermolecular entre sítios *att* resulta na integração de uma molécula de DNA circular em um *locus* genômico correspondente. Na reação inversa, a recombinação intramolecular de sítios *att* compatíveis arranjados em “cabeça a cauda” resulta em um resultado de excisão. B. Em contraste, quando os sites estão em orientação “cabeça a cabeça” (ou “repetição invertida”), o resultado do evento de recombinação é a inversão, que isto é, “virar” o segmento de DNA flanqueado pelos sítios *att* de recombinação. C. Finalmente, a recombinação intermolecular envolvendo moléculas lineares de DNA gera duas moléculas recombinantes lineares diferentes. Adaptado de (Abioye et al., 2022).

Estes possíveis resultados são usados para uma ampla variedade de propósitos em sistemas biológicos. Mais comumente, o uso de recombinação sítio-específica por um organismo ou elemento genético é impulsionado por uma necessidade primária para unir ou separar fisicamente segmentos de DNA. Além da integração e excisão de fagos e resolução de cointegração, os exemplos incluem redução de dímeros de replicação a monômeros e transposição de DNA (Grindley et al., 2006). No entanto, a recombinação sítio-específica também é usada como um meio de ativar ou mudar a expressão de um gene, bem como um

meio de gerar diversidade genética através da aquisição de genes ou segmentos de genes vantajosos (Merrick et al., 2018).

As recombinases sítio-específicas geralmente se enquadram em uma das duas famílias distintas que usam diferentes mecanismos de catálise, das tirosina (também conhecida como a família λ integrase) ou das serina recombinases (também conhecida como a família resolvase, em homenagem a recombinase de resolução de cointegração codificada por transposons como Tn3 e $\gamma\delta$) (Smith and Thorpe, 2002). Estas duas famílias de recombinases não apresentam relação em quanto a sequência ou estrutura da proteína e empregam diferentes mecanismos de recombinação; cada família parece ter surgido e evoluído separadamente (Poulter and Goodwin, 2005, Grindley et al., 2006). A família das tirosina recombinases é estruturalmente diversificada e extremamente versátil e inclui integrases, resolvases, invertases e transposases (Poulter and Goodwin, 2005, Grindley et al., 2006). A família das serina recombinases é mais heterogênea, variando em tamanho de 180 a quase 800 resíduos de aminoácidos e com variações inesperadas na organização dos domínios (Smith and Thorpe, 2002, Smith, 2015).

As integrases reconhecem dois sítios com aproximadamente 50 pb conhecidos como *attB* (*attachment Bacteria* ou sítio de ligação de bactéria) e *attP* (*Attachment Phage* ou sítio de ligação do fago) (Abioye et al., 2022). Dependendo da orientação dos sítios, elas são capazes de realizar a integração/excisão ou a inversão da orientação do segmento de DNA, gerando dois outros sítios denominados *attL* (*attachment Left* ou sítio de ligação esquerdo) e *attR* (*attachment Right* ou sítio de ligação direito) (Smith and Thorpe, 2002, Grindley et al., 2006, Smith, 2015). Para a reversão da ação da integrase, é necessária a expressão de um fator proteico denominado RDF (*Recombination Directionality Factor* ou fator direcional de recombinação) que auxilia a integrase a agir nos sítios *attL* e *attR*, não sendo possível a reversão pela própria integrase devido à modificação dos sítios *attP* e *attB* (Figura 7) (Smith and Thorpe, 2002, Merrick et al., 2018).

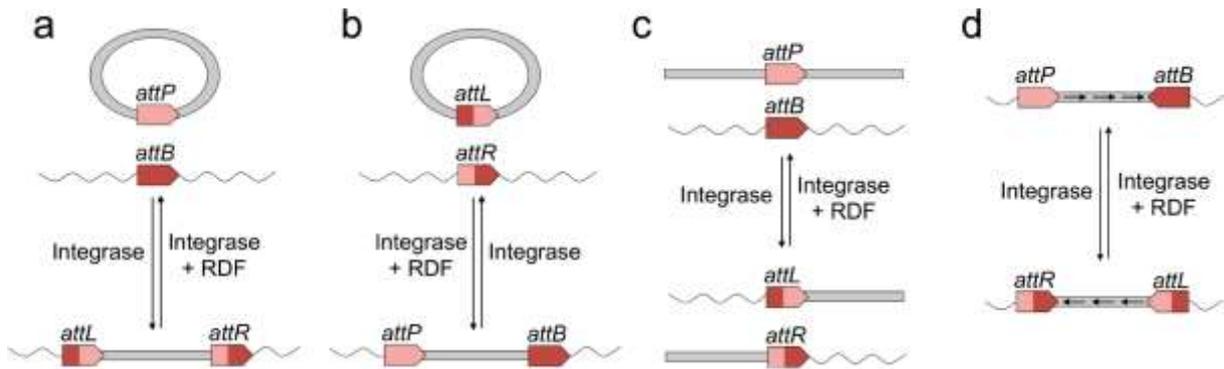


Figura 7. Exemplos de rearranjos de DNA mediados por integrases e RDF. Na presença de uma integrase, sítios $attP$ e $attB$ se recombinam para formar os sítios $attL$ e $attR$. Na presença de um RDF, esta reação é revertida. Para a integração e excisão de DNA, os sítios att estão na mesma orientação. Para a inversão do DNA, os sítios att estão em orientações opostas. (a) Integração de DNA mediada pela recombinação $attP \times attB$, e excisão por recombinação $attL \times attR$. (b) Integração mediada por recombinação $attL \times attR$, e excisão por recombinação $attP \times attB$. (c) Recombinação entre sítios att no DNA linear. (d) Inversão de DNA por recombinação $attP \times attB$ e revertida por recombinação $attL \times attR$. Fonte: Merrick *et al.* (Merrick *et al.*, 2018).

Dito isso, as integrases do tipo serina apresentam características tais como sítios de reconhecimento pequenos (40 a 60 pb), ausência de necessidade de sítios e proteínas acessórias para dobras do DNA e recombinação ou determinadas conformações específicas do DNA, e por seus resultados de recombinação serem unidirecionais, ou seja, são capazes de realizar a inversão de um segmento de DNA de forma permanente e irreversível pela mesma, são um alvo importante como ferramenta para a biotecnologia e a biologia sintética (Merrick *et al.*, 2018).

Até o presente, já foram estudadas bioquimicamente 14 integrases do tipo serina, das mais de 4.000 identificadas (Van Duyne and Rutherford, 2013, Merrick *et al.*, 2018). Yang *et al.* (2014) descreveram 11 integrases funcionais em *E. coli*, sendo altamente ortogonais. Essa propriedade confere a integrase a característica de não reconhecer o sítio de outra integrase, evitando a inversão do segmento de DNA no lugar errado (Yang *et al.*, 2014).

A utilização das integrases tem sido descrita no campo da engenharia de genomas, por exemplo, na integração genômica de DNA em um único sítio att , ou a integração direcionada GripTite Jump-In (Merrick *et al.*, 2018). Outro exemplo é o intercâmbio de cassete mediado por recombinase (RMCE) com uma serina integrase (Merrick *et al.*, 2018). Outro caso é a troca dupla de cassete de integrase (DICE). Um cassete de DNA carregando genes para resistência a neomicina (neo) e a proteína fluorescente verde (GFP) ladeada por sítios $attP$ para as integrases phiC31 e Bxb1 é inserida no genoma de embriões de células-tronco ou células-tronco pluripotentes induzidas por recombinação homóloga. Um vetor doador carrega um gene de

resistência à puromicina (*puroR*), uma proteína fluorescente (*mCherry*), e um gene de interesse flanqueado pelos sítios *phiC31* e *Bxb1 attB*. Na presença de integrases *phiC31* e *Bxb1*, expressadas a partir de vetores de expressão separados, os sítios *attP* e *attB* se recombinam para remover o cassete neo-GFP do genoma, substituindo-o pelo cassete *puroR-mCherry-GOI* (Merrick et al., 2018).

Estes exemplos utilizando as integrases, possibilitam a utilização das mesmas na construção de um circuito ou interruptor genético. Especificamente as aplicações onde o que acontece é a inversão da sequência, tem ganhado importância para a construção de portas e circuitos lógicos. Os circuitos genéticos biológicos sintéticos são baseados na álgebra binária dos circuitos eletrônicos, onde se colocam partes genéticas sob um controle de entrada e saída (input-output) para a geração de interruptores (*switches*), portas lógicas e redes genéticas sintéticas (Moon et al., 2011). Falando da construção de circuitos lógicos, a literatura apresenta alguns exemplos: as serina-integrases já foram testadas em bactérias (Siuti et al., 2013, Yang et al., 2014, Hsiao et al., 2016), leveduras (Xu and Brown, 2016) e células de mamíferos (Weinberg et al., 2017).

Siuti *et al.* descreveram uma estratégia, mediante o uso das integrases *phiC31* e *Bxb1* e combinações de promotores e terminadores, que permitiu criar todas as 16 funções de lógica booleana de duas entradas em células vivas de *E. coli* sem a necessidade de cascatas compostas por múltiplas portas lógicas (Siuti et al., 2013). Em 2017, Weinberg *et al.*, desenvolveram uma ferramenta, testada em células de mamíferos, capaz de prever a resposta de circuitos lógicos baseados em integrases. Foram montados 113 circuitos sintéticos lógicos, dos quais 109 foram funcionais (Weinberg et al., 2017). Yang *et al.* (2014) usaram diferentes integrases para a construção de circuitos de memória permanente em *E. coli*. Mediante análise bioinformática, foram identificadas 34 integrases de fago (e seus sítios de reconhecimento *attB* e *attP*), a partir do qual foram construídos 11 circuitos de memória perfeitamente ortogonais entre si e as integrases bacterianas *FimE* e *HbiF* (Yang et al., 2014).

A integrases têm sido usadas como componentes de circuitos genéticos. Pham *et al.* 2017 descreveram um conjunto de dispositivos genéticos em bactérias, para a detecção baseada em pH para permitir o controle da expressão de acordo com a diferença no pH ambiental (Pham et al., 2017). Especificamente, a integrase 2 foi utilizada formando parte de um circuito baseado em RNA capaz de gerar uma memória genética em *E. coli*. Quando pH do meio é alterado, a integrase 2 é produzida, promovendo uma inversão na sequência, ativando o gene repórter permanentemente,

gerando assim uma memória genética (Pham et al., 2017). Por outro lado, as integrases 5, 7, Bxb1 e Tp901 foram utilizadas em um circuito baseado em portas lógicas do tipo NOT em cascata. Neste circuito, só haverá um sinal de saída (produção de sfGFP) na ausência de um sinal de entrada. Na presença do sinal de entrada as integrases atuaram invertendo a sequência do promotor P7, de forma que não haveria mais a produção do gene repórter (Guiziou et al., 2019).

Considerando que as leveduras tais como *S. cerevisiae* e *K. phaffii* são organismos amplamente utilizados em biotecnologia, nesses organismos também foi avaliada a atividade de 10 serina-integrases diferentes: phiBT1, TP901, R4, Bxb1, MR11, A118, phiK38, phiC31, Wβ e SPBC. Todas elas apresentaram atividade o que confirma a potencial aplicação destas proteínas nas leveduras (Xu and Brown, 2016).

Portanto, com as vantagens da levedura *S. cerevisiae* apresentadas anteriormente, junto as características apresentadas dos sistemas optogenéticos e dos sistemas de regulação por integrases, neste trabalho, serão utilizadas as integrases do tipo serina e um sistema optogenético para a construção e validação de um circuito duplamente regulado na levedura *S. cerevisiae*. Especificamente nesta levedura, recentemente, Yang *et al.*, que desenvolveram os sistemas LightOn e LightOff em células de mamíferos, apresentaram o sistema yLightOn adequado para *S. cerevisiae* (Levskaia et al., 2009, Xu et al., 2018). O sistema contém apenas uma proteína monomérica sensível à luz LVAD, que é uma fusão do LexA-VVD (LEVI) e o domínio de ativação da proteína Gal4 (Gal4AD) (Xu et al., 2018). Por outro lado, em *S. cerevisiae* também foi desenvolvido um sistema de expressão gênica baseado em EL222, capaz de produzir até $8,49 \pm 0,31$ g/L de isobutanol e $2,38 \pm 0,06$ g/L de 2-metil-1-butanol (Zhao et al., 2018), que foi usado para regular o fluxo metabólico e estudar o mecanismo de regulação da tradução em leveduras. Recentemente, foi descrito um sistema optogenético responsivo à luz azul (CRY-CIB) em um modelo de interação cooperativa a partir da expressão da enzima invertase (Suc2) que *S. cerevisiae* utiliza para hidrolisar sacarose e utilizá-la como fonte única de carbono (Moreno Morales et al., 2021). Até o presente, em *S. cerevisiae* não foi testada a combinação da regulação utilizando um sistema baseado em optogenética e o uso das integrases. Combinar estes dos sistemas de regulação apresenta-se como uma alternativa promissora e brindaria ao grupo e aos outros laboratórios uma ferramenta de controle fino e altamente regulável.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver sistema para controle da expressão gênica em leveduras baseado em optogenética e no uso de integrases.

2.2 Objetivos específicos

- Obter uma linhagem de *K. phaffii* expressando PCB.
- Obter linhagens com o sistema de luz vermelha em *K. phaffii* e *S. cerevisiae*.
- Validar o sistema de luz vermelha com o gene repórter *EGFP* ou *Venus*.
- Obter um sistema para a expressão e atividade da integrase 13 em *S. cerevisiae*
- Obter linhagens de *S. cerevisiae* com o sistema optogenético e integrases 4 ou 13
- Validar o sistema final com o gene repórter *Venus*

3. ESTRATÉGIA

A estratégia utilizada para o estudo optogenético induzível por luz vermelha em *K. phaffii* está descrita na Figura 8.

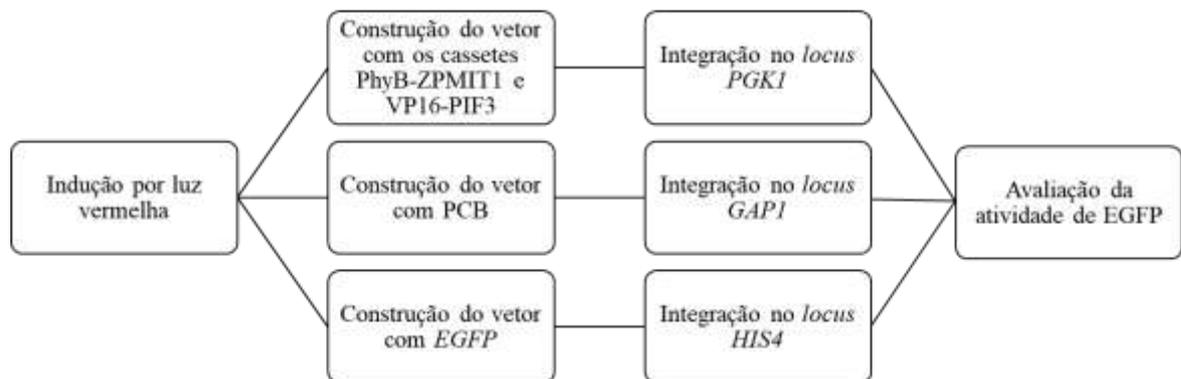


Figura 8. Estratégia de trabalho para a construção de um sistema optogenético ativado por luz vermelha.

A estratégia utilizada para a regulação mediante o uso de um circuito optogenético induzível por luz vermelha e o sistema de regulação com as integrases 4 e 13 em *S. cerevisiae* está descrita na Figura 9.

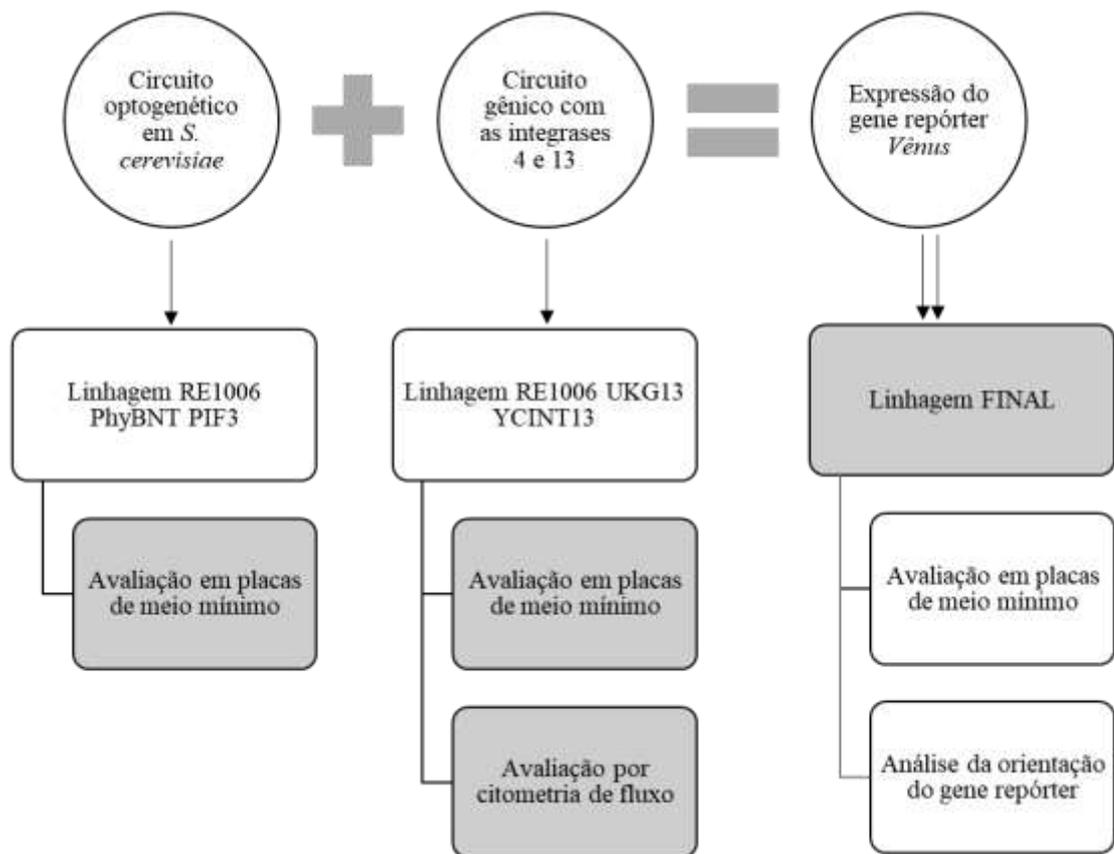


Figura 9. Estratégia de trabalho para a construção de um sistema optogenético induzível por luz vermelha e o sistema de regulação com as integrases 4 e 13 em *S. cerevisiae*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Células

Bactérias

- *Escherichia coli* XL10-gold (Agilent Technologies, EUA): *Tet^r Δ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*

Leveduras

- *K. phaffii* X-33: *arg4::HIS4* (derivada da linhagem GS115) (Invitrogen, Waltham, MA, EUA)
- *S. cerevisiae* RE1006: (*MATa can1-100, his3-11,15, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52*) (R. Strich) (R. Strich) (Torres and Bonner, 1995).

4.1.2 Meios de cultura para bactérias e leveduras

Meio Luria-Bertani – LB

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

O pH foi ajustado para 7,2. Para o meio sólido, foi adicionado ágar 2% (p/v)

SOB

Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	0,6 g/L
KCl	0,5 g/L
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Foram feitas soluções de MgCl₂ e MgSO₄ na concentração de 1 M e filtradas. Depois do meio ser autoclavado foram adicionadas as soluções para a concentração final de 10 mM.

YPD

Extrato de levedura	1% (p/v)
---------------------	----------

Peptona	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

Para o meio sólido, foi adicionado ágar 2% (p/v)

MD (Meio Mínimo com Dextrose)

YNB com sulfato de amônio	1,34% (p/v)
Biotina (para <i>K. phaffii</i>)	4x10 ⁻⁵ % (p/v)
Glicose	2% (p/v)

Para o meio sólido, foi adicionado ágar 2% (p/v).

Quando necessário foi adicionado 0,003% L-leucina, 0,002% de L-histidina, 0,002% de L-triptofano e 0,002% de uracila.

MGal (Meio Mínimo com Galactose)

YNB com sulfato de amônio	1,34% (p/v)
Galactose	2% (p/v)

Para o meio sólido, foi adicionado ágar 2% (p/v)

4.1.3 Soluções

Soluções estoque para meios de cultura

- Solução YNB (Yeast Nitrogen Base) com sulfato de amônio 10X

Yeast Nitrogen Base w/o ammonium sulfate (Difco)	3,4% (p/v)
Sulfato de Amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	10% (p/v)

Esterilizada por filtração

- Solução de glicose 10X

Glicose	20% (p/v)
---------	-----------

- Solução de galactose 10X

Galactose	20% (p/v)
-----------	-----------

- Solução de Biotina 500X

Biotina 0,02% (p/v)

Esterilizada por filtração

Antibióticos

- Solução de ampicilina (1000X)

Ampicilina 100 mg/mL

Dissolvida em água milli Q e esterilizada por filtração

- Solução de kanamicina (1000X)

Kanamicina 50 mg/mL

Dissolvida em água milli Q e esterilizada por filtração

- Solução de G418 (100X)

G418 50 mg/mL

Dissolvida em água milli Q e esterilizada por filtração

- Solução de higromicina B (300 µg/mL e 900 µg/mL e 900)

Higromicina B 50 mg/mL

Dissolvida em PBS (Invitrogen, Waltham, MA, EUA)

- Solução de zeocina (50 µg/mL e 100 µg/mL)

Zeocina 100 mg/mL

Dissolvida em água (Invitrogen, Waltham, MA, EUA)

Aminoácidos

Os aminoácidos foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm ou autoclavados.

Aminoácido	Concentração estoque	Concentração Final
L-Leucina	1% (p/v)	0,03%
L-Histidina	1% (p/v)	0,02%

L-Triptofano	1% (p/v)	0,02%
Uracila	0,2% (p/v)	0,02%

Soluções para células bacterianas competentes

- Tampão de transformação I

RbCl	12 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,9 g/L
Acetato de potássio	0,03 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 g/L
Glicerol	150 g/L

Uma solução estoque de acetato de potássio 1 M foi preparada e seu pH ajustado para 7,5 com ácido acético glacial. A solução foi esterilizada por filtração. O pH do tampão de transformação foi ajustado para 5,8 com ácido acético 0,2 M e a solução foi esterilizada por filtração.

- Tampão de transformação II

MOPS	0,02 M
RbCl	1,2 g/L
CaCl ₂	11 g/L
Glicerol	150 g/L

Uma solução estoque de MOPS 1 M foi preparada e seu pH ajustado para 6,8 com NaOH. A solução foi esterilizada por filtração. O pH do tampão de transformação foi ajustado para 6,8 com NaOH e a solução foi esterilizada por filtração.

Soluções para preparação de DNA plasmidial (miniprep)

- Solução I

Tris-HCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM

- Solução II

NaOH	0,2 M
------	-------

SDS	1% (p/v)
-----	----------

Solução preparada no momento de uso.

- Solução III

Acetato de sódio	3 M
------------------	-----

Ácido acético	2 M
---------------	-----

O pH foi ajustado para 5,0.

Soluções para eletroforese em gel de agarose

- Brometo de Etídio

EtBr	10 mg/mL
------	----------

- Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X

Tris	2 M
------	-----

Ácido acético	1 M
---------------	-----

EDTA pH 8,0	0,05 M
-------------	--------

- Tampão de amostra

TAE 20X	50% (p/v)
---------	-----------

Glicerol	30% (v/v)
----------	-----------

Azul de bromofenol	0,25 (p/v)
--------------------	------------

4.1.4 Kits

- Qiagen Plasmid Maxi kit (Qiagen): purificação de plasmídeos em grande escala.
- In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech): clonagem de fragmentos por recombinação homóloga *in vitro*.
- NEBBuilder HiFi DNA Assembly (NEB): Clonagem de fragmentos por recombinação homóloga
- Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega): purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose e purificação de produtos de PCR.
- Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega): extração de DNA genômico da levedura.
- QIAquick® PCR and Gel Cleanup Kit (Qiagen): purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose e purificação de produtos de PCR.

4.1.5 Oligonucleotídeos (*primers*)

A Tabela 1 apresenta os *primers* utilizados neste trabalho com seus respectivos sítios de restrição sublinhados.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho. Os sítios de restrição estão sublinhados. As sequências em minúscula representam regiões de identidade com o *template* para recombinação homóloga.

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')	Sítio de Restrição
TEFBGL2	TCATGAGATC <u>CAGATCT</u> ATAACTGTCGCCTCTTTT ATC	BglII
TEFBSTBI	AATCTCATCGTT <u>TTCGA</u> ACGAATAACTAAAATGTA TG	BstBI
ttTEF1-F:	TTAGTTATTCGTTTCGA <u>ACTCTCGAGTTGCGGCCG</u> <u>CATTGCTTGAAGCTTTAATTTATTTTATTAACA</u>	XhoI, NotI
ttTEF1-R	TGGTGTGTGGGGGATCCGCTGTGTACTTGCCCTT CGGTTGAA	
ZFMIT1-F	AGCGAAGGCGGCGGCAGCGAAGGCGGCACCAG CGGCGCGACCACCGGCC <u>CATATGAGT</u> ACCGCAGC CCCAATCA	NdeI
ZFMIT1-R	ATGATGATGATGGTCGACGCGGCCGCTCATTCCA ATCCAATTGAGGAAAGCGA	
PHYBNT-F	GCCCAATTGATTACGAAATTCGAAACGATGCCA AAGAAGAAAAGAAAAGTTGTTTCCGGAGTCGGG GGTAGT	
PHYBNT-R	TTCGCTGCCGCCGCTTCGCTGCCGCCCGCGCCG CTCGCGCCGGTAGATTCTTTAAAAGAGTCTCTCA GA	
VP16-F	TTAGTTATTCGTTTCGAAAAAATGCCAAAGAAGA AAAGAAAAGTTTCTACGGCCCCCCCCGACCGAT	
VP16-R	CTTCGCTGCCGCCGCTTCGCTGCCGCCCGCGCC GCTCGCGCCGGTCCCACCGTACTCGTCAATTCCA A	

PIF3-F	CGAAGGCGGCAGCGAAGGCGGCACCAGCG GCGCGACCACCGGCATGCCTCTGTTTGAGCTTTT CAG	
PIF3-R	GTTAATAAAAATAAATTAAGCTTCAAGCAATGC GGCCGCTCACGACGATCCACAAAACACTGAT	
FINAL-F	GGGCAAGTACACAGCGGATC <u>AGATCT</u> GCGAGGC AAGCATCTAC	BglII
FINAL-R	CTATGGTGTGTGGGGGATCCGCACAAACGAAGG TCTCACTT	
PGKD8	<u>AGATCT</u> CGAGCAAGTGTCCTATGCTG	BglII
qPHYBNT-F	GAAGAGGAGGAGAACAAGCTC	
qPHYBNT-R	TGGAGTCTTGCGTCGACGGT	
qMIT1-R	GAAGGTATATCCTTGTTTCATTAGG	
qVP16-F	CTAGACGATTTTCGATCTGGAC	
qVP16-R	AACTCGAAGTCGGCCATATCC	
qPIF3-F	ACGGACCACAGTTCCAAGTC	
qPIF3-R	CATTGCCAATCGTCGAAGAAC	
qPIF3II-F		
GAPBGL-F	GCA <u>AGATCT</u> TTTTTTGTAGAAA	BglII
3'AOX-R	CTATGGTGTGTGGGGGATCCGCACAAACGAAGG TCTCACTT	
EGFP-F	GGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAG	
EGFP-R	GGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	
PCBin-R	ATGAGCAAAGTAGATGTTGTAGAA	
qmHy1-F	CAGAACCAACAGCTCCTGGTA	
qmHy1II-R	ATGAGACGAAGTATCTCACC	
Venus-F	AGGGAATATTA <u>AAGCTT</u> AATAATGGTGAGCAAGGG CGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGT	HindIII
Venus-R	TAGATGCATG <u>CTCGAGT</u> TACTTGTACAGCTCGTC CATG	XhoI
GALIN-F	cggtagccgggatccACGGATTAGAAGCCGCCGA	BamHI
CYCIN-R	ccaagcttgcctgcagCCGCAAATTAAGCCTTCGA	PstI

VenusI-F	tctaagttttaattacaaaggatccataATGGTGAGCAAGGGCGA GG	BamHI
VenusI-R	ttcaattcaattcaatgcgccgcTTACTTGTACAGCTCGTCCA TG	NotI
TEFVenus-F	TACGCTGCAGGTCGACgGATCccccacacaccatagcttca	
VenusPGK-R	gaggCAAGCTAAACAGATCTtaacgaacgcagaattttcg	
HO-F	CGGCGTTGTTGTACTGTTGCA	
HO-R	TGAGATGGCGTATTTCTACTCCA	
HO-UKG-F	CCCCACACACCATAGCTTCAA	
HO-UKG-R	TAACGAACGCAGAATTTTCGAGT	
VenusI-F	tctaagttttaattacaaaggatccataATGGTGAGCAAGGGCGA GG	
VenusI-R	ttcaattcaattcaatgcgccgcTTACTTGTACAGCTCGTCCA TG	

4.1.6 Marcadores de massa molecular para DNA

- 2-log DNA ladder, 100-10.000 pb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).
- O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder 75-20.000 pb (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).
- DNA Ladder 1 kb PLUS (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA)
- DNA Ladder 1 kb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA)
- DNA Ladder 100 bp (Promega, Madison, WI, EUA)

4.1.7 Vetores

A Tabela 2 exibe todos os vetores usados neste trabalho e apresenta uma breve descrição de cada um deles.

Tabela 2. Vetores base utilizados

Vetor	Descrição
<i>K. phaffii</i>	
pPICK2	Vetor construído em nosso laboratório.
pPICK3	Vetor construído neste trabalho contendo o promotor e o terminador do <i>TEF1</i>

pPIC9ΔBGAL4:V P16	Vetor construído no nosso laboratório contendo a sequência de VP16
pGAPZB	Vetor comercial (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) utilizado para colocar os genes para a expressão da PCB
pAMDS-EGFP	Vetor construído no nosso laboratório usado para a expressão do <i>EGFP</i> (Piva et al., 2018)
<i>S. cerevisiae</i>	
YCplac111	Vetor centromérico contendo a marca de seleção <i>LEU2</i>
YCplac33	Vetor centromérico contendo a marca de seleção <i>URA3</i>
HO-Poly-KanMX4-HO	Vetor de levedura para integração no <i>locus</i> HO com marca de seleção que confere resistência a G418
pYES2	Vetor desenvolvido pela Invitrogen contendo o promotor $P_{Gal1,10}$ e o terminador <i>CYC1</i> com a marca de seleção <i>URA3</i>

4.2 Métodos

4.2.1 Células e meios de cultura

As bactérias foram cultivadas a 37 °C e as leveduras a 28 °C. Para ambos casos, uma velocidade de agitação de 250 rpm foi usada quando o crescimento foi em meio líquido.

Para o caso da levedura *K. phaffii* as linhagens utilizadas nesse trabalho foram a linhagem comercial X-33 (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) e a linhagem Xhis23 (X-33 transformada com um vetor derivado do plasmídeo comercial pPIC9 contendo o gene da proteína fluorescente verde (*EGFP*) sob o controle do P_{AOX1}) (Piva et al., 2018). Para o caso da levedura *S. cerevisiae* foi utilizada a linhagem RE1006 (Torres and Bonner, 1995).

Os meios utilizados para o cultivo de leveduras foram: o meio complexo YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%), e os meios mínimos MD (YNB 1,34%, sulfato de amônio 1%, biotina 4×10^{-5} % e glicose 2%, BMD (meio MD tamponado com tampão fosfato 100 mM pH 6.0), BMM (YNB 1,34%, sulfato de amônio 1%, biotina 4×10^{-5} %, metanol 0,5% e tampão fosfato 100 mM pH 6.0), BMG (YNB 1,34%, sulfato de amônio 1%, biotina 4×10^{-5} %, glicerol 1% e tampão fosfato 100 mM pH 6.0). Para meios sólidos foi adicionado ágar 1%. Para as leveduras transformadas com vetores contendo zeocina como marca de seleção, foi usado o meio YPDS (sorbitol 1M foi adicionado ao meio YPD ágar). Quando necessário, foram adicionados 100 µg/mL de zeocina ou 500 µg/mL de G418.

As etapas de clonagem foram feitas em *E. coli* XL10-gold (Agilent Technologies, EUA). O cultivo de bactérias foi feito em meio LB (0,5% extrato de levedura, 1% peptona e 1% NaCl. Para o meio sólido foi adicionado ágar 1,5%). Para vetores com a marca de seleção de zeocina, foi usado o meio LB low-salt com 0,5% de NaCl. Quando necessário foram adicionados 25 µg/mL zeocina, 50 µg/mL kanamicina e 100 µg/mL ampicilina. Para o preparo de células competentes, foi utilizado o meio SOB (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,06% NaCl, 0,05% KCl e 10 mM de cada um dos sais: MgCl₂ e MgSO₄).

4.2.2 Amplificação por PCR (*primers*)

A amplificação de fragmentos por reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com diferentes enzimas, dependendo da aplicação. Foram utilizadas a Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), *Platinum* Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). Todas as enzimas foram utilizadas de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.3 Preparação de células bacterianas competentes

Células de *E. coli* XL10-gold foram semeadas em meio LB ágar a partir de um estoque armazenado a -80 °C e incubadas a 37 °C durante a noite. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SOB em um frasco Erlenmeyer de 125 mL e incubada a 37 °C sob agitação a 250 rpm por 16 h. Dois mililitros desse pré-inóculo foram inoculados em 100 mL de meio SOB em um frasco Erlenmeyer de 500 mL e incubados a 37 °C sob agitação a 250 rpm por aproximadamente 1 h, até atingir uma OD₆₀₀ de 0,3. A cultura foi resfriada por 15 min em banho de água-gelo e, posteriormente, as células foram coletadas a 3.000 x g por 5 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 32 mL de tampão de transformação I e incubado no gelo por 15 min. Em seguida, as células foram concentradas por centrifugação sob as mesmas condições e ressuspendidas em 4 mL de tampão de transformação II. Finalmente, foram feitas alíquotas de 100 µL em tubos de 1,5 mL e armazenadas a -80 °C.

4.2.4 Manipulação do DNA

As digestões de DNA foram realizadas segundo as instruções do fabricante das enzimas. A quantidade de enzima foi ajustada à quantidade de DNA a ser digerido considerando que o

volume da enzima não devia ser maior do que 10% do volume total de reação. Todas as reações foram incubadas por 2 horas.

Para retirar sais e enzimas após a digestão, o DNA foi precipitado adicionando acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol 100% gelado. Após incubação a -20 °C por 16 h, o sistema foi coletado por centrifugação a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% por centrifugação a 10.000 x g por 2 min. O sobrenadante foi descartado e, uma vez seco, o precipitado foi ressuscitado em 10 µL de água milli Q.

A análise de fragmentos de DNA foi feita utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose adaptada de Sambrook (1989) (Sambrook et al., 1989). O gel preparado na concentração de 1% (p/v) de agarose em tampão TAE 1X continha brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à corrente elétrica (70 V) para permitir a migração e separação dos fragmentos de DNA. A visualização das bandas de DNA foi feita com a exposição do gel à luz ultravioleta. Os fragmentos de DNA eluídos de gel de agarose foram purificados utilizando kits de purificação, seguindo as orientações especificadas pelo fabricante.

4.2.5 Construção de plasmídeos

O processo de construção dos diferentes vetores foi feito por ligação ou por recombinação *in vitro*. Para a construção dos vetores por ligação, os produtos de PCR ou fragmentos de DNA provenientes de digestão foram unidos ao vetor numa proporção molar de 3:1. A ligação utilizou T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI, EUA) ou T4 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi feita a 16 °C durante 16 h. As digestões de fragmentos de DNA com enzimas de restrição foram realizadas conforme instruções do fabricante (Promega, Madison, WI, EUA ou New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

A construção de vetores por recombinação *in vitro* foi feita com o *kit* In-Fusion Cloning *Kit* (Clontech, EUA) ou Nebuilder HiFi DNA assembly cloning kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). Os fragmentos foram amplificados com sequências homólogas ao vetor e a reação foi realizada de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

O sistema de ligação ou o sistema de recombinação *in vitro* foram utilizados para transformar células bacterianas competentes pelo método de choque térmico (Sambrook et al., 1989). Para extrair os plasmídeos das células bacterianas, foi utilizado o protocolo de extração de plasmídeos por lise alcalina descrito por Sambrook et al., 1989 com adaptações.

4.2.6 Sequenciamento de plasmídeos

O sequenciamento para conferência da sequência dos plasmídeos construídos foi realizado pela empresa Myleus Biotecnologia (Belo Horizonte, Brasil), que utiliza o método de Sanger e a plataforma ABI 3730 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para eletroforese.

4.2.7 Preparação de DNA plasmidial

Para extrair os plasmídeos das células bacterianas em pequena escala (miniprep) foi utilizado o protocolo descrito por (Sambrook et al., 1989) com adaptações. Cinco mililitros de meio LB contendo o antibiótico adequado foram inoculados com uma colônia transformante e incubados a 37 °C por 16-18h sob agitação. Três mililitros da cultura foram coletados por centrifugação a 10.000 x g por 2 min e o precipitado de células foi ressuscitado em 200 µL de solução I. Em seguida, foram adicionados 360 µL de solução II recém-preparada; a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada à temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de solução III gelada, a mistura homogeneizada e incubada no gelo por 5 min. Após esse tempo a amostra foi concentrada por centrifugação a 10.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 750 µL de isopropanol. A mistura foi homogeneizada por inversão e submetida a centrifugação a 10.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 200 µL de solução I. Em seguida, foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e a mistura homogeneizada vigorosamente seguido de centrifugação a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 750 µL de etanol 100% gelado. Após centrifugação a 10.000 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70% seguido de uma nova centrifugação a 10.000 x g por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol foi seco à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água milli Q contendo RNase A (0,1 mg/mL) e incubado a 37 °C por 15 min. O DNA foi armazenado a -20 °C até seu uso.

Para a obtenção dos plasmídeos em maior quantidade foi utilizado o kit Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante.

4.2.8 Preparação de células bacterianas competentes por choque térmico

Este protocolo foi adaptado de Sambrook et al., 1989. Células de *E. coli* XL10-gold foram semeadas em meio LB ágar a partir de um estoque armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a noite. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SOB em um frasco Erlenmeyer de 125 mL e incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação a 250 rpm por 16 h. Dois mililitros desse pré-inóculo foram inoculados em 100 mL de meio SOB em um frasco Erlenmeyer de 500 mL e incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação a 250 rpm por aproximadamente 1 h, até atingir uma OD_{600} de 0,3. A cultura foi resfriada por 15 min em banho de água-gelo e, posteriormente, as células foram coletadas a $3.000 \times g$ por 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O precipitado foi ressuscitado em 32 mL de tampão de transformação I (12 g/L RbCl, 9,9 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,03 M acetato de potássio, 1,5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 150 g/L glicerol) e incubado no gelo por 15 min. Em seguida, as células foram concentradas por centrifugação sob as mesmas condições e ressuscitadas em 4 mL de tampão de transformação II (0,02 M MOPS, 1,2 g/L RbCl, 11 g/L CaCl_2 e 150 g/L glicerol). Finalmente, foram feitas alíquotas de 100 μL em tubos de 1,5 mL e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Uma alíquota de células competentes armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi descongelada em banho de gelo e em seguida foram adicionados 10 μL do sistema de ligação ou 2 μL do sistema de recombinação *in vitro*. As células foram incubadas no gelo por 30 min e posteriormente foram submetidas a choque térmico a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 s. Foram adicionados 900 μL de meio LB ao sistema, que foi incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h. As células foram semeadas em meio LB ágar contendo o antibiótico adequado.

4.2.9 Transformação de *K. phaffii* por eletroporação

A transformação com vetores integrativos foi feita por eletroporação segundo o protocolo descrito no EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) com algumas modificações. Uma colônia fresca de levedura foi inoculada em 5 mL de YPD. Após 12 h de crescimento a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 250 rpm, 500 μL desse pré-inóculo foram usados para inocular mais 5 mL de meio. Após 8h de incubação, o volume necessário dessa nova cultura foi inoculado em 100 mL de meio YPD para atingir uma OD_{600} de 1,3 após 16 h de

crescimento. As células foram coletadas e lavadas 3 vezes com água estéril gelada (100 mL na primeira lavagem e 50 mL nas outras duas) e uma vez com sorbitol 1 M gelado (3 mL) centrifugando-se a 1.500 x g por 5 min a 4 °C. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 300 µL de sorbitol 1 M gelado e 80 µL dessas células competentes foram misturadas com 5-10 µg de DNA linearizado e transferidas a uma cubeta de eletroporação de 2 mm (Bio-Rad). A cubeta foi incubada no gelo por 5 min antes de aplicar um pulso elétrico sob as seguintes condições: 1500 V, 400 Ω, e 25 µF. Imediatamente após o pulso, 1 mL de sorbitol 1 M gelado foi adicionado. As células foram semeadas em meio mínimo para seleção de transformantes.

4.2.10 Transformação de *S. cerevisiae* por eletroporação

Foi utilizado o protocolo proposto por (Becker e Guarente, 1991 (Becker and Guarente, 1991)) com adaptações. Uma colônia isolada foi crescida em 3 mL de YPD por 16 horas. Foi feito um inóculo em 100 mL de YPD com OD₆₀₀ inicial de 0,1. Todas as centrifugações deste protocolo foram realizadas utilizando o rotor de ângulo fixo F15-6X100 da Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos quando a cultura atingiu a OD₆₀₀ de 0,8. As células foram ressuspensas com 25 mL de tampão de transformação. As células foram incubadas em temperatura ambiente por 1 h, homogeneizando suavemente a cada 10 minutos. As células foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com 25 mL de água milli-Q estéril gelada duas vezes. Após esse processo, o sedimento foi lavado novamente em 10 mL de 1 M de sorbitol gelado duas vezes. O precipitado celular foi ressuspendido em 100 µL de 1 M sorbitol. Para cada transformação, foi utilizado 40 µL. Adicionou-se 1 µg de DNA em uma alíquota de célula, incubando no gelo por 5 minutos. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm e submetida ao choque nos seguintes parâmetros: 1,5 kV, 25 uF, 200 Ω. Posteriormente foi adicionado 1 mL de sorbitol gelado imediatamente e incubado por 30 minutos, mesmo para seleção auxotrófica. Para seleção para marca de resistência a drogas, incubar entre 2-3 horas a 30 °C.

4.2.11 Transformação de leveduras pelo protocolo One-Step

O protocolo utilizado foi descrito anteriormente por Chen, 1992 (Chen et al., 1992). A cultura de levedura foi inoculada e crescida sob agitação a 30 °C até a fase estacionária. Após este período, 200 µL de células foram coletadas em tubos do tipo Eppendorf e centrifugadas durante 5 segundos à velocidade máxima. As células foram ressuspensas em tampão *One*

Step (0,2 M acetato de Lítio, 40% (p/v) de PEG 4000 e 100 mM de DTT). O plasmídeo foi adicionado na concentração entre 50 a 1000 ng em um volume final de 100 µL. As células foram incubadas durante 1 hora a 45 °C e em seguida, plaqueadas em meio seletivo adequado.

4.2.12 Extração de DNA total de leveduras

O DNA genômico de leveduras foi extraído utilizando o *kit* Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

4.2.13 Extração de DNA genômico de leveduras para PCR

A extração de DNA de levedura que foi utilizado para as reações de PCR foi realizada conforme descrito por Drumonde, 2013, com modificações (Drumonde-Neves et al., 2013). Uma colônia isolada de levedura foi inoculada em 1 mL de meio de cultura adequado e incubada a 30 °C por 16 horas. As células foram centrifugadas a 10.000 x g por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 100 µL de Tampão I e 1,66 µL de liticase (20 mg/mL). As células foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de Tampão II e as células foram incubadas a 65 °C por 5 minutos. Foram adicionados 80 µL de acetato de potássio 5 M e a amostra foi homogeneizada e incubada a -20 °C por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 250 µL de isopropanol e a solução foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 2 minutos, o sobrenadante removido e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%. A seguir, o precipitado foi ressuspensado em 500 µL de água deionizada contendo 100 µg/mL de RNase A.

4.2.14 Extração de RNA e tratamento com DNase I

A extração de RNA foi feita com o *kit* RNaseasy Plus Mini (Qiagen, Alemanha), de acordo com as orientações do fabricante. O RNA foi tratado com DNase I (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

4.2.15 RT-PCR do RNA de levedura

A reação de RT-PCR a partir do RNA de *K. phaffii* foi feita com o *kit* Illustra Ready-To-Go RT-PCR Beads (GE Healthcare, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

4.2.16 Indução por galactose

Protocolo adaptado de (Guthrie e Fink, 1991). As leveduras foram inoculadas a partir de colônias isoladas em frasco de 125 mL com 10 mL de meio mínimo com glicose. As colônias foram crescidas por 21 horas a 28 °C e 200 rpm e foram inoculadas em 10 mL de meio mínimo contendo 2% galactose. As leveduras foram inoculadas para OD₆₀₀ de 0,3 para a indução com galactose.

4.2.17 Indução da expressão e detecção de EGFP em meio líquido

4.2.17.1 Indução por metanol

Uma colônia nova da levedura foi inoculada em 25 mL de meio BMG e incubada por 24 h a 28 °C e 250 rpm. Após esse tempo, as células foram lavadas com água destilada e ressuspensas em 25 mL de BMM (meio de indução), que contém 1% metanol. Quando necessário, foi adicionado metanol a cada 24 h, numa concentração de 1% (v/v). Amostras de cultura foram coletadas em diferentes tempos (0 e 24 h) para avaliar a presença de EGFP.

4.2.17.2 Indução por luz vermelha (660 nm)

Uma colônia nova da levedura foi inoculada em 25 mL de meio BMG e incubada por 24 h a 28 °C e 250 rpm. Em seguida, as células foram ativadas com luz vermelha (660 nm) durante diferentes tempos de indução. Inicialmente foram testados os tempos 0, 12, 24 e 36 h de indução contínua. Amostras de cultura foram coletadas em diferentes momentos (0, 12, 24, 36 e 48 h) para avaliar a presença de EGFP. O dispositivo para a emissão de luz vermelha utilizado foi o LED Grow Light 25W 660nm Luz Vermelha Dispositivo Luz da Planta para Planta Interior LED Growing Panel Lamp Adjus.

A partir dos resultados dos primeiros ensaios serão testados outros tempos de indução, assim como outros tempos nos intervalos entre as diferentes induções.

4.2.18 Análise de fluorescência por citometria de fluxo

Para avaliar a produção intracelular de EGFP, ymUKG1 ou Venus, a respectiva levedura transformada foi submetida a análise por citometria de fluxo. As células foram crescidas em 25 mL do respectivo meio durante 24 h. Posteriormente as células foram lavadas 2 vezes com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) centrifugando a 3000 x g por 5 min a 4 °C. Finalmente, as células foram ressuspensas no volume adequado de PBS a fim de ter aproximadamente 1 x 10⁶ células/mL e foram mantidas a 4 °C até a análise no citômetro FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A análise

dos dados adquiridos foi feita com o software FlowJo versão 10.8.1 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

4.2.19 Análise por microscopia de fluorescência

Cerca de 10 μ L de cada cultura foram depositados numa lâmina e a fluorescência emitida por células expressando o gene o gene repórter foi detectada utilizando o microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axio Observer Z1 equipado com uma objetiva 63x NA 1,4. As imagens foram capturadas com a câmera AxioCam MRm (Carl Zeiss) e coletadas com o programa Zen software (Carl Zeiss).

4.2.20 Indução da expressão e detecção de ymUKG1 e Venus em meio sólido

Uma colônia nova da levedura foi inoculada em 25 mL de meio BMG ou meio mínimo, dependendo do caso, e incubada por 24 h a 28 °C e 250 rpm. Em seguida, foi medido o crescimento e calculado para começar com uma OD₆₀₀ de 1. A partir dessa diluição foram feitas duas diluições seriadas (1:10 e 1:100). Em uma placa de meio mínimo sólido foram colocadas 4 μ L de cada diluição e as placas foram incubadas sob as diferentes condições. A presença do gene repórter foi avaliada colocando as placas no aparelho Amersham (Fotodocumentador Amersham Imager 600, GE, tempo de exposição 1s).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de facilitar a leitura do documento e a compreensão dos resultados, estes foram divididos em três capítulos. O capítulo 1 trata do estudo da regulação com luz mediante a construção de um sistema optogenético em *K. phaffii*. O capítulo 2 trata do estudo de um sistema de regulação com luz a partir da construção de um sistema optogenético em *S. cerevisiae*. Já o capítulo 3 descreve os resultados obtidos na combinação do sistema optogenético em *S. cerevisiae* com o sistema de regulação contendo as integrases 4 e 13 para a ativação do gene repórter *Venus*.

5.1 Capítulo 1: Construção de um sistema optogenético na levedura *Komagataella phaffii*

K. phaffii é o organismo de escolha para a produção comercial de muitas proteínas importantes. A primeira parte do trabalho teve como objetivo a construção de um sistema optogenético para ser empregado nesse organismo.

5.1.1 Construção dos vetores de expressão

Com o objetivo de construir dois vetores para a expressão das proteínas responsivas à luz, PHYBNT e PIF3, fusionadas aos domínios de ligação ao DNA (ZFMIT1) e de ativação (VP16), respectivamente, foram utilizados os vetores pPICK2 (Anexo 1) e pPICK3. A diferença entre esses dois vetores está nas sequências regulatórias: o vetor pPICK2 (construído no nosso laboratório) tem o promotor do gene *PGK1* (P_{PGK1}) e o terminador do gene *AOX1* (*AOX1*tt), enquanto o vetor pPICK3 (construído neste trabalho) tem o promotor e o terminador do gene *TEF1* (P_{TEF1} e *TEF1*tt). Foram utilizados dois vetores diferentes para que as construções estivessem sob o controle de diferentes promotores e terminadores, assim evitando perdas de fragmentos por recombinações intramoleculares comuns em *K. phaffii* (Cregg et al., 1985, Vogl et al., 2018).

5.1.1.1 Construção do vetor pPICK3

A estratégia de construção do plasmídeo pPICK3 está representada na Figura 10. O vetor pPICK2, construído no nosso laboratório, foi utilizado como base para a construção do vetor pPICK3.

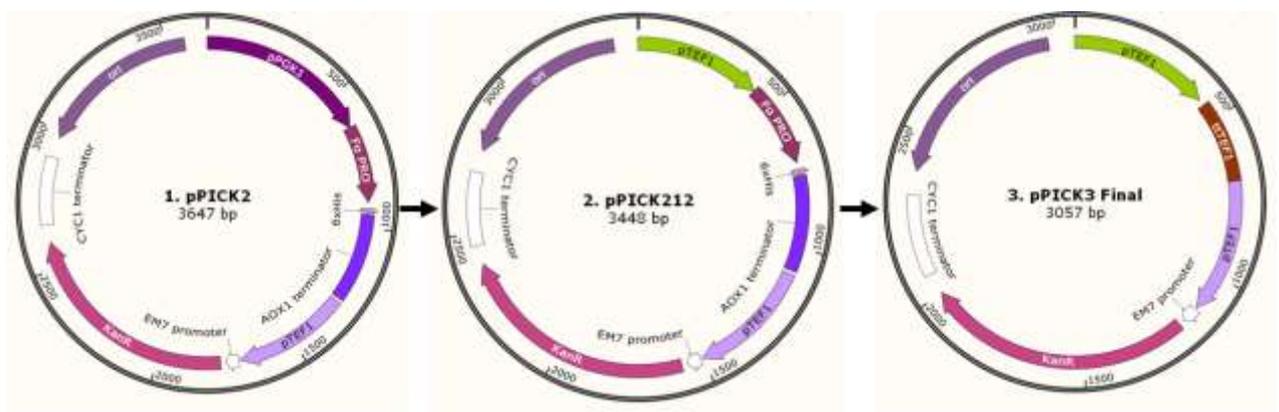


Figura 10. Estratégia para a construção do vetor pPICK3. Este vetor contém as sequências do P_{TEF1} e o *TEF1*tt e a marca de seleção kanamicina para bactérias e geneticina (G418) para leveduras. Na etapa 1 acontece a mudança do promotor do *PGK* pelo promotor do *TEF1* e na segunda etapa a mudança do terminador do *AOX1* pelo terminador do *TEF1*.

Tanto o P_{TEF1} quanto o $TEF1tt$ foram amplificados a partir do DNA genômico da linhagem X-33 de *K. phaffii* com os *primers* TEFBGL2-F/TEFBSTBI-R (Figura 11A) ttTEF1-F/ttTEF1-R (Figura 11B) (Vogl et al., 2016).

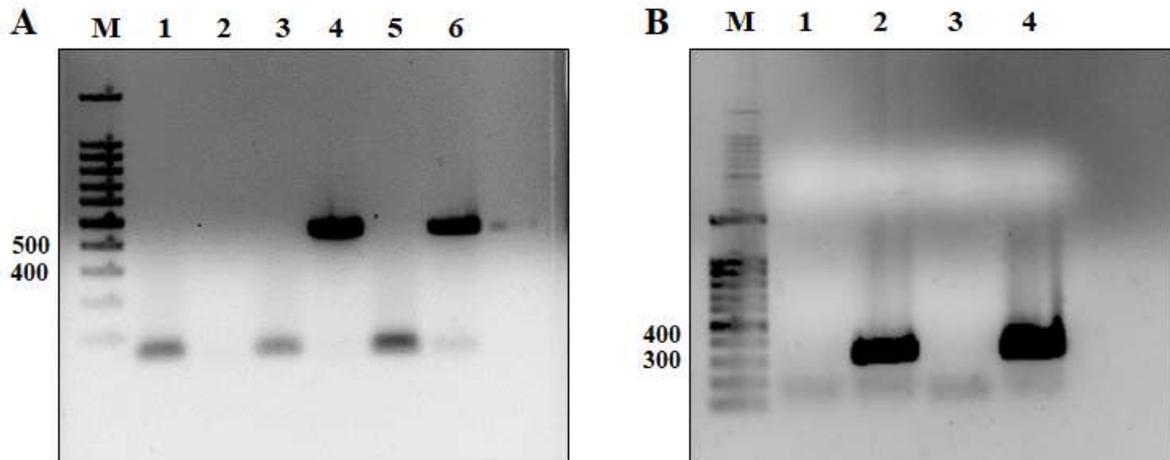


Figura 11. Amplificação de P_{TEF1} e $TEF1tt$ do genoma de X-33. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A. Amplificação do P_{TEF1} (426 pb): Poços 1, 3, 5: controle negativo. Poços 2, 4, 6: Amplificação do fragmento do P_{TEF1} . B. Amplificação do $TEF1tt$ (303 pb): Poços 1, 3: controle negativo. Poços 2, 4: Amplificação do fragmento do $TEF1tt$. M: Marcador 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, EUA).

O vetor pPICK2 foi digerido com as enzimas BglII e BstBI (digestão sequencial), liberando um fragmento de 625 pb que corresponde ao P_{PGK1} . O outro fragmento resultante da digestão (3022 pb) foi purificado a partir do gel de agarose e ligado ao fragmento correspondente ao P_{TEF1} (426 pb), por sua vez amplificado por PCR, digerido e purificado (Figura 11A). Esta ligação deu origem ao vetor intermediário pPICK212, que contém o P_{TEF1} e o $AOX1tt$. O vetor pPICK212 foi digerido com as enzimas BstBI e NotI (digestão sequencial), liberando um fragmento de 664 pb que correspondia ao fator α e ao $AOX1tt$. O outro fragmento resultante da digestão (2784) foi eluído e purificado, sendo utilizado para a montagem por recombinação homóloga com o $TEF1tt$ (303 pb) amplificado por PCR (Figura 11B). O vetor resultante foi nomeado pPICK3 (3057 pb).

Após a transformação de XL10-gold com o sistema de recombinação homóloga e seleção em antibiótico adequado, diferentes clones foram submetidos a extração de plasmídeos por lise alcalina e analisados por digestão com enzimas de restrição. A digestões com as enzimas BglII e BamHI, separadamente, linearizaram o vetor (3057 pb). A Figura 12 mostra o resultado da digestão de dois clones selecionados.

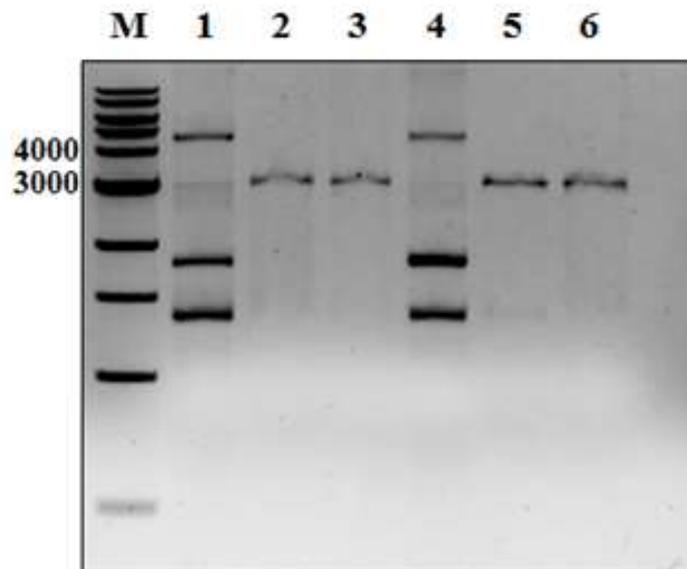


Figura 12. Análise de restrição do vetor pPICK3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio apresentando o DNA plasmidial intacto (1, 4) e digerido com as enzimas BglII (2, 5) e BamHI (3, 6) de 2 clones transformantes. M: Marcador 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

A partir da construção do vetor pPICK3, obteve-se mais um vetor no nosso laboratório com uma combinação diferente de promotor e terminador: foi o primeiro vetor construído com o *TEF1*tt. É muito importante ter uma variedade de vetores com diferentes promotores e terminadores para ter várias opções de escolha a fim de evitar recombinações entre fragmentos indesejados.

5.1.1.2 Construção do vetor pPICK2-PHYBNT-MIT1

O vetor pPICK2-PHYBNT-MIT1 foi construído mediante recombinação homóloga de três partes (Figura 13). A partir do DNA genômico da linhagem de *K. phaffii* X-33, foi amplificada a sequência ZFMIT1 (codificando os primeiros 150 resíduos de aminoácidos da proteína Mit1), contendo regiões de homologia com a sequência *linker* (accggcgcgagcggcgcgggcgggcagcgaaggcggcggcagcgaaggcggcgccaccagcggcgcgaccaccggc) e com o *AOX1*tt (fragmento amplificado de 531 pb, *primers* ZFMIT1-F e ZFMIT1-R) (Figura 14A). O *primer* ZFMIT1-F contém homologia com o *linker* que estará entre PHYBNT e ZFMIT1 e contém um sítio para NdeI que estará dividindo o *linker* e o ZFMIT1. O *primer* ZFMIT1-R contém homologia com o *AOX1*tt (Figura 14A).

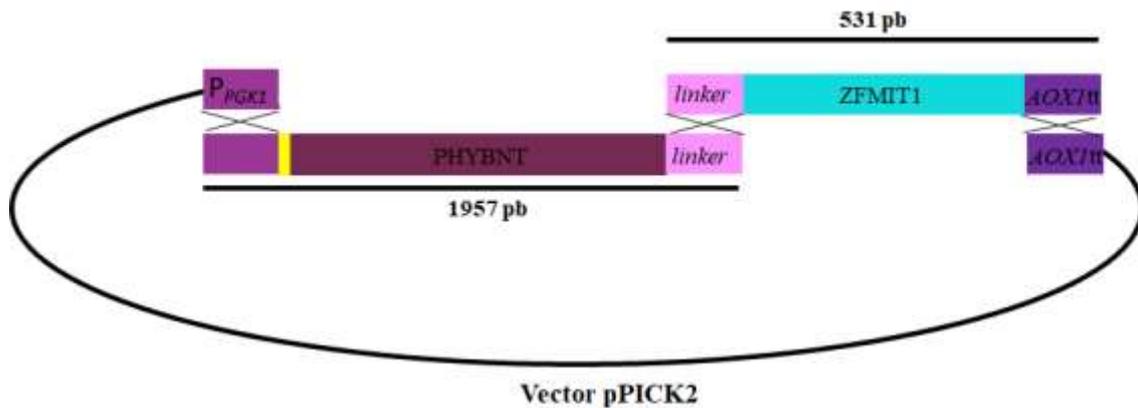


Figura 13. Estratégia para a montagem do vetor pPICK2-PhyBNT-ZFMIT1. O vetor pPICK2-PhyBNT-ZFMIT1 foi montado por recombinação homóloga de três partes.

A amplificação da região N-terminal da proteína PHYB (PHYBNT) foi feita a partir do vetor pD153phyBN (pPHYBNTGal4DBD), gentilmente doado pelo professor Peter Quail (Professor, Research Director, PGEC, Albany, NY, EUA) (Ni et al., 1998). A partir deste vetor, foi feita uma PCR para amplificar a região PHYBNT contendo homologia com o P_{PGK1} e a sequência *linker*, respectivamente (Fragmento amplificado de 1957 pb, *primers* PHYBNT-F e PHYBNT-R) (Figura 14B). O *primer* PHYBNT-F contém homologia com o P_{PGK1} e inclui a sequência Kozak (ACG) do P_{AOX1} e o sinal de localização nuclear (NLS) SV40 (atGCCAAAGAAGAAAAGAAAAGTT) (Weninger et al., 2015). O NLS utilizado foi o do já bem caracterizado antígeno T do vírus símio 40 (SV40), que já foi aplicado em *K. phaffii* com o objetivo de importar para o núcleo uma proteína heteróloga, a RNA polimerase do bacteriófago T7 de procaríotos (Hobl et al., 2013, Weninger et al., 2015). Além de *K. phaffii*, este NLS já foi utilizado com sucesso em *S. cerevisiae* (Nelson and Silver, 1989) e *Schizosaccharomyces pombe* (Fleig et al., 2000). Além do emprego do SV40 em *K. phaffii* para os fins explicados anteriormente, um estudo publicado recentemente utilizou um fator de transcrição fotossensível contendo este SV40 para a construção do primeiro sistema optogenético em *K. phaffii* baseado em EL222, responsivo à luz azul (Wang et al., 2022). O *primer* PHYBNT-R contém homologia com a sequência *linker* projetada para ficar entre o PHYBNT e o ZFMIT1.

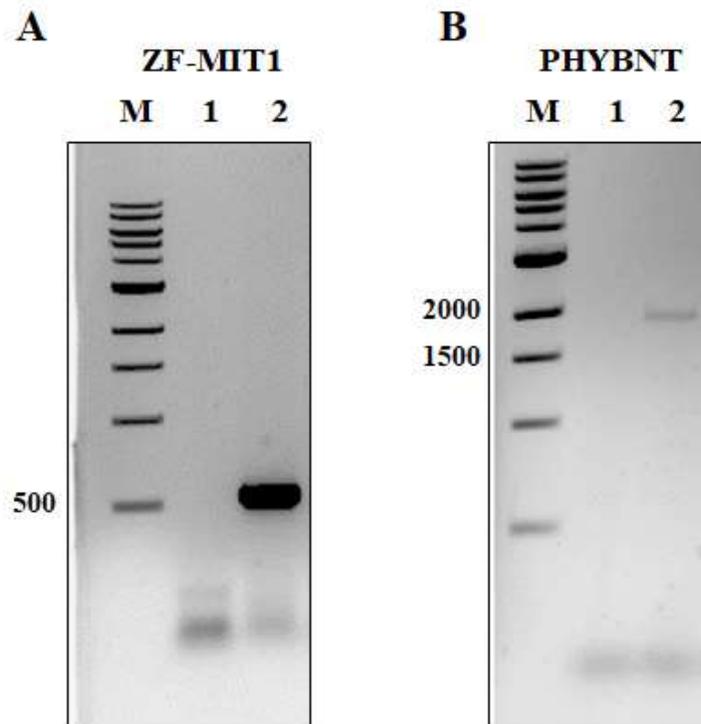


Figura 14. Amplificação do ZFMIT1 e do PHYBNT do genoma de X-33 e do vetor obtido por doação, respectivamente. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A. Amplificação do ZFMIT1 (531 pb) B. Amplificação do PHYBNT (1957 pb). 1: controle negativo da PCR. 2: Amplificação do fragmento correspondente. M: 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Após a amplificação dos dois cassetes (PHYBNT e ZFMIT1), foi construído por recombinação homóloga, junto com o vetor pPICK2 digerido com as enzimas BstBI e NotI, o vetor pPICK2-PHYBNT-ZFMIT1 (5774 pb). Diferentes extrações plasmidiais e digestões utilizando enzimas de restrição permitiram confirmar a clonagem a partir de clones selecionados. Foram feitas digestões com as enzimas BglII e BamHI e com a enzima PvuI. No caso de uma recombinação bem-sucedida, a primeira digestão daria fragmentos de 2358, 2191, 1143 e 82 pb, e a segunda digestão linearizaria o vetor (5744 pb). A Figura 15 mostra o resultado da digestão para os clones selecionados.

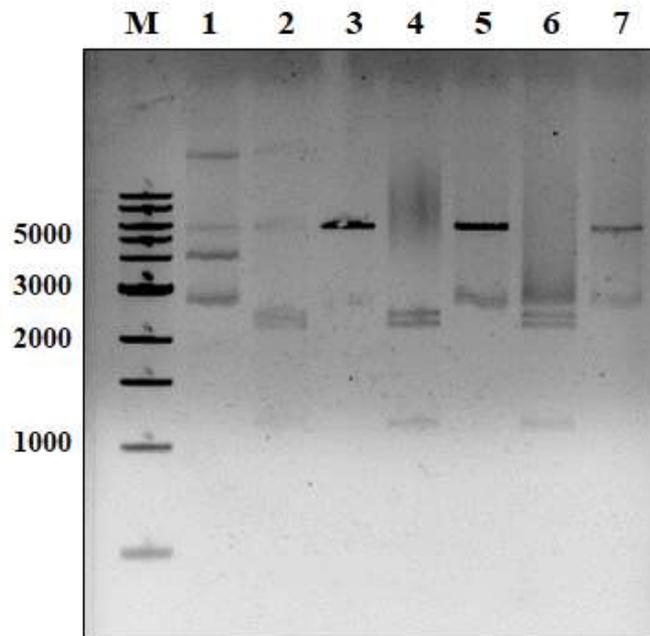


Figura 15. Análise da clonagem, perfil de restrição do vetor pPICK2-PHYBNT-ZFMIT1. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio apresentando o DNA plasmidial intacto (1) e digerido com as enzimas BglIII e BamHI (2, 4, 6) e PvuI (3, 5, 7) para 3 clones transformantes. M: Marcador 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

5.1.1.3 Construção do vetor pPICK3-VP16-PIF3

A partir do vetor pPICK3, foi construído o vetor pPICK3-VP16-PIF3, que contém a proteína PIF3, que responde à luz vermelha, e o domínio de ativação da transcrição VP16, unidos por uma sequência *linker* de 72 pb. A proteína PIF3 foi escolhida para a montagem do sistema optogenético, pois foi demonstrado que o sistema PHYBNT/PIF3 mostrou vantagens significativas sobre os sistemas PHYB/PIF3, CRY2/CIB, TULIPs e PHYB/PIF6 em relação ao controle transcricional, mostrando níveis mais altos de ativação, baixo *background* e controle reversível no vermelho distante (740 nm) (Pathak et al., 2014).

Da mesma forma que o vetor pPICK2-PHYBNT-ZFMIT1, o vetor pPICK3-VP16-PIF3 foi montado por recombinação homóloga de três partes (Figura 16). A sequência VP16 foi amplificada a partir do vetor de expressão pPIC9ΔBGAL4:VP16 (Anexo 2) construído no nosso laboratório (fragmento amplificado de 331 pb, *primers* VP16-F e VP16-R) (Figura 17A). O *primer* VP16-F contém homologia com o P_{TEF1} e o *primer* VP16-R, com a sequência *linker* situada entre o VP16 e o PIF3. Foi publicado recentemente o uso do VP16, no primeiro estudo optogenético em *K. phaffii*, indicando que este fator de ativação pode ser utilizado para a

construção de um sistema optogenético, no caso em questão, um sistema responsivo à luz azul (Wang et al., 2022).

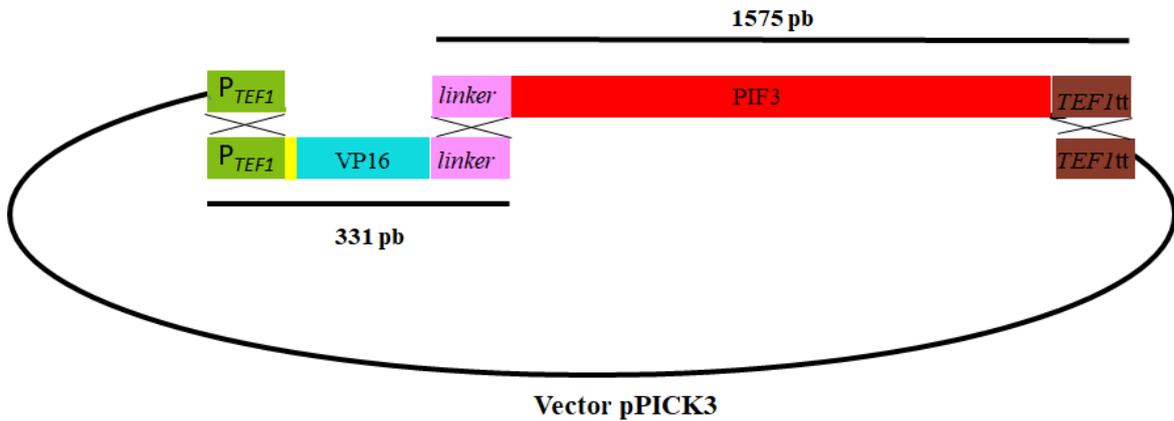


Figura 16. Estratégia para a montagem do vetor pPICK3-VP16-PIF3. O vetor pPICK3-VP16-PIF3 foi montado por recombinação homóloga de três partes.

A amplificação do PIF3 foi feita a partir do vetor de expressão pGAD-PIF3 (pGADPIF3), também doado pelo professor Peter Quail, adicionando sequências de homologia com a sequência *linker* e o *TEF1tt* (Fragmento amplificado de 1575 pb, *primers* PIF3-F e PIF3-R) (Figura 17B). O *primer* PIF3-F contém homologia com a sequência *linker* situada entre VP16 e PIF3 e inclui a sequência Kozak (ACG) e o sinal de localização nuclear (NLS) SV40 (atgCCAAAGAAGAAAAGAAAAGTT) (Weninger et al., 2015). O *primer* PIF3-R tem homologia com o *TEF1tt*.

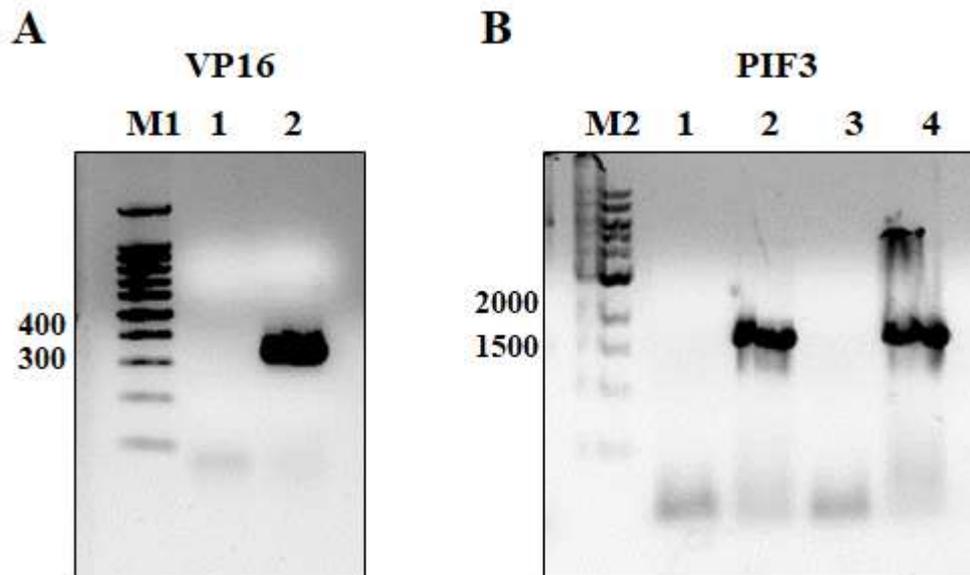


Figura 17. Amplificação das seqüências VP16 e PIF3 do vetor pPIC9 Δ BGAL4:VP16 e do vetor pGAD-PIF3, respectivamente. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A. Amplificação da seqüência VP16 (331 pb) B. Amplificação de PIF3 (1575 pb). 1,3: Controle negativo da PCR. 2,4: Amplificação do fragmento correspondente. M1: Marcador 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, EUA) e M2: Marcador 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Após a amplificação dos dois cassetes, foi construído por recombinação homóloga, juntamente com o vetor pPICK3 digerido com as enzimas BstBI e NotI, o vetor pPICK3-VP16-PIF3 (4961 pb). Foram feitas digestões com as enzimas BglII; ScaI e XbaI; BamHI; XbaI; e SpeI e ScaI para confirmar a clonagem. A Figura 18 mostra o resultado da digestão para os clones selecionados.

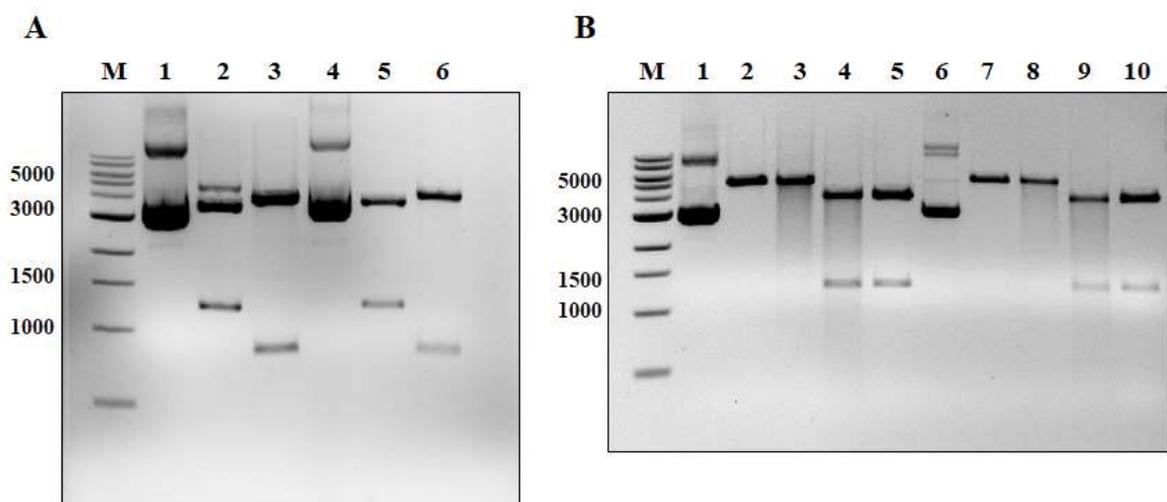


Figura 18. Análise da clonagem, perfil de restrição do vetor pPICK3-VP16-PIF3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio apresentando o DNA plasmidial intacto e digerido com as enzimas BglII, ScaI e XbaI, BamHI, XbaI, e SpeI e ScaI para 2 clones transformantes. A: DNA intacto

(1,4). DNA digerido com BglII (2, 5) e com ScaI e XbaI (3, 6). B: DNA intacto (1,6). DNA digerido com BamHI (2,7), XbaI (3,8), SpeI e ScaI (4,9) e BglII (5,10) M: 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Com estes resultados obtidos, foram construídos os dois vetores contendo as proteínas de fusão para a construção do sistema optogenético na levedura *K. phaffii*.

5.1.1.4 Construção do vetor pPICOPTORED

Uma vez construídos e confirmados os vetores pPICK2-PHYBNT-ZFMIT1 e pPICK3-VP16-PIF3 o próximo passo foi a união deles para formar o vetor final pPICOPTORED, contendo as proteínas que respondem à luz e os elementos de ligação ao DNA e de ativação (Figura 19). O vetor final contém as construções PHYB-ZFMIT1 e VP16-PIF3 sob o controle de diferentes promotores e terminadores. Resumindo, a partir do vetor pPICK2, foi construído o vetor pPICK2-PHYBNT-ZFMIT1, contendo a região codante da região N-terminal da proteína PHYB (aminoácido 1-621) — que responde à luz vermelha — fusionada à região codante do domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição MIT1 (ZFMIT1) (Wang et al., 2016), com uma sequência *linker* de 72 pb. Foi escolhida a versão truncada do PHYB (PHYBNT) pois estudos prévios demonstraram que esta é suficiente para a ligação a PCB e posteriormente ao PIF3 (Pathak et al., 2014).

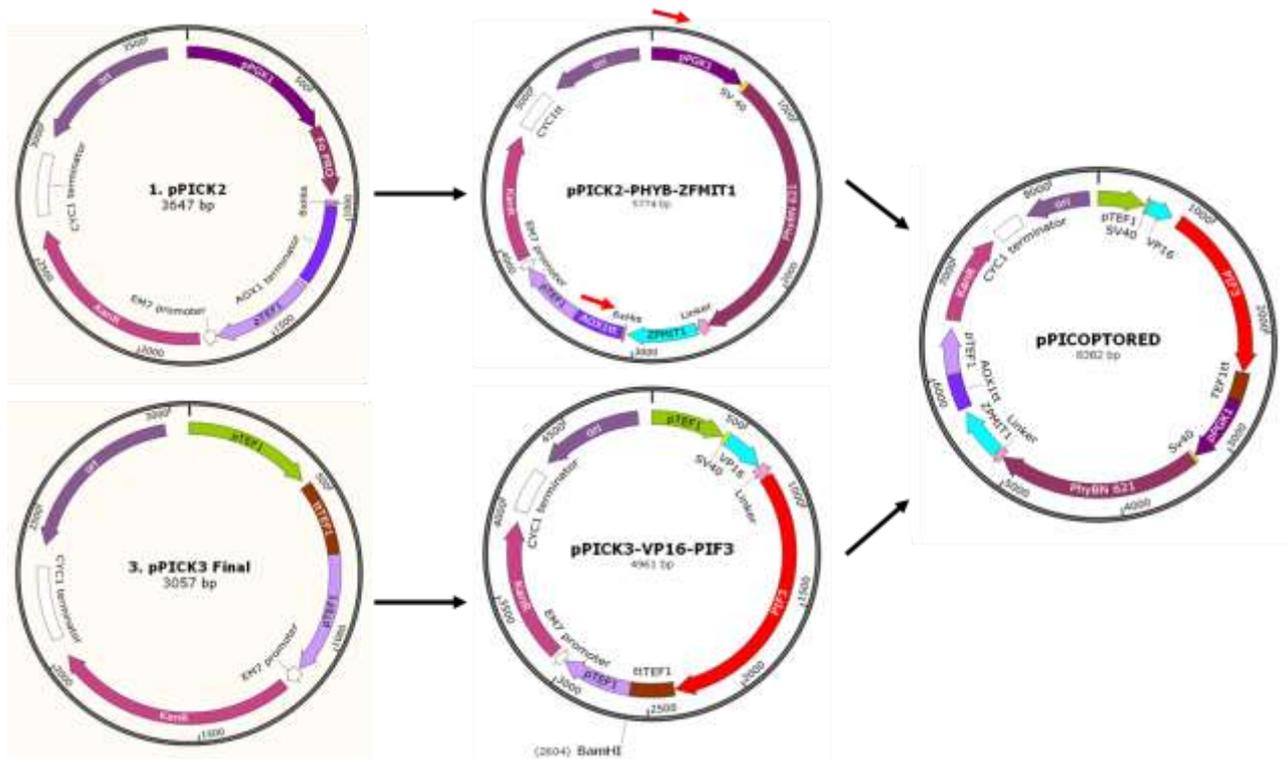


Figura 19. Estratégia para a construção do vetor pPICOPTORED. O vetor pPICK3-VP16-PIF3 (construído a partir do vetor pPICK3) foi digerido com a enzima BamHI e utilizado para fazer recombinação homóloga com o fragmento PPGK1-PHYBNT-ZFMIT1-AOX1tt, amplificado por PCR do vetor pPICK2-PHYB-ZFMIT1 (construído a partir do vetor pPICK2).

A estratégia foi a seguinte: a partir do vetor pPICK2-PHYBNT-ZFMIT1 foi amplificado o fragmento que contém a região com o promotor, a proteína de fusão e o terminador (P_{PGK1} -PHYBNT-ZFMIT1-AOX1tt) com *primers* com homologia com o vetor pPICK3-VP16-PIF3 digerido com a enzima BamHI (*primers* Final-F e Final-R) (Figura 20).



Figura 20. Mapa contendo a região amplificada a partir do vetor pPICK2-PHYBNT-ZFMIT1. Região contendo a região do P_{PGK1} -PHYBNT-ZFMIT1-AOX1tt (3457 pb), amplificada por PCR com os *primers* Final-F e Final-R.

Uma vez amplificada a região de 3457 pb, foi feita recombinação homóloga para obter o vetor final pPICOPTORED (Figura 21).

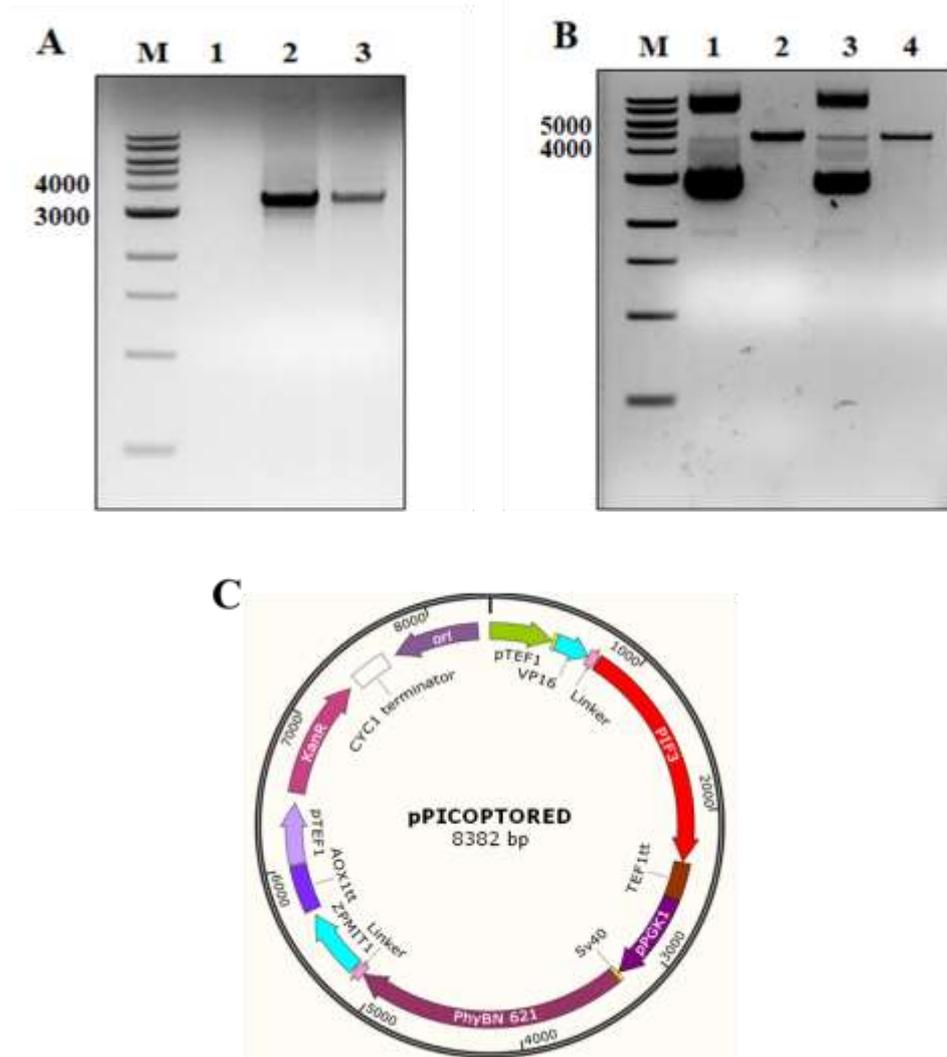


Figura 21. Construção do vetor pPICOPTORED. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A. Amplificação do fragmento P_{PGK1} -PHYBNT-ZFMIT1-AOX1tt (3457 pb) por PCR. B. DNA plasmidial intacto (1, 3) e digerido com a enzima BamHI (2, 4) para 2 clones transformantes. M: 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). C. Mapa físico do vetor pPICOPTORED (8382 pb). Em verde claro, a sequência do promotor do *TEF1*. Em azul turquesa, a sequência do VP16. Em rosa o *linker*, em vermelho, a sequência do PIF3 e em marrom o terminador do *TEF1*. Em roxo o promotor do *PGK1*, em amarelo o sinal de localização nuclear SV40, em roxo claro a sequência do PHYBNT, em azul turquesa o domínio de ligação ao DNA do *MIT1* e em roxo o terminador do *AOX1*. EM rosa o gene de resistência a kanamicina (KanR). Origem de replicação bacteriana é indicada em roxo escuro.

Uma vez feita a recombinação homóloga, a clonagem foi confirmada por digestões com as enzimas BamHI, ScaI e SpeI, e PvuI (Figura 22A,B). Além de digestões, foram feitas confirmações da montagem do vetor pPICOPTORED por PCR (Figura 22C,D).

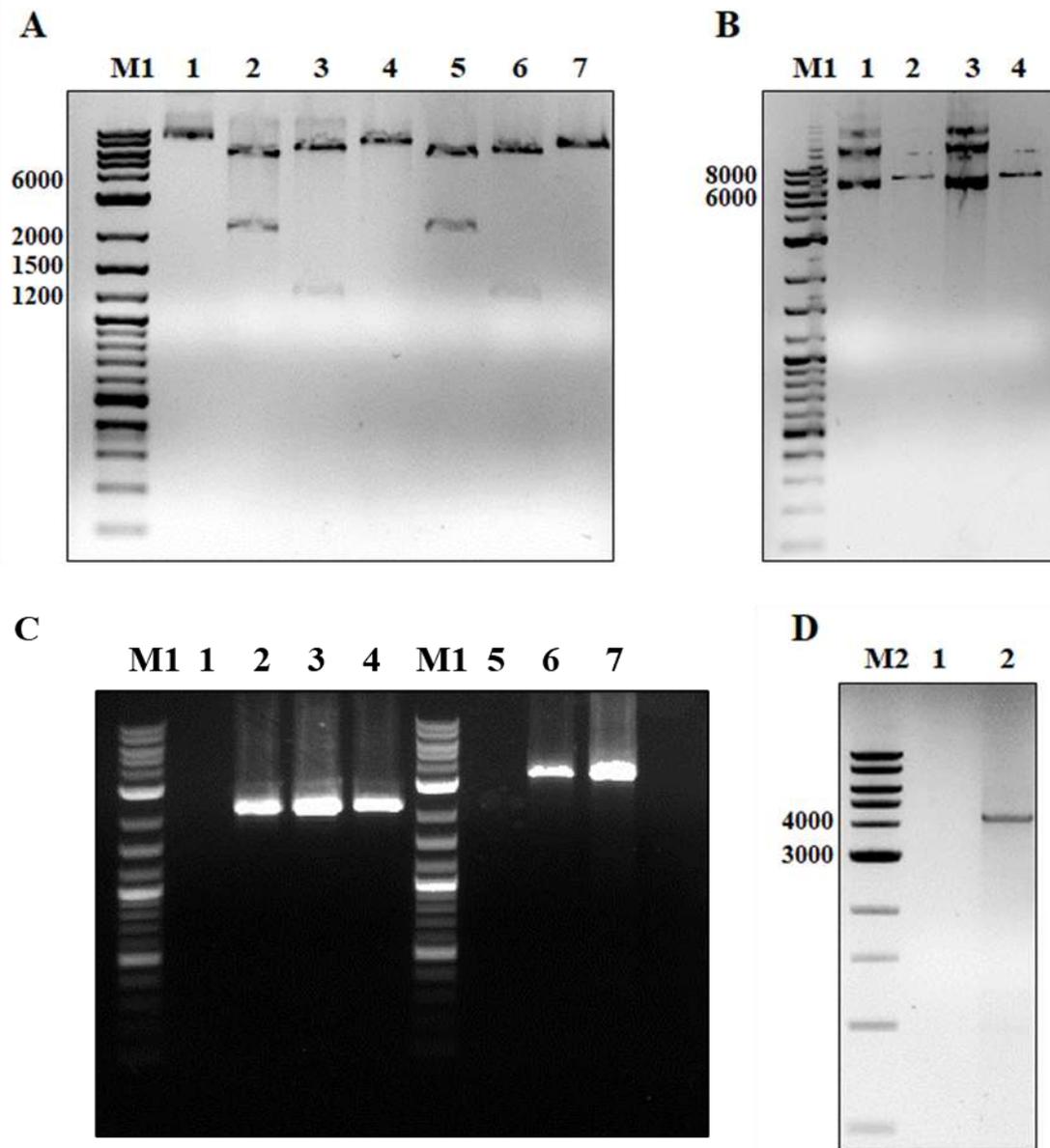


Figura 22. Confirmação da construção do vetor pPICOPTORED. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Análise do perfil de restrição A. DNA plasmidial intacto (1) e digerido com as enzimas BamHI (2,5), ScaI e SpeI (3,6), e PvuI (4,7) para 2 clones transformantes. B. DNA plasmidial intacto (1,3) e digerido com a enzima PvuI (2,4) para 2 clones transformantes. Amplificação por PCR. C. Amplificação por PCR do fragmento PIF3-PHYBNT (2176 pb) (2,3,4) e do fragmento PIF3-PHYBNT (3169 pb) (6,7). Controle negativo (1,3). D. Amplificação do fragmento PIF3-PHYB (2). Controle negativo (1). M1: 2-log DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e M2: 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

5.1.2 Construção do vetor para a expressão de PCB

Para a expressão da PCB é necessária a atuação de duas proteínas, a heme oxigenase (Hy1) e a fitocromobilina ferredoxina redutase (Hy2) presentes normalmente em plantas. Foram escolhidas essas enzimas para a síntese da PCB ao invés das enzimas presentes em cianobactérias, pois em um estudo feito em *K. phaffii*, as enzimas presentes em plantas foram

mais eficazes na síntese deste cromóforo quando comparadas com as correspondentes em cianobactérias (Shin et al., 2014).

Um cassete contendo as sequências dos genes para as duas enzimas, assim como uma região de autoclivagem (T2A1, do vírus *Thosea asigna*) (Geier et al., 2015) e o sinal de localização mitocondrial (MTS) do gene *FUM1* de *K. phaffii* (Shin et al., 2014) (Figura 23) foram sintetizados pela empresa Epoch Life Science (Epoch Life Science, Missouri, TX, EUA).

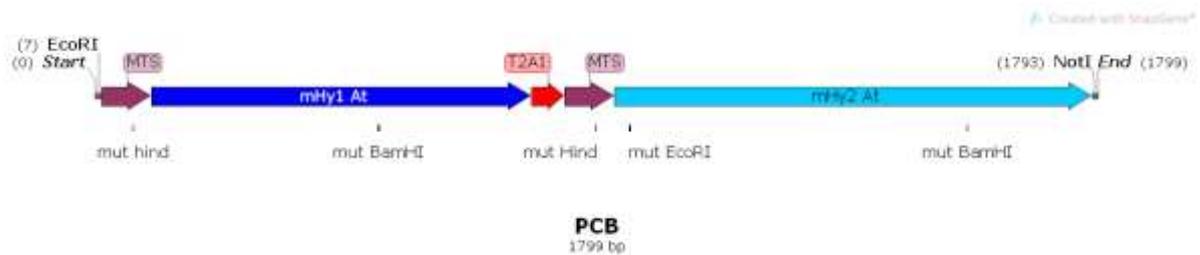


Figura 23. Cassete de expressão para a síntese da PCB em *K. phaffii*. Cassete de expressão contendo o MTS, os genes *mHy1* e *mHy2* e a região de autoclivagem T2A1.

O vetor GS63751-2 pUC_PCB_cassete (Anexo 3) recebido pela empresa Epoch Life Science (Epoch Life Science, Missouri, TX, EUA) foi digerido com as enzimas EcoRI e NotI (1786 pb) e clonado por ligação no vetor pGAPZB (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) digerido com as mesmas enzimas (2882 pb). O vetor resultante, pGAPZB-PCB (4678 pb) (Anexo 4) foi confirmado por digestão com as enzimas XhoI, e EcoRI mais NotI (Figura 24).

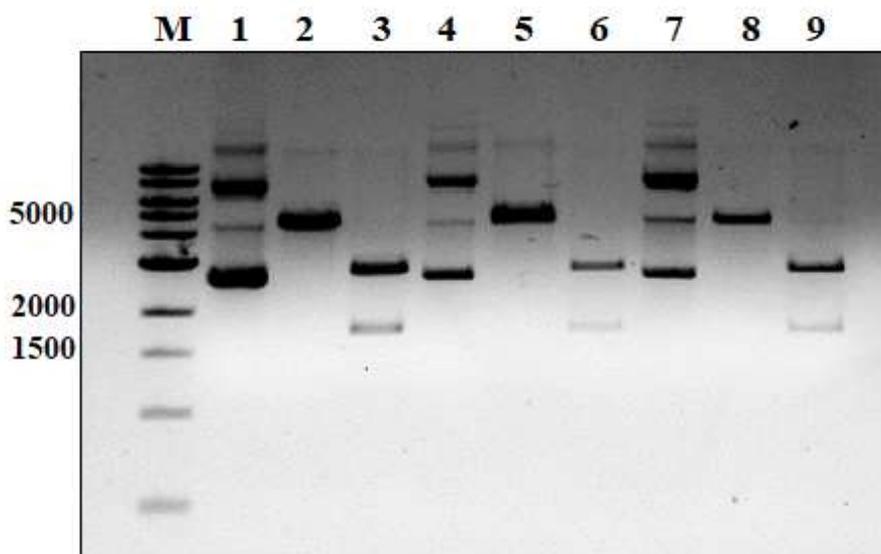


Figura 24. Análise da clonagem, perfil de restrição do vetor pGAPZB-PCB. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio apresentando o DNA plasmidial intacto (1, 4, 7) e digerido com as enzimas XhoI (2, 5, 8) e EcoRI e NotI (3, 6, 9) para 3 clones transformantes. M: 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

5.1.3 Construção e confirmação das diferentes linhagens

Em *K. phaffii*, os cassetes de expressão contendo os elementos de interesse são tipicamente integrados no genoma para a obtenção de clones recombinantes (Vogl et al., 2018). O DNA linearizado, resultando em cassetes do tipo *ends-in*, pode gerar transformantes estáveis de *K. phaffii* via recombinação homóloga entre o DNA transformador e regiões de homologia dentro do genoma (Cereghino and Cregg, 2000). A integração do tipo *ends-in* leva à inserção aditiva do gene alvo, resultando na inserção do fragmento desejado sem deleções (Schwarzshans et al., 2016, Vogl et al., 2018).

Foram utilizados três vetores para a construção de uma linhagem da levedura *K. phaffii* capaz de expressar um gene repórter na presença de luz vermelha. Cada vetor contém um componente para o funcionamento do sistema. Para a avaliação do sistema de expressão optogenético foi utilizado como gene repórter que codifica para a proteína verde fluorescente (EGFP). O *EGFP* encontra-se num vetor sob o controle do P_{AOXI} , construído no nosso laboratório (pAMDS-EGFP) (Anexo 5) (Piva et al., 2018). O gene repórter encontra-se sob o controle do P_{AOXI} pois é especificamente este promotor que será ativado com a luz, ao invés de com seu agente indutor (metanol).

Previamente à transformação, os vetores pPICK2 (3647 pb) e pPICOPTORED (8382 pb) foram linearizados com a enzima PvuI (que digere dentro da região do P_{PGKI}), e os vetores pGAPZB (2900 pb) e pGAPZB-PCB (4618 pb) com a enzima BspHI (que digere dentro da região do P_{GAP}).

A partir da linhagem Xhis23, construída no nosso laboratório, que contém o vetor pAMDS-EGFP, foram construídas todas as linhagens com a presença do gene repórter *EGFP*. Foram construídas diferentes linhagens com cada um dos vetores integrados, contendo as diferentes proteínas, e com vetores vazios. A Tabela 3 mostra todas as linhagens construídas com seus respectivos componentes.

Tabela 3. Linhagens construídas neste trabalho (Parte I). EGFP: vetor pAMDS-EGFP, PHYB-PIF3: vetor pPICOPTORED, PCB: vetor pGAPZB-PCB. + : presença do vetor, O: presença do vetor vazio:- ausência do vetor.

Linhagens	EGFP	PHYB-PIF3	PCB
Xhis23	+	-	-
Xhis23 pPICK2	+	O	-

Xhis23 pPICOPTORED	+	+	-
Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-PCB	+	+	+
Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB	+	+	O
Xhis23 pPICK2 pGAPZB	+	O	O
Xhis23 pPICK2 pGAPZB-PCB	+	O	+
X-33 pPICOPTORED pGAPZB-PCB	-	+	+
X-33	-	-	-

Por outro lado, foram construídas também as linhagens contendo apenas uma das proteínas de fusão e uma linhagem contendo as duas proteínas de fusão, mas sem o gene repórter (Tabela 4).

Tabela 4. Linhagens construídas neste trabalho (Parte II). EGFP: vetor pAMDS-EGFP, PHYB: vetor pPICK2-PHYBNT-MIT1, PIF3: vetor pPICK3-VP16-PIF3, PHYB-PIF3: vetor pPICOPTORED. + : presença do vetor, -: ausência do vetor.

Linhagens	EGFP	PHYB	PIF3	PHYB-PIF3
Xhis23 pPICK2-PHYBNT-MIT1	+	+	-	-
Xhis23 pPICK3-VP16-PIF3	+	-	+	-
X33 pPICOPTORED	-	-	-	+

As diferentes linhagens construídas e mostradas nas Tabelas 3 e 4 foram confirmadas por PCR utilizando DNA genômico como molde, tanto de fragmentos individuais como amplificando regiões que continham mais de um fragmento e as suas junções, para garantir que o cassete estivesse completamente integrado. A correta localização da integração também foi analisada por PCR.

A Figura 25 mostra todas as PCR realizadas para a confirmação da linhagem Xhis23 pPICOPTORED. Foram realizadas PCRs para amplificar os fragmentos VP16 (331 pb, *primers* VP16-F e VP16-R), PHYBNT (1900 pb, *primers* PHYBNT-F e PHYBNT-R), fragmentos dentro das regiões PHYBNT-MIT1 (1922 pb, *primers* qPHYBNT-F e qMIT1 e 2500 pb, *primers* PHYBNT-F e MIT1-R) e VP16-PIF3 (1628 pb, *primers* qVP16-F e qPIF3-R). Para confirmar o local de integração foi realizada uma PCR com um primer que amplifica uma região do *P_{PGK1}* que não está presente na sequência do vetor, já que o vetor apresenta uma versão truncada do promotor (2500 pb, *primers* PGKD8 e PHYBNT-R) (Arruda et al., 2016).

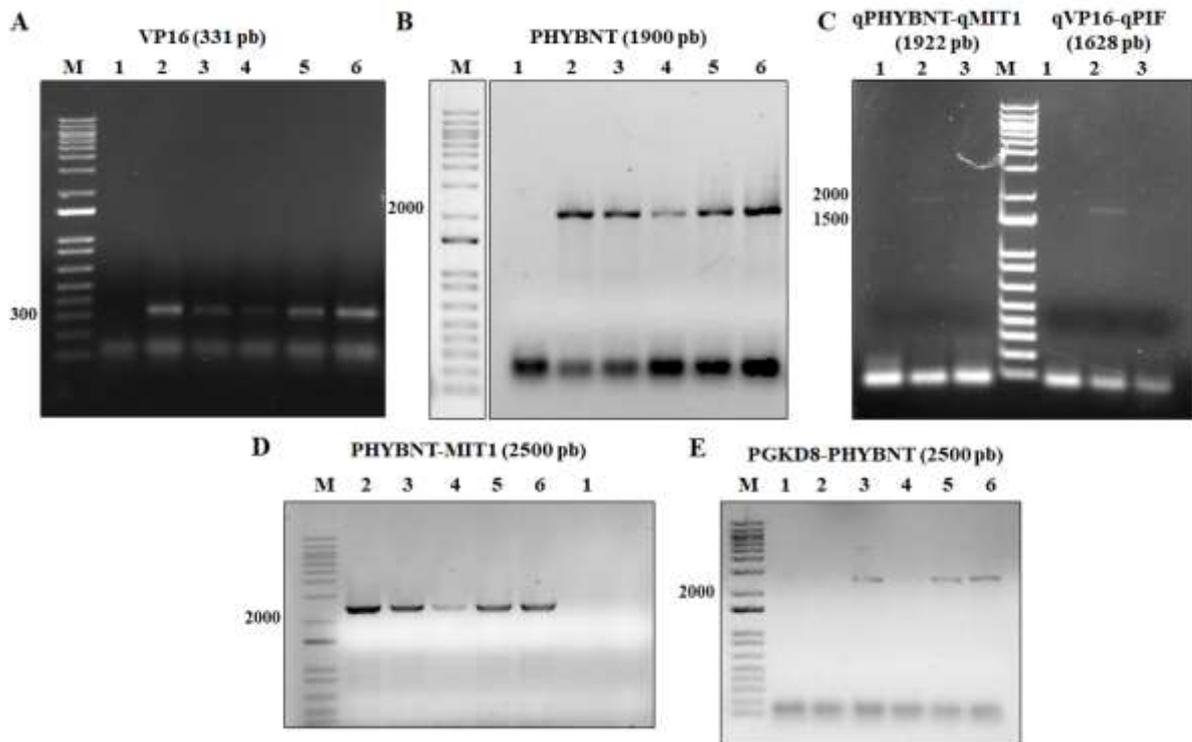


Figura 25. Confirmação da linhagem Xhis23 pPICOPTORED. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação das regiões: A. VP16 (331 pb) B. PHYBNT (1900 pb) C. PHYBNT-MIT1 (1922 pb) e VP16-PIF3 (1628 pb) D. PHYBNT-MIT1 (2500 pb) E: PGKD8-PHYBNT (2500 pb). Controle negativo (1). Fragmento amplificado (2-6). M: Marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

As linhagens Xhis23 pPICK2 pGAPZB e Xhis23 pPICK2 pGAPZB-PCB foram confirmadas com uma PCR com os *primers* que anelam no começo do P_{GAP1} e no final do $AOX1tt$. Como esses vetores foram linearizados para a transformação justamente dentro da sequência do promotor e o fragmento que corresponde ao cromóforo PCB clonado dentro dessa combinação de promotor-terminador, essa PCR pode confirmar tanto a integração do fragmento desejado quanto a integração no local certo. Para o caso da linhagem Xhis23 pPICK2 pGAPZB, que possuía o vetor pGAPZB vazio, se o vetor tivesse sido integrado no *locus GAP1*, a PCR amplificaria um fragmento de 988 pb. Para o caso da linhagem Xhis23 pPICK2 pGAPZB-PCB, como ela apresenta o vetor contendo o cassete para a expressão da PCB, a mesma PCR amplificaria um fragmento de 2700 pb. A Figura 26 mostra o resultado para as duas linhagens.

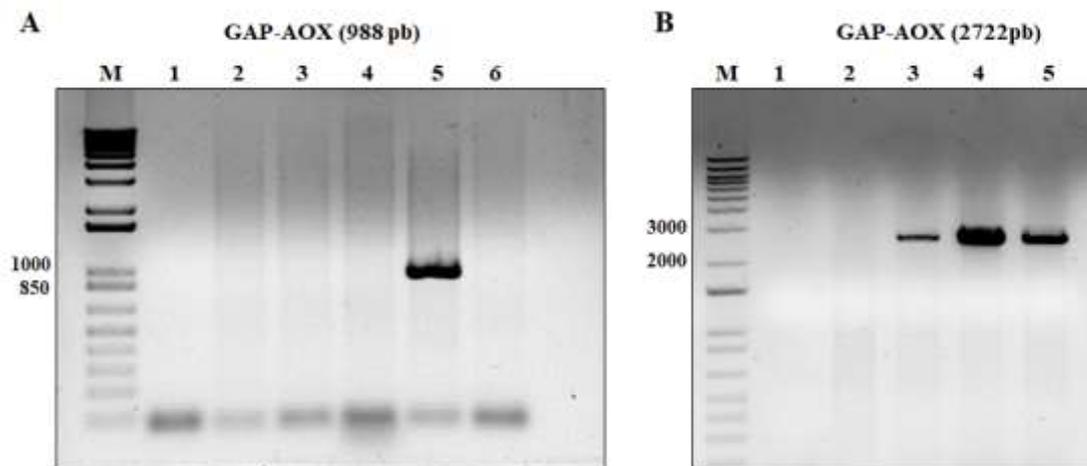


Figura 26. Confirmação das linhagens Xhis23 pPICK2 pGAPZB e Xhis23 pPICK2 pGAPZB-PCB. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação das regiões GAP-AOX na linhagem A. Xhis23 pPICK2 pGAPZB (988 pb) e B. Xhis23 pPICK2 pGAPZB-PCB (2700 pb). Controle negativo (1). Fragmento amplificado (2-6). M: 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

A linhagem Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-PCB é a que contém todos os componentes do circuito optogenético, ou seja, o gene repórter, os cassetes com as proteínas que respondem a luz vermelha com seus respectivos fatores fusionados, e as enzimas para a produção da PCB. Para a confirmação dessa linhagem foram feitas PCR que avaliaram a presença de todos os componentes do sistema. Para confirmar o local de integração foi feita a PCR para amplificar o fragmento PGKD8-PHYBNT (2500 pb) para o caso do vetor pPICOPTORED e os fragmentos GAP-PCBin (1054 pb) e GAP-AOX (2722) para o caso do vetor pGAPZB-PCB. Foi feita também uma PCR para amplificar uma região dentro do PHYBNT (qPHYBNT, 113 pb), uma região dentro do VP16 (qVP16, 110 pb) e outra para amplificar uma região dentro do cassete PHYBNT-MIT1 (qPHYBNT-qMIT1, 1922 pb). A Figura 27 mostra todos os resultados das confirmações da linhagem Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-PCB.

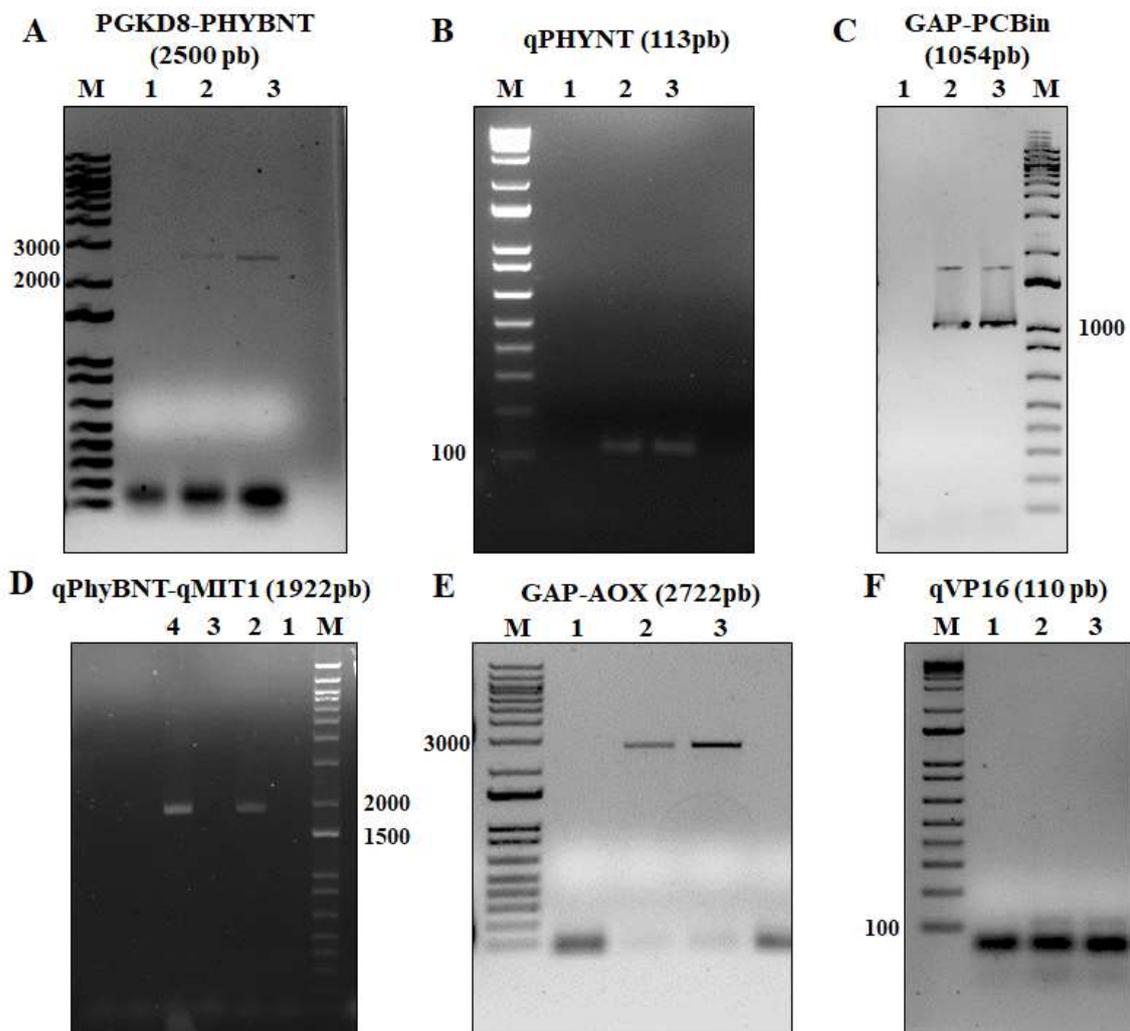


Figura 27. Confirmação da linhagem Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-PCB. Eletroforese em gel de agarose 1% (A-E) ou 2% (F) corado com brometo de etídio. Amplificação das regiões: A. PGKD8-PHYBNT (2500 pb) B. qPHYBNT (113 pb) C. GAP-PCBin (1054) D. qPHYBNT-qMIT1 (1922 pb) E: GAP-AOX (2722 pb) e E: qVP16 (110 pb). Controle negativo (1). Fragmento Amplificado (2-4). M: 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

A linhagem Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB foi confirmada com duas PCRs. O vetor pGAPZB foi confirmado com a PCR que amplifica o fragmento GAP-AOX (988 pb, *primers* GAPBGL-F e 3'AOX-R) e o vetor pPICOPTORED com a PCR que amplifica o fragmento qPHYB-qMIT1 (1922 pb, *primers* qPHYBNT-F e qMIT1-R). A Figura 28 mostra os resultados da confirmação por PCR.

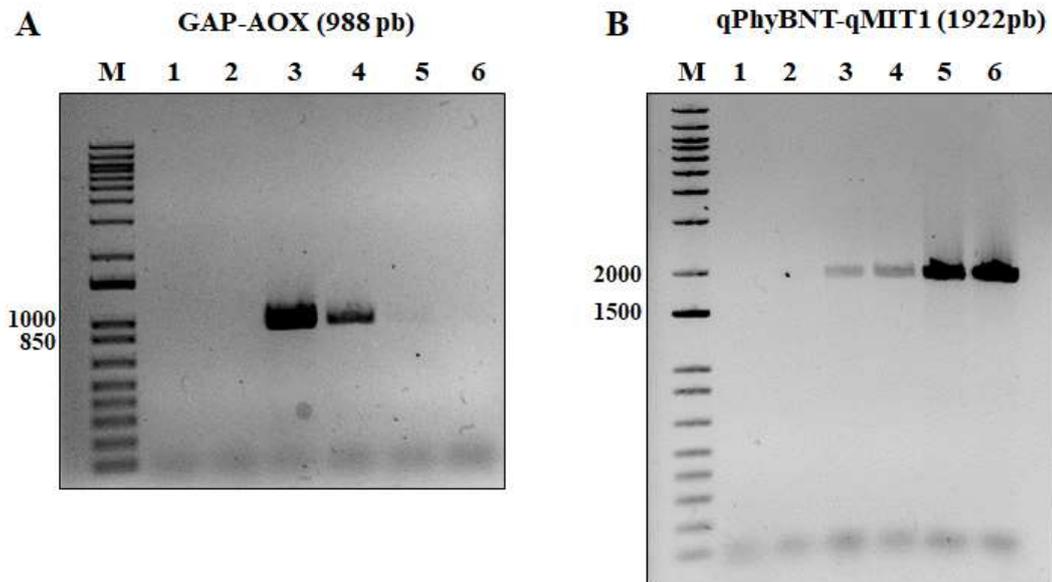


Figura 28. Confirmação da linhagem Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação das regiões A. GAP-AOX (988 pb) e B. qPHYBNT-qMIT1 (1922 pb). Controle negativo (1). Fragmento amplificado (2-6). M: 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Todas as linhagens que apresentam o gene repórter contêm o vetor pAMDS-EGFP. Para confirmar a presença do *EGFP* foi feita uma PCR (190 pb, *primers*: EGFP-F e EGFP-R) nas diferentes linhagens (Figura 29).

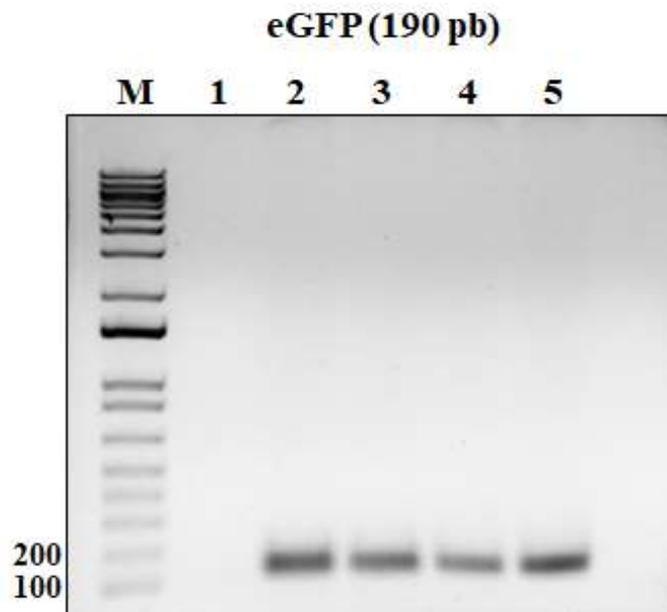


Figura 29. Confirmação da presença do *EGFP* nas diferentes linhagens. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação do *EGFP* (190 pb) com os *primers* EGFP-F e EGFP-R nas linhagens Xhis23 (2), Xhis23 pPICOPTORED (3) e Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-

PCB (4 e 5). Controle negativo, sem DNA (1) M: 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

A linhagem Xhis23 pPICK2-PHYBNT-MIT1 foi confirmada com duas PCRs. O vetor pPICK2-PHYBNT-MIT1 foi confirmado com a PCR que amplifica o fragmento PGKD8-PHYBNT (2500 pb, *primers* PGKD8 e PHYBNT-R) e com a PCR que amplifica o fragmento qPHYBNT-qMIT1 (1922 pb, *primers* qPHYBNT-F e qMIT1-R). A Figura 30 (A e B) mostra os resultados da confirmação por PCR. A linhagem Xhis23 pPICK3-VP16-PIF3 foi confirmada com três PCRs. O vetor pPICK3-VP16-PIF3 foi confirmado com a PCR que amplifica o fragmento VP16-PIF3 (1970 pb, *primers* VP16-F e PIF3-R), com a PCR que amplifica o fragmento qVP16-qPIF3 (1628 pb, *primers* qVP16-F e qPIF3-R) e com a PCR que amplifica o fragmento VP16 (331 pb, *primers* VP16-F e VP16-R). A Figura 30 (C-E) mostra os resultados das confirmações por PCR.

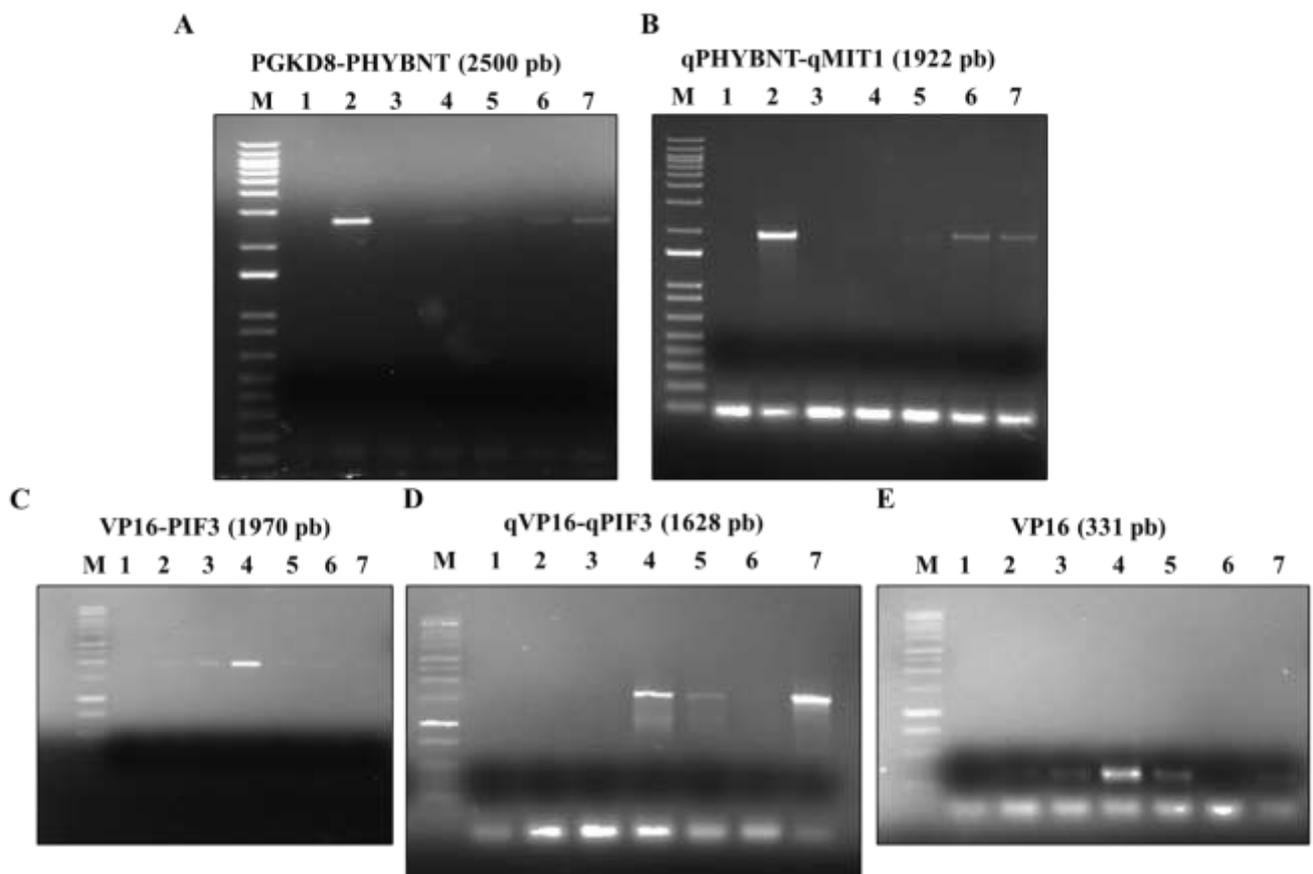


Figura 30. Confirmação das linhagens Xhis23 pPICK2-PHYBNT-MIT1 e Xhis23 pPICK3-VP16-PIF3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação das regiões A. PGKD8-PHYBNT (988 pb) e B. qPHYBNT-qMIT1 (1922 pb) da linhagem Xhis23 pPICK2-PHYBNT-MIT1 e C. VP16-PIF3 (1970 pb), D. qVP16-qPIF3 (1628) e E. VP16 (331 pb). Controle negativo (1). Fragmento amplificado (2-7). M: 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) ou 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

5.1.4 Análise da expressão: extração de RNA, tratamento com DNase I e RT-PCR

A extração de RNA é o primeiro passo para estudos de expressão gênica e caracterização de transcritos (King, 2010). Uma vez construídas e confirmadas todas as linhagens de *K. phaffii* para a construção do sistema optogenético, foram escolhidas as linhagens Xhis23, Xhis23 pPICOPTORED e Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-PCB para a extração de RNA e avaliação da transcrição de diferentes genes presentes no sistema. Para verificar a integridade do RNA extraído as amostras foram analisadas em gel de agarose 0.8%. A Figura 31 mostra o resultado da extração de RNA antes e após o tratamento com DNase I, para diferentes clones de algumas linhagens escolhidas.

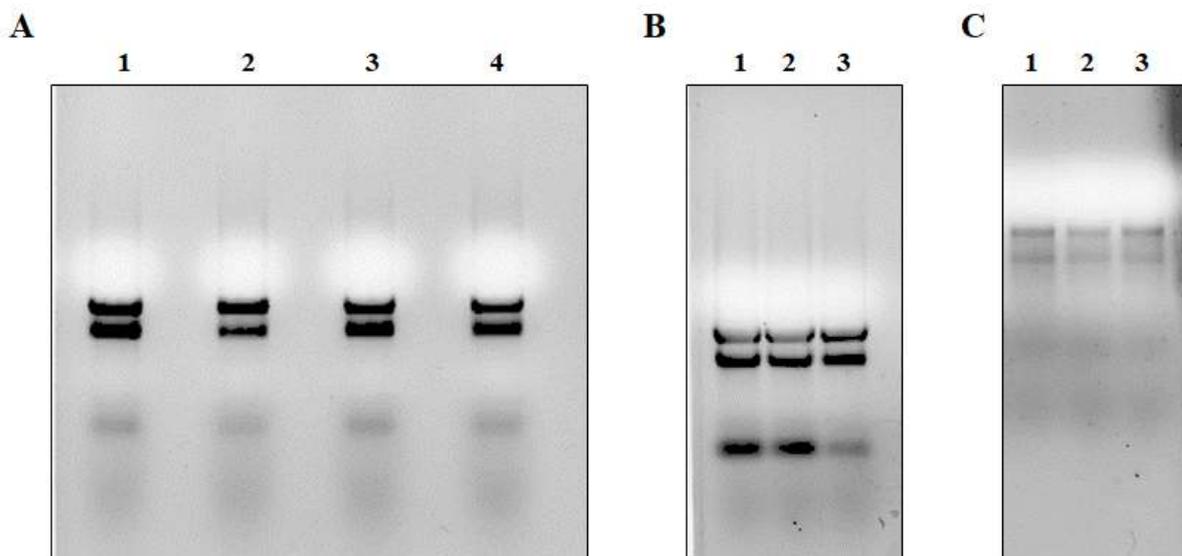


Figura 31. Extração de RNA e tratamento do RNA com DNase I. Eletroforese em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio. RNA extraído antes (A, B) e após o tratamento com DNase I (C) de clones das linhagens Xhis23 (1), Xhis23 pPICOPTORED (2) e Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-PCB (3, 4).

Uma vez obtido o RNA total para cada linhagem, e tratado com DNase I para eliminar todos os possíveis restos de DNA, o cDNA foi obtido utilizando como primer 3' um oligonucleotídeo rico em timina (oligo dT) para amplificar sequências de mRNA que possuíam caudas poli-A. A partir deste material, foi feita uma PCR convencional utilizando diferentes pares de primers de acordo com a região a ser amplificada. Foram utilizados primers para amplificar regiões dentro da sequência do *PHYBNT*, do *PIF3* e do *mHy1*. Como controle, foi feita uma PCR usando como molde o RNA sem tratamento com transcriptase reversa (controle negativo). A Figura 32 mostra o resultado para todas as regiões amplificadas.

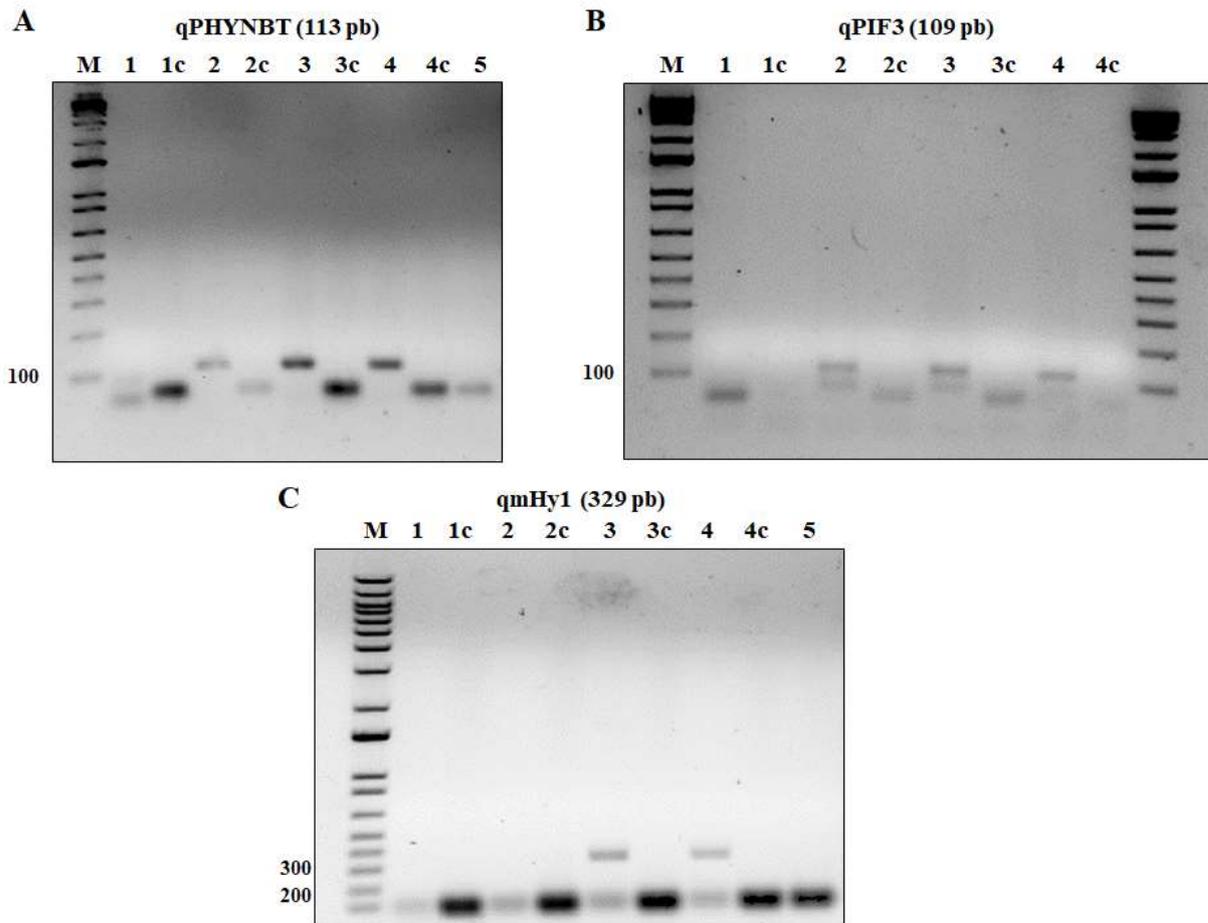


Figura 32. Análise da expressão dos genes *PHYBNT*, *PIF3* e *mHy1* nas linhagens Xhis23 (1), Xhis23 pPICOPTORED (2) e Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-PCB (3,4). Eletroforese em gel de agarose 1% (C) ou 2% (A, B) corado com brometo de etídio. Controle (c). M: Marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA)

Os resultados da Figura 32 evidenciam que tanto as proteínas que respondem a luz (*PHYBNT* e *PIF3*), quando uma das proteínas necessárias para a síntese da PCB (*mHy1*) estavam sendo expressas nas linhagens onde os respectivos genes foram integrados. Os resultados mostraram que na linhagem Xhis23, como esperado, não foi observada amplificação de nenhuma região, confirmando a ausência de todas essas proteínas.

5.1.5 Avaliação da atividade do gene repórter *EGFP*

Com o objetivo de construir um sistema optogenético capaz de regular a atividade do P_{AOXI} independente de metanol, o vetor que contém o gene repórter (pAMDS-EGFP) apresenta o *EGFP* sob o controle deste promotor. Para avaliar a fluorescência do *EGFP*, foram comparadas a ativação na presença de metanol (seu indutor natural) e na presença de luz vermelha.

5.1.5.1 Indução de *EGFP* na presença de metanol

Todas as linhagens construídas a partir da linhagem Xhis23 apresentam o *EGFP* sob o controle do P_{AOXI} . Para avaliar a atividade do promotor na presença do seu agente indutor, o metanol, foram feitos ensaios de citometria de fluxo e de microscopia de fluorescência. As células foram crescidas inicialmente em glicerol como fonte de carbono e posteriormente na presença de metanol para avaliar a indução de EGFP.

5.1.5.1.1 Fluorescência de EGFP avaliada por citometria de fluxo

A atividade da proteína EGFP foi avaliada na presença de metanol por citometria de fluxo. As diferentes linhagens foram crescidas em meio mínimo na presença de 1% de metanol durante 24 h e as células foram coletadas e preparadas para a citometria de fluxo (Figura 33).

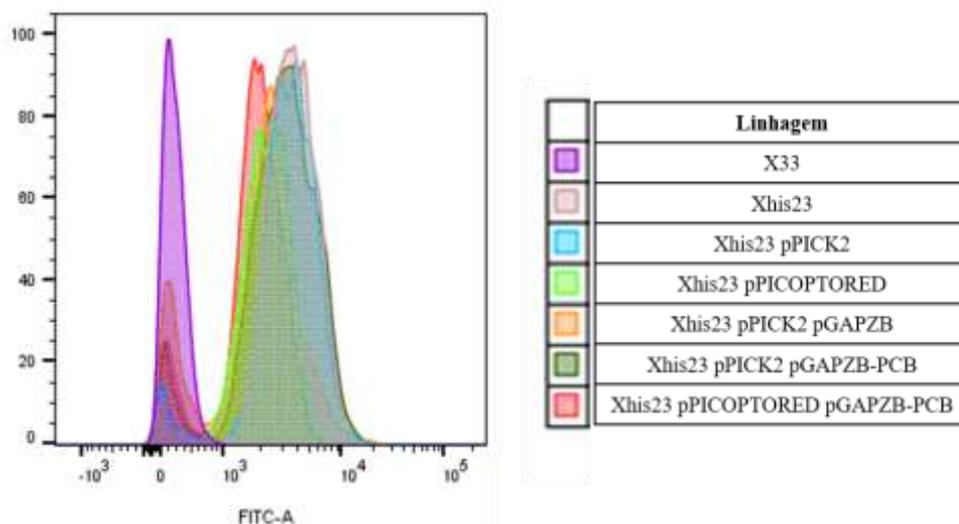


Figura 33. Expressão intracelular de EGFP nas diferentes linhagens. Análise da expressão de EGFP por citometria de fluxo. Xhis23: controle positivo e X-33: controle negativo.

Os resultados observados no experimento de citometria de fluxo confirmaram a atividade da proteína EGFP em todos os clones avaliados. Pode-se observar que todos os clones transformantes das diferentes linhagens apresentam fluorescência quando comparados com a levedura não-transformada (X-33).

5.1.5.1.2 Fluorescência de EGFP avaliada por microscopia de fluorescência.

A atividade da proteína EGFP foi analisada também por microscopia de fluorescência. A Figura 34 mostra os resultados para um clone da linhagem Xhis23 pPICOPTORED e para

dois clones da linhagem Xhis23 pPICOPTORED pGAPZB-PCB, além dos controles positivo (Xhis23) e negativo (X-33) do experimento.

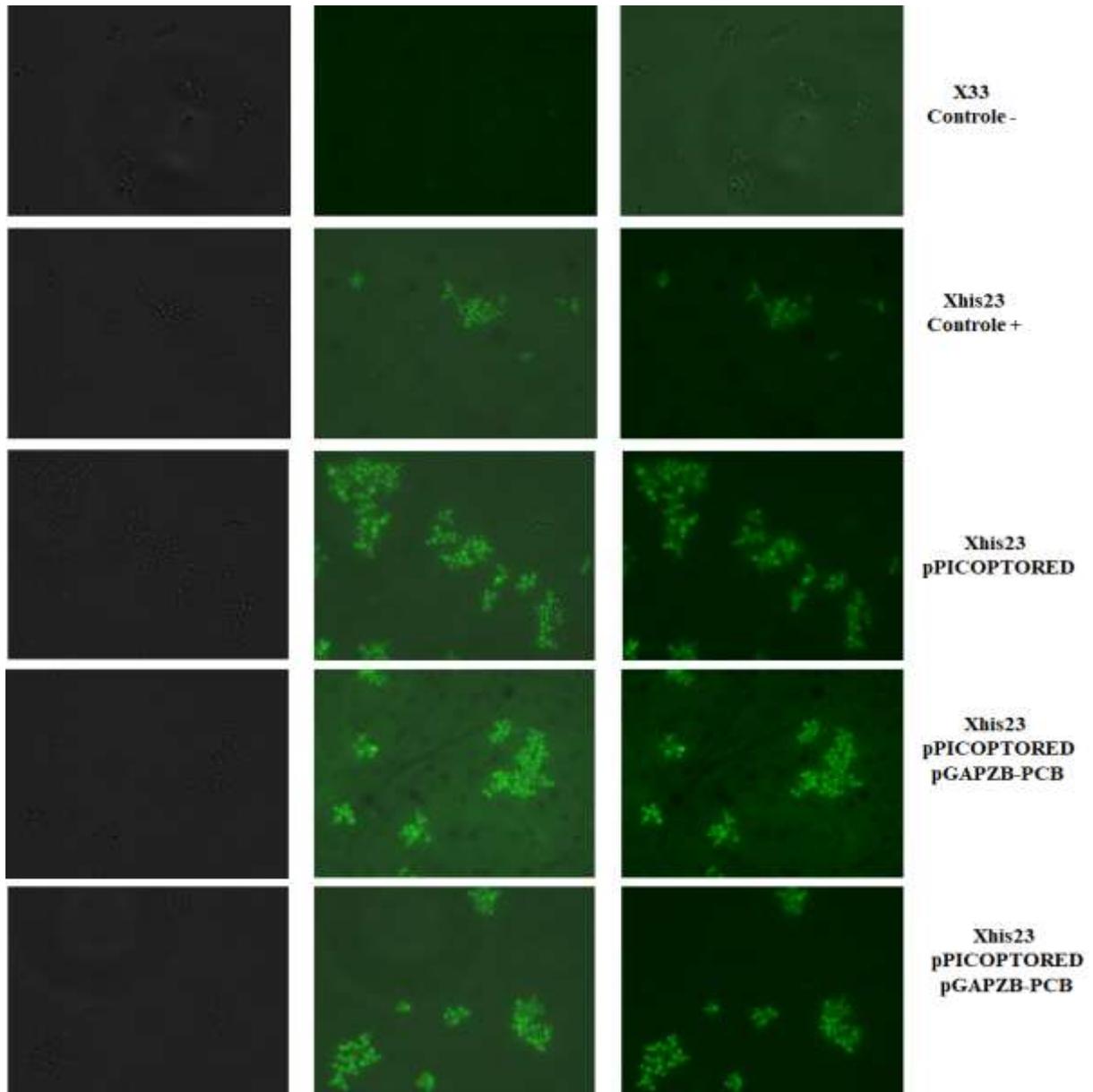


Figura 34. Expressão intracelular de EGFP nas diferentes linhagens. Análise da expressão de EGFP por microscopia de fluorescência na presença de metanol. Xhis23: controle positivo e X-33: controle negativo. Coluna 1: campo claro. Coluna 2: campo fluorescente. Coluna 3: superposição dos campos.

Os dois experimentos para avaliar a atividade de EGFP, tanto por citometria de fluxo quanto por microscopia de fluorescência, reafirmaram que o *EGFP* estava sendo expresso e ativo na presença de metanol como agente indutor, ou seja, sob o controle do P_{AOX1} . O próximo passo foi então avaliar a atividade do gene repórter na presença de luz vermelha (660 nm) como agente indutor.

5.1.5.2 Indução de EGFP na presença de luz vermelha

5.1.5.2.1 Testes iniciais da indução com luz vermelha

Para construir um circuito optogenético funcional é necessária a expressão das proteínas, importação do cromóforo PCB, e a montagem do complexo. Por isso, é necessário testar diferentes condições de preincubação e fotoindução para avaliar qual será a condição ideal para a ativação do sistema. Estudos mostraram que uma condição de ativação eficiente é a preincubação das células com o cromóforo na escuridão e a incubação posterior na presença de luz (Quail, 2002).

A nossa estratégia inicial para a construção de um sistema optogenético em *K. phaffii* incluiu a construção de um vetor contendo os dois genes necessários para a produção da PCB. O objetivo é fazer com que a própria levedura use esse cromóforo necessário para o correto funcionamento do sistema. A produção da PCB já foi testada em vários organismos, incluindo *K. phaffii* (Ge et al., 2013, Muller et al., 2013, Shin et al., 2014, Hochrein et al., 2017).

Para todos os experimentos realizados as células das linhagens com os componentes do circuito optogenético foram crescidas em meio complexo, com glicerol como fonte de carbono. Nos primeiros experimentos realizados para analisar a funcionalidade do circuito os clones escolhidos foram incubados durante diferentes tempos, primeiro uma preincubação no escuro e depois na presença de luz vermelha. Foram coletadas amostras 12 e 24 h após ativar o sistema com a luz vermelha. Após 12 h de indução continua com luz vermelha, não se observou praticamente nenhuma fluorescência nos clones avaliados. Só o controle positivo que apresentou fluorescência. Cabe mencionar que para o controle positivo de fluorescência, a linhagem Xhis23 é crescida em meio com metanol.

A Figuras 35 mostra o resultado do experimento depois de 24 h após indução, respectivamente.

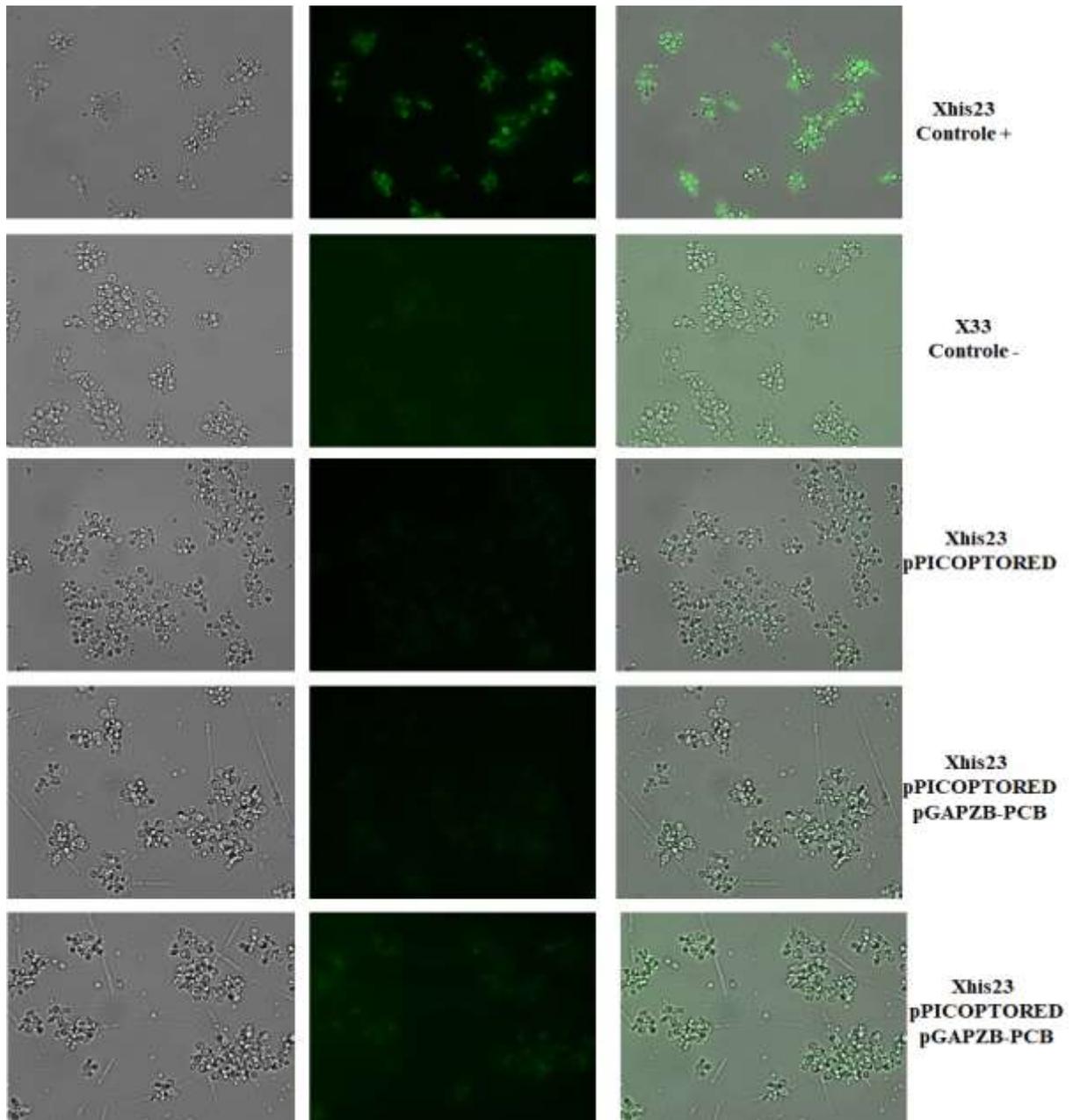


Figura 35. Expressão intracelular de EGFP após 24 h de indução contínua. Análise da expressão de EGFP por microscopia de fluorescência na presença de luz vermelha (660 nm). Xhis23: controle positivo e X-33: controle negativo. As células foram induzidas por 24 h na presença de luz vermelha.

Já após 24 h após o sistema ser ligado, pode-se observar uma determinada fluorescência nos clones avaliados, quando comparado com os controles do experimento (Figura 35). Ainda o controle positivo segue mostrando uma fluorescência superior. Nesses primeiros resultados foram usadas as linhagens construídas no trabalho contendo todos os componentes do sistema, incluídos os genes para a síntese da PCB.

5.1.5.2.2 Indução na presença da PCB exógena

A partir dos resultados apresentados no experimento anterior, decidiu-se utilizar a PCB exógena nos experimentos. O experimento foi feito em meio mínimo com glicerol e foi adicionado a PCB (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) na concentração final de 20 μM na amostra correspondente. As amostras foram incubadas na presença de luz vermelha contínua, e foi avaliada a fluorescência do gene repórter após 24 e 48 horas de incubação.

A Figura 36 mostra os resultados obtidos após 24 horas de indução. Pode-se observar que a linhagem contendo todos os componentes do sistema optogenético e com a adição de PCB (c3 + PCB) mostrou fluorescência no experimento de microscopia. Quando se analisaram os controles, a linhagem Xhis23 crescida em metanol (controle positivo) mostrou fluorescência como esperado. As linhagens X-33 (controle negativo) e a linhagem c3-PCB não mostraram fluorescência.

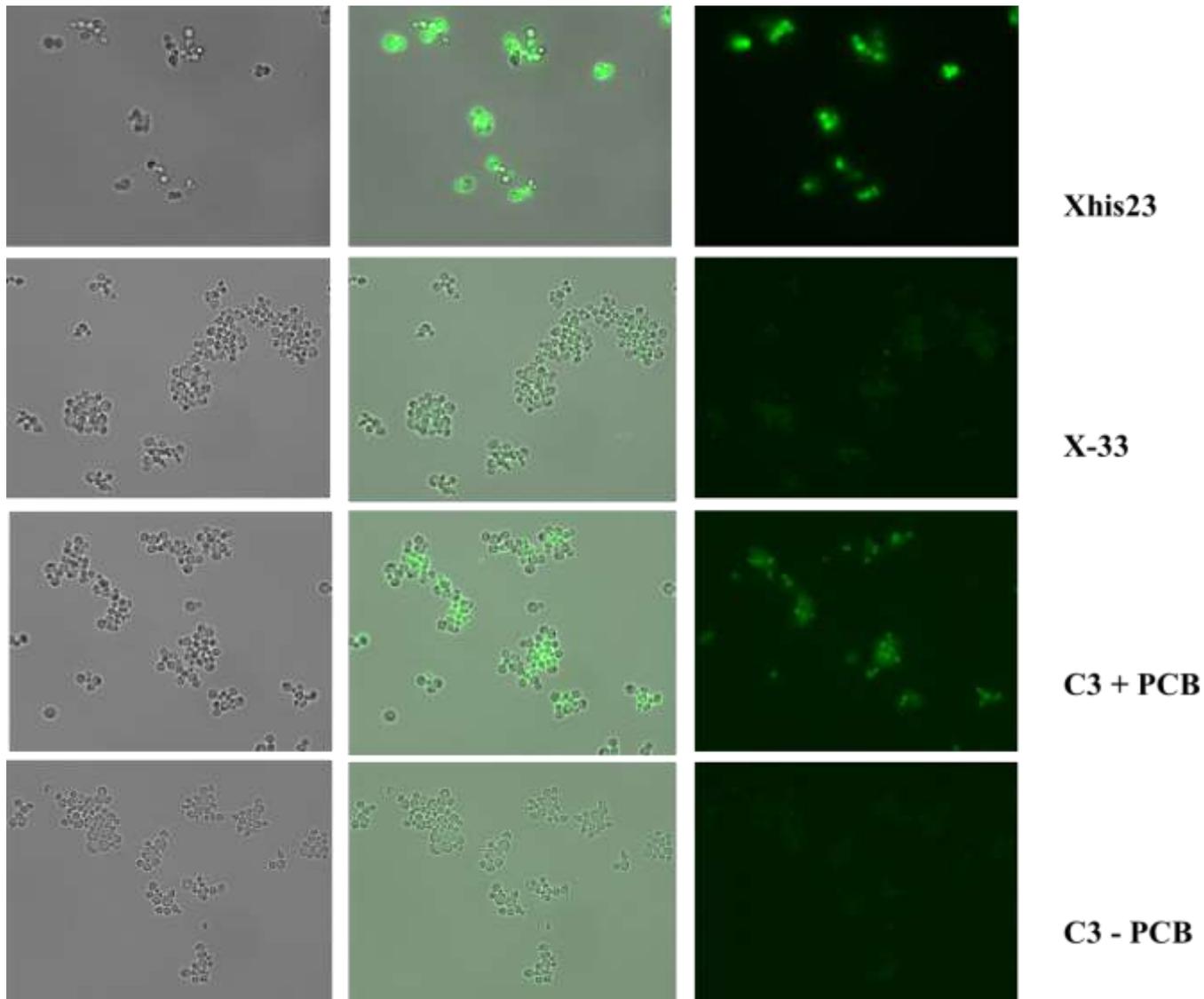


Figura 36. Expressão intracelular de EGFP após 24 h de indução contínua. Análise da expressão de EGFP por microscopia de fluorescência na presença de luz vermelha (660 nm). Xhis23: controle positivo e X-33: controle negativo. Amostras: c3+PCB e c3-PCB

Após 48 horas de indução na luz vermelha, se confirmou o mesmo resultado observado após 24 horas (Figura 37).

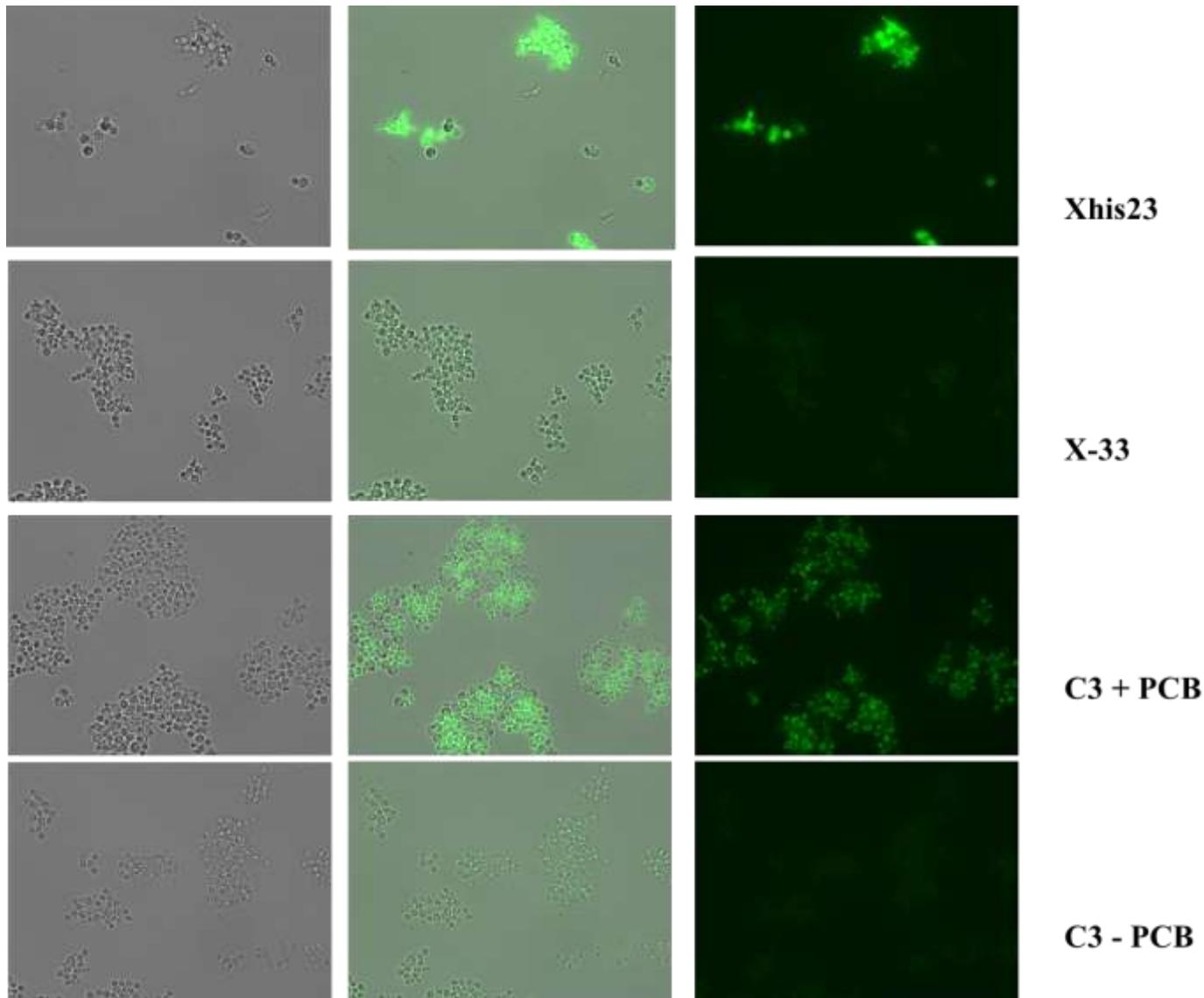


Figura 37. Expressão intracelular de EGFP após 48 h de indução contínua. Análise da expressão de EGFP por microscopia de fluorescência na presença de luz vermelha (660 nm). Xhis23: controle positivo e X-33: controle negativo. Amostras: c3+PCB e c3-PCB

Com estes resultados preliminares, pode-se observar que na presença de PCB e indução na luz vermelha, a amostra c3 mostrou fluorescência a partir de 24 horas de indução e que se manteve durante as 48 horas de indução.

5.1.5.2.3 Indução na presença de PCB exógeno, em diferentes tempos de indução

A partir dos resultados obtidos, foi planejado um novo experimento sob as mesmas condições e os resultados foram analisados também por citometria de fluxo. As linhagens foram crescidas nos seus respectivos meios de cultura e o crescimento foi medido em diferentes

tempos (0 h, 0,5 h, 2 h, 4 h, 6 h 24 h, 30 h, 48 h e 52 h) (Figura 38A). Foram coletadas amostras nos tempos 0 h, 2 h, 6 h, 24 h, 30 h e 48 h para análise por citometria de fluxo (Figura 38B).

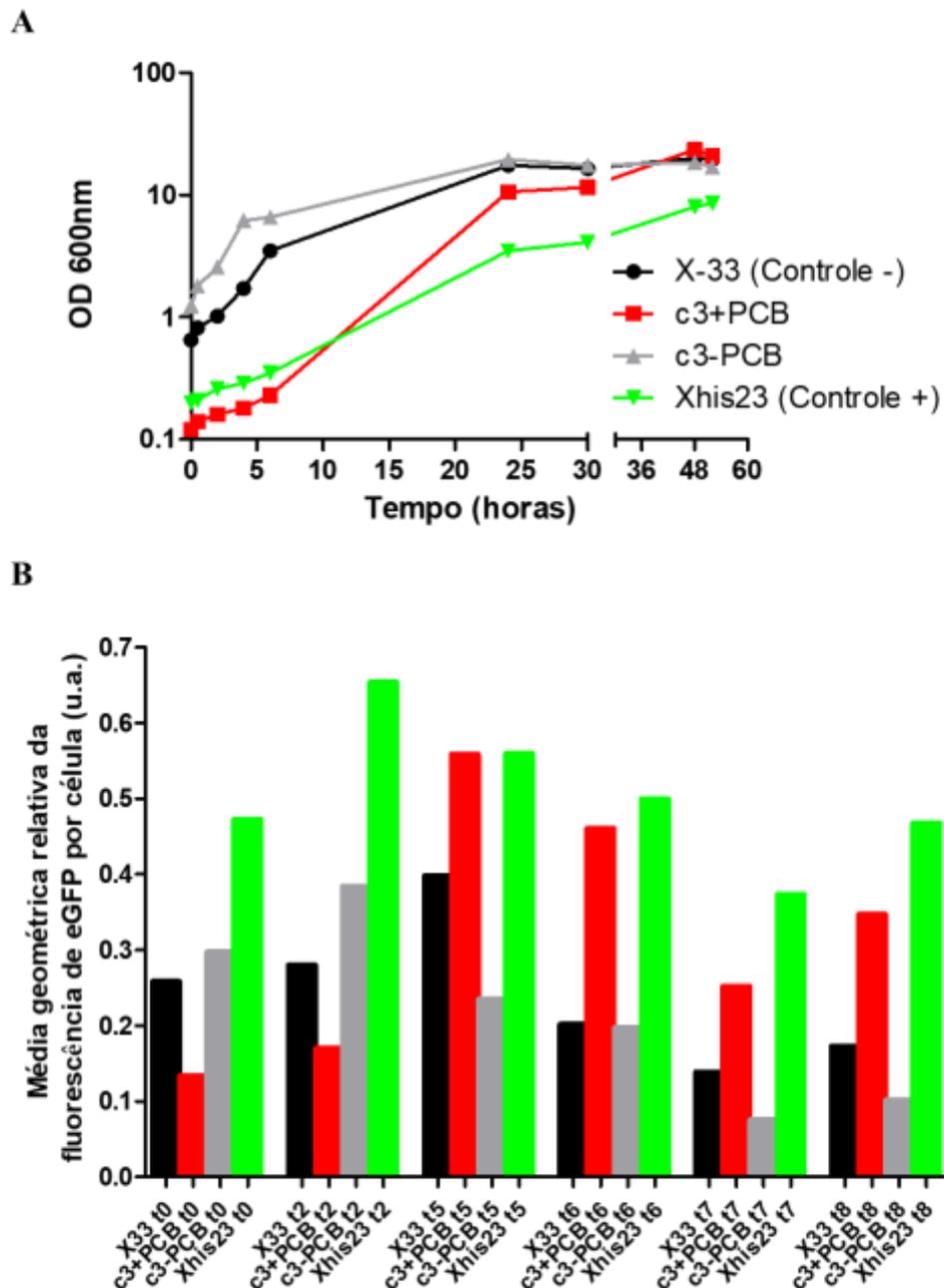


Figura 38. Indução na presença da PCB exógena. A. Curva de crescimento das diferentes linhagens no tempo. B. Análise da expressão de EGFP por citometria de fluxo em diferentes tempos.

Os resultados obtidos da curva de crescimento (Figura 38) mostram que a linhagem controle positivo (Xhis23, crescida em metanol), mostrou menos crescimento que as outras linhagens. Isto faz sentido com o fato de que o metanol inibe o crescimento, então é esperado que na presença deste agente indutor o crescimento seja mais devagar. Por outro lado, nas

linhagens X33 e c3-PCB o crescimento é semelhante, o que indica que a presença dos componentes do sistema optogenético não interferem no crescimento da levedura. A linhagem c3+PCB que apresenta a adição do cromóforo, inicialmente o crescimento é mais lento, mas depois chega na mesma magnitude das outras linhagens. Os resultados da citometria de fluxo (Figura 38) confirmaram os resultados obtidos por microscopia de fluorescência no experimento anterior. Os resultados no tempo t6 (30 h de indução) mostraram uma diferença maior entre a amostra da linhagem c3+PCB e o controle negativo e a amostra c3-PCB e resultados similares quando comparados com o controle positivo.

5.1.5.2.4 Indução da linhagem Xhis23 pPICOPTORED nas diferentes condições

A partir dos resultados obtidos onde se observou fluorescência na linhagem contendo os componentes do sistema optogenético e com a adição da PCB exógena, o próximo experimento incluiu a avaliação dessa linhagem junto com a PCB na presença de luz e no escuro. A mesma linhagem foi utilizada para avaliar as diferentes condições de indução. Ou seja, na presença de metanol como controle positivo, sem PCB como controle negativo e na presença de PCB na luz e no escuro. Todas as amostras foram incubadas inicialmente em meio mínimo com glicerol (com a adição da PCB nas amostras necessárias) e mantidas no escuro durante 18 h. A partir desse tempo, foram induzidas na presença de luz vermelha durante 72 h. A fluorescência foi analisada nos tempos 0 h, 24 h, 48 h e 72 h por citometria de fluxo (Figura 39).

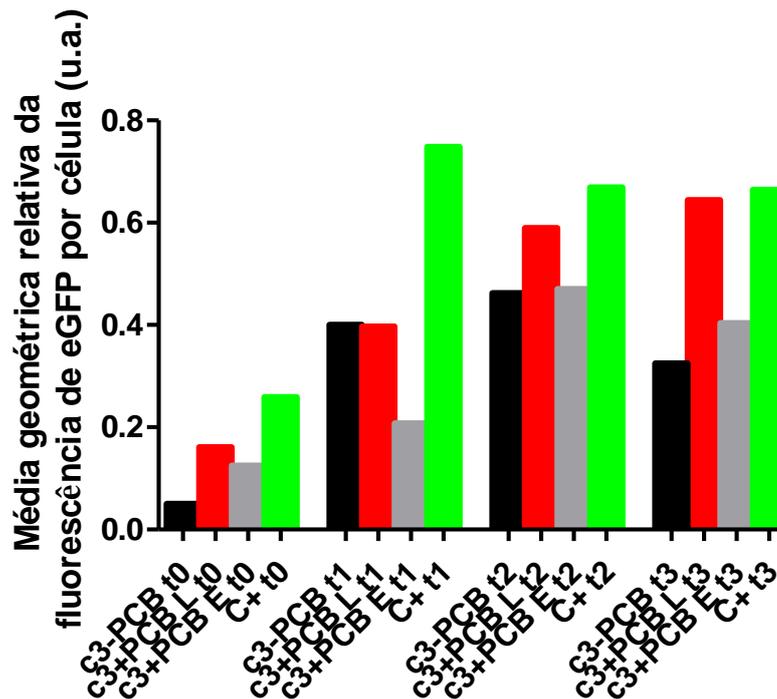


Figura 39. Avaliação da linhagem Xhis23 pPICOPTORED em todas as condições. Análise da expressão de EGFP por citometria de fluxo em diferentes tempos. t0: momento antes de colocar na luz vermelha, t1, t2 e t3: 24 h, 48 h e 72 h respectivamente de incubação na presença de luz vermelha ou no escuro.

Pode-se observar dos resultados obtidos na citometria de fluxo, que a linhagem Xhis23 pPICOPTORED em presença de metanol mostrou fluorescência, a diferença do observado no caso da linhagem crescida em glicerol. Quando observamos a linhagem Xhis23 pPICOPTORED + PCB foi observada fluorescência na amostra na presença de luz, diferentemente da amostra incubada no escuro.

5.1.5.2.5 Indução de todas as linhagens nas diferentes condições

Considerando os resultados obtidos em todos os experimentos anteriores, o próximo passo foi a realização de um experimento contendo todas as linhagens construídas no trabalho nas diferentes condições. Diferentemente dos experimentos anteriores que foram feitos em frascos de 250 mL com um volume final de 20 mL, este último experimento foi feito em placas de 12 poços com um volume final de 1 mL para cada amostra. Todas as linhagens foram incubadas durante 18 horas no escuro e a fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo nos tempos 0 h, 24 h, 48 h, 72 h de exposição (ou não) a luz vermelha. O experimento foi feito em quadruplicata. Neste experimento, além da linhagem Xhis23 pPICOPTORED (metanol, glicerol e com PCB), foram analisadas as linhagens X33 (controle negativo), Xhis23 (metanol,

controle positivo), Xhis23 pPICK2-PHYBNT-MIT1 (linhagem contendo uma proteína de fusão (c1)), Xhis23 pPICK3-VP16-PIF3 (linhagem contendo a outra proteína de fusão (c10)) e X33 pPICOPTORED (linhagem com as duas proteínas de fusão e sem o gene repórter (c45)).

Para observar melhor os resultados, o experimento foi dividido em duas figuras. A Figura 40A mostra os resultados obtidos para o caso dos controles do experimento (controle positivo, ctrole+ e negativo, ctrole-) e a amostra contendo os componentes do sistema optogenético nas condições na Luz (c3 + PCB L) e no Escuro (c3 + PCB E). A Figura 40B mostra as linhagens restantes nas duas condições.

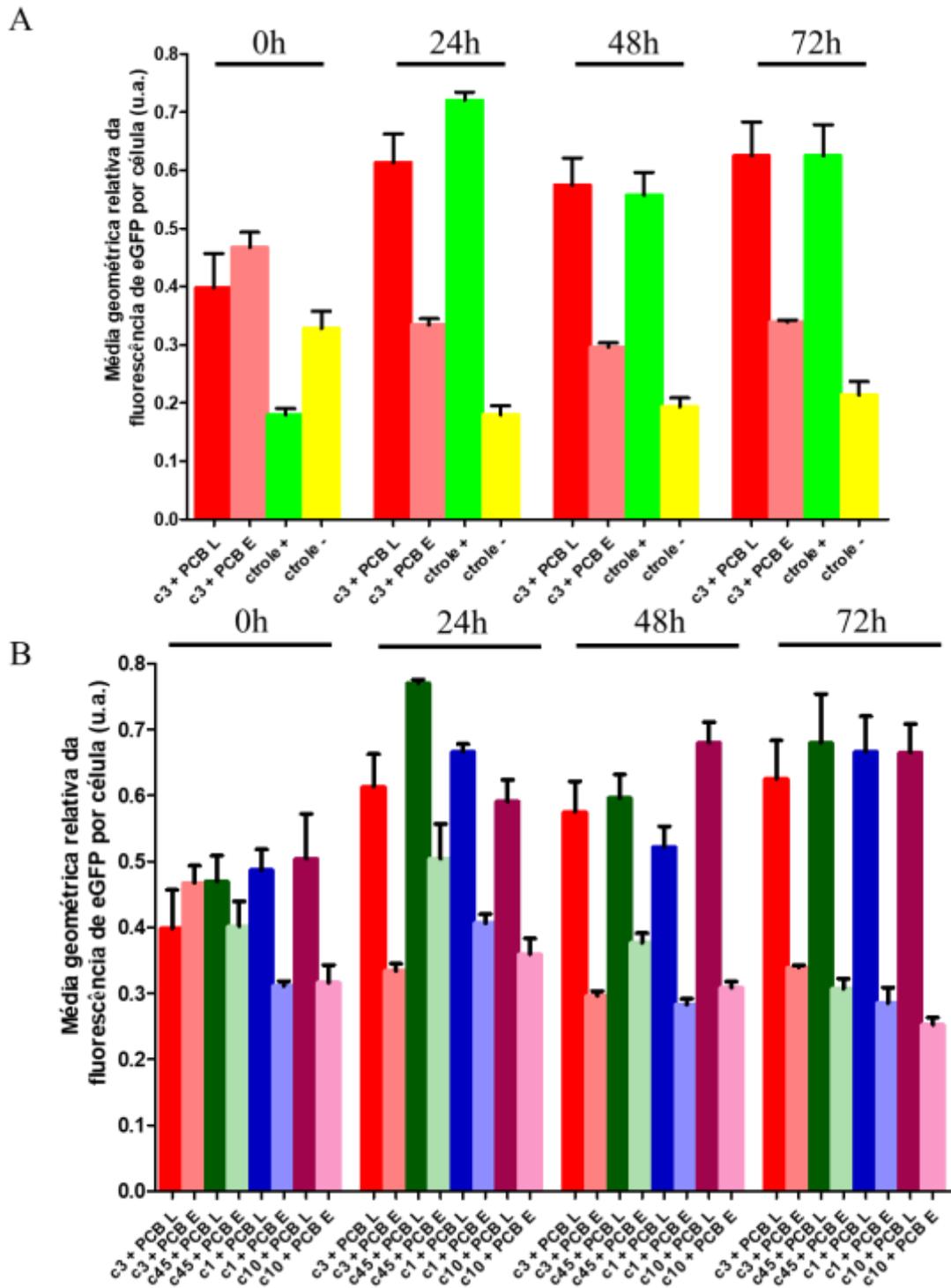


Figura 40. Indução de todas as linhagens nas diferentes condições. Análise da expressão de EGFP por citometria de fluxo nos tempos 0, 24, 48 e 72 h. A. Amostras: c3 + PCB L: linhagem Xhis23 pPICOPTORED na luz; c3 + PCB E: linhagem Xhis23 pPICOPTORED no escuro; ctrole+: linhagem Xhis23, em metanol; ctrole-: linhagem X33. B. Amostras: c3 + PCB L: linhagem Xhis23 pPICOPTORED na luz; c3 + PCB E: linhagem Xhis23 pPICOPTORED no escuro; c45 + PCB L: linhagem X33 pPICOPTORED na luz; c45 + PCB E: linhagem X33 pPICOPTORED no escuro; c1 + PCB L: linhagem Xhis23 pPICK2-PHYBNT-MIT1 na luz; c1 + PCB E: linhagem Xhis23 pPICK2-

PHYBNT-MIT1 no escuro; c10 + PCB L: linhagem Xhis23 pPICK3-VP16-PIF3 no escuro; c10 + PCB L: linhagem Xhis23 pPICK3-VP16-PIF3 no escuro.

A partir destes resultados pode-se observar que, à diferença dos resultados dos experimentos anteriores, quando analisamos a fluorescência incluindo todos os controles do experimento, todas as linhagens onde foi adicionada a PCB apresentaram fluorescência quando na presença de luz vermelha. Ou seja, alguma interferência está acontecendo com a adição do cromóforo, o que fez todas as linhagens fluoescerem.

A partir de todos os resultados obtidos na construção e implementação de um sistema optogenético em *K. phaffii*, o objetivo foi entender os possíveis fatores que levaram ao não funcionamento do nosso sistema. O vetor utilizado, contendo todos os componentes do sistema, foi o vetor pPICOPTORED, vetor integrativo que compreende as duas proteínas de fusão que compõem o sistema optogenético. Um estudo recente em *S. cerevisiae* utilizando um sistema responsivo à luz azul (CRY2/CIB1) que também utilizou as duas proteínas de fusão na mesma construção integrativa (no caso, no *locus* HO) incluiu no desenho do sistema um DNA espaçador de aproximadamente 1,4 kb entre as duas proteínas de fusão. Demonstraram, com base em testes iniciais nesse estudo, que o espaçamento entre os dois marcos abertos de leitura que codificam os fatores de transcrição do sistema é importante para o funcionamento ideal do sistema optogenético (Moreno Morales et al., 2021). Não temos garantia que esse fosse o problema no nosso caso, mas em testes futuros, poderá ser incluído no desenho do nosso sistema esta sequência espaçadora.

Os sistemas optogenéticos responsivos à luz vermelha são baseados no sistema de duplo híbrido de leveduras. No caso deste trabalho, as proteínas de fusão que compõem os sistemas de duplo híbrido de leveduras são: a fusão do PHYBNT com o domínio de ligação ao DNA do Mit1 (PHYBNT-MIT1) e o PIF3 fusionado ao fator de ativação VP16 (VP16-PIF3). O sistema baseado no PHYBNT/PIF3 mostrou superioridade quando comparado com outros sistemas responsivos às luzes vermelha e azul (Pathak et al., 2014). Na nossa proposta, para a introdução do estudo da optogenética em nosso grupo de pesquisa, optamos por estudar também um dos fatores de transcrição envolvido na regulação do promotor do *AOX1* como uma alternativa à regulação por metanol, combinando então o estudo da optogenética com a regulação deste promotor. A escolha deste fator de transcrição foi baseada nos estudos do grupo de trabalho de Wang et al, que descreveu o funcionamento do Mit1 e como funciona a regulação do P_{AOX1} envolvendo os diferentes fatores de transcrição. Ainda este grupo de trabalho descreveu a região

pertencente ao domínio de ligação ao DNA do Mit1 e a sua capacidade de ativar o promotor (Wang et al., 2016).

A partir dos resultados obtidos com o fator de transcrição Mit1, decidimos explorar o funcionamento dos componentes responsivos à luz vermelha, ou seja, PHYBNT/PIF3 utilizando um sistema de ligação ao DNA/ativação já estudado e conhecido. A resposta baseada na indução por galactose tornou-se um exemplo canônico para integração de sinal combinatória com base em um interruptor genético (Escalante-Chong et al., 2015). Escolhemos o sistema de regulação baseado no Gal4: domínio de ligação ao DNA do Gal4 e o domínio de ativação do Gal4. O sistema de regulação responsivo à galactose já foi estudado em *S. cerevisiae* e por isso escolhemos ele para testar o nosso sistema optogenético em *S. cerevisiae*.

5.2 Capítulo 2: Construção de um sistema optogenético na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A optogenética é importante como uma ferramenta para o controle transcricional e a levedura *S. cerevisiae* tem sido utilizada como plataforma para a aplicação da mesma (Quail, 2002, Shimizu-Sato et al., 2002, An-Adirekkun et al., 2020). Neste capítulo se abordará a construção de um sistema optogenético na levedura *S. cerevisiae* utilizando um sistema de duplo híbrido de leveduras com o sistema de regulação do Gal4. Como um fator de transcrição de ligação ao DNA eucariótico bem caracterizado, Gal4 tem sido extensivamente empregado para construir sistemas de expressão gênica controláveis em *S. cerevisiae* (Zhou et al., 2020).

A galactose é um agente indutor que tem sido muito utilizado em sistemas de duplo híbrido e utilizar este sistema junto com a ativação por luz ajuda a estudar o funcionamento do sistema optogenético além de oferecer uma alternativa a indução com galactose (Stockwell et al., 2015). Apesar de ser efetiva e muito utilizada na ativação de genes, ela possui alguns pontos a se refletir. Como fonte de carbono, ela é consumida pela levedura e precisa ser repostada no meio para manter a indução. Além disso, o sistema é reprimido pela presença da glicose, o que requer uma mudança de meio para a indução. Outra desvantagem é a influência da galactose na fisiologia da levedura em vias não relacionadas ao gene de interesse (Ikushima and Boeke, 2017). Então, apresenta-se realmente favorável o estudo do sistema optogenético baseado no sistema induzido por galactose.

5.2.1 Construção do vetor contendo o gene repórter

Com os resultados obtidos no Capítulo 1, com o gene repórter *EGFP*, uma alternativa viável foi a troca para outro gene repórter. Dentre as variantes de GFP presentes em *Aequorea*, as proteínas fluorescentes amarelas (YFP) são uma alternativa para resolver o problema. Dentre as YFP, foi descrita uma versão melhorada chamada “Venus”. Venus é uma proteína fluorescente amarela básica (constitutivamente fluorescente) publicada em 2002, derivada de *Aequorea victoria*. É um dímero fraco de maturação rápida com sensibilidade moderada a ácidos (Nagai et al., 2002, Genove et al., 2005). Com essas informações, foi escolhido esse novo gene repórter (*Venus*) para os próximos testes.

O gene repórter *Venus* foi amplificado por PCR com os primers Venus-F e Venus-R a partir do vetor pET21 FLIP XY/P e recombinado *in vitro* no vetor pYES2 (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, EUA, digerido com HindIII e SlaI), formando o vetor pYVenus (Figura 41).

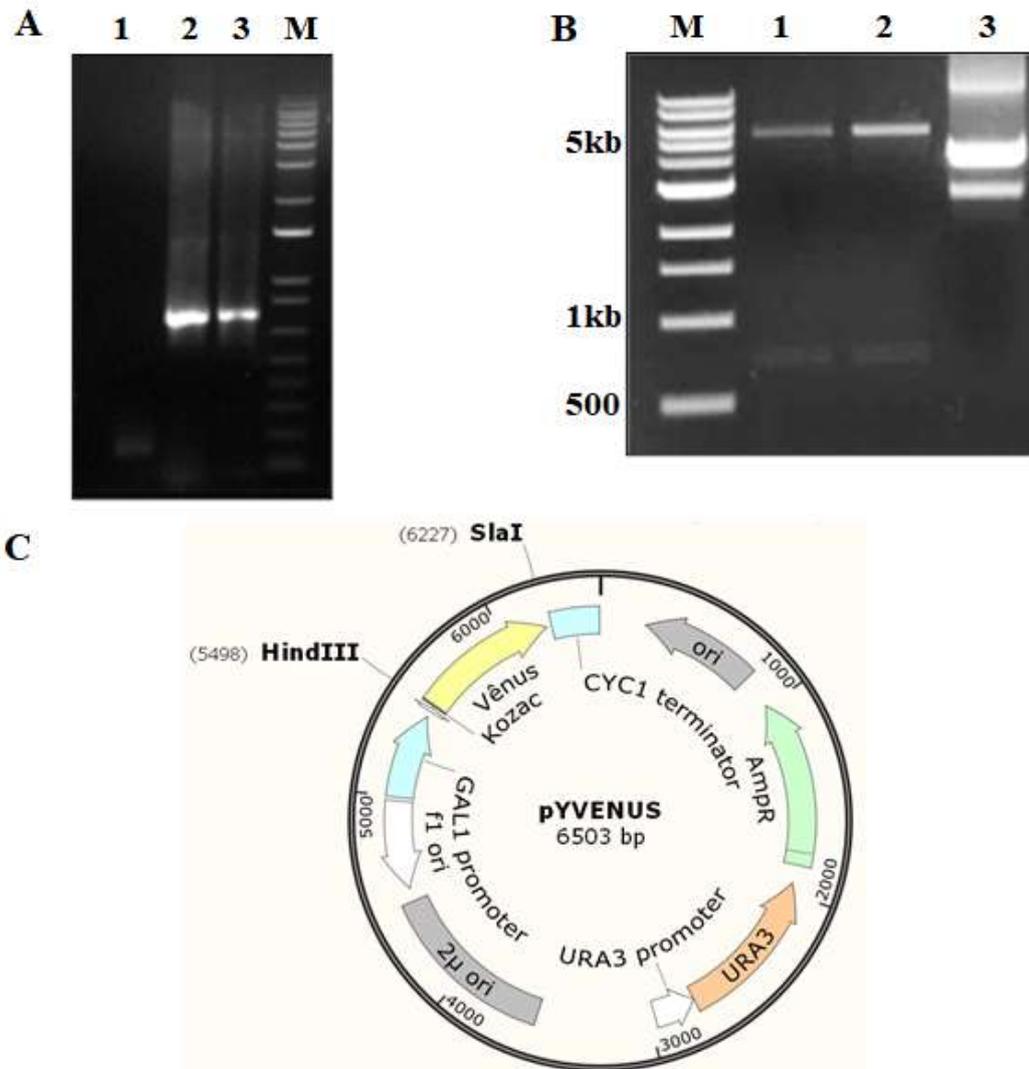


Figura 41. Construção do vetor pYVenus. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A. Amplificação do gene Venus por PCR com os primers Venus-F e Venus-R. M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) B. Confirmação do vetor pYVenus por digestão. Poços 1 e 2: digerido com HindIII e SlaI (5.7 kb e 750 pb); Poço 3: vetor intacto, não digerido. M: 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). C. Mapa físico do vetor pYVenus. Em azul turquesa, a sequência do promotor do *GAL1* e do terminador do *CYC1*. EM amarelo a sequência da Venus. Origem de replicação bacteriana é indicada em cinza. Origem de replicação de leveduras é indicada em cinza. Em alaranjado a marca auxotrófica para *URA3* e em branco o promotor do gene *URA3*. Em verde o gene de resistência a ampicilina (AmpR).

Em seguida, o vetor pYVenus foi utilizado para transformação na levedura RE1006 (R. Strich) (Torres and Bonner, 1995), gerando a linhagens RE1006 pYVenus. O vetor vazio, pYES2, também foi transformado na levedura, gerando a linhagem RE1006 pYES.

5.2.2 Indução com galactose

O plasmídeo pYVenus (Figura 41C) construído anteriormente é necessário para a expressão do gene repórter *Venus*. Por ser um vetor epissomal, espera-se que ele esteja presente em mais cópias na levedura (Da Silva and Srikrishnan, 2012), o que leva a uma quantidade maior do gene repórter sendo expresso no estado induzido, facilitando sua detecção.

As linhagens RE1006 pYVenus e RE1006 pYES foram induzidas na presença de galactose em experimentos em placas com meio mínimo e em experimentos em meio líquido (Figura 42).

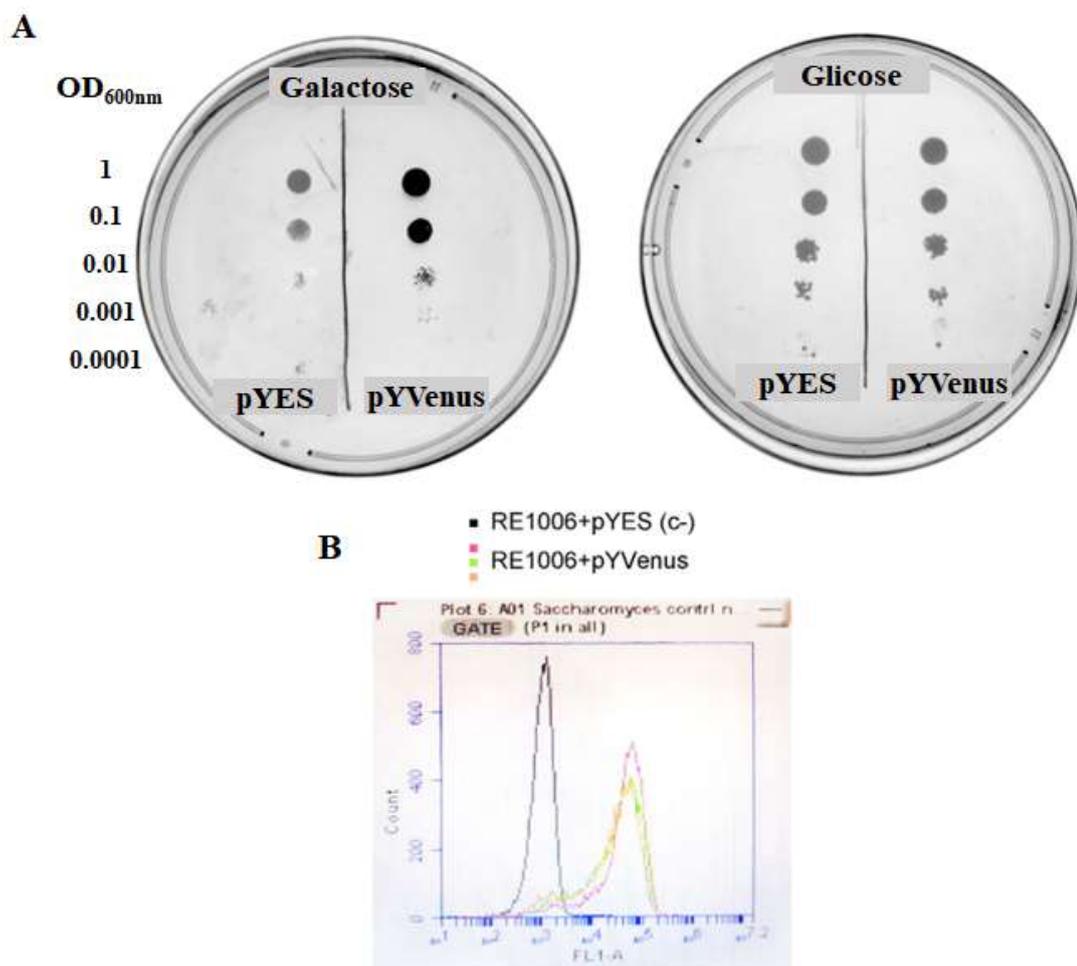


Figura 42. Avaliação da fluorescência após 48 h de indução com galactose. A. Fluorescência no fotodocumentador de placas de meio mínimo com galactose ou glicose contendo diluições seriadas de cada clone pYES ou pYVenus. (B) Citometria de fluxo a partir de inóculos com galactose. A fluorescência obtida pela linhagem RE1006 pYES está representada em preto, enquanto por RE1006 pYVenus está representada em cores.

Em ambos os ensaios, a levedura RE1006 pYVenus mostrou fluorescência quando comparada com a linhagem com o vetor vazio (RE1006 pYES) na presença do agente indutor (Figura 42). Como esperado, não foi observada fluorescência na presença de glicose, agente repressor do sistema de regulação.

5.2.3 Construção e confirmação da linhagem contendo os componentes do sistema optogenético em *S. cerevisiae*

Os vetores pD153phyBN (pPHYBNTGal4DBD) e pGAD-PIF3 (pGADPIF3), doados gentilmente pelo professor Peter Quail, foram utilizados para a construção de um sistema optogenético responsivo a luz vermelha e foram transformados na linhagem RE1006 pYVenus obtida anteriormente. A linhagem RE1006 pYVenus foi transformada primeiro com o vetor pGAD-PIF3 e a linhagem resultante foi transformada então com o vetor pD153phyBN. As linhagens intermediárias, assim como linhagem final (RE1006 pYVenus pD153phyBN pGAD-PIF3), foram confirmadas por PCR utilizando DNA genômico como molde e crescidas em placas de meio mínimo para comprovar as respectivas auxotrofias (Figura 43). Ou seja, em placas de meio mínimo, sem a presença dos aminoácidos uracila, triptofano e leucina, só seria capaz de crescer a linhagem final contendo todos os vetores de expressão para cada uma das partes do sistema optogenético. Esse resultado esperado foi confirmado nas placas de meio mínimo na ausência desses três aminoácidos (Figura 43).

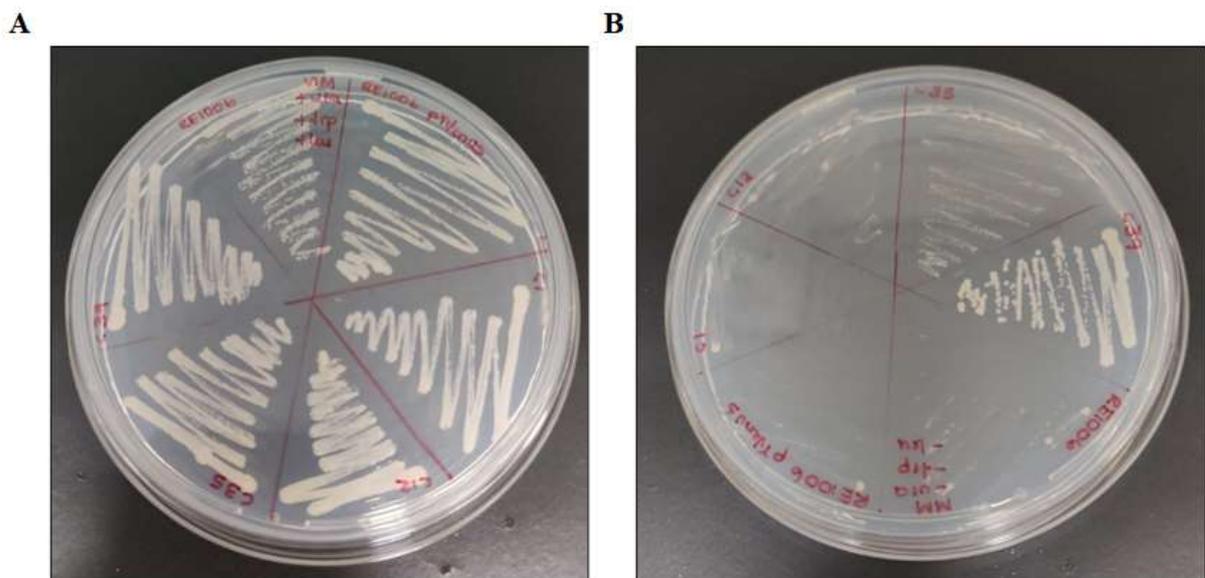


Figura 43. Avaliação do crescimento em meio mínimo das linhagens obtidas. A. Crescimento das linhagens construídas em meio mínimo suplementado com uracila, triptofano e leucina. B. Crescimento das linhagens em meio mínimo sem uracila, triptofano e leucina.

A linhagem RE1006 pYVenus pD153phyBN foi confirmada com os *primers* PhyBNT-F e qPhyBNTII-R (680 pb) e a linhagem RE1006 pYVenus pGAD-PIF3 com os *primers* qPIF3II-F e PIF3-R (668 pb). A linhagem RE1006 pYVenus pD153phyBN pGAD-PIF3 foi confirmada com os *primers* qPhyBNT-F e qPhyB-R (112 pb), Venus-F e Venus-R (755 pb) (Figura 44).

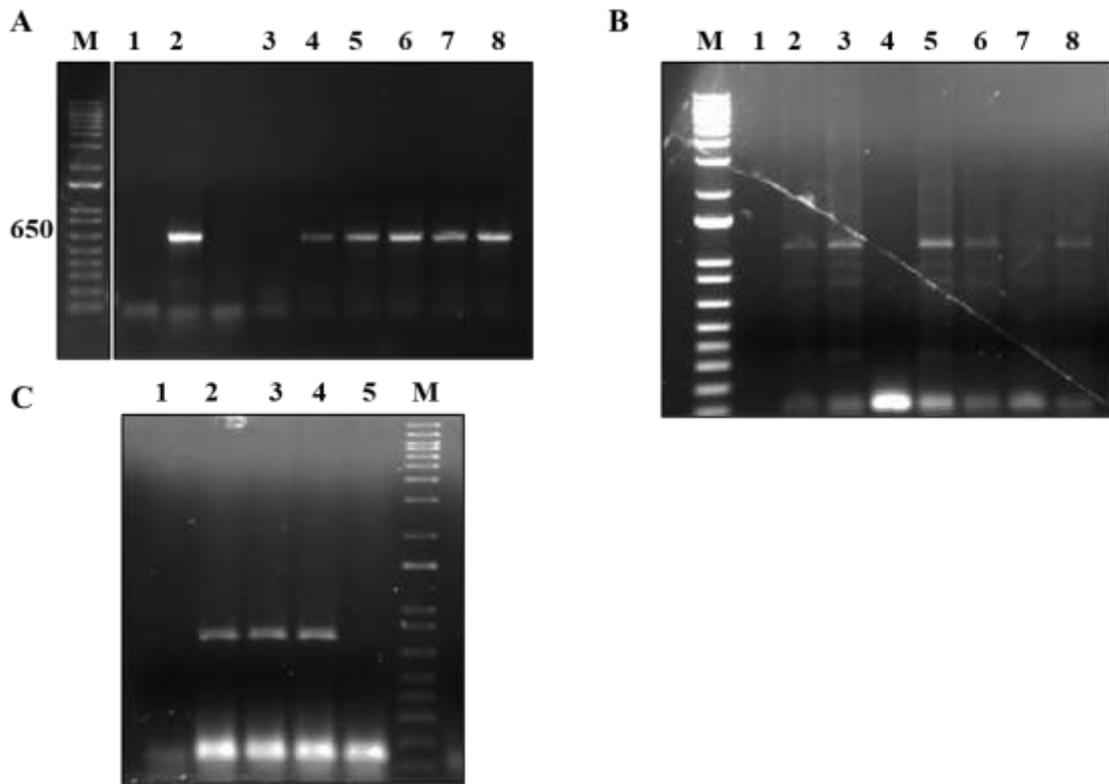


Figura 44. Confirmação das linhagens. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação das regiões: A. PHYBNT (680 pb), poços 1-3 na linhagem RE1006 pYVenus pD153phyBN e PIF3 (668 pb), poços 3-8 na linhagem RE1006 pYVenus pGAD-PIF3. B. PhyBNT (112 pb), poços 2-8 na linhagem RE1006 pYVenus pD153phyBN pGAD-PIF3. C. Venus (755 pb), poços 2-5 na linhagem RE1006 pYVenus. M: marcador 1 kb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Uma vez confirmadas as linhagens construídas, o próximo passo foi avaliar a atividade do gene repórter na presença de luz vermelha e compará-la com a ativação da presença do agente indutor, no caso galactose.

5.2.4 Avaliação da atividade do gene repórter *Venus* na presença de luz vermelha (660 nm)

5.2.4.1 Experimento 1

Da mesma forma que em *K. phaffii*, para construir um circuito optogenético funcional em *S. cerevisiae* é necessário um tempo prévio de incubação para a expressão das proteínas e demais fatores explicados anteriormente. A linhagem RE1006 pYVenus pD153phyBN pGAD-

PIF3 foi crescida inicialmente em meio mínimo com glicose como fonte de carbono para o crescimento da linhagem prévio à etapa de indução.

No primeiro experimento, o pré-inóculo foi incubado durante 24 h. Depois desse tempo, foi medido o crescimento e foi feito um experimento em placas de meio mínimo com as diferentes condições. Ou seja, placas de meio mínimo com galactose como controle positivo (agente indutor) e glicose como controle negativo (agente repressor). Para avaliar a ativação na presença de luz vermelha (660 nm), foram feitas placas de meio mínimo com glicose e a adição do cromóforo PCB (necessário para o completo funcionamento do sistema optogenético) e colocadas nas duas condições (luz e escuro). Todas as placas foram mantidas 48 h no escuro. Após esse período de incubação, uma placa de meio mínimo com glicose e PCB foi colocada na luz vermelha e a outra foi mantida no escuro. Após 96 horas de crescimento, foi analisada a fluorescência e o resultado se mostra na figura a seguir (Figura 45).

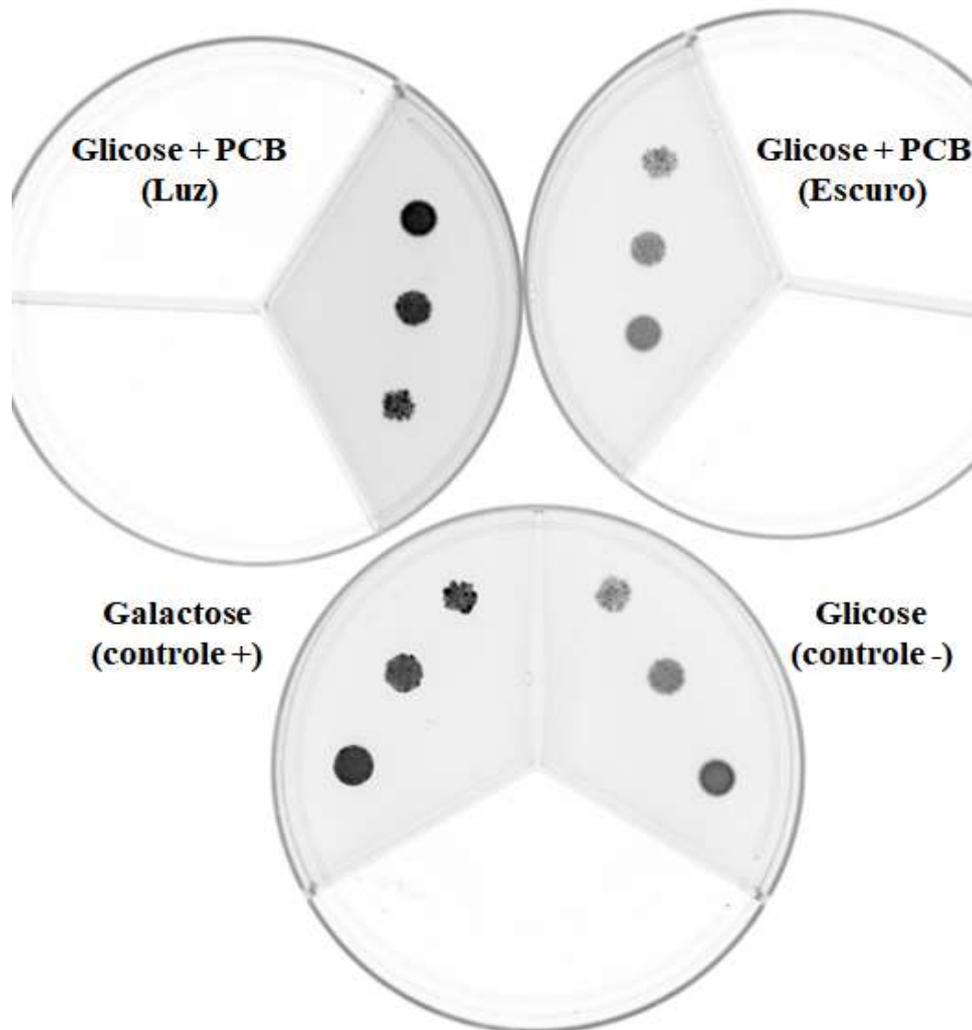


Figura 45. Expressão intracelular da proteína Venus após 48 h no escuro e 96 h de indução na presença de luz vermelha. Análise da expressão da Venus em placas de meio mínimo na presença de luz vermelha (660 nm). A linhagem RE1006 pYVenus pD153phyBN pGAD-PIF3 foi avaliada na presença de galactose (controle positivo), glicose (controle negativo) e glicose + PCB (luz e escuro).

Após 96 horas de crescimento, na placa que foi colocada sob a luz vermelha, pode-se observar a fluorescência da proteína Venus a diferença da placa que foi mantida no escuro. Ou seja, o sistema optogenético foi ativado na presença da luz de comprimento de 660 nm.

5.2.4.2 Experimento 2

A partir dos resultados obtidos no Experimento 1, foi feito um novo experimento, para avaliar se 24 horas de incubação no escuro, ao invés de 48 horas (Experimento 1), eram suficientes para ativar o sistema optogenético. A Figura 46 mostra os resultados obtidos neste experimento.

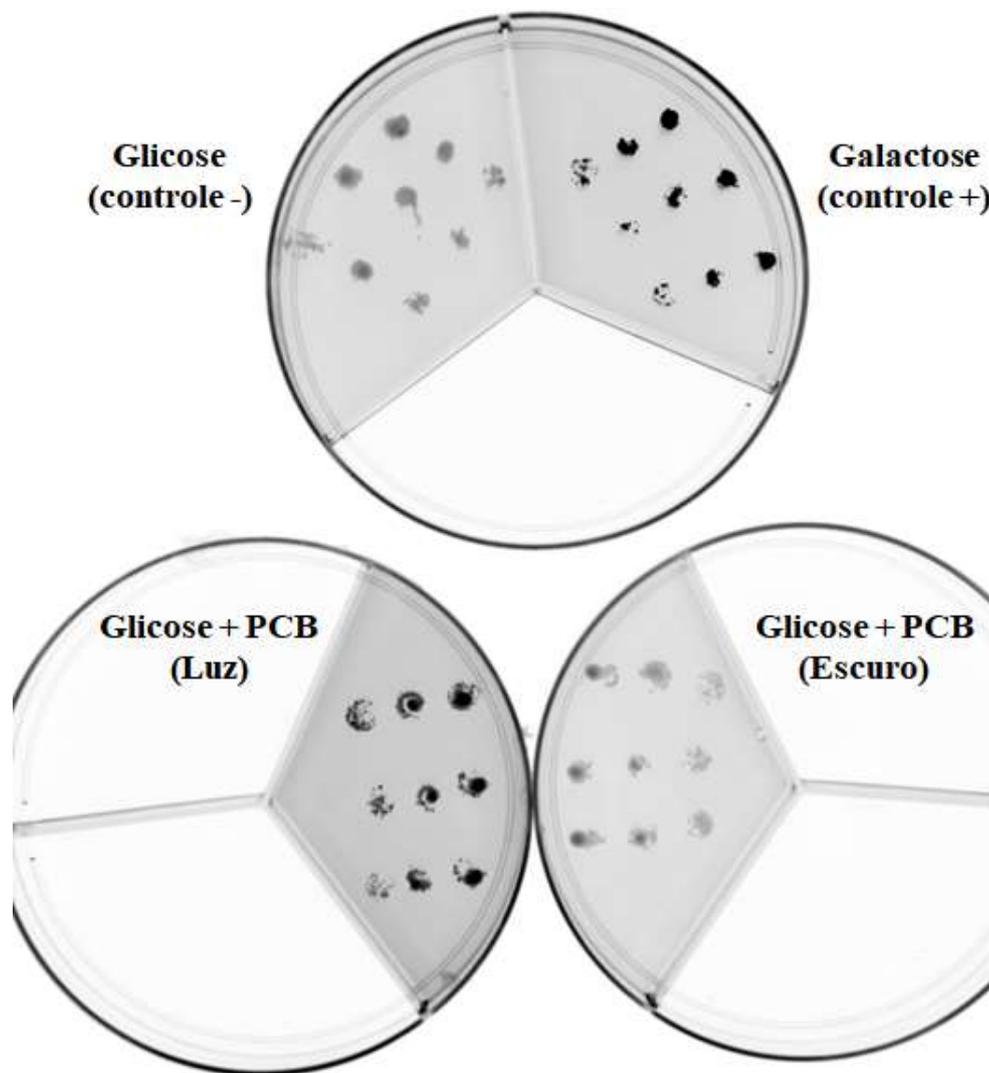


Figura 46. Expressão intracelular da Venus após 24 h no escuro e 48 h de indução na presença de luz vermelha. Análise da expressão da Venus em placas de meio mínimo na presença de luz vermelha (660 nm). A linhagem RE1006 pYVenus pD153phyBN pGAD-PIF3 foi avaliada na presença de galactose (controle positivo), glicose (controle negativo) e glicose + PCB (luz e escuro).

A partir destes resultados pode-se concluir que com 24 horas de incubação no escuro e 48 horas de indução, obteve-se o resultado desejado. Ou seja, a fluorescência da proteína Venus foi observada na amostra incubada na luz vermelha e na amostra controle positivo, na presença de galactose, e não foi observada no escuro e no controle negativo.

O estudo de sistemas optogenéticos, composto por proteínas sensíveis a luz codificadas geneticamente que podem controlar eventos celulares como expressão gênica ou localização de proteínas, está sendo explorado atualmente (Figuerola et al., 2021, Moreno Morales et al., 2021, Kumar et al., 2022, Perez et al., 2022, Wang et al., 2022, Wegner et al., 2022). A disponibilidade

da indução por luz representa uma ferramenta a mais para sistemas de expressão que precisam de regulação fina.

Falando em mecanismos de regulação fina, as integrases tem esta capacidade e por isso pensamos na união da regulação mediante sistemas optogenéticos e sistemas baseados no uso das integrases, para ter uma levedura *S. cerevisiae* que tenha um sistema muito bem regulável com um agente indutor que não precisa ser adicionado ao meio.

- 5.3 Capítulo 3: Combinação do sistema de indução optogenético em *S. cerevisiae* com o sistema contendo integrases
- 5.3.1 Construção de um sistema contendo os componentes para a expressão e atividade da integrase 13

No nosso laboratório, anteriormente foi avaliada a expressão e funcionalidade da serina-integrase Int 4 (*Streptococcus equi* subsp *equi* 4047) assim como o não funcionamento das serina-integrases Int 5 (*Streptomyces phage* PhiK38-) e Int 8 (*Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435) (Duarte, 2019), descritas inicialmente para a construção de um circuito lógico utilizando diferentes integrases em bactérias (Yang et al., 2014). A partir dos resultados obtidos no nosso laboratório, outras análises indicaram que a serina-integrase Int 13 (*Bacillus cytotoxicus* NVH 391-98) também possuía ortogonalidade com as integrases 4 e 8, de forma que poderia substituir a integrase 5 em um novo circuito (Yang et al., 2014). A escolha dessas integrases foi feita tendo em consideração os dados obtidos de ortogonalidade entre essas integrases e a formação dos sítios *attL* e *attR* das mesmas (Yang et al., 2014). Foi analisada a presença de códons de iniciação seguidos por códons de terminação dentro das sequências que seriam formadas após a inversão do promotor nos sítios *attL* e *attR*, para evitar que se pudesse causar uma parada prematura da transcrição. As integrases 4, 5, 8 e 13 atenderam aos critérios de ortogonalidade e não possuíam sítios de iniciação seguidos por códons de terminação dentro dos sítios que foram formados após a inversão. As integrases 5 e 8 embora atenderam esses critérios, não se apresentaram funcionais.

A partir dessas análises, um sistema de dois plasmídeos foi construído para testar a funcionalidade da Int 13. O primeiro plasmídeo contém o gene da *int13* sob o controle do promotor induzível por galactose (P_{GAL}). Um segundo plasmídeo repórter contém os sítios *attB* e *attP* que flanqueiam o gene repórter de proteína fluorescente *ymUkG1*. Para estes experimentos, foi utilizada a proteína *ymUkG1* do coral Umi-Kinoko (*Sarcophyton* sp.), já que o estudo publicado por o Kaishima *et al.* mostrou que entre diferentes GFP testadas, a *ymUkG1*, a versão monomérica com códon otimizado para *S. cerevisiae*, mostrou níveis mais altos de expressão e fluorescência (Kaishima et al., 2016).

Um promotor constitutivo (P_{TEF1}) foi colocado na frente do sítio *attB* e transcreve o gene repórter na orientação contrária. Depois que a integrase é expressa, a orientação do gene

repórter é invertida e sua sequência codante é transcrita. Após a inversão, os sítios *attB* e *attP* recombinados resultam na formação de *attL* e *attR* (Figura 47).

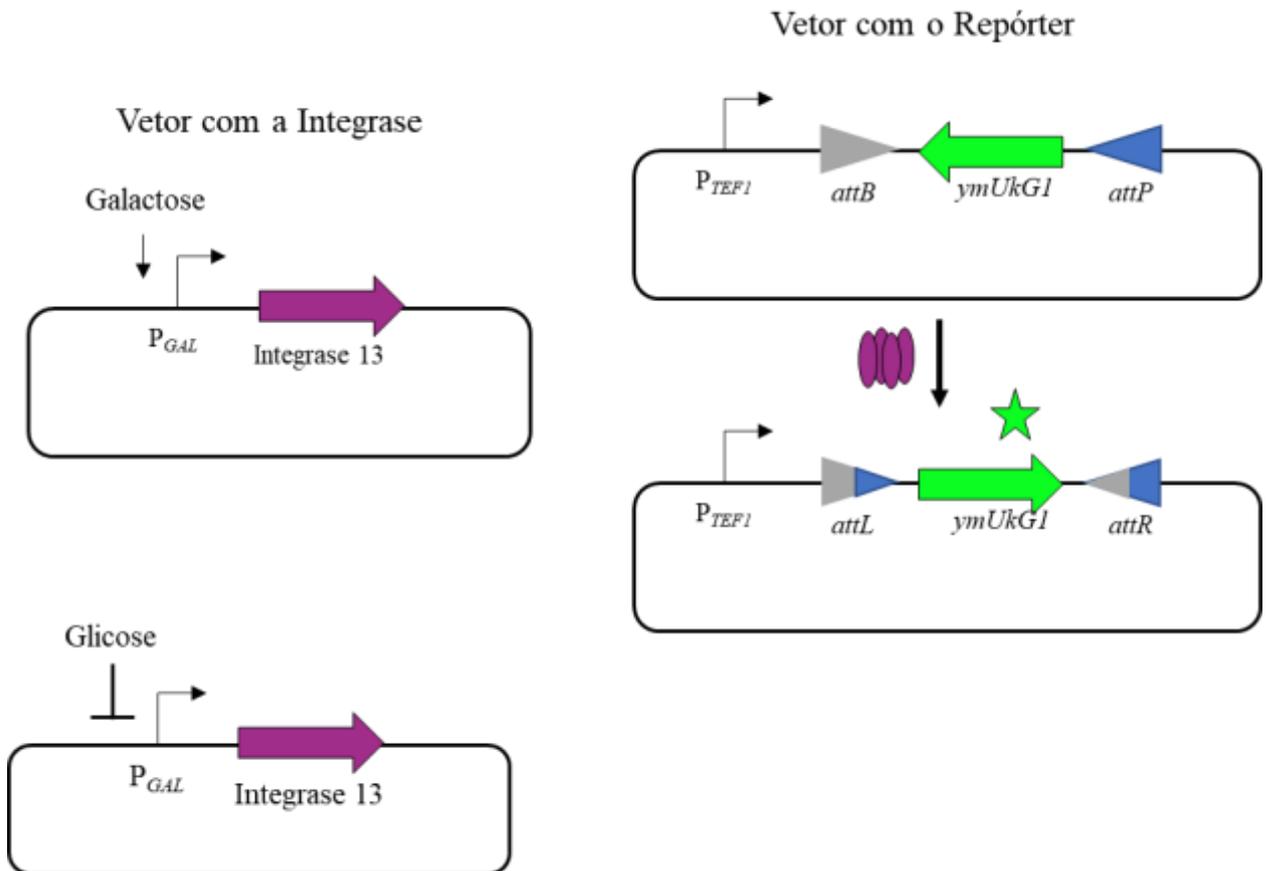


Figura 47. Sistema de dois plasmídeos para testar a funcionalidade da integrase 13. O sistema de dois plasmídeos é mostrado para testar a integrase e seus locais de reconhecimento. O promotor constitutivo P_{TEF1} controla a expressão do gene repórter *ymUkG1* após a inversão de DNA. O promotor induzível P_{GAL} é utilizado para expressão da integrase 13.

Na primeira etapa, a linhagem RE1006 de *S. cerevisiae* foi transformada com o vetor contendo um fragmento com os sítios únicos para a Int 13 (*attB* 13 e *attP* 13) flanqueando a sequência do gene repórter *ymUGK1* com orientação invertida (YCUKGYINT13). O vetor sem sítios únicos para a Int13 com a sequência do gene repórter na orientação correta (YCyUKG) foi transformado também para ser utilizado como controle positivo na expressão do gene repórter (Figura 48).

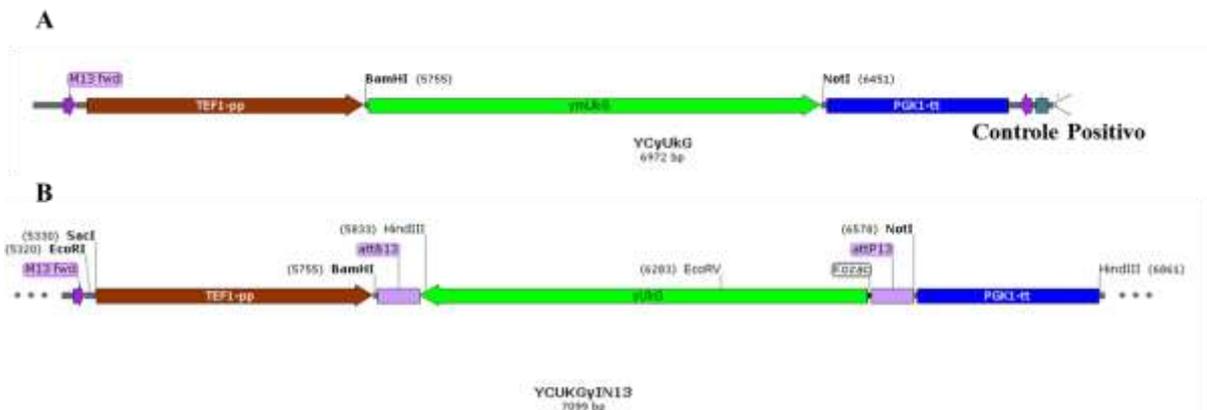


Figura 48. Cassete de expressão do gene repórter *ymUkG1*. A. Esquema contendo os cassetes de expressão do gene repórter. A. Cassete de expressão com o gene *ymUkG1* na orientação correta (Controle positivo). B. Cassete de expressão com o gene *ymUkG1* na orientação invertida. TEF1-pp: promotor do *TEF1*, *ymUkG1*: gene repórter *ymUkG1*, PGK1-tt: terminador do *PGK1*. attB 13 e attP 13: sítios únicos para a Int 13.

5.3.1.1 Construção do vetor centromérico contendo a integrase 13

A serina-integrase Int 13 (*Bacillus cytotoxicus* NVH 391-98) foi sintetizada (Epoch Life Science, Missouri, TX, EUA) e clonada no vetor pYES2, que contém o $P_{GAL1,10}$ (resultando no vetor pYINT13). O gene referente à Int 13 foi amplificado por PCR a partir do vetor pYINT13 com os pares de *primers* GALIN-F e CYCIN-R, para amplificar todo o cassete de expressão (contendo o $P_{Gal1,10}$, a integrase 13 e o terminador CYC1, 2189 pb) (Figura 49A). Por outro lado, o vetor YCplac111 foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e PstI (Figura 49B). Tanto o fragmento com a Int 13 como o vetor YCplac111 digerido foram purificados para posterior recombinação *in vitro*, resultando no vetor YCINT13.

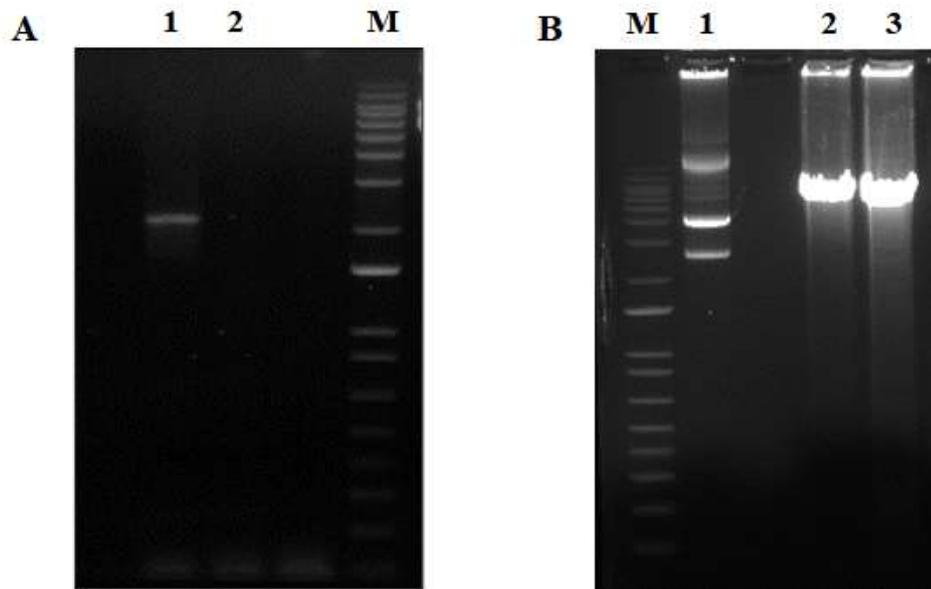


Figura 49. Construção do vetor YCINT13. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A. Amplificação por PCR do fragmento contendo o $P_{Gal1,10}$, a integrase 13 e o terminador CYC1 com os primers GALIN-F e CYCIN-R. M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). B. Perfil de restrição do vetor YCPLAC111 digerido com as enzimas BamHI e PstI. Poço 1. Vetor intacto, não digerido. Poços 2 e 3: YCPLAC111 digerido com BamHI e PstI (6089 pb e 14 pb); M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Para a confirmação da clonagem do vetor YCINT13 foi feita a PCR utilizando os *primers* GALIN e CYCIN resultando em um produto com 2189 pb (Figura 50A); a análise de restrição utilizou a enzima PvuI, cujos produtos seriam de 3949, 2265 e 2048 pb, e NcoI cujo produto seria o vetor linearizado (8262 pb) (Figura 50B).

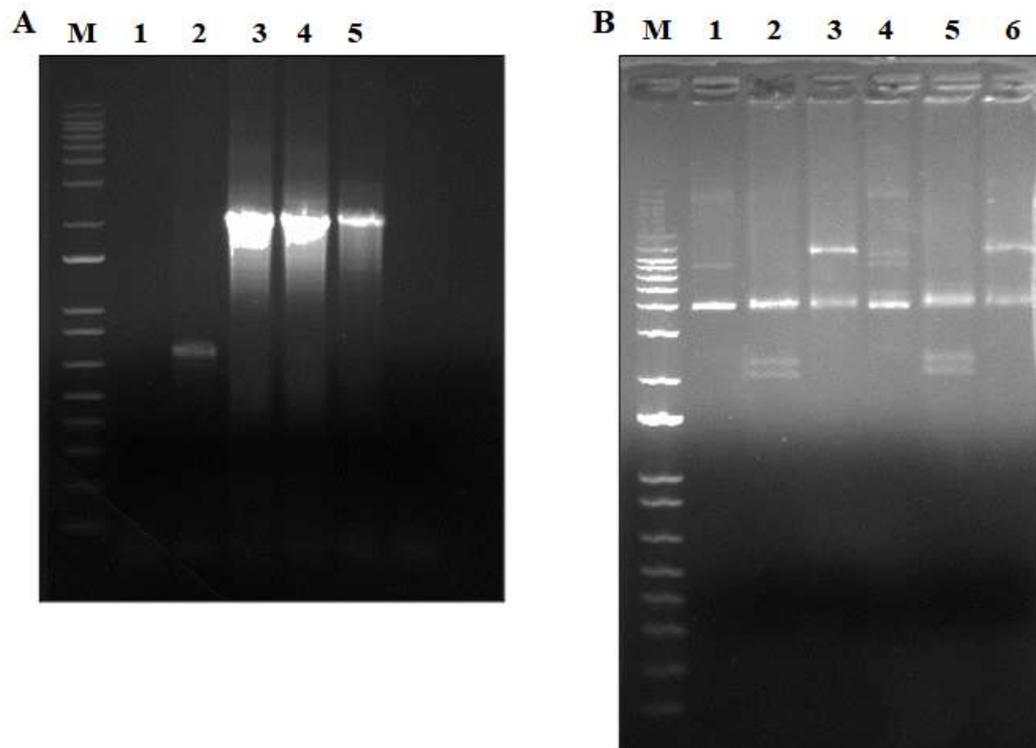


Figura 50. Confirmação da construção do vetor centromérico contendo o cassete de expressão da integrase 13. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: Marcador 1 kb Plus DNA Ladder. A. Amplificação por PCR do fragmento contendo o $P_{Gall,10}$, a integrase 13 e o terminador CYC1 com os primers GALIN-F e CYCIN-R. M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). B. Perfil de restrição do vetor YCINT13. Poços 1 e 4: YCINT13 intacto. Poços 2 e 5: YCINT13 digerido com PVUI. Poços 3 e 6: YCINT13 digerido com NcoI.

Com esses resultados, foi construído o vetor centromérico YCINT13 (Figura 51) contendo o $P_{Gall,10}$, a Int 13 e o $CYC1_{tr}$, que será utilizado para transformar a linhagem RE1006 de *S. cerevisiae*.

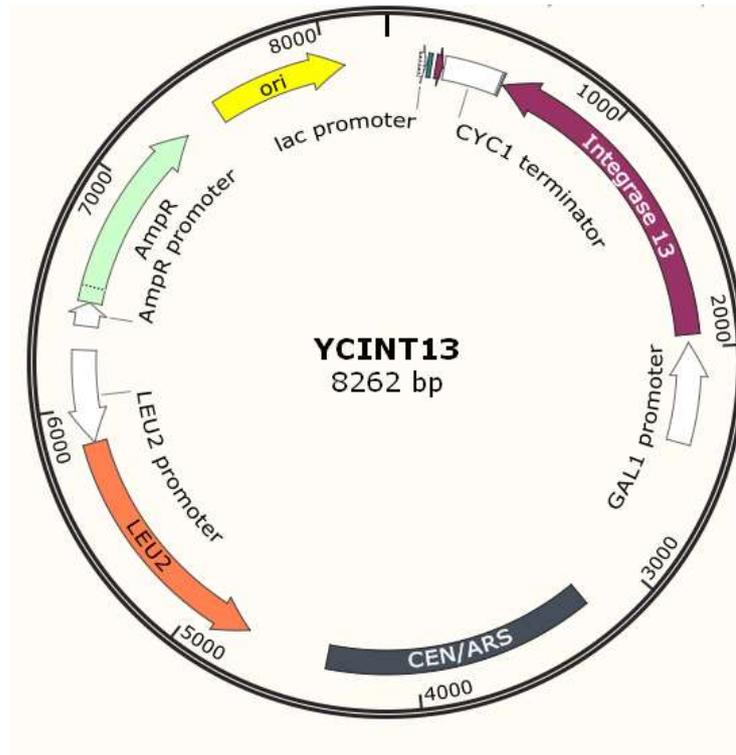


Figura 51. Mapa físico do vetor YCINT13. Vetor construído para a expressão da integrase 13 sob o controle do promotor induzível por galactose. Em roxo, a sequência para a integrase 13 de *S. cerevisiae* de K phaffii. Em branco o promotor *GAL1* e o terminador *CYC1* de *S. cerevisiae*. Em cinza a sequência CEN/ARS. Em alaranjado a marca de seleção *LEU2*. Em verde claro a marca de resistência a ampicilina (AmpR). Origem de replicação bacteriana é indicada em amarelo.

Os vetores centroméricos apresentam maior estabilidade mitótica e podem fornecer segregação adequada durante a mitose. Uma maior estabilidade mitótica, bem como baixo número de cópias, permitem a expressão constante e estável da proteína de interesse (Cao et al., 2017, Piva et al., 2020).

5.3.1.2 Construção da linhagem contendo a Int 13 e o gene repórter *ymUkG1* com os sítios de reconhecimento para a integrase 13

A linhagem RE1006 UKG13 (contendo o vetor com o gene repórter *ymUkG1* com orientação invertida e os sítios únicos de reconhecimento da integrase 13) de *S. cerevisiae* foi transformada com o vetor YCINT13, obtido anteriormente, gerando a nova linhagem RE1006 UKG13 YCINT13. Foi extraído o DNA total e foram feitas PCRs com diferentes combinações de *primers* para confirmar a presença do vetor, além de observar o fenótipo da complementação da auxotrofia para leucina e uracila. Para a confirmação por PCR foram utilizados os *primers* GALIN e CYCIN, gerando um produto de 2189 pb (Figura 52).

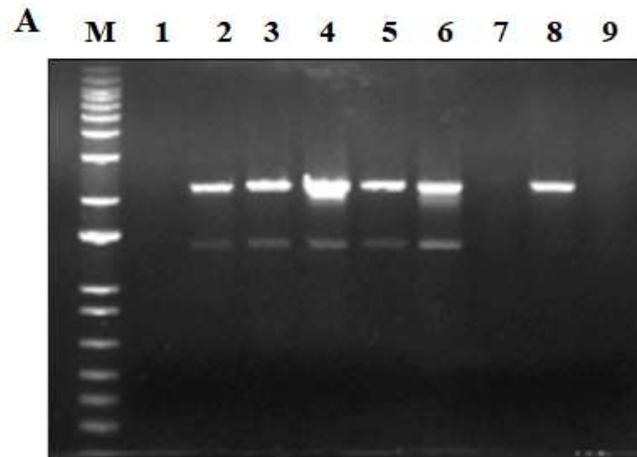


Figura 52. Confirmação da linhagem RE1006 UKG13 YCINT13. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. M: Marcador 1 kb Plus DNA Ladder A. Reação de PCR com os *primers* GALIN e CYCIN. Poço 1: Controle da reação sem DNA. Poços 2-9: Amplificação do fragmento de 2189 pb com os *primers* GALIN e CYCIN.

Com estes resultados, ficou pronta a levedura contendo um sistema constituído por um plasmídeo para a expressão da Int 13 sob o promotor responsivo a galactose e o sistema contendo o gene repórter *ymUkG1* na orientação invertida flanqueado pelos sítios de reconhecimento da Int 13.

5.3.1.3 Análise funcional da Int 13: análise em placas de meio mínimo e citometria de fluxo

Em um trabalho anterior no nosso laboratório foram testadas as integrases 4 e 8 em *S. cerevisiae*, e os resultados concluíram com o correto funcionamento da integrase 4 nesta levedura. Por outro lado, a integrase 8 não se mostrou funcional nas condições avaliadas (Duarte, 2019). A partir destes resultados decidiu-se continuar os estudos com a integrase 4 e testar também a integrase 13, com o objetivo futuro de ter duas alternativas de uso de integrases e construir um circuito genético para estudos de regulação e combinação com um sistema optogenético.

A construção de um circuito de memória baseado em uma integrase (no caso a Int 4 ou a Int 13) requer tanto seu gene quanto os sítios de reconhecimento *attB/P*. Os vetores contendo ambos os componentes foram construídos anteriormente. O próximo passo foi analisar o funcionamento individual da Int 13. Para isso, foram feitos dois experimentos diferentes, um em placas de meio mínimo e um experimento de citometria de fluxo.

A Figura 53 mostra o resultado do experimento de indução com galactose em placas de meio mínimo. Quando comparamos os resultados, após 72 h de crescimento, observamos a ausência de fluorescência na placa de meio mínimo com glicose (agente repressor do sistema) e a presença de fluorescência na placa de meio mínimo com galactose para os 8 clones transformantes da linhagem RE1006 UKG13 YCINT13. O sistema contendo a integrase 4 já havia sido testado em nosso laboratório, provando seu funcionamento, enquanto o sistema contendo a integrase 8 não havia mostrado resultados satisfatórios (Duarte, 2019).

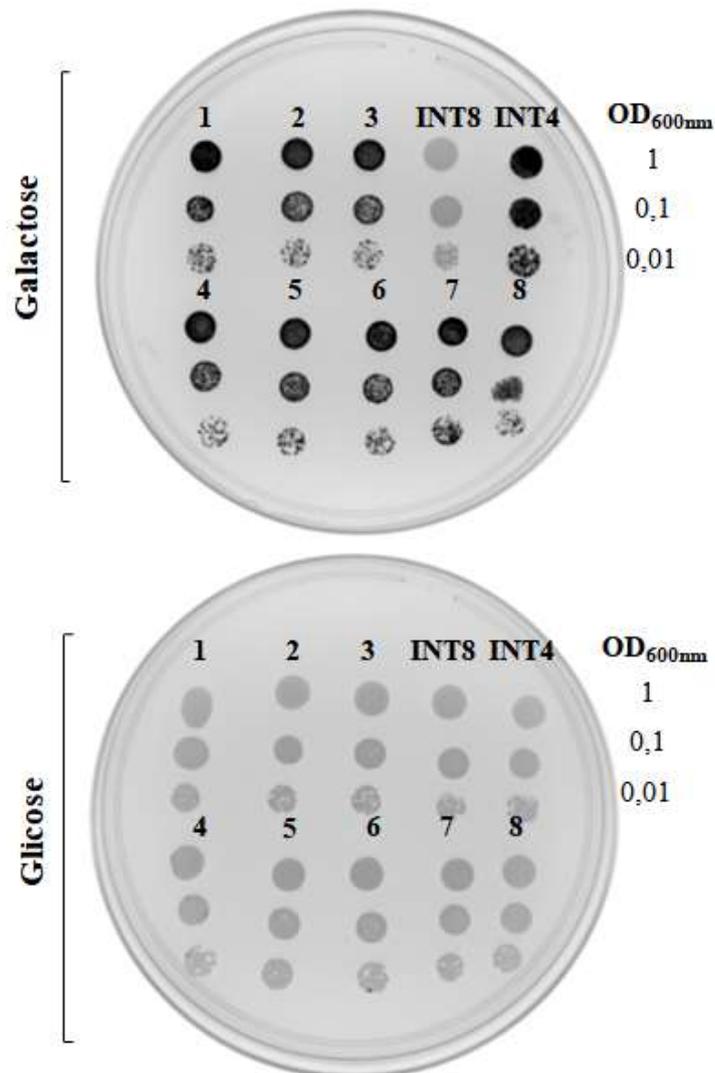


Figura 53. Funcionalidade da integrase 13 em placas de meio mínimo. Avaliação da fluorescência após 72 h de indução com galactose. (A) Fluorescência no fotodocumentador de placas de glicose ou galactose contendo diluições seriadas de cada clone. INT4: linhagem RE1006 UKG4 YCINT4, INT8: linhagem RE1006 UKG8 YCINT8, 1-8: clones 1-8 da linhagem RE1006 UKG13 YCINT13. Fotodocumentador Amersham Imager 600, GE, tempo de exposição 1s.

O outro experimento para avaliar a funcionalidade da integrase 13 foi mediante citometria de fluxo. A Figura 54 mostra os resultados obtidos no experimento após 24 horas de indução com galactose, em todas as amostras avaliadas (Figura 54A) e em uma seleção de amostras para ver melhor a diferença entre os clones (Figura 54B), já que na Figura 54A foram colocadas todas as amostras avaliadas. A vantagem deste experimento é que a indução em galactose foi feita apenas durante 24 h, e só com esse tempo de incubação pôde-se observar a presença de fluorescência nos 8 clones da linhagem RE1006 UKG13 INT13 quando comparado com o controle negativo (RE1006 YCplac111 YCPlac33) e com o controle positivo (RE1006 UKG13 (na orientação correta)) do experimento.

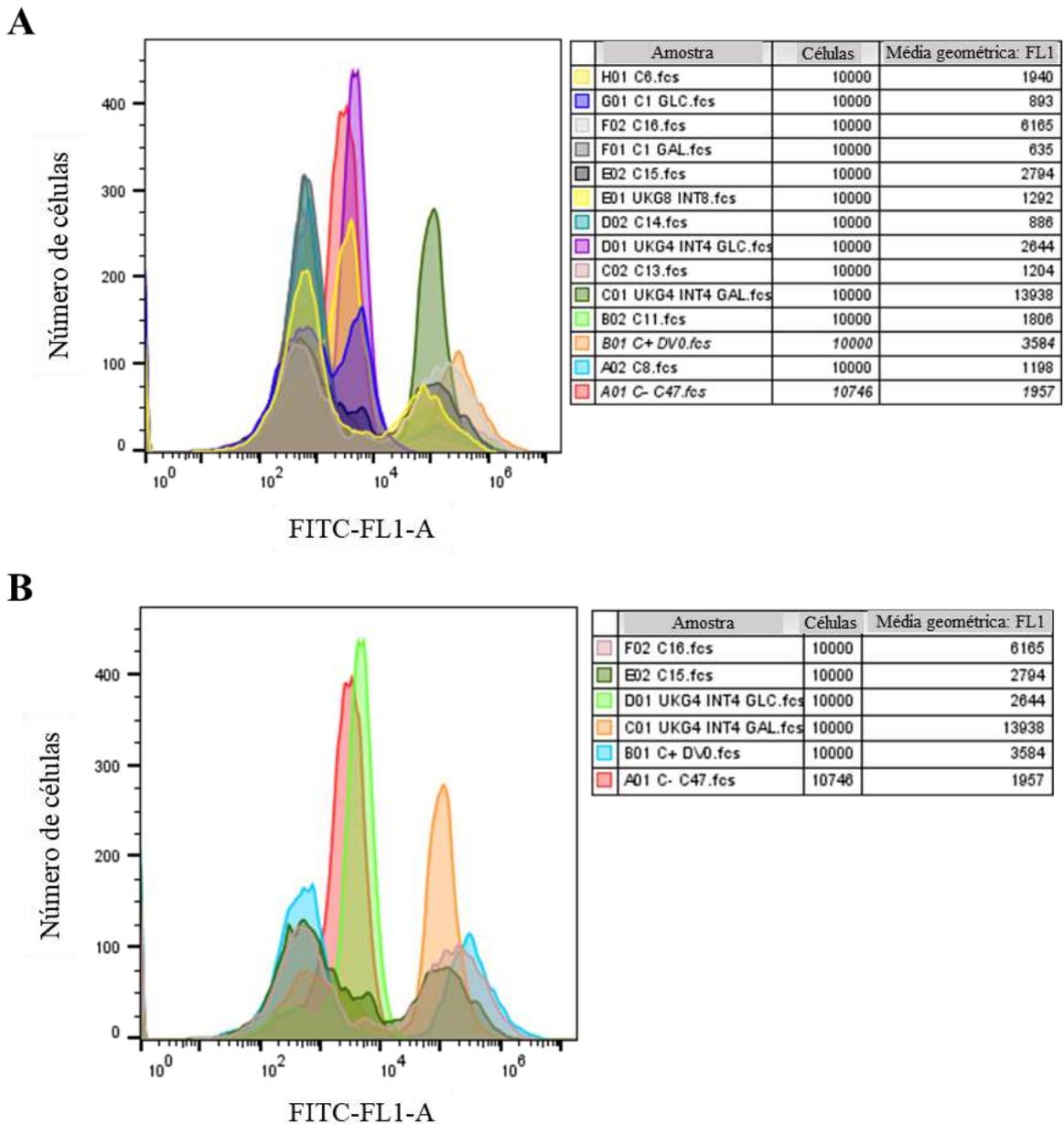


Figura 54. Funcionalidade da integrase 13 analisada por citometria de fluxo. Os histogramas mostram o número de células no canal FITC-FL-1. As amostras foram crescidas durante 24 horas em meio mínimo com galactose e sua fluorescência detectada através de citometria de fluxo. Mostram-se os histogramas das amostras avaliadas. A. Todas as amostras avaliadas. 8 amostras da linhagem RE1006 UKG13 YCINT13 em crescidas em galactose e uma amostra destas também crescida em glicose. 1 amostra da linhagem RE1006 UKG4 YCINT4 crescida em glicose e em galactose. Controle positivo: RE1006 UKG13. Controle negativo: RE1006 YCplac111 YCPlac33. B. Seleção de amostras para avaliar melhor a diferença entre os clones. Controles positivo e negativo. 1 amostra da linhagem RE1006 UKG4 YCINT4 em glicose e em galactose e dois amostras da linhagem RE1006 UKG13 YCIN13.

A Figura 55 mostra os gráficos de pontos individuais do experimento de citometria de fluxo para 6 amostras selecionadas.

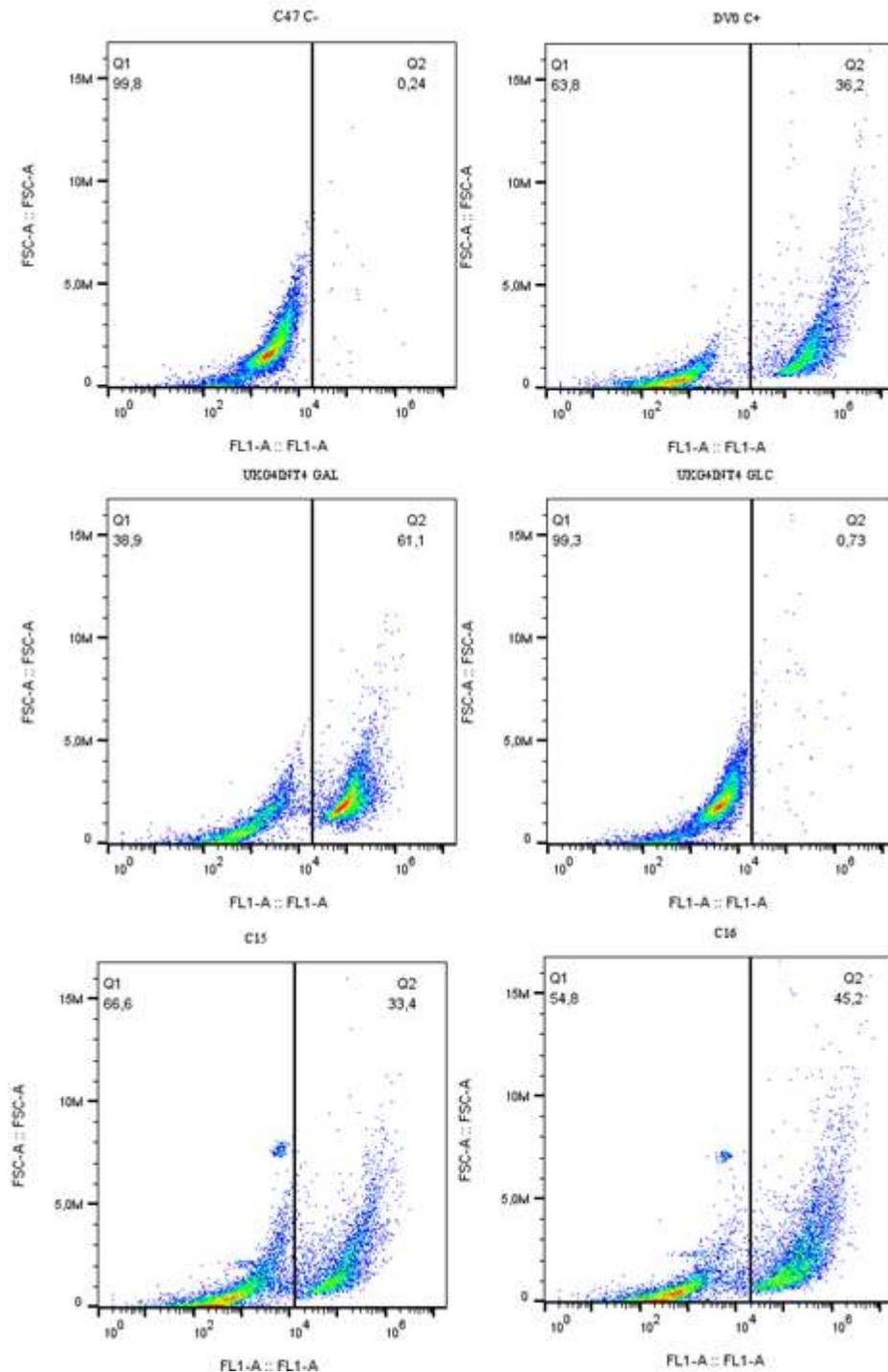


Figura 55. Funcionalidade da integrase 13 analisada por citometria de fluxo em amostras selecionadas. As amostras foram crescidas durante 24 horas em meio mínimo com galactose e sua fluorescência detectada através de citometria de fluxo. Mostram-se os gráficos de FSC vs. FL1 para seis amostras selecionadas, assim como a porcentagem positiva para fluorescência.

Pode-se observar que em todos os clones há presença de uma população heterogênea. Isto acontece devido à expressão das integrases que estão sob o controle do promotor responsivo a galactose, então o tempo de indução leva em conta a síntese da integrase que irá atuar no gene repórter permitindo que haja a expressão deste último. Com estes resultados, pode-se concluir que a integrase 13 foi expressa com sucesso e a mesma é capaz de induzir, na presença de galactose, a recombinação e inversão do gene repórter *ymUkG1*. Com isso, somam-se duas integrases (Int 4 e Int 13) que podem ser usadas para a regulação da expressão gênica. Ou seja, estas duas integrases em conjunto podem ser utilizadas para ligar e desligar um sistema de expressão gênica (circuito gênico), já que cada uma dela tem seus respectivos sítios de reconhecimento. Colocando os sítios de reconhecimento de cada integrase em sequência, estas podem ser utilizadas para construção de circuitos lógicos destinados a ligar/desligar o transgene. Dessa forma, circuitos gênicos podem ser ligados e desligados várias vezes de acordo com a combinação de integrases utilizadas, culminando numa resposta lógica de expressão gênica via recombinação do DNA. Em *E. coli*, Yang et al, descreveram a utilização da combinação das integrases para a avaliação da ativação/inativação da GFP. (Yang et al., 2014). A partir dos nossos resultados em *S. cerevisiae*, pode-se extrapolar a construção desses novos circuitos combinando as diferentes integrases Int 4 e 13 nesta levedura.

Além de experimentos utilizando mais de uma integrase, podem-se combinar experimentos para duplamente regular a expressão de genes, por exemplo, combinando o sistema de regulação com as integrases com o sistema de regulação optogenético.

5.3.2 Combinação do sistema optogenético com o sistema contendo as integrases 4 e 13

A partir dos resultados obtidos com a integrase 13, o objetivo dessa última parte do trabalho foi a utilização do sistema optogenético de *S. cerevisiae* junto com o sistema de regulação contendo a integrase 4 ou a integrase 13 para permitir um controle ainda mais fino e regulado da expressão gênica. A estratégia foi a seguinte: na presença de luz vermelha (660 nm), se ativar o sistema optogenético, levando a ativação do $P_{Gal,10}$ e com isso a expressão da integrase 4 ou a integrase 13 (Figura 56A-B), que reconhecerá os seus respectivos sítios e levará à ativação do gene repórter *Venus* (Figura 56C). O controle fino de sistemas biológicos tem aplicações potenciais na fabricação de produtos biológicos, de saúde e biossensores, além da geração de organismos geneticamente modificados.

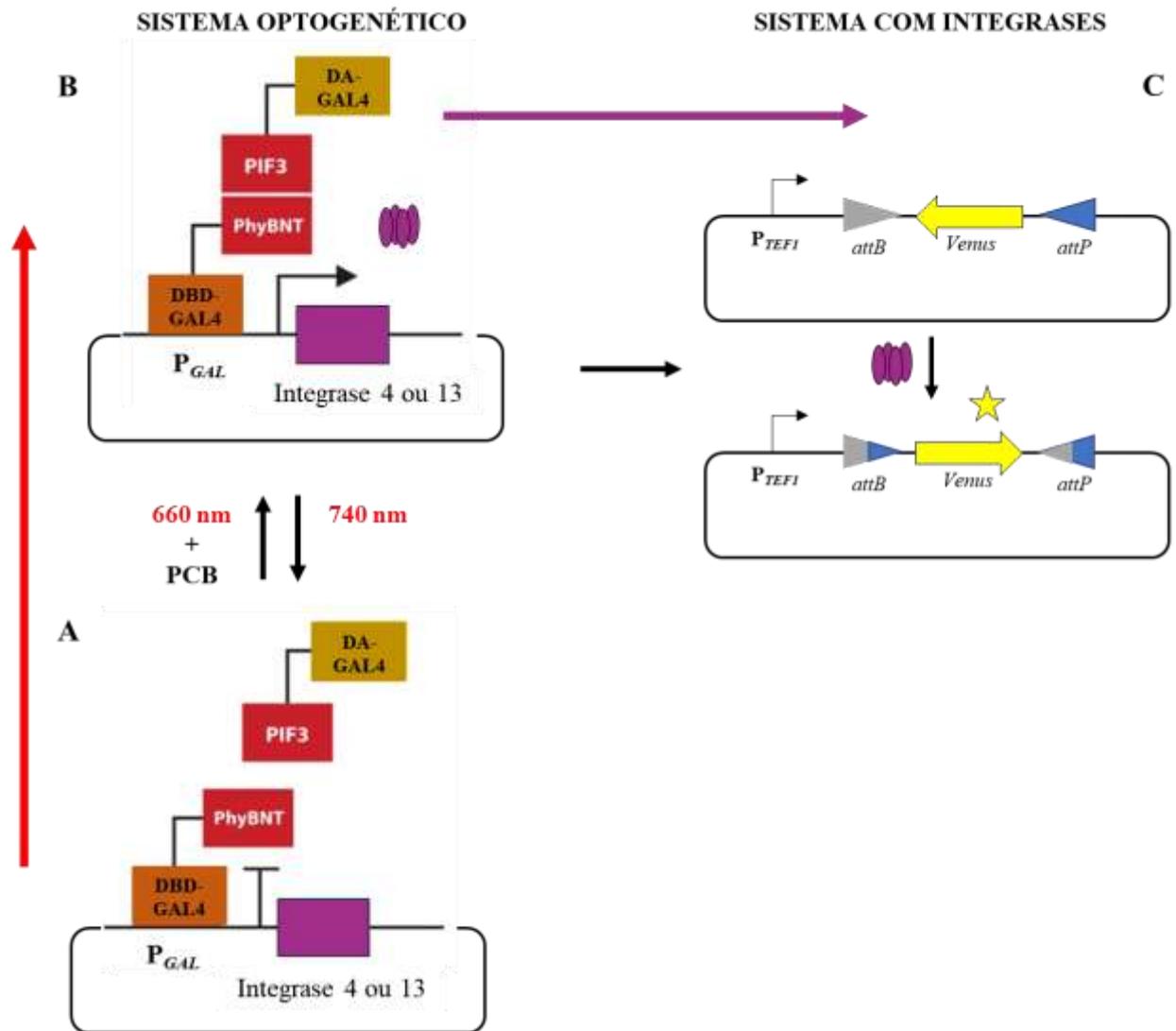


Figura 56. Estratégia para a construção de um sistema de expressão regulado por optogenética e por integrases. Na presença de luz vermelha (660 nm), se ativa o sistema optogenético, levando a ativação do P_{GAL} e com isso a expressão da integrase 4/integrase 13 (A-B), e levará à ativação do gene repórter *Venus* (C).

5.3.2.1 Construção das linhagens

Para a utilização do sistema optogenético foram utilizados os vetores de expressão pPHYBNTGal4DBD e pGAD-PIF3 (Shimizu-Sato et al., 2002).

Com o objetivo de construir a linhagem contendo todos os componentes do sistema de regulação, primeiro foi construída a linhagem RE1006 contendo o gene repórter *Venus*. O cassete contendo a sequência do gene repórter *Venus* com orientação invertida e flanqueado pelas sequências de reconhecimento da Int 4 e a Int 13, com o promotor P_{TEF1} e o terminador

do *PGK* foi sintetizado (Epoch Life Science, Missouri, TX, EUA) com as enzimas de restrição BamHI e BglII nas extremidades (Figura 57).



Figura 57. Cassete de expressão do gene repórter *Venus*. A. Esquema contendo o cassete de expressão do gene repórter *Venus* com os sítios de reconhecimento das integrases 4 (em preto, attB4 e attP4) e 13 (em roxo, attP13 e attP13).

A estratégia a seguir incluiu a digestão do vetor HO-poly-KanMX4-HO (Figura 58A) (Voth et al., 2001) com as enzimas BamHI e BglII (Figura 58B). O fragmento de aproximadamente 6000 pb foi purificado e utilizado posteriormente.

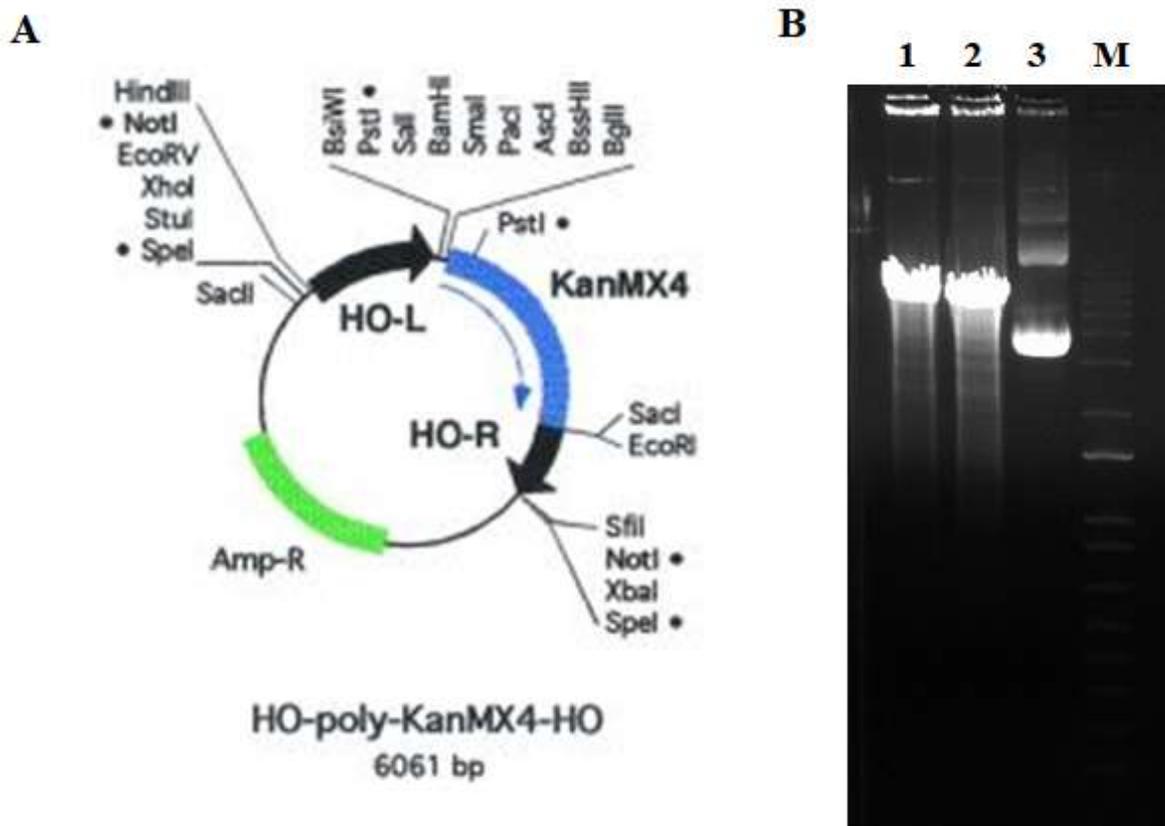


Figura 58. Digestão do vetor HO-poly-KanMX4-HO. A. Mapa físico do vetor HO-poly-KanMX4-HO. Em preto, as regiões para a integração no locus HO. Em azul a marca de resistência a kanamicina/G418 (KanMX4) e, em verde, a marca de resistência a ampicilina (AmpR) B. Perfil de

restrição do vetor HO-poly-KanMX4-HO. Poços 1 e 2: HO-poly-KanMX4-HO digerido com as enzimas BamHI e BglII. Poço 3: HO-poly-KanMX4-HO intacto. M: marcador 1 kb plus (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Por outro lado, o vetor obtido da síntese (pEZclone-NRS-Amp-Blunt-HC-Venus-INT4_13), contendo o gene repórter *Venus* no sentido contrário e os sítios de reconhecimento das integrases 4 e 13, foi digerido com as enzimas BglII, BamHI e PvuI para liberar o cassete de interesse de 1692 pb (Figura 59).

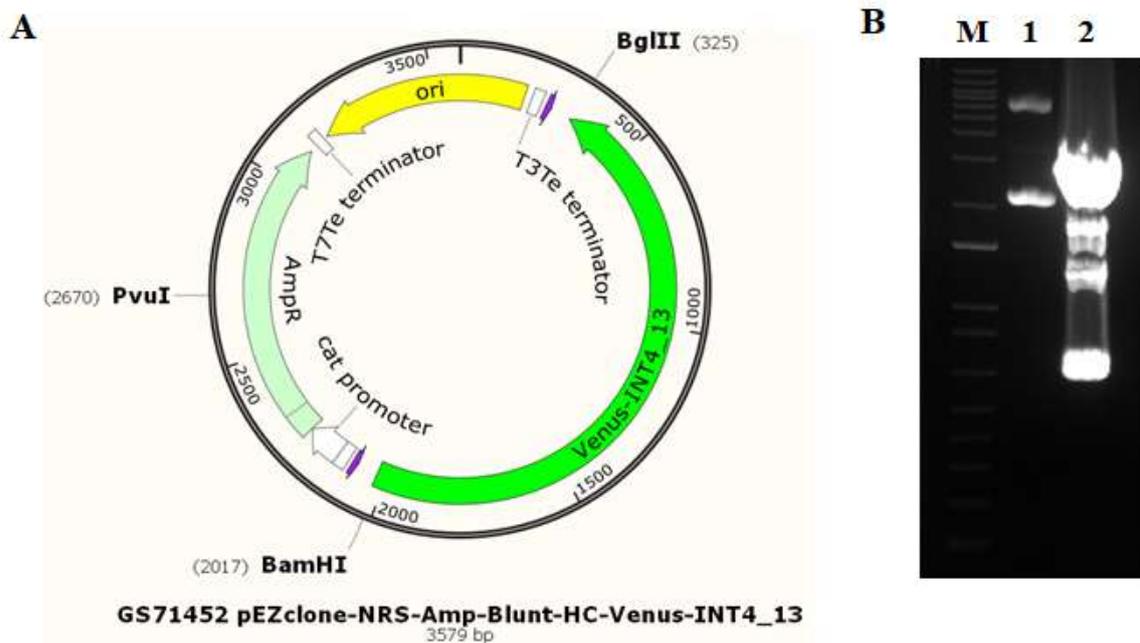


Figura 59. Digestão do vetor pEZclone-NRS-Amp-Blunt-HC-Venus-INT4_13. A. Mapa físico do vetor pEZclone-NRS-Amp-Blunt-HC-Venus-INT4_13. Em verde, a sequência que veio da síntese. Em amarelo, a origem de replicação bacteriana. Em verde claro, o gene de resistência a ampicilina (AmpR). B. Perfil de restrição do vetor pEZclone-NRS-Amp-Blunt-HC-Venus-INT4_13. Poço 1: vetor intacto. Poço 2: vetor digerido com as enzimas BamHI, BglII e PvuI. M: marcador 1 kb plus (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

A banda de interesse (1692 pb) foi purificada e foi feita a clonagem por ligação desse fragmento com o fragmento de aproximadamente 6000 pb purificado anteriormente, para dar o vetor HO-13-4-Venus-4-13. O vetor resultante foi confirmado por digestão com a enzima SpeI (Figura 60). A confirmação mediante digestão com a enzima SpeI deu como resultado uma banda de 4648 pb e outra de 3079 pb.

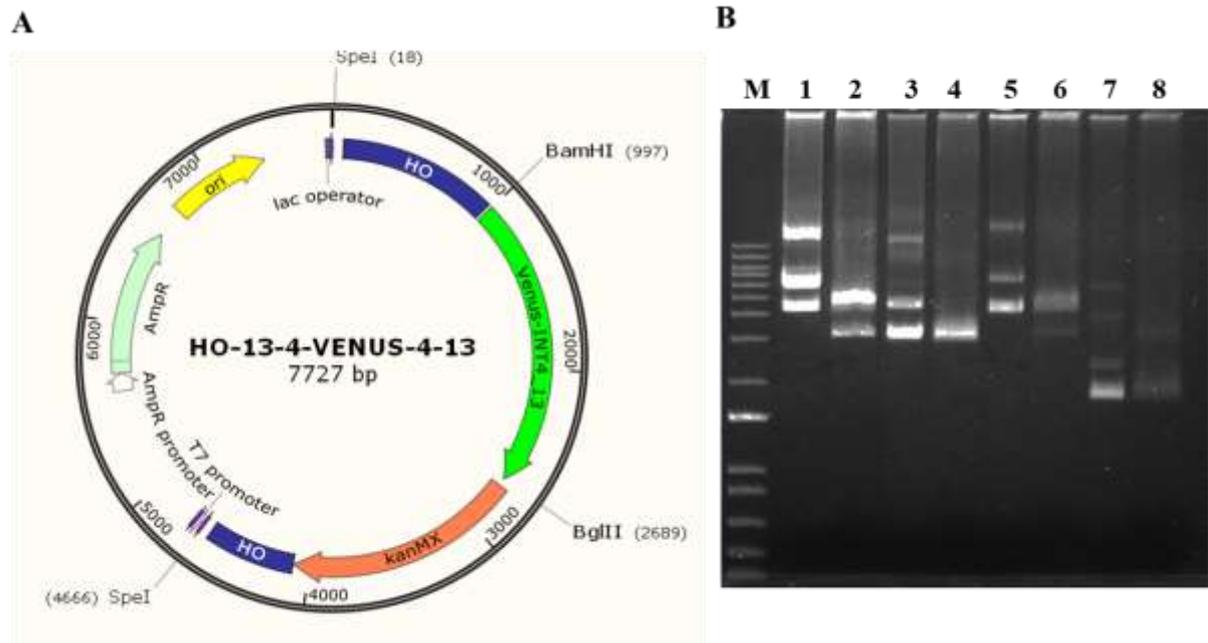


Figura 60. Construção do vetor HO-13-4-Venus-4-13. A. Mapa físico do vetor HO-13-4-Venus-4-13. Em verde a sequência que veio da síntese. Em alaranjado a marca de resistência a kanamicina/G418 (kanMX) e em azul as sequências para o direcionamento para a integração no *locus* HO. Em amarelo, a origem de replicação bacteriana. Em verde claro, o gene de resistência a ampicilina (AmpR). B. Perfil de restrição do vetor HO-13-4-Venus-4-13. Poços 1, 3, 5 e 7: vetor intacto. Poços 2, 4, 6 e 8: vetor digerido com a enzima SpeI. M: marcador 1 kb plus (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Uma vez construído e confirmado o vetor HO-13-4-Venus-4-13, a digestão com a enzima SpeI, que libera o cassete para integração no *locus* HO, foi realizada e o DNA foi precipitado. O DNA obtido foi utilizado para a transformação da linhagem RE1006 por eletroporação e seleção dos transformantes obtidos na presença de G418. O vetor HO-poly-KanMX4-HO foi também digerido com SpeI e o fragmento obtido foi utilizado para integração no *locus* HO (linhagem controle negativo, sem gene repórter).

A confirmação da integração no *locus* HO de *S. cerevisiae* RE1006 foi feita por PCR após extração de DNA genômico de clones selecionados aleatoriamente. Para a linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 foram utilizados os pares de *primers* HO-UKG-F e HO-UKG-R (1686 pb), HO-F e HO-UKG-R (2700 pb), e HO-F e HO-R (4800 pb) (Figura 61). Para o caso da linhagem RE1006 HO-poly-KanMX4-HO foram utilizados os *primers* HO-F e HO-R (3100 pb) (Figura 61).

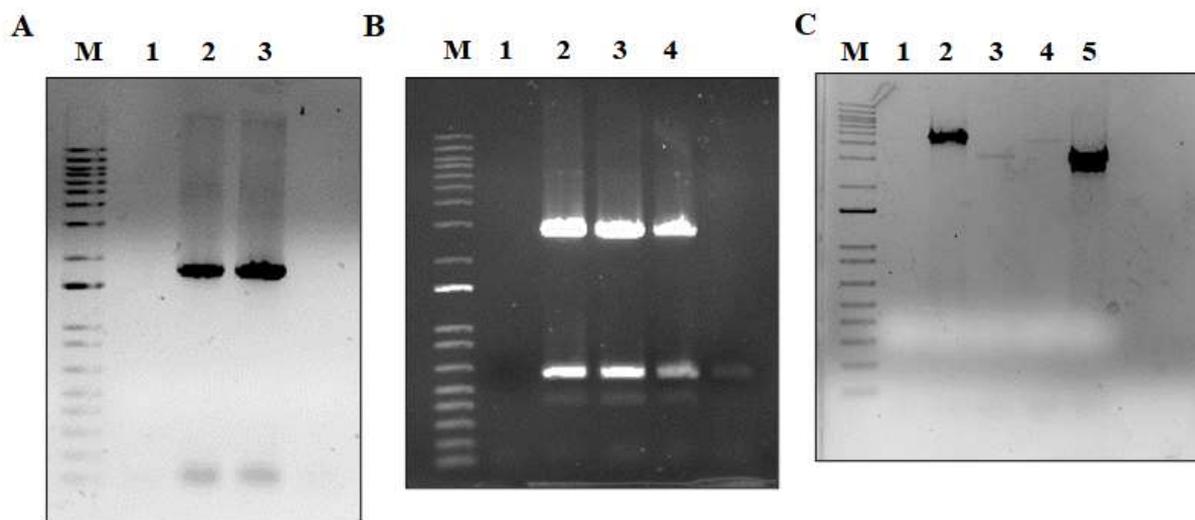


Figura 61. Confirmação das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 e RE1006 HO-poly-KanMX4-HO. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação das regiões: A. Promotor-ymUkG1-Terminador (1686 pb), poços 1-3 na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13. B. HO-UKG (2700 pb), poços 1-4 na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 e C. *Locus* HO na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 (poços 1-4, 4800 pb) e na linhagem RE1006 HO-poly-KanMX4-HO (poço 5, 3100 pb). M: marcador 1 kb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

As linhagens obtidas anteriormente foram utilizadas para a inserção do resto dos componentes para a construção do sistema combinando a utilização das integrases e o sistema optogenético. Todas as linhagens construídas para a avaliação do sistema encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Linhagens construídas. Venus: vetor HO-13-4-Venus ou vetor HO-Venus (controle positivo), Int4 ou Int13: vetor pYINT4 ou pYINT13, PhyB: vetor pPHYBNTGal4DBD, PIF3: vetor pGAD-PIF3. +: presença do vetor, O: presença do vetor vazio, -: ausência do vetor.

Linhagens	Venus	Int 4 ou Int 13	PhyB	PIF3
RE1006 HO-13-4-Venus Int4 PhyBNT PIF3	+	+	+	+
RE1006 HO-13-4-Venus Int13 PhyBNT PIF3				
RE1006 HO-Kan-HO Int4 PhyBNT PIF3	O	+	+	+
RE1006 HO-Kan-HO Int13 PhyBNT PIF3				
RE1006 HO-Venus (Controle Positivo)	+	-	-	-
RE1006 HO-13-4-Venus pYES2	+	O	-	-

Os vetores utilizados para a construção das diferentes linhagens foram os seguintes: pYINT4 ou pYINT13 (para a expressão das respectivas integrases: integrase 4 e integrase 13), pD153phyBN (PhyBNT) e pGAD-PIF3 (PIF3). Foram construídas as linhagens contendo todos os vetores com o gene repórter na orientação invertida ou sem o gene repórter (C-), a linhagem controle positivo (C+) e uma linhagem contendo o gene repórter na orientação invertida e o

vetor pYES2 (vetor vazio, sem as respectivas integrases). A confirmação de cada uma das linhagens obtidas foi feita por PCR utilizando como molde DNA genômico de clones selecionados em cada caso.

As linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 e RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT4 foram confirmadas com os *primers* GAL-IN e CYC-IN (2232 pb) (Figura 62).

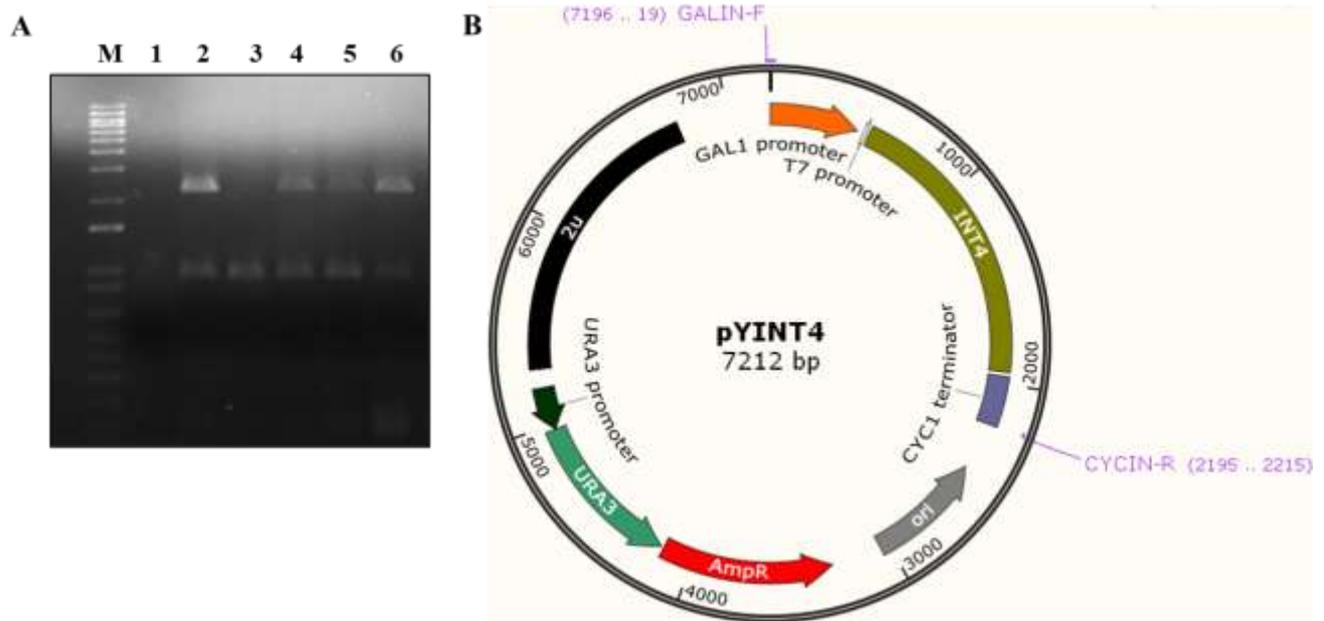


Figura 62. Confirmação das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 e RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT4. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação da região: A. Promotor-INT4-Terminador (primers GALIN-F e CYCIN-R, 2232 pb), poço 1 é o controle negativo, poços 2-3 região na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4, poços 4-6 na linhagem RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT4. M: marcador 1 kb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). B. Mapa físico do vetor pYINT4. Em verde a sequência para a integrase 4. Em alaranjado o promotor *GAL1* e em azul o terminador *CYC1*. Em cinza se mostra a origem de replicação bacteriana e em preto a origem de replicação 2μ de leveduras. Em vermelho a marca de resistência a ampicilina. Em verde claro a marca auxotrófica para *URA3*.

Para o caso da integrase 13, as linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT13 e RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT13 também foram confirmadas com os *primers* GAL-IN e CYC-IN (2189 pb) (Figura 63A-B). A linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYES2 também foi confirmada com os *primers* GAL-IN e CYC-IN. A diferença é que neste caso, o vetor não contém nenhuma integrase (vetor vazio). Então, o fragmento a ser amplificado com este par de *primers* é de 752 pb (Figura 63C).

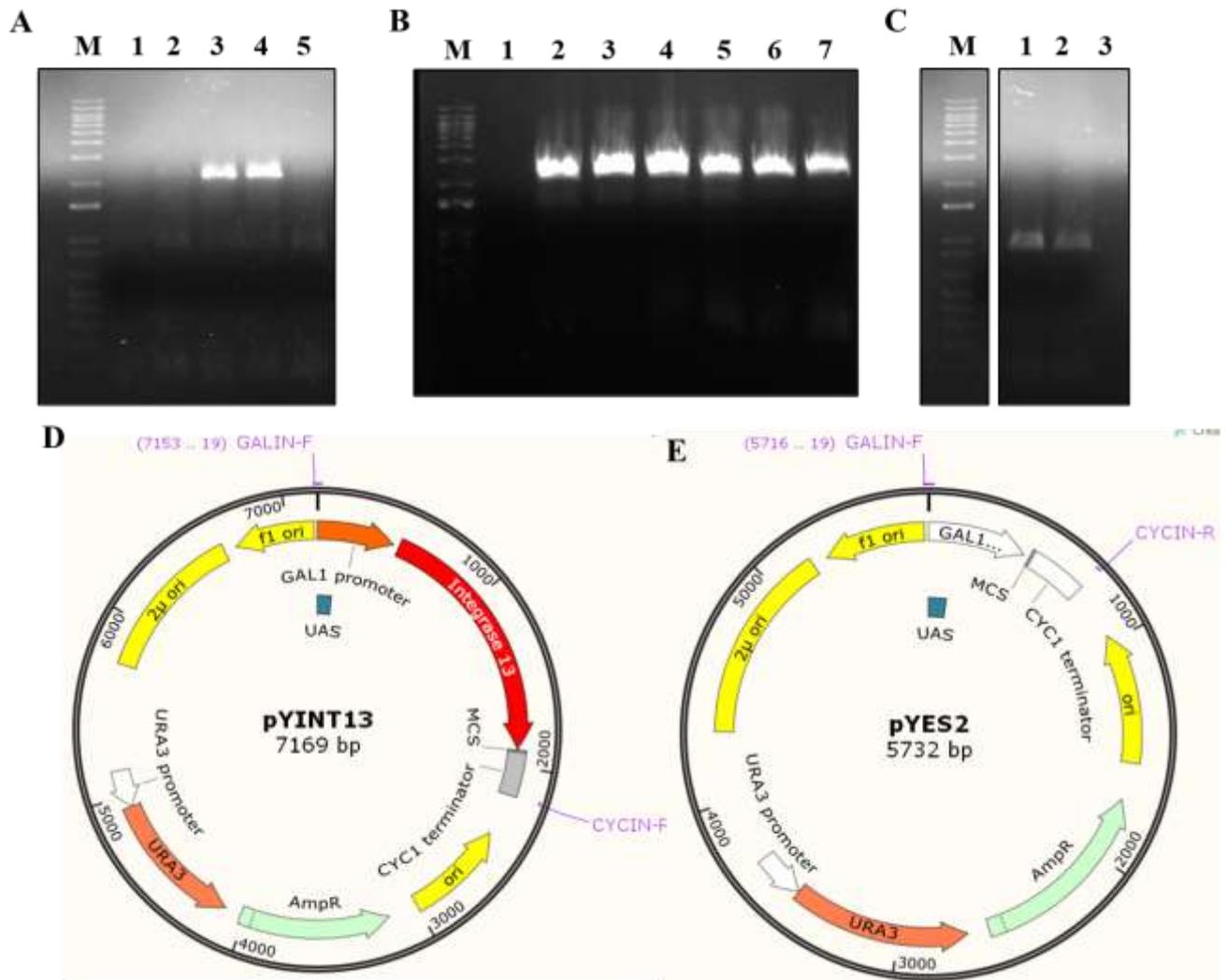


Figura 63. Confirmação das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT13, RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT13 e RE1003 HO-13-4-Venus-4-13 pYES2. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação da região: A. Promotor-INT13-Terminador (2189 pb), poço 1 é o controle negativo, poços 2-5 na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT13. B. Promotor-INT13-Terminador (2189 pb), poço 1 é o controle negativo, poços 2-7 na linhagem RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT13. C. Promotor-Terminador (752 pb), poço 3 é o controle negativo, poços 1-2 na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYES2. M: marcador 1 kb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). D. Mapa físico do vetor pYINT13. Em alaranjado, o promotor *GAL1* e, em cinza, o terminador do *CYC1*. Em vermelho, a sequência da integrase 13. Em amarelo, a origem de replicação bacteriana. Em verde claro o gene de resistência a ampicilina (*AmpR*). Em alaranjado claro, a marca auxotrófica *URA3*. Em amarelo, a origem de replicação 2μ de leveduras. E. Mapa físico do vetor pYES2. Em branco, o promotor do *GAL1* e, em cinza, o terminador *CYC1*. Em amarelo, a origem de replicação bacteriana. Em verde claro, o gene de resistência a ampicilina (*AmpR*). Em alaranjado claro, a marca auxotrófica *URA3*. Em amarelo, a origem 2μ de replicação.

Uma vez construídas as linhagens com ou sem o gene repórter e as integrases, o próximo passo foi colocar os componentes do sistema optogenético, PHYBNT (vetor pPHYBNTGal4DBD) e PIF3 (vetor pGAD-PIF3). A presença do gene PHYBNT foi confirmada utilizando os *primers* PHYBNT-F e qPHYBNT-R (250 pb) (Figura 64).

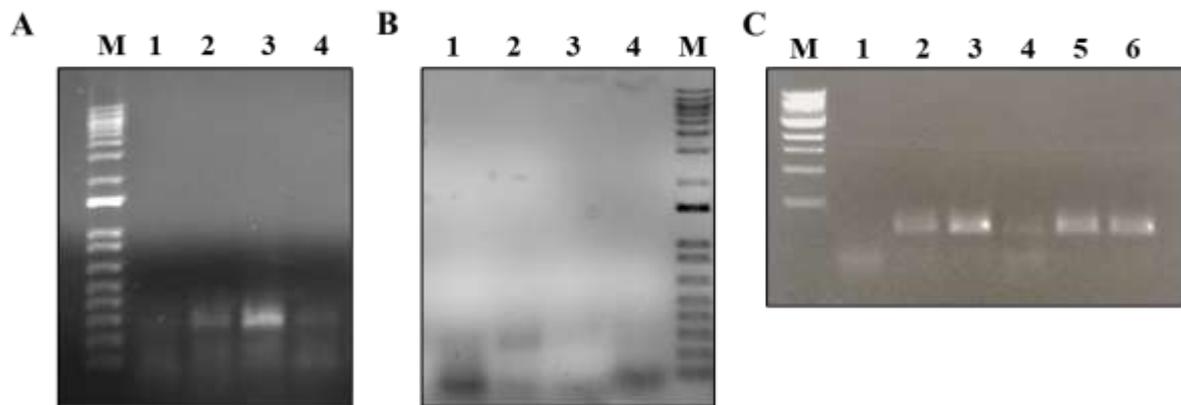


Figura 64. Confirmação das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT, RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT4 PHYBNT, RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT13 PHYBNT e RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT13 PHYBNT. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação da região: A. PHYBNT (250 pb), poço 1 é o controle negativo, poço 2 na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT, poços 3-4 na linhagem RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT4 PHYBNT. B. PHYBNT (250 pb), poço 1 é o controle negativo, poços 2-4 na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT13 PHYBNT. M: marcador 1 kb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). C. PHYBNT (250 pb), poço 1 é o controle negativo, poços 2-6 na linhagem RE1006 poly-KanMX4-HO pYINT13 PHYBNT. M: marcador 1 kb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Por outro lado, a presença do PIF3 em todas as linhagens foi confirmada utilizando os *primers* qPIF3II-F e qPIF3-R (512 pb) (Figura 65).

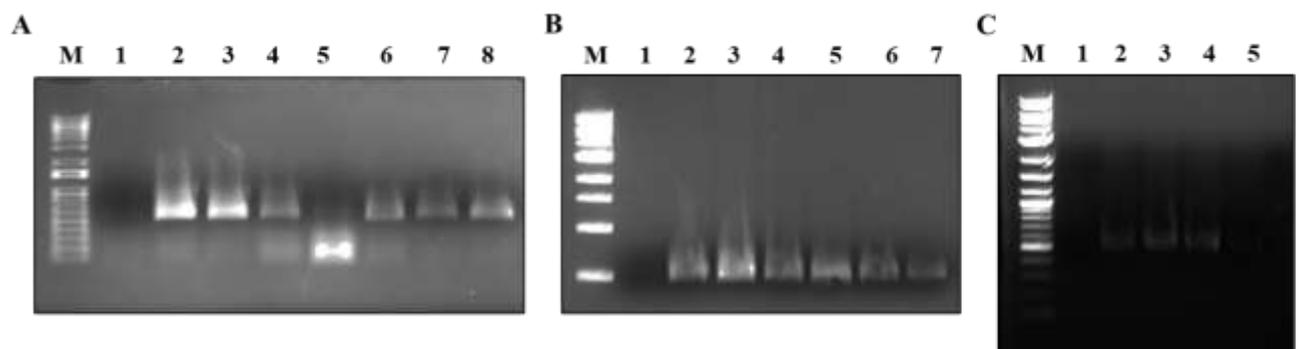


Figura 65. Confirmação das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT PIF3, RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT4 PHYBNT PIF3, RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT13 PHYBNT PIF3 e RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT13 PHYBNT PIF3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação da região: A. PIF3 (512 pb), poço 1 é o controle negativo, poços 2-5 na linhagem RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT4 PHYBNT PIF3, poços 6-8 na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT PIF3. M: Marcador: 2-log DNA Ladder B (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). B. PIF3 (512 pb), poço 1 é o controle negativo, poços 2-7 na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT13 PHYBNT PIF3. M: Marcador 1 kb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). C. PIF3 (512 pb), poço 1 é o controle negativo, poços 2-5 na linhagem RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT13 PHYBNT PIF3. M: Marcador: 2-log DNA Ladder B (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Para o desenvolvimento do sistema, foi construída uma linhagem controle positivo, contendo o gene repórter da orientação certa sob o controle do promotor constitutivo do gene *TEF1*. A estratégia foi a seguinte: o gene repórter foi amplificado do vetor pYVenus (Anexo 6) utilizando *primers* com homologia ao vetor YCUKGyIN4 (Anexo 7) digerido com as enzimas de restrição BamHI e NotI (*Primers*: VenusI-F e VenusI-R, fragmento de 776 pb). O fragmento amplificado foi utilizado para fazer recombinação homóloga com o vetor YCUKGyIN4 digerido com BamHI e NotI, dando o vetor YCVenus (Figura 66). O vetor YCVenus foi confirmado por digestão com as enzimas de restrição BamHI e HindIII e com a enzima PstI (Figura 66).

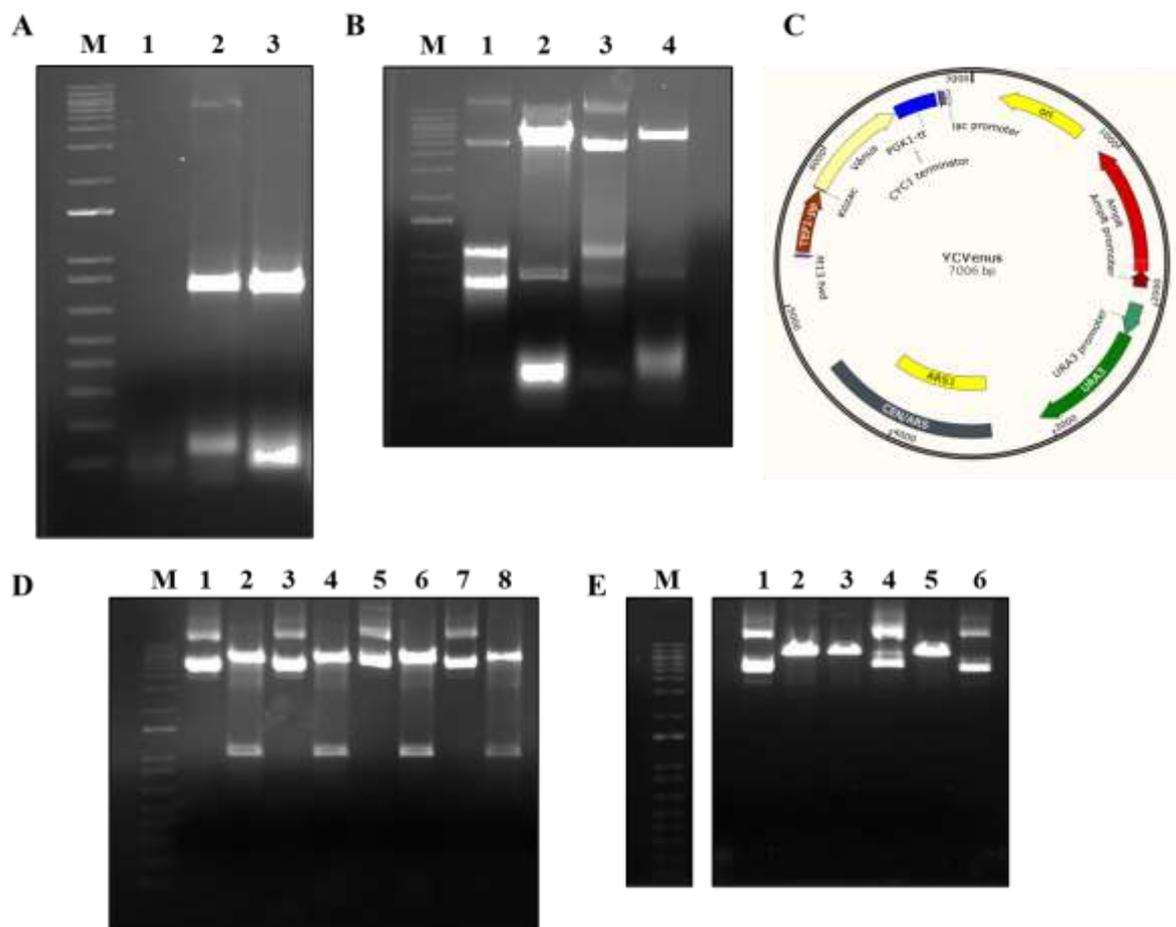


Figura 66. Construção do vetor YCVenus. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A. Amplificação por PCR do fragmento contendo o gene repórter *Venus* com homologia com o vetor YCUKGyIN4 digerido com BamHI e NotI, *primers* VenusI-F e VenusI-R (776 pb). B. Perfil de restrição do vetor YCUKGyIN4 digerido com as enzimas BamHI e NotI. Poços 1 e 3: Vetor intacto, não digerido. Poços 2 e 4: YCUKGyIN4 digerido com BamHI e NotI (6276 pb e 824 pb); M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). C. Mapa físico do vetor YCVenus obtido por recombinação homóloga. Em marrom, o promotor do *TEF1* e, em azul, o terminador *PGK1*. Em amarelo, a sequência da *Venus*. Em vermelho, a marca de resistência a ampicilina. Em amarelo, a origem de replicação bacteriana. Em verde, a marca auxotrófica *URA3*. Em cinza, o CEN/ARS. D. Perfil de

restrição do vetor YCVenus digerido com as enzimas BamHI e HindIII. Poços 1, 3, 5 e 7. Vetor intacto, não digerido. Poços 2, 4, 6 e 8: YCVenus digerido com BamHI e HindIII (5993 pb e 1013 pb). E. Perfil de restrição do vetor YCVenus digerido com a enzima PstI. Poços 1, 4 e 6. Vetor intacto, não digerido. Poços 2, 3 e 5: YCVenus digerido com PstI (7006 pb) M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

A partir do vetor YCVenus construído e confirmado anteriormente, foi amplificado o cassete contendo o promotor do *TEF1*, o gene repórter e o terminador do *PGK* (cassete: TEF-Venus-PGK) com *primers* contendo homologia com o *locus* HO no genoma da levedura *S. cerevisiae* (*primers*: TEFVenus-F e VenusPGK-R, 1478 pb). O cassete resultante da amplificação foi utilizado para fazer recombinação homóloga com o vetor HO-Int13Int4VENUSInt4INT13 digerido com as enzimas de restrição BglII e BamHI, dando o vetor final HO-Venus (controle positivo). O vetor final foi confirmado por digestão com as enzimas de restrição BglII e SalI, PstI e SpeI (Figura 67).

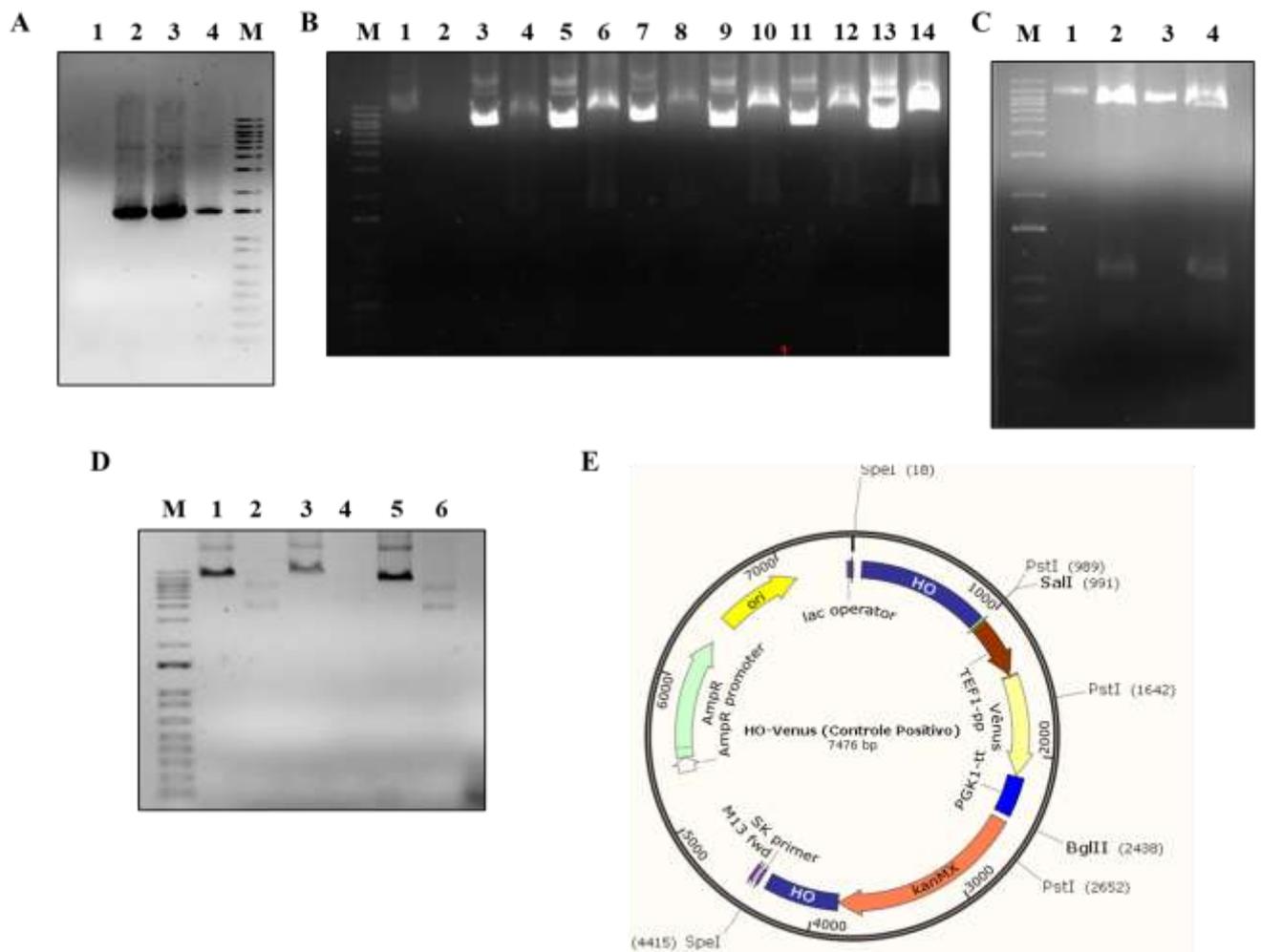


Figura 67. Construção do vetor HO-Venus (controle positivo). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A. Amplificação por PCR do fragmento contendo o promotor do *TEF1*,

o gene repórter e o terminador do *PGK* (cassete: TEF-Venus-PGK), *primers* TEFVenus-F e VenusPGK-R, (1478 pb). B. Perfil de restrição do vetor HO-Venus (Controle positivo) digerido com as enzimas *SalI* e *BglII*. Poços 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13. Vetor intacto, não digerido. Poços 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14: HO-Venus (Controle positivo) digerido com *SalI* e *BglII* (6029 pb e 1447 pb). C. Perfil de restrição do vetor HO-Venus (Controle positivo) digerido com a enzima *PstI*. Poços 1 e 3. Vetor intacto, não digerido. Poços 2 e 4: HO-Venus (Controle positivo) digerido com *PstI* (5813 pb, 1010 pb e 653 pb). D. Perfil de restrição do vetor HO-Venus (Controle positivo) digerido com a enzima *SpeI*. Poços 1, 3 e 5. Vetor intacto, não digerido. Poços 2, 4 e 6: HO-Venus (Controle positivo) digerido com *SpeI* (4397 pb e 3079 pb). M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). E. Mapa físico do vetor HO-Venus (Controle positivo) obtido por recombinação homóloga. Em azul, as sequências para o direcionamento para a integração no *locus* HO. Em marrom, o promotor *TEF1* e, em azul, o terminador *PGKI*. Em amarelo, a sequência da Venus. Em alaranjado, a marca de resistência a kanamicina/G418 (kanMX). Em amarelo, a origem de replicação bacteriana. Em verde claro o gene de resistência a ampicilina (AmpR).

Com os resultados obtidos até este ponto, foram construídas todas as linhagens para a construção do sistema de regulação combinando o uso das integrases 4 e 13 e o sistema optogenético responsivo à luz vermelha baseado no uso do PHYBNT e do PIF3.

5.3.2.2 Avaliação do funcionamento do sistema integrases-optogenética

5.3.2.2.1 Experimento em placas para avaliar a fluorescência da Venus

A optogenética permite novas modalidades de controle dinâmico, em que a luz ou a escuridão agem como agentes indutores. Para avaliar o funcionamento do sistema combinando o uso da optogenética com as integrases 4 ou 13, foi feito um experimento em placas de meio mínimo na presença de luz vermelha/escuridão. Para este experimento os clones foram crescidos em meio seletivo com glicose como fonte de carbono. Após 24 h de crescimento, foram feitas as placas. As placas foram incubadas por 48 h. Após esse tempo, a placa com galactose como fonte de carbono, glicose sem a presença da PCB e uma placa de glicose + PCB foram mantidas no escuro durante 96h. A outra placa de glicose + PCB foi colocada na presença da luz vermelha por esse mesmo tempo. No final do experimento, as placas foram colocadas no fotodocumentador para avaliar a fluorescência da Venus (Figura 68).

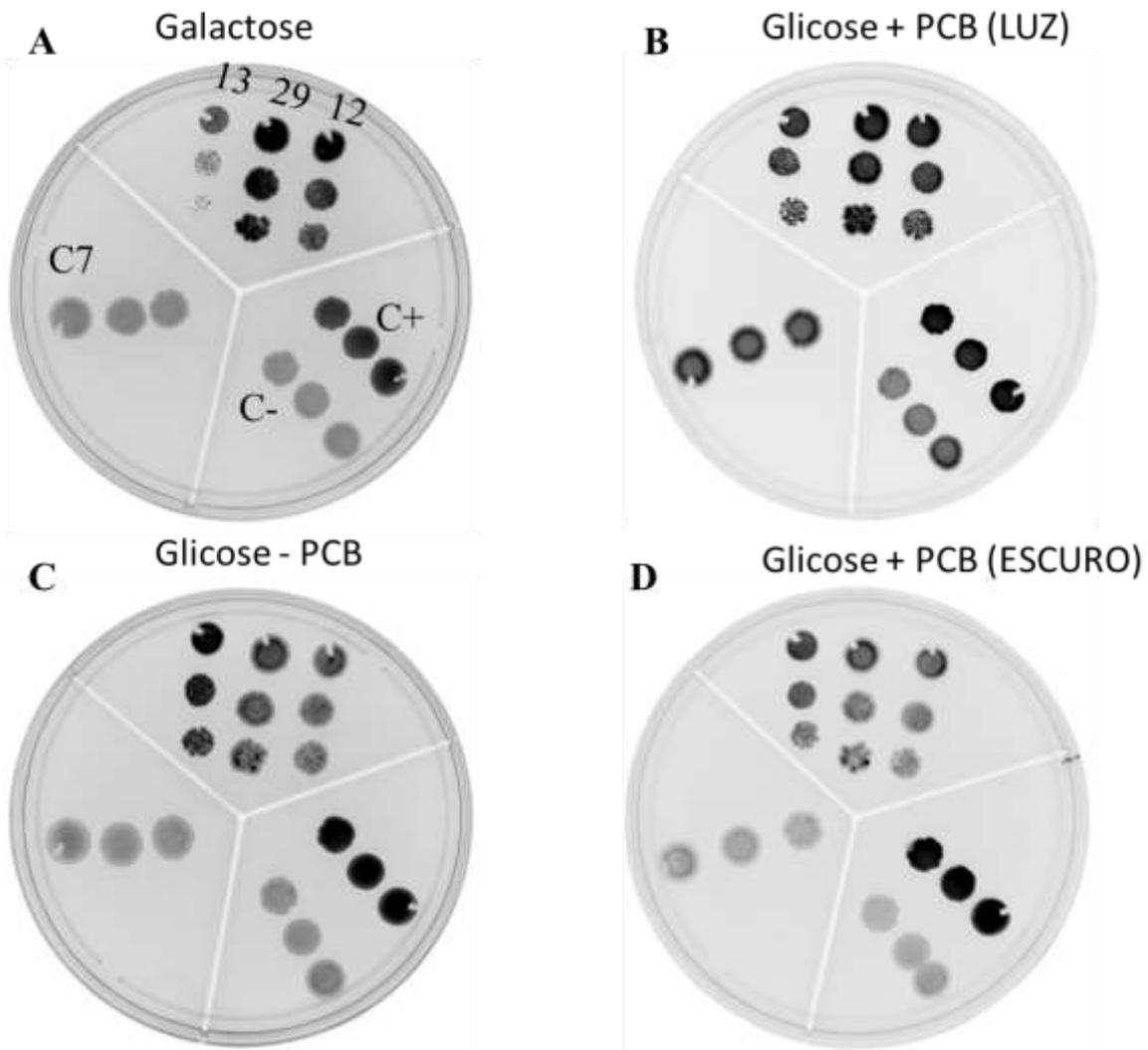


Figura 68. Expressão intracelular da proteína Venus após 48 h no escuro e 96 h de indução na presença de luz vermelha. Análise da expressão da Venus em placas de meio mínimo na presença de luz vermelha (660 nm). A linhagens foram avaliadas na presença de A. Galactose, no escuro; B. Glicose + PCB, na presença de luz vermelha; C. Glicose – PCB, no escuro; D. Glicose + PCB, no escuro. Amostras analisadas: c7: RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYES2, c13: RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT13 PHYBNT PIF3, c29: RE1006 HO-poly-KanMX4-HO pYINT4 PHYBNT PIF3, c12: RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT PIF3, c+: RE1006 HO-Venus, c-: RE1006.

Os resultados obtidos mostraram que na condição na luz (Glicose + PCB, LUZ), as linhagens apresentam fluorescência quando comparadas com a mesma condição no escuro e na amostra c7 (RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYES2) e a amostra controle negativo (RE1006). Na placa nas condições em galactose o resultado é o esperado assim como na placa sem PCB. Só a amostra c29 que não deveria ter fluorescência nenhum, pois não apresenta gene repórter que está dando um resultado diferente ao esperado.

5.3.2.2 Análise da orientação do gene repórter *Venus*

Uma vez desenvolvidas e confirmadas todas as linhagens, o próximo passo foi testar o funcionamento do sistema, que foi avaliado primeiro em experimentos em placas de meio mínimo (Figura 68) e depois mediante experimentos de PCR. Com os experimentos a partir de PCR o objetivo é ver se na presença do agente indutor (luz vermelha ou galactose), o gene repórter é invertido e fica na orientação correta. A Figura 69 mostra os dois possíveis cenários que podem acontecer, ou seja, na orientação invertida e na orientação correta, e os pares de *primers* que amplificam em cada caso.

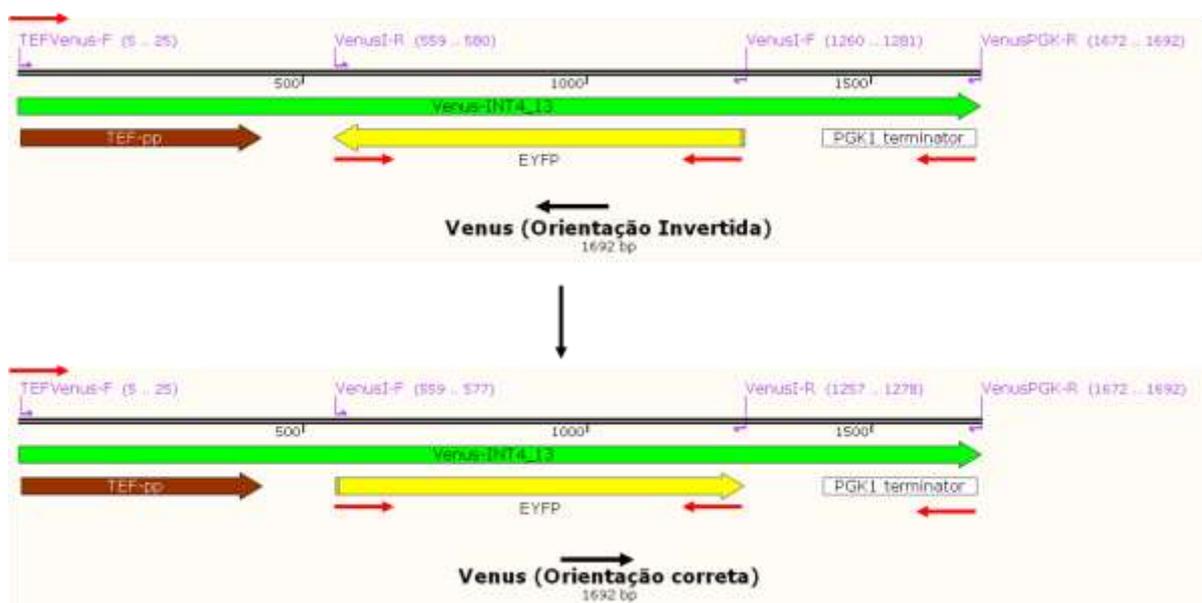


Figura 69. Análise da orientação do gene repórter *Venus* nas diferentes condições. Para a orientação correta, os pares de *primers* que amplificam são VenusI-F e VenusPGK-R; e TEFVenus-F e VenusI-R. Para a orientação invertida os pares de *primers* que amplificam são VenusI-R e VenusPGK-R; e TEFVenus-F e VenusI-F.

Para avaliar a orientação correta do gene *Venus*, primeiramente foi feita a PCR com os vetores como controles do experimento. Para a orientação correta foi utilizado como molde o vetor HO-*Venus* (controle positivo), e para a orientação invertida foi utilizado o vetor HO-13-4-*Venus*-4-13. Foram utilizados os pares de primers VenusI-F e VenusI-R, VenusI-F e VenusPGK-R, e VenusI-R e VenusPGK-R. O resultado esperado é o seguinte: sempre que a linhagem tiver o gene repórter, amplificam os pares de primers VenusI-F e VenusI-R. Para ver a orientação, se o gene repórter estiver na orientação correta amplificará o par de primers VenusI-F e VenusPGK-R e se o gene repórter estiver na orientação invertida amplificará o par de primers VenusI-R e VenusPGK-R. A Figura 70 mostra os resultados obtidos com os controles do experimento.

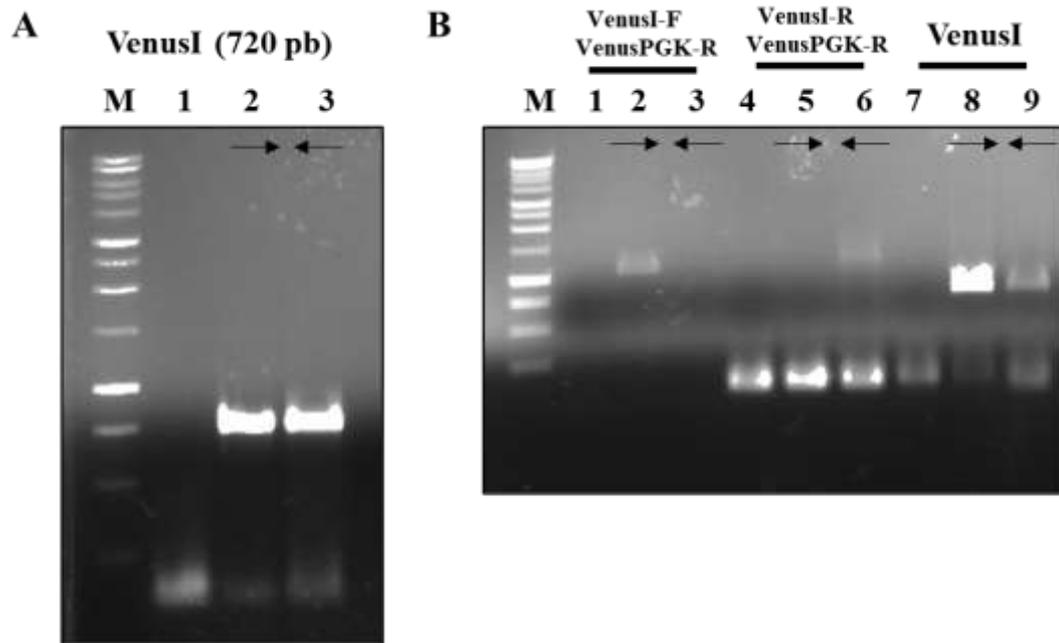


Figura 70. Análise da orientação do gene repórter nos controles do experimento. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A. Amplificação por PCR do fragmento contendo o gene repórter, primers VenusI-F e VenusI-R, (720 pb). B. Amplificação por PCR e análise da orientação do gene repórter, poços 1-3: primers VenusI-F e VenusPGK-R, poços 4-6: primers VenusI-R e VenusPGK-R e poços 7-9: primers VenusI-F e VenusI-R. →: Vetor HO-Venus. ←: Vetor HO-13-4-Venus-4-13. M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

A partir deste primeiro resultado, foram feitas estas mesmas análises nas amostras das linhagens RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT PIF3 (c12) e RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYES2 (c7) após a indução com luz vermelha (Figura 71).

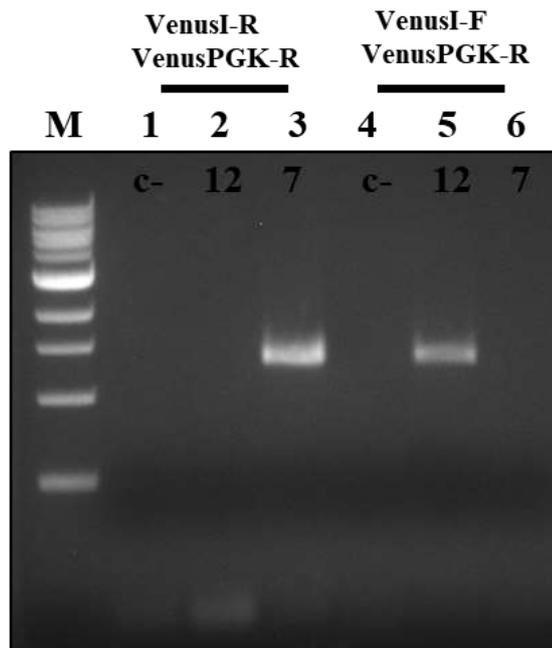


Figura 71. Análise da orientação do gene repórter na indução com luz vermelha. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Amplificação por PCR e análise da orientação do gene repórter, poço 1 e 4: controles negativos; poços 2 e 4: linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT PIF3 (c12); poços 3 e 5: linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYES2 (c7). M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Os resultados observados na Figura 71 mostram o seguinte: na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT PIF3 (c12), amplificaram os primers que se correspondem com a orientação correta, ou seja, na presença da luz vermelha o sistema ontogenético expressou a integrase 4 e a integrase inverteu a orientação do gene repórter. No caso da linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYES2 (7), a amplificação ocorreu, como esperado, com os primers para a orientação invertida. Como esta linhagem não expressa a integrase, o gene repórter não teve sua orientação invertida em momento algum. Os resultados obtidos até aqui demonstram que as integrases 4 e 13 avaliadas funcionaram e que o sistema tem dois níveis de regulação: a indução por luz e a atividade de integrase. Utilizando dois níveis de regulação o sistema de expressão fica mais robusto e permite, por exemplo a diminuição dos vazamentos do sistema ou diminuir o *background*.

A partir desses resultados, foi avaliada a orientação do gene repórter nas diferentes condições de indução, ou seja, na presença de luz, no escuro e na presença de galactose. Os resultados obtidos se mostram na Figura 72.

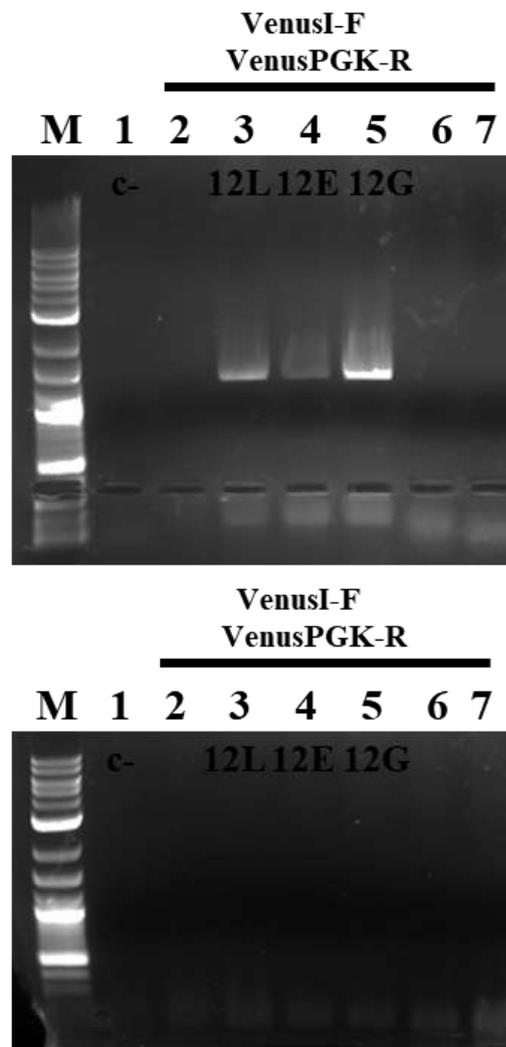


Figura 72. Análise da orientação do gene repórter nas diferentes condições de indução na linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT PIF3 (c12). Eletroforese em gel de 1% agarose corado com brometo de etídio. Amplificação por PCR e análise da orientação do gene repórter, poço 1: controle negativo; poços 3-5: linhagem RE1006 HO-13-4-Venus-4-13 pYINT4 PHYBNT PIF3 (c12) nas diferentes condições, luz, escuro e galactose, respectivamente. M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA).

Os resultados obtidos na Figura 72 mostram que o gene repórter, como esperado, virou para a orientação correta tanto na indução com luz vermelha, quando na indução com galactose. Ao avaliar a linhagem na indução no escuro, pode-se observar que o gene repórter também virou, indicando que o sistema está sendo ativado no escuro também. Cabe mencionar que como é um ensaio de PCR com o mínimo nível de fundo que se obtenha vai se amplificar o gene na orientação que estiver. O sistema responsivo a luz vermelha baseado do PHYBNT/PIF3 foi demonstrado que responde a luz ambiente (luz branca) (Pathak et al., 2014). Uma coisa que pode ter acontecido é que em algum momento as linhagens, durante algum momento do processo ficaram expostas, embora minimamente, a luz branca e com isso o sistema se ativou.

Com este trabalho desenvolvido no nosso laboratório, estamos começando o estudo de sistemas optogenéticos e embora tenhamos uma sala com luz verde, para evitar a luz branca, nem todos os lugares por onde precisamos passar estão acondicionados para estudos optogenéticos. Então para os ensaios futuros, recomendamos a adaptação de todos os ambientes donde seja necessário trabalhar.

Esse foi o primeiro trabalho de optogenética no nosso laboratório e, embora o sistema não tenha funcionado como esperado idealmente, abre uma nova possibilidade de estudo para um sistema de regulação baseado na luz como agente indutor. Um novo sistema mais sensível e regulável que junto ao sistema baseado no uso de integrases, oferecerá uma alternativa de sistema regulação fina e duplamente regulado que pode ser utilizado para a construção de circuitos genéticos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nos últimos anos, a optogenética emergiu como uma alternativa promissora para substituir produtos químicos. A optogenética concentrou-se principalmente na otimização de sistemas existentes e aplicá-los a novos processos. Há uma necessidade contínua de interruptores que permitem um controle mais rígido da sinalização e podem ser facilmente aplicados em uma variedade de configurações, incluindo o tratamento de doenças humanas.

Com o estudo da optogenética em leveduras neste trabalho, por um lado, estudamos um sistema optogenético responsivo a luz vermelha em *K. phaffii*, combinando-o com o estudo do domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição Mit1, fator de transcrição presente na regulação do promotor do *AOX1*. O sistema optogenético precisa ser refinado, e analisar os principais problemas obtidos, tanto na construção do sistema baseado nas proteínas que respondem a luz, como no estudo do fator de transcrição.

O sistema de regulação baseado no uso das integrases 4 e 13 em *S. cerevisiae* mostrou resultados favoráveis e promissores, e se obtiveram duas integrases funcionais que podem ser usadas para a construção de um circuito genético. O próximo passo é combinar as duas integrases para a construção de um circuito genético contendo um sinal para ligar e outro para desligar o sistema.

O estudo de regulação estudado nesta levedura se voltou para a construção de circuitos estáveis e finamente regulados. O sistema optogenético baseado na luz vermelha em *S. cerevisiae* se apresentou funcional. A partir desses primeiros resultados positivos, se combinou a regulação baseada no uso das integrases com o sistema optogenético. Os resultados obtidos mostram que o sistema foi ativado e o gene repórter foi invertido para a orientação correta, mas precisam ser feito ajustes nas condições de escuridão para ver as diferenças na ativação/não ativação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abioye, J., Lawson-Williams, M., Lecanda, A., Calhoun, B., McQue, A. L., Colloms, S. D., Stark, W. M., Olorunniji, F. J. 2022. High fidelity one-pot DNA assembly using orthogonal serine integrases. *Biotechnol J.* e2200411. <https://doi.org/10.1002/biot.202200411>
- An-Adirekkun, J. M., Stewart, C. J., Geller, S. H., Patel, M. T., Melendez, J., Oakes, B. L., Noyes, M. B., McClean, M. N. 2020. A yeast optogenetic toolkit (yOTK) for gene expression control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng.* 117, 886-893. <https://doi.org/10.1002/bit.27234>
- Arruda, A., Reis, V. C., Batista, V. D., Daher, B. S., Piva, L. C., De Marco, J. L., de Moraes, L. M., Torres, F. A. 2016. A constitutive expression system for *Pichia pastoris* based on the PGK1 promoter. *Biotechnol Lett.* 38, 509-517. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2002-2>
- Becker, D. M., Guarente, L. 1991. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol.* 194, 182-187. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94015-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94015-5)
- Borodina, I., Kildegaard, K. R., Jensen, N. B., Blicher, T. H., Maury, J., Sherstyk, S., Schneider, K., Lamosa, P., Herrgard, M. J., Rosenstand, I., Oberg, F., Forster, J., Nielsen, J. 2015. Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via beta-alanine. *Metab Eng.* 27, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.10.003>
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K. 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci.* 8, 1263-1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>
- Buijs, N. A., Siewers, V., Nielsen, J. 2013. Advanced biofuel production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Chem Biol.* 17, 480-488. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.036>
- Camara, E., Monforte, S., Albiol, J., Ferrer, P. 2019. Deregulation of methanol metabolism reverts transcriptional limitations of recombinant *Pichia pastoris* (*Komagataella* spp) with multiple expression cassettes under control of the AOX1 promoter. *Biotechnol Bioeng.* 116, 1710-1720. <https://doi.org/10.1002/bit.26947>
- Cao, M., Gao, M., Lopez-Garcia, C. L., Wu, Y., Seetharam, A. S., Severin, A. J., Shao, Z. 2017. Centromeric DNA Facilitates Nonconventional Yeast Genetic Engineering. *ACS Synth Biol.* 6, 1545-1553. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00046>
- Carra, P. O. 1970. Algal biliproteins. *Biochem J.* 119, 2P-3P. <https://doi.org/10.1042/bj1190002p>
- Cereghino, J. L., Cregg, J. M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24, 45-66.
- Chen, D. C., Yang, B. C., Kuo, T. T. 1992. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet.* 21, 83-84. <https://doi.org/10.1007/BF00318659>
- Chernov, K. G., Redchuk, T. A., Omelina, E. S., Verkhusha, V. V. 2017. Near-Infrared Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools Engineered from Phytochromes. *Chem Rev.* 117, 6423-6446. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00700>
- Crefcoeur, R. P., Yin, R., Ulm, R., Halazonetis, T. D. 2013. Ultraviolet-B-mediated induction of protein-protein interactions in mammalian cells. *Nat Commun.* 4, 1779. <https://doi.org/10.1038/ncomms2800>
- Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., Madden, K. R. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol.* 5, 3376-3385.

- Da Silva, N. A., Srikrishnan, S. 2012. Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 12, 197-214. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00769.x>
- Damasceno, L. M., Huang, C. J., Batt, C. A. 2012. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93, 31-39. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3654-z>
- Deisseroth, K. 2011. Optogenetics. *Nat Methods.* 8, 26-29. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.324>
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A. K., Miesenbock, G., Ting, A., Schnitzer, M. J. 2006. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci.* 26, 10380-10386. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006>
- Deiters, A. 2010. Principles and applications of the photochemical control of cellular processes. *Chembiochem.* 11, 47-53. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900529>
- Drepper, T., Krauss, U., Meyer zu Berstenhorst, S., Pietruszka, J., Jaeger, K. E. 2011. Lights on and action! Controlling microbial gene expression by light. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90, 23-40. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3141-6>
- Drumonde-Neves, J., Vieira, E., Lima, M. T., Araujo, I., Casal, M., Schuller, D. 2013. An easy, quick and cheap high-throughput method for yeast DNA extraction from microwell plates. *J Microbiol Methods.* 93, 206-208. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.03.016>
- Duarte, D. V. 2019. Desenvolvimento de circuito sintético lógico para controle preciso e eficiente da expressão gênica em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana). Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, <https://doi.org/https://repositorio.unb.br/handle/10482/35547>
- Escalante-Chong, R., Savir, Y., Carroll, S. M., Ingraham, J. B., Wang, J., Marx, C. J., Springer, M. 2015. Galactose metabolic genes in yeast respond to a ratio of galactose and glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112, 1636-1641. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418058112>
- Fahrenkrog, B., Aebi, U. 2003. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 757-766. <https://doi.org/10.1038/nrm1230>
- Figueroa, D., Rojas, V., Romero, A., Larrondo, L. F., Salinas, F. 2021. The rise and shine of yeast optogenetics. *Yeast.* 38, 131-146. <https://doi.org/10.1002/yea.3529>
- Fleig, U., Salus, S. S., Karig, I., Sazer, S. 2000. The fission yeast ran GTPase is required for microtubule integrity. *J Cell Biol.* 151, 1101-1111. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.5.1101>
- Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I. J., Filsinger Interrante, M., Smolke, C. D. 2015. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science.* 349, 1095-1100. <https://doi.org/10.1126/science.aac9373>
- Gautier, A., Gauron, C., Volovitch, M., Bensimon, D., Jullien, L., Vríz, S. 2014. How to control proteins with light in living systems. *Nat Chem Biol.* 10, 533-541. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1534>
- Ge, B., Li, Y., Sun, H., Zhang, S., Hu, P., Qin, S., Huang, F. 2013. Combinational biosynthesis of phycocyanobilin using genetically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 35, 689-693. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1132-z>
- Ge, B., Sun, H., Feng, Y., Yang, J., Qin, S. 2009. Functional biosynthesis of an allophycocyan beta subunit in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng.* 107, 246-249. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.11.014>
- Geier, M., Fauland, P., Vogl, T., Glieder, A. 2015. Compact multi-enzyme pathways in *P. pastoris*. *Chem Commun (Camb).* 51, 1643-1646. <https://doi.org/10.1039/c4cc08502g>
- Genove, G., Glick, B. S., Barth, A. L. 2005. Brighter reporter genes from multimerized fluorescent proteins. *Biotechniques.* 39, 814, 816, 818 passim. <https://doi.org/10.2144/000112056>

- Grindley, N. D., Whiteson, K. L., Rice, P. A. 2006. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Biochem.* 75, 567-605. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073908>
- Guiziou, S., Mayonove, P., Bonnet, J. 2019. Hierarchical composition of reliable recombinase logic devices. *Nat Commun.* 10, 456. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08391-y>
- Guru, A., Post, R. J., Ho, Y. Y., Warden, M. R. 2015. Making Sense of Optogenetics. *Int J Neuropsychopharmacol.* 18, pyv079. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv079>
- Heyland, J., Fu, J., Blank, L. M., Schmid, A. 2010. Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng.* 107, 357-368. <https://doi.org/10.1002/bit.22836>
- Ho, C., Morsut, L. 2021. Novel synthetic biology approaches for developmental systems. *Stem Cell Reports.* 16, 1051-1064. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.04.007>
- Hobl, B., Hock, B., Schneck, S., Fischer, R., Mack, M. 2013. Bacteriophage T7 RNA polymerase-based expression in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 92, 100-104. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.09.004>
- Hochrein, L., Machens, F., Messerschmidt, K., Mueller-Roeber, B. 2017. PhiReX: a programmable and red light-regulated protein expression switch for yeast. *Nucleic Acids Res.* 45, 9193-9205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx610>
- Hong, K. K., Nielsen, J. 2012. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. *Cell Mol Life Sci.* 69, 2671-2690. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0945-1>
- Horner, M., Gerhardt, K., Salavei, P., Hoess, P., Harrer, D., Kaiser, J., Tabor, J. J., Weber, W. 2019. Production of Phytochromes by High-Cell-Density *E. coli* Fermentation. *ACS Synth Biol.* 8, 2442-2450. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00267>
- Hsiao, V., Hori, Y., Rothmund, P. W., Murray, R. M. 2016. A population-based temporal logic gate for timing and recording chemical events. *Mol Syst Biol.* 12, 869. <https://doi.org/10.15252/msb.20156663>
- Ikushima, S., Boeke, J. D. 2017. New Orthogonal Transcriptional Switches Derived from Tet Repressor Homologues for *Saccharomyces cerevisiae* Regulated by 2,4-Diacetylphloroglucinol and Other Ligands. *ACS Synth Biol.* 6, 497-506. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00205>
- Kaishima, M., Ishii, J., Matsuno, T., Fukuda, N., Kondo, A. 2016. Expression of varied GFPs in *Saccharomyces cerevisiae*: codon optimization yields stronger than expected expression and fluorescence intensity. *Sci Rep.* 6, 35932. <https://doi.org/10.1038/srep35932>
- Kawano, F., Okazaki, R., Yazawa, M., Sato, M. 2016. A photoactivatable Cre-loxP recombination system for optogenetic genome engineering. *Nat Chem Biol.* 12, 1059-1064. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2205>
- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E. A., Al-Sady, B., Lanzatella, C., Quail, P. H. 2004. A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell.* 16, 3033-3044. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025643>
- King, N. 2010. RT-PCR protocols. Preface. *Methods Mol Biol.* 630, v. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0>
- Kranthi, B. V., Kumar, R., Kumar, N. V., Rao, D. N., Rangarajan, P. N. 2009. Identification of key DNA elements involved in promoter recognition by Mxr1p, a master regulator of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris*. *Biochim Biophys Acta.* 1789, 460-468. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.05.004>
- Krivoruchko, A., Siewers, V., Nielsen, J. 2011. Opportunities for yeast metabolic engineering: Lessons from synthetic biology. *Biotechnol J.* 6, 262-276. <https://doi.org/10.1002/biot.201000308>

- Krueger, D., Izquierdo, E., Viswanathan, R., Hartmann, J., Pallares Cartes, C., De Renzis, S. 2019. Principles and applications of optogenetics in developmental biology. *Development*. 146, <https://doi.org/10.1242/dev.175067>
- Kumar, A., Baldia, A., Rajput, D., Kateriya, S., Babu, V., Dubey, K. K. 2022. Multiomics and optobiotechnological approaches for the development of microalgal strain for production of aviation biofuel and biorefinery. *Bioresour Technol*. 369, 128457. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128457>
- Kumar, I., Swaminathan, K., Hudson, K., Hudson, M. E. 2016. Evolutionary divergence of phytochrome protein function in *Zea mays* PIF3 signaling. *J Exp Bot*. 67, 4231-4240. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw217>
- Leao-Helder, A. N., Krikken, A. M., van der Klei, I. J., Kiel, J. A., Veenhuis, M. 2003. Transcriptional down-regulation of peroxisome numbers affects selective peroxisome degradation in *Hansenula polymorpha*. *J Biol Chem*. 278, 40749-40756. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304029200>
- Levskaya, A., Weiner, O. D., Lim, W. A., Voigt, C. A. 2009. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature*. 461, 997-1001. <https://doi.org/10.1038/nature08446>
- Li, Y., Li, S., Thodey, K., Trenchard, I., Cravens, A., Smolke, C. D. 2018. Complete biosynthesis of noscapine and halogenated alkaloids in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115, E3922-E3931. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721469115>
- Lin-Cereghino, G. P., Godfrey, L., de la Cruz, B. J., Johnson, S., Khuongsathiene, S., Tolstorukov, I., Yan, M., Lin-Cereghino, J., Veenhuis, M., Subramani, S., Cregg, J. M. 2006. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*. 26, 883-897. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.883-897.2006>
- Liu, B., Zhao, Y., Zhou, H., Zhang, J. 2022. Enhancing xylanase expression of *Komagataella phaffii* induced by formate through Mit1 co-expression. *Bioprocess Biosyst Eng*. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02760-6>
- Logez, C., Alkhalfioui, F., Byrne, B., Wagner, R. 2012. Preparation of *Pichia pastoris* expression plasmids. *Methods Mol Biol*. 866, 25-40. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-770-5_3
- McCue, A. C., Kuhlman, B. 2022. Design and engineering of light-sensitive protein switches. *Curr Opin Struct Biol*. 74, 102377. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102377>
- Medema, M. H., Breitling, R., Bovenberg, R., Takano, E. 2011. Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 9, 131-137. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2478>
- Merrick, C. A., Zhao, J., Rosser, S. J. 2018. Serine Integrases: Advancing Synthetic Biology. *ACS Synth Biol*. 7, 299-310. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00308>
- Mokdad-Gargouri, R., Abdelmoula-Soussi, S., Hadiji-Abbes, N., Amor, I. Y., Borchani-Chabchoub, I., Gargouri, A. 2012. Yeasts as a tool for heterologous gene expression. *Methods Mol Biol*. 824, 359-370. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_18
- Moon, T. S., Clarke, E. J., Groban, E. S., Tamsir, A., Clark, R. M., Eames, M., Kortemme, T., Voigt, C. A. 2011. Construction of a genetic multiplexer to toggle between chemosensory pathways in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 406, 215-227. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.019>
- Moreno Morales, N., Patel, M. T., Stewart, C. J., Sweeney, K., McClean, M. N. 2021. Optogenetic Tools for Control of Public Goods in *Saccharomyces cerevisiae*. *mSphere*. 6, e0058121. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00581-21>

- Muller, K., Engesser, R., Timmer, J., Nagy, F., Zurbriggen, M. D., Weber, W. 2013. Synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells. *Chem Commun (Camb)*. 49, 8970-8972. <https://doi.org/10.1039/c3cc45065a>
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., Miyawaki, A. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*. 20, 87-90. <https://doi.org/10.1038/nbt0102-87>
- Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., Bamberg, E., Hegemann, P. 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*. 296, 2395-2398. <https://doi.org/10.1126/science.1072068>
- Nelson, M., Silver, P. 1989. Context affects nuclear protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 9, 384-389. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.2.384>
- Ni, M., Tepperman, J. M., Quail, P. H. 1998. PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*. 95, 657-667. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81636-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81636-0)
- Ni, M., Tepperman, J. M., Quail, P. H. 1999. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*. 400, 781-784. <https://doi.org/10.1038/23500>
- Ni, W., Xu, S. L., Chalkley, R. J., Pham, T. N., Guan, S., Maltby, D. A., Burlingame, A. L., Wang, Z. Y., Quail, P. H. 2013. Multisite light-induced phosphorylation of the transcription factor PIF3 is necessary for both its rapid degradation and concomitant negative feedback modulation of photoreceptor phyB levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25, 2679-2698. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.112342>
- Nielsen, J. 2013. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered*. 4, 207-211. <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>
- Ohsawa, S., Oku, M., Yurimoto, H., Sakai, Y. 2022. Regulation of Peroxisome Homeostasis by Post-Translational Modification in the Methylotrophic Yeast *Komagataella phaffii*. *Front Cell Dev Biol*. 10, 887806. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.887806>
- Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J. 2000. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64, 34-50. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.34-50.2000>
- Paddon, C. J., Westfall, P. J., Pitera, D. J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M. D., Tai, A., Main, A., Eng, D., Polichuk, D. R., Teoh, K. H., Reed, D. W., Treynor, T., Lenihan, J., Fleck, M., Bajad, S., Dang, G., Dengrove, D., Diola, D., Dorin, G., Ellens, K. W., Fickes, S., Galazzo, J., Gaucher, S. P., Geistlinger, T., Henry, R., Hepp, M., Horning, T., Iqbal, T., Jiang, H., Kizer, L., Lieu, B., Melis, D., Moss, N., Regentin, R., Secrest, S., Tsuruta, H., Vazquez, R., Westblade, L. F., Xu, L., Yu, M., Zhang, Y., Zhao, L., Lievens, J., Covello, P. S., Keasling, J. D., Reiling, K. K., Renninger, N. S., Newman, J. D. 2013. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*. 496, 528-532. <https://doi.org/10.1038/nature12051>
- Pathak, G. P., Strickland, D., Vrana, J. D., Tucker, C. L. 2014. Benchmarking of optical dimerizer systems. *ACS Synth Biol*. 3, 832-838. <https://doi.org/10.1021/sb500291r>
- Perez, A. L. A., Piva, L. C., Fulber, J. P. C., de Moraes, L. M. P., De Marco, J. L., Vieira, H. L. A., Coelho, C. M., Reis, V. C. B., Torres, F. A. G. 2022. Optogenetic strategies for the control of gene expression in yeasts. *Biotechnol Adv*. 54, 107839. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107839>
- Pham, H. L., Wong, A., Chua, N., Teo, W. S., Yew, W. S., Chang, M. W. 2017. Engineering a riboswitch-based genetic platform for the self-directed evolution of acid-tolerant phenotypes. *Nat Commun*. 8, 411. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00511-w>

- Piva, L. C., De Marco, J. L., de Moraes, L. M. P., Reis, V. C. B., Torres, F. A. G. 2018. Acetamidase as a dominant recyclable marker for *Komagataella phaffii* strain engineering. *Appl Microbiol Biotechnol.* 102, 2753-2761. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8824-9>
- Piva, L. C., De Marco, J. L., Moraes, L. M. P., Reis, V. C. B., Torres, F. A. G. 2020. Construction and characterization of centromeric plasmids for *Komagataella phaffii* using a color-based plasmid stability assay. *PLoS One.* 15, e0235532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235532>
- Poulter, R. T., Goodwin, T. J. 2005. DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons. *Cytogenet Genome Res.* 110, 575-588. <https://doi.org/10.1159/000084991>
- Quail, P. H. 2002. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 85-93. <https://doi.org/10.1038/nrm728>
- Robertson, J. B., Davis, C. R., Johnson, C. H. 2013. Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 21130-21135. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313369110>
- Rockwell, N. C., Martin, S. S., Li, F. W., Mathews, S., Lagarias, J. C. 2017. The phycocyanobilin chromophore of streptophyte algal phytochromes is synthesized by HY2. *New Phytol.* 214, 1145-1157. <https://doi.org/10.1111/nph.14422>
- Sahu, U., Krishna Rao, K., Rangarajan, P. N. 2014. Trm1p, a Zn(II)(2)Cys(6)-type transcription factor, is essential for the transcriptional activation of genes of methanol utilization pathway, in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun.* 451, 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.094>
- Salinas, F., Rojas, V., Delgado, V., Agosin, E., Larrondo, L. F. 2017. Optogenetic switches for light-controlled gene expression in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101, 2629-2640. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8178-8>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2o ed. New York.
- Sasano, Y., Yurimoto, H., Yanaka, M., Sakai, Y. 2008. Trm1p, a Zn(II)2Cys6-type transcription factor, is a master regulator of methanol-specific gene activation in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Eukaryot Cell.* 7, 527-536. <https://doi.org/10.1128/EC.00403-07>
- Schmidt, D., Cho, Y. K. 2015. Natural photoreceptors and their application to synthetic biology. *Trends Biotechnol.* 33, 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.007>
- Schwarzans, J. P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J., Friehs, K. 2016. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microb Cell Fact.* 15, 84. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0486-7>
- Sherman, F. 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350, 3-41. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)50954-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)50954-x)
- Shimizu-Sato, S., Huq, E., Tepperman, J. M., Quail, P. H. 2002. A light-switchable gene promoter system. *Nat Biotechnol.* 20, 1041-1044. <https://doi.org/10.1038/nbt734>
- Shin, A. Y., Han, Y. J., Song, P. S., Kim, J. I. 2014. Expression of recombinant full-length plant phytochromes assembled with phytochromobilin in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 588, 2964-2970. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.050>
- Siddiqui, M. S., Thodey, K., Trenchard, I., Smolke, C. D. 2012. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. *FEMS Yeast Res.* 12, 144-170. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00774.x>
- Siuti, P., Yazbek, J., Lu, T. K. 2013. Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nat Biotechnol.* 31, 448-452. <https://doi.org/10.1038/nbt.2510>

- Smith, M. C., Thorpe, H. M. 2002. Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol.* 44, 299-307. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02891.x>
- Smith, M. C. M. 2015. Phage-encoded Serine Integrases and Other Large Serine Recombinases. *Microbiol Spectr.* 3, <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0059-2014>
- Stockwell, S. R., Landry, C. R., Rifkin, S. A. 2015. The yeast galactose network as a quantitative model for cellular memory. *Mol Biosyst.* 11, 28-37. <https://doi.org/10.1039/c4mb00448e>
- Tepperman, J. M., Hwang, Y. S., Quail, P. H. 2006. phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of Arabidopsis seedling de-etiolation. *Plant J.* 48, 728-742. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02914.x>
- Tippmann, S., Chen, Y., Siewers, V., Nielsen, J. 2013. From flavors and pharmaceuticals to advanced biofuels: production of isoprenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J.* 8, 1435-1444. <https://doi.org/10.1002/biot.201300028>
- Torres, F. A., Bonner, J. J. 1995. Genetic identification of the site of DNA contact in the yeast heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol.* 15, 5063-5070. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.9.5063>
- Tullio, V. 2022. Yeast Genomics and Its Applications in Biotechnological Processes: What Is Our Present and Near Future? *J Fungi (Basel).* 8, <https://doi.org/10.3390/jof8070752>
- Uda, Y., Goto, Y., Oda, S., Kohchi, T., Matsuda, M., Aoki, K. 2017. Efficient synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells for optogenetic control of cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114, 11962-11967. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707190114>
- Van Duyne, G. D., Rutherford, K. 2013. Large serine recombinase domain structure and attachment site binding. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 48, 476-491. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.831807>
- Verwaal, R., Wang, J., Meijnen, J. P., Visser, H., Sandmann, G., van den Berg, J. A., van Ooyen, A. J. 2007. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol.* 73, 4342-4350. <https://doi.org/10.1128/AEM.02759-06>
- Vogl, T., Gebbie, L., Palfreyman, R. W., Speight, R. 2018. Effect of Plasmid Design and Type of Integration Event on Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol.* 84, <https://doi.org/10.1128/AEM.02712-17>
- Vogl, T., Kickenweiz, T., Pitzer, J., Sturmberger, L., Weninger, A., Biggs, B. W., Kohler, E. M., Baumschlager, A., Fischer, J. E., Hyden, P., Wagner, M., Baumann, M., Borth, N., Geier, M., Ajikumar, P. K., Glieder, A. 2018. Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization. *Nat Commun.* 9, 3589. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05915-w>
- Vogl, T., Kickenweiz, T., Pitzer, J., Sturmberger, L., Weninger, A., Biggs, B. W., Kohler, E. M., Baumschlager, A., Fischer, J. E., Hyden, P., Wagner, M., Baumann, M., Borth, N., Geier, M., Ajikumar, P. K., Glieder, A. 2018. Publisher Correction: Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization. *Nat Commun.* 9, 4566. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07112-1>
- Vogl, T., Sturmberger, L., Kickenweiz, T., Wasmayer, R., Schmid, C., Hatzl, A. M., Gerstmann, M. A., Pitzer, J., Wagner, M., Thallinger, G. G., Geier, M., Glieder, A. 2016. A Toolbox of Diverse Promoters Related to Methanol Utilization: Functionally Verified Parts for Heterologous Pathway Expression in *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol.* 5, 172-186. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00199>
- Voth, W. P., Richards, J. D., Shaw, J. M., Stillman, D. J. 2001. Yeast vectors for integration at the HO locus. *Nucleic Acids Res.* 29, E59-59. <https://doi.org/10.1093/nar/29.12.e59>

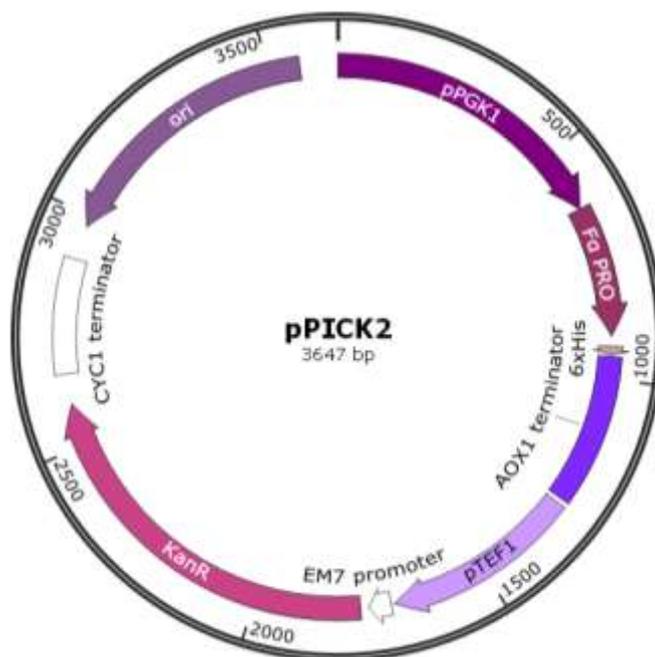
- Wang, G., Huang, M., Nielsen, J. 2017. Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. *Curr Opin Biotechnol.* 48, 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.017>
- Wang, J., Wang, X., Shi, L., Qi, F., Zhang, P., Zhang, Y., Zhou, X., Song, Z., Cai, M. 2017. Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*. *Sci Rep.* 7, 41850. <https://doi.org/10.1038/srep41850>
- Wang, M., Jiang, S., Wang, Y. 2016. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered.* 7, 155-165. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1191707>
- Wang, X., Chen, X., Yang, Y. 2012. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Methods.* 9, 266-269. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1892>
- Wang, X., Wang, Q., Wang, J., Bai, P., Shi, L., Shen, W., Zhou, M., Zhou, X., Zhang, Y., Cai, M. 2016. Mit1 Transcription Factor Mediates Methanol Signaling and Regulates the Alcohol Oxidase 1 (AOX1) Promoter in *Pichia pastoris*. *J Biol Chem.* 291, 6245-6261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.692053>
- Wang, Z., Yan, Y., Zhang, H. 2022. Design and Characterization of an Optogenetic System in *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol.* 11, 297-307. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00422>
- Wegner, S. A., Barocio-Galindo, R. M., Avalos, J. L. 2022. The bright frontiers of microbial metabolic optogenetics. *Curr Opin Chem Biol.* 71, 102207. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.102207>
- Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A. B., Figueroa, C. A., Pessoa, A., Farias, J. G. 2013. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Braz J Microbiol.* 44, 1043-1048.
- Weinberg, B. H., Pham, N. T. H., Caraballo, L. D., Lozanoski, T., Engel, A., Bhatia, S., Wong, W. W. 2017. Large-scale design of robust genetic circuits with multiple inputs and outputs for mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 35, 453-462. <https://doi.org/10.1038/nbt.3805>
- Weninger, A., Glieder, A., Vogl, T. 2015. A toolbox of endogenous and heterologous nuclear localization sequences for the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 15, <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov082>
- Weninger, A., Hatzl, A. M., Schmid, C., Vogl, T., Glieder, A. 2016. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol.* 235, 139-149. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.027>
- Wu, S. H., Lagarias, J. C. 1996. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* synthesizes a functionally active chromophore precursor of the plant photoreceptor phytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 8989-8994. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.8989>
- Xu, X., Du, Z., Liu, R., Li, T., Zhao, Y., Chen, X., Yang, Y. 2018. A Single-Component Optogenetic System Allows Stringent Switch of Gene Expression in Yeast Cells. *ACS Synth Biol.* 7, 2045-2053. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00180>
- Xu, Z., Brown, W. R. 2016. Comparison and optimization of ten phage encoded serine integrases for genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biotechnol.* 16, 13. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0241-5>
- Yang, L., Nielsen, A. A., Fernandez-Rodriguez, J., McClune, C. J., Laub, M. T., Lu, T. K., Voigt, C. A. 2014. Permanent genetic memory with >1-byte capacity. *Nat Methods.* 11, 1261-1266. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3147>
- Yazawa, H., Iwahashi, H., Kamisaka, Y., Kimura, K., Uemura, H. 2009. Production of polyunsaturated fatty acids in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to alkaline pH tolerance. *Yeast.* 26, 167-184. <https://doi.org/10.1002/yea.1659>

- Zhao, E. M., Zhang, Y., Mehl, J., Park, H., Lalwani, M. A., Toettcher, J. E., Avalos, J. L. 2018. Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production. *Nature*. 555, 683-687. <https://doi.org/10.1038/nature26141>
- Zhou, P., Xu, N., Yang, Z., Du, Y., Yue, C., Xu, N., Ye, L. 2020. Directed evolution of the transcription factor Gal4 for development of an improved transcriptional regulation system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.* 142, 109675. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109675>

ANEXOS

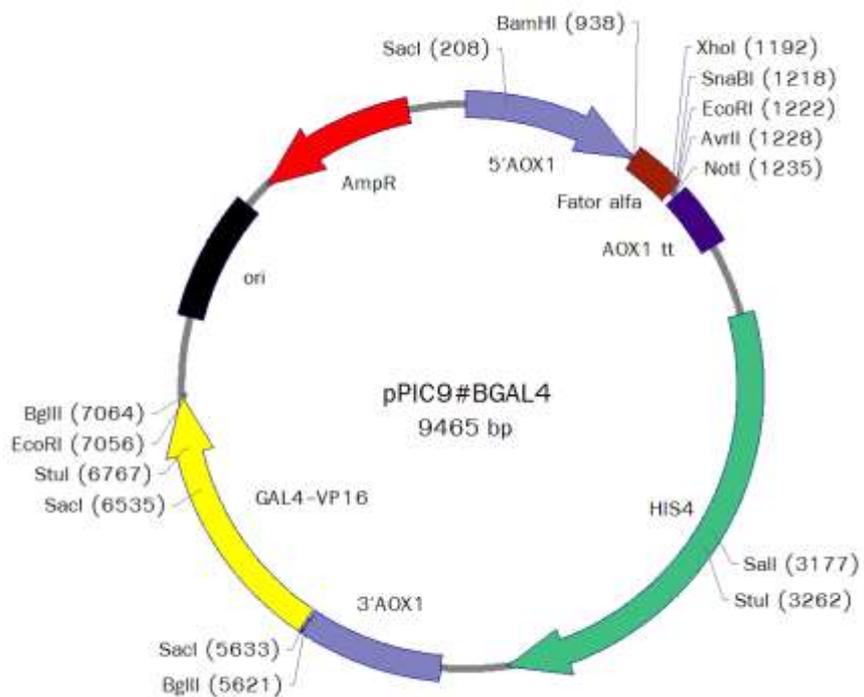
Anexo 1. Mapa físico do vetor pPICK2.

Vetor utilizado para a montagem do vetor pPICK2-PHYB-ZFMIT1.



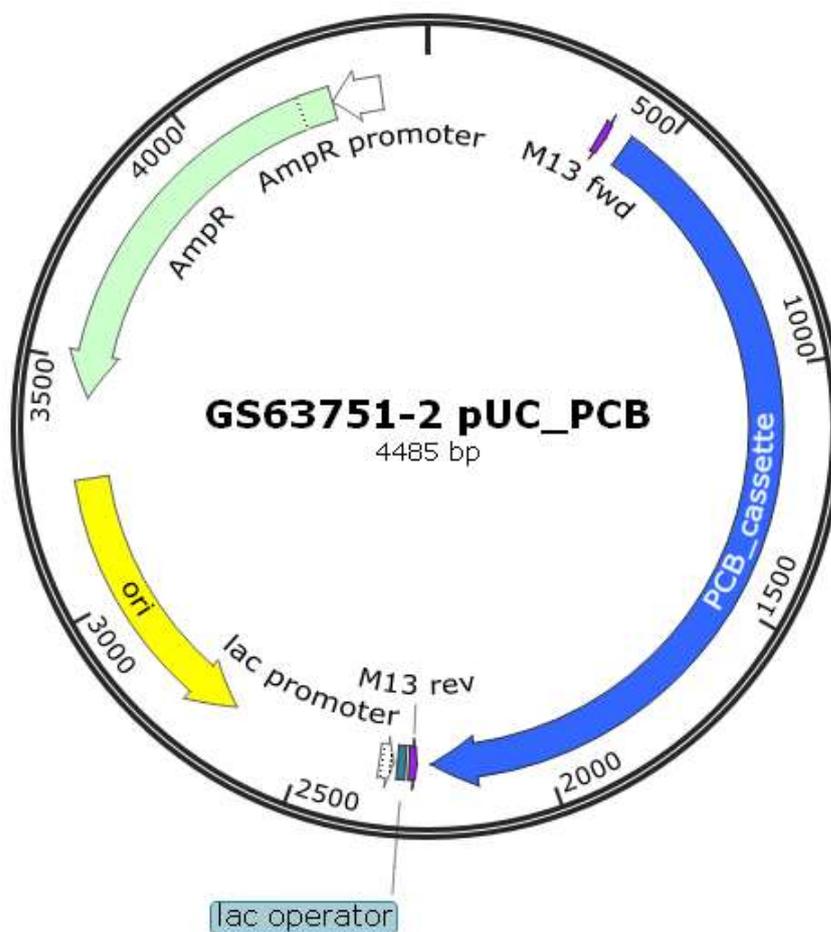
Anexo 2. Mapa físico do vetor pPIC9ΔBGAL4:VP16FPLC

Vetor utilizado para a amplificação da região VP16



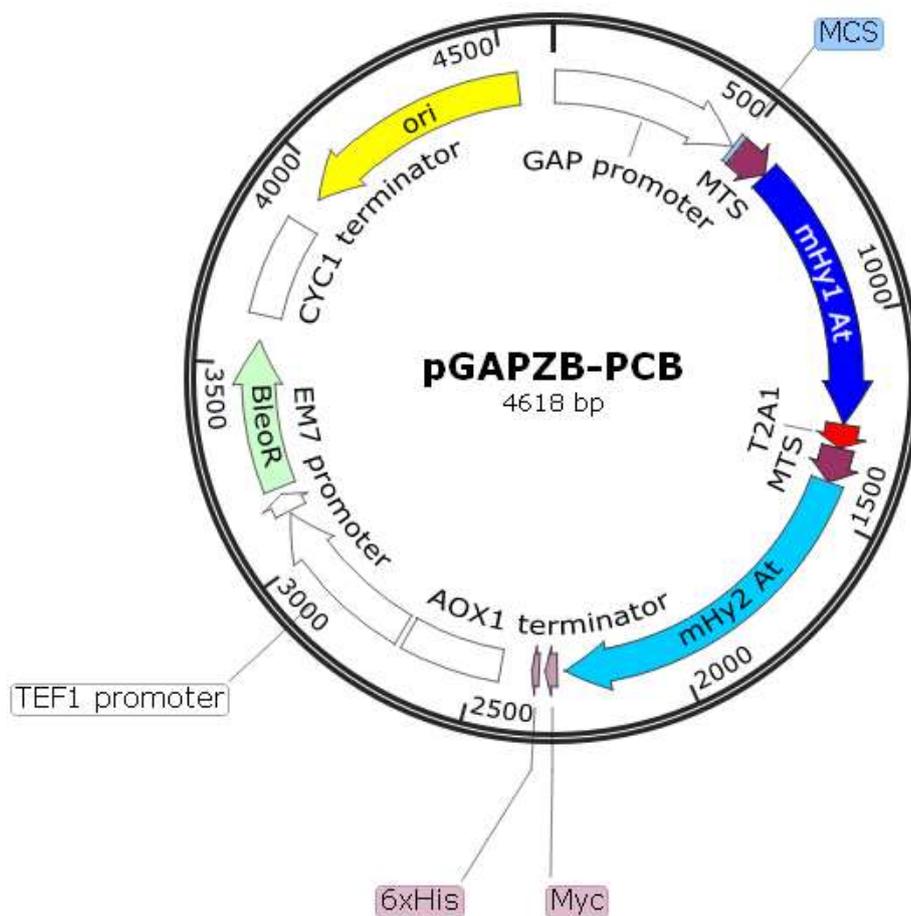
Anexo 3. Mapa físico do vetor GS63751-2 pUC_PCB

Vetor com o cassete sintetizado que contém as duas enzimas para a síntese da PCB.

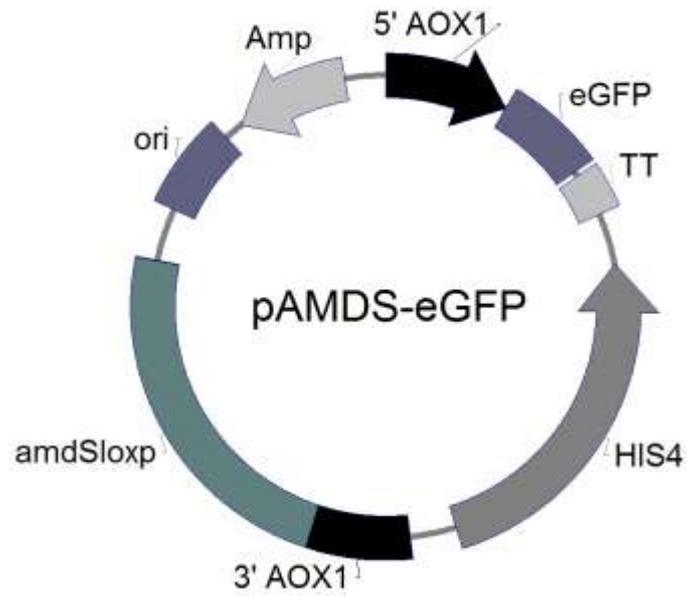


Anexo 4. Mapa físico do vetor pGAPZB-PCB

Vetor utilizado com os genes para enzimas para a expressão da PCB.

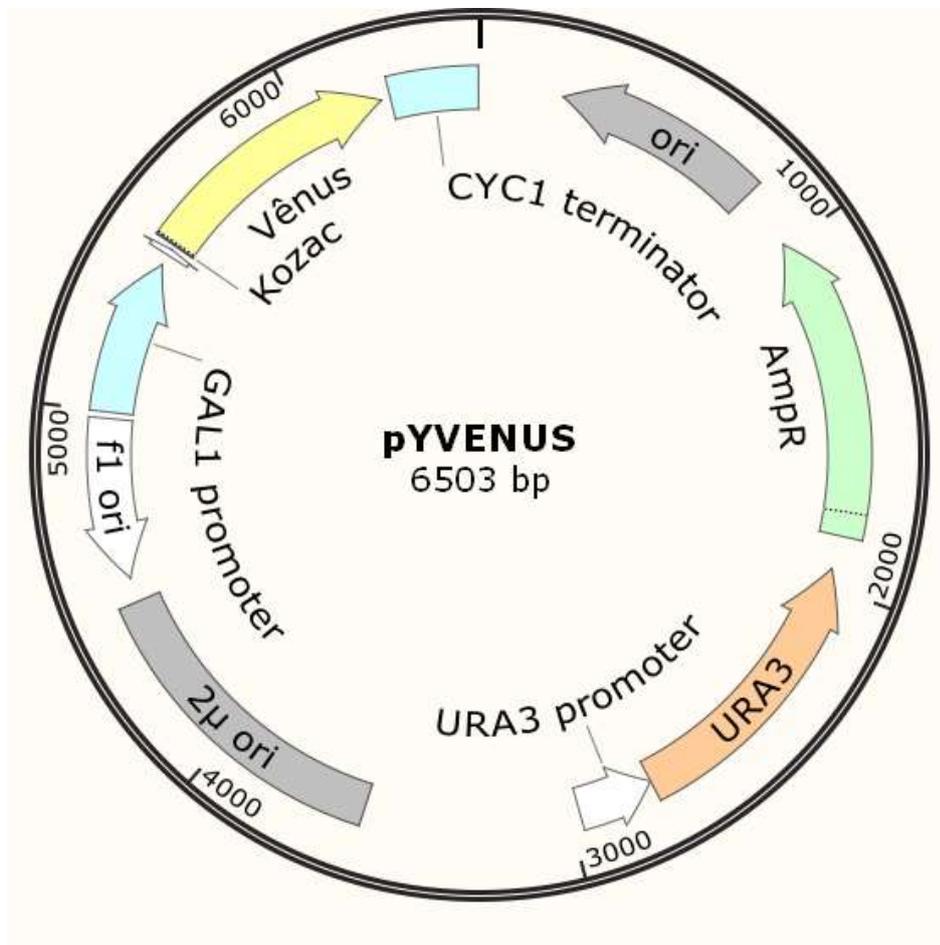


Anexo 5. Mapa físico do vetor pAMDS-EGFP

Vetor utilizado para a expressão do gene repórter *EGFP*

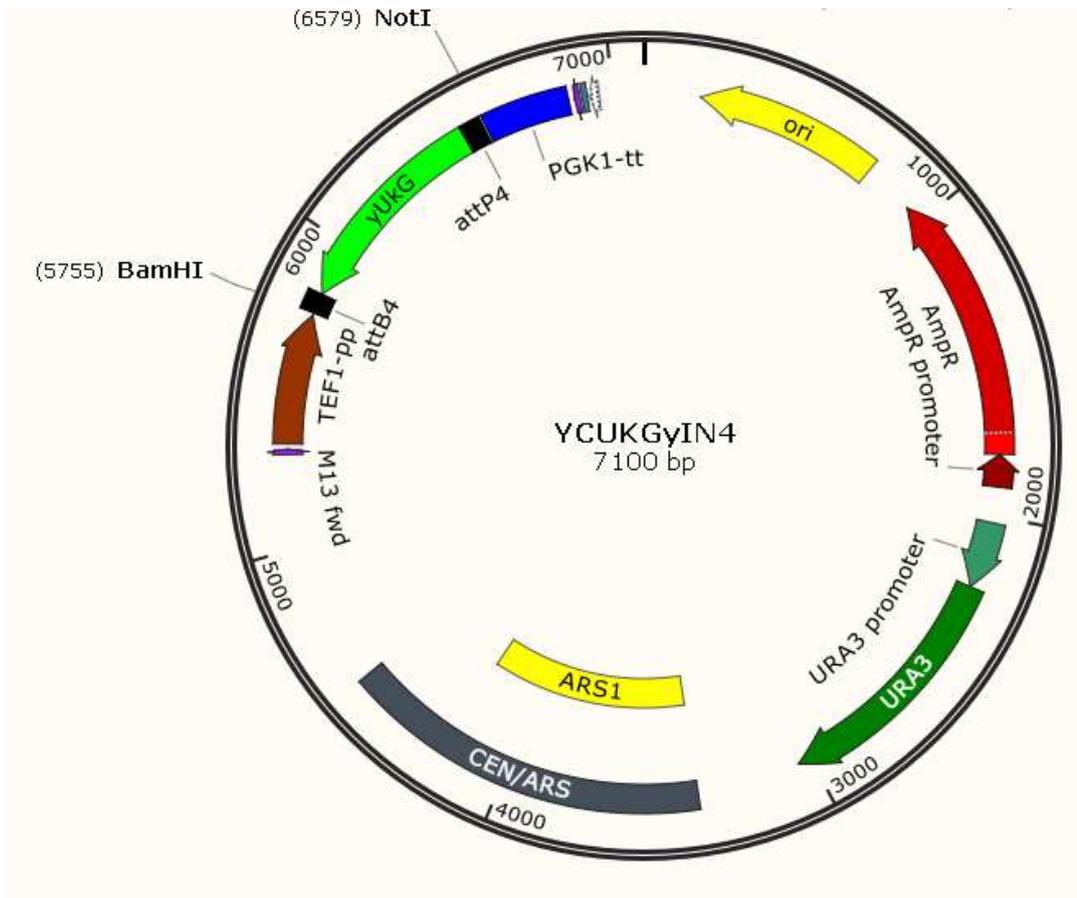
Anexo 6. Mapa físico do vetor pYVenus

Vetor utilizado para a amplificação do gene repórter *Venus*



Anexo 7. Mapa físico do vetor YCUKGyINT4

Vetor utilizado para a construção do vetor YCVenus





Contents lists available at ScienceDirect

Biotechnology Advances

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biotechadv

Review article

Optogenetic strategies for the control of gene expression in yeasts

Ana Laura A. Pérez, Luiza C. Piva, Julia P.C. Fulber, Lidia M.P. de Moraes, Janice L. De Marco, Hugo L.A. Vieira, Cintia M. Coelho, Viviane C.B. Reis¹, Fernando A.G. Torres^{*,1}

Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Bloco K, 1º andar, Universidade de Brasília, Brasília 70910-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Light
Optogenetics
Yeast
Biotechnology
Heterologous gene expression

ABSTRACT

Optogenetics involves the use of light to control cellular functions and has become increasingly popular in various areas of research, especially in the precise control of gene expression. While this technology is already well established in neurobiology and basic research, its use in bioprocess development is still emerging. Some optogenetic switches have been implemented in yeasts for different purposes, taking advantage of a wide repertoire of biological parts and relatively easy genetic manipulation. In this review, we cover the current strategies used for the construction of yeast strains to be used in optogenetically controlled protein or metabolite production, as well as the operational aspects to be considered for the scale-up of this type of process. Finally, we discuss the main applications of optogenetic switches in yeast systems and highlight the main advantages and challenges of bioprocess development considering future directions for this field.

1. Introduction

Optogenetics is an approach that combines genetic manipulation and optical stimulation for regulating cellular processes (Deisseroth, 2011). In the field of neuroscience, it has been used to activate or suppress membrane channels in different types of neurons; in biotechnology, optogenetics has been used as a tool for controlling gene expression in basic and applied research (Boyden et al., 2005; Salinas et al., 2017). Since the early 2000s, optogenetic systems responsive to red, green, and blue light (Nagel et al., 2002; Shimizu-Sato et al., 2002; Boyden et al., 2005; Deisseroth et al., 2006), as well as near-infrared and ultraviolet (UV) light (Shimizu-Sato et al., 2002; Crefcoeur et al., 2013; Pathak et al., 2014; Chernov et al., 2017) have been developed using different light-absorbing proteins and were applied to various fields of research.

Bacteria, filamentous fungi, yeasts, and mammalian cells have been used in studies aiming at the optogenetic control of gene expression (Lozi et al., 2018; Figueroa et al., 2021). This approach is particularly useful for strain engineering of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), which are easily manipulated and can reach high product yields with relatively low costs (Celik and Calik, 2012). These organisms have been used in the production of thousands of bacterial, viral, and human proteins, including antibodies, enzymes, peptides, cytokines, plasma proteins, and hormones, some of which are already commercially available or in the final stages of development

(Byrne et al., 2005; Celik and Calik, 2012; Mokdad-Gargouri et al., 2012; Nielsen, 2013; Kim et al., 2015). As for metabolite production, the metabolic engineering of *K. phaffii* allowed for the production of molecules such as riboflavin (He et al., 2006), lycopene, and β -carotene (Araya-Garay et al., 2012), while *S. cerevisiae* was used in the production of artemisinic acid, a precursor of the first-line antimalarial drug artemisinin (Paddon and Keastling, 2014).

In heterologous gene expression, the use of inducible promoters is desired when the target protein is toxic for its host even at small concentrations, whereas metabolic engineering strategies require multiple promoters with varying strengths and elaborate control strategies for fine tuning of gene expression. Inducible gene expression is usually based on chemically inducible promoters that can affect the culture medium and endogenous metabolism; its use is also limited by the number of different possible inducers. In comparison, light-controlled induction of gene expression is highly inducible and dose-dependent, as well as non-toxic and inexpensive (Zhao et al., 2018). It also offers spatiotemporal control and does not require changes in the culture medium, being compatible with any carbon source or nutrient composition (Kawano et al., 2015; Lozi et al., 2018). Light as an inducer of gene expression is also cost-effective and allows for the regulation of intensity and cycle duration. Together, these features provide fine tuning of the expression of key genes in order to overcome current hurdles in strain development and further improve process scalability.

* Corresponding author.

E-mail address: ftorres@unb.br (F.A.G. Torres).

¹ These authors have contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107839>

Received 17 February 2021; Received in revised form 7 September 2021; Accepted 22 September 2021

Available online 28 September 2021

0734-9750/© 2021 Published by Elsevier Inc.

Please cite this article as: Ana Laura A. Pérez, *Biotechnology Advances*, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107839>

At the molecular level, optogenetic systems are based on the use of proteins named photoreceptors, which operate as switches (Salinas et al., 2017; Losi et al., 2018). Yeasts contain no known native photoreceptors and are therefore suitable as chassis for the construction of optogenetic switches: several optical dimerization systems based on different protein domains such as phytochromes, cryptochromes, light-oxygen-voltage (LOV) proteins, and UVR8 domains have been used in these organisms (Pathak et al., 2014; Hochrein et al., 2017; Salinas et al., 2018; An-Adizekum et al., 2020). Optogenetic circuits have been described in yeast proof-of-concept studies, mostly using reporter genes for the characterization of these genetic tools and, to a smaller extent, for investigating the lab-scale control of important endogenous genes, regulators, and branched biochemical pathways (Pathak et al., 2014; Salinas et al., 2017). Although several different light-controlled gene expression systems have been developed for yeast cells, studies on the scale-up of these processes are still scarce (Zhao et al., 2018).

In this review, we have covered the current strategies used for the construction of yeast strains for optogenetically controlled protein or metabolite production, the existing systems and available parts for the cloning steps, and the current and potential scale-up possibilities for these processes. The advantages and main challenges of the development of yeast optogenetic systems are also discussed, covering their main applications in yeast biotechnology.

1.1. Optogenetic components

Photoreceptor proteins are naturally present in plants, animals (in specialized cells), light-responsive fungi, and even some bacterial species. Specific light wavelengths cause conformational changes in the photoreceptor that can expose a domain, induce protein dimerization, or open an ion channel (Schmidt and Cho, 2015). Considering that this review focuses on optogenetic strategies used in yeasts, systems involving ion channels will not be further mentioned since these have predominantly been used in neurobiology studies. Chromophores are also required for photoreceptor proteins to respond to light; these are molecules that absorb radiation at certain wavelengths and can exist as attached cofactors or as amino acid residues of the protein itself. Upon absorbing radiation, photochemical reactions occur within the chromophore, leading to conformation changes or changes in protein/chromophore interaction (Losi et al., 2018).

By creating fusion constructs of light-responsive proteins and different proteins or domains of interest, optogenetics can be used to control cellular functions through specific light inputs. Cellular processes such as metabolism (Zhao et al., 2018), genetic recombination (Kennedy et al., 2010), gene expression (Shimizu-Sato et al., 2002; Avalos et al., 2013; Crefcoeur et al., 2013; Pathak et al., 2014; Hochrein et al., 2017), subcellular localization (Kennedy et al., 2010; Strickland et al., 2012; Crefcoeur et al., 2013; Niopek et al., 2016; Yunereferendi et al., 2016), and signaling pathways (Strickland et al., 2012) have been manipulated in yeast using optogenetic systems. Various platforms have been developed for these applications, mostly using red, blue, or UV light.

The choice of photoreceptors depends on the intended purpose and desired characteristics of the biotechnological platform. Each optogenetic system has its particularities, including protein size, light wavelength, or possible requirement of an exogenous chromophore. One of the most interesting aspects to be considered is the photocycle, that is, some applications might require fast activation and inactivation for fine-tuned temporal control, while other projects might value systems that remain activated for hours even after interrupting light exposure (Shimizu-Sato et al., 2002; Pathak et al., 2014). However, the photocycle is not the only determinant of process speed; although it determines how fast the optogenetic proteins change conformation and assemble or disassemble, subsequent steps will also influence the total response time. For example, after the optogenetic components interact with each other, transcription and protein synthesis or downstream signaling may follow,

and these processes can increase the duration between illuminating the system and observing the final desired response. Similarly, after removing the light stimulus, even if the optogenetic proteins disassemble quickly, there might be a delay in terminating the response due to a low protein degradation rate.

1.2. Red light-based systems

Most optogenetic systems activated by red light are based on the interaction between members of the phytochrome family (such as phytochrome A [PhyA] and phytochrome B [PhyB]) and the phytochrome interacting factor (PIF) family (such as PIF3 and PIF6). The PhyB/PIF3 system is based on proteins from *Arabidopsis thaliana*. Through a covalent bond with a chromophore, PhyB changes its conformation when exposed to red light (660 nm). The protein conformation variant induced by red light (Pfr) can interact with PIF3, while that induced by far-red light (740 nm) or darkness (Pr) cannot. Phytochromes associate with their binding partners within seconds upon red light exposure and dissociate within hours in the absence of light. Far-red light illumination accelerates the dissociation kinetics and shortens this process to seconds (Levkaya et al., 2009).

It is important to note that the interconversion between the Pr and Pfr states is dose-dependent, that is, higher light intensities trigger a faster change in overall protein conformation, allowing for greater PIF3-PhyB interaction in a shorter time (Shimizu-Sato et al., 2002). These protein states also absorb light at wavelengths that are sufficiently similar so that they have an overlapping range, which results in an equilibrium between states achieved under specific light conditions (Sharrock, 2008). The interaction between the Pfr state of PhyB and PIF3 can be used to control gene expression by attaching a DNA-binding domain (DBD) to PhyB and a DNA transcription activation domain (AD) to PIF3, creating a yeast two-hybrid system (Fig. 1a). Therefore, gene expression will occur in red light and cease to happen in darkness or upon exposure to far-red light (Shimizu-Sato et al., 2002).

The first optogenetic switch developed and implemented in yeast (Shimizu-Sato et al., 2002) consisted of a fusion protein containing the PhyBNT domain with the Gal4-DBD, as well as a fusion construct of PIF3 and Gal4-AD (PhyBNT-GBD/PIF3-GAD) to drive reporter gene expression in *S. cerevisiae*. In this pioneering study, the best induction conditions triggered a 1000-fold expression of the reporter gene with almost undetectable background in the dark. Moreover, red light pulses of 1 min were sufficient to obtain maximal induction when compared to 5, 15, and 30 min of irradiation (Shimizu-Sato et al., 2002; de Mena et al., 2018). When comparing 4 light-induced systems (PhyB/PIF3, PhyB/PIF6, and 2 blue light switches) using a Gal4-based system in *S. cerevisiae* (Pathak et al., 2014), Pathak et al. showed that the PhyB/PIF3 system displayed superior results regarding light sensitivity and fold activation levels when compared to the other systems, in addition to presenting a low background expression level and reversible inactivation (Pathak et al., 2014).

PhyB can use phytychromobilin (Pfb) or phytycyanobilin (Pcb) as chromophores, which are required for the system to achieve its maximum potential. As these cofactors are not endogenous to yeasts, a common approach is to supplement the medium with PCB, which increases process costs and limits scalability. Alternatively, yeasts can be engineered to produce the chromophore by expressing two enzymes: heme oxygenase and bilin reductase (Shin et al., 2014; Hochrein et al., 2017). This was performed with the PhiReX (PhyB/PIF3) system, where in addition to testing varying PCB concentrations, the authors also created a *S. cerevisiae* strain that produced endogenous PCB, providing a cost-effective alternative system that shows potential as a protein production process (Hochrein et al., 2017).

Near-infrared (NIR) light can also be used in optogenetic systems. Although the NIR-based optogenetic switch has not yet been tested in yeast, it could contribute with a new activation wavelength in case of multiple-gene induction systems. Phytochrome BphP1 forms a

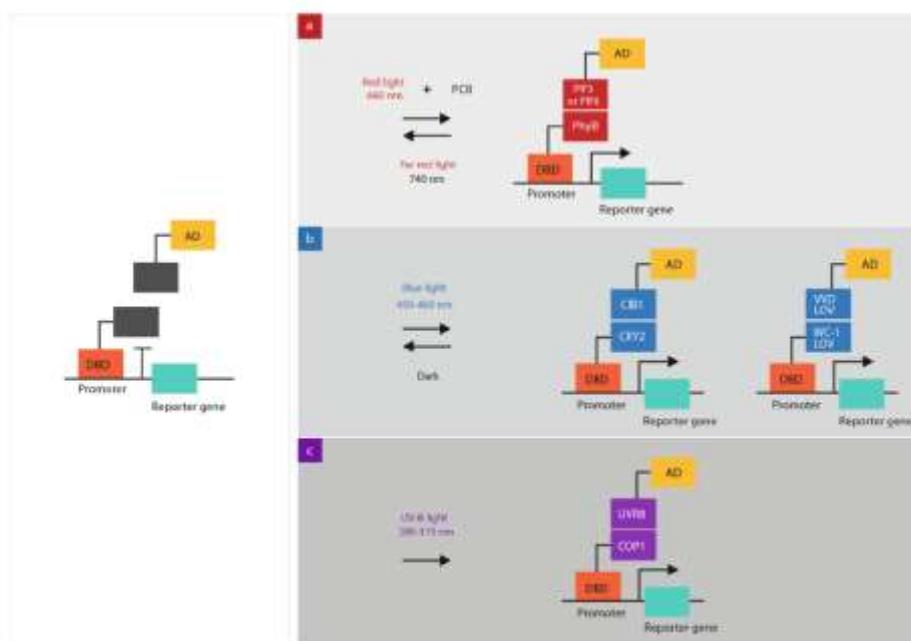


Fig. 1. Optogenetic induction systems used in yeast. a. Red/far-red light optogenetic switches are based on the interaction between red light photoreceptor phytochrome B (PhyB) and a protein of the PIF family (such as PIF3 or PIF6) from *Arabidopsis thaliana*. Through a covalent bond with chromophore phycocyanobilin (PCB), PhyB changes conformation when exposed to red light (660 nm), bringing together the fused DNA-binding and activation domains (DBD and AD, respectively). Far-red light (740 nm) causes a conformation change that disassembles the complex. b. The blue light optogenetic switch is based on 450–460 nm light stimulation. These systems may use *Arabidopsis thaliana* cryptochrome 2 (CRY2) and its interacting partner CIB1 or the *Neurospora crassa* VVD LOV along with WC-1 LOV. c. The UV-B light optogenetic switch is based on the interaction between *Arabidopsis thaliana* ultra-violet-B photoreceptor UVR8, which once stimulated with UV light (280–315 nm), forms monomers that can interact with the constitutive photomorphogenesis protein 1 (COP1). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

heterodimer with PpsR2; both proteins are derived from *Rhodospirillum rubrum*. NIR light converts BphP1 to its Pr state, which interacts with PpsR2. Darkness is necessary to completely dissociate the BphP1/PpsR2 dimer and return BphP1 to its Pfr conformation, even though exposure to 636 nm or 650 nm light can accelerate this process (Chernov et al., 2017). This system does not require PCB as a chromophore and uses biliverdin IX α instead. In mammalian cells, the endogenous biliverdin concentration was sufficient for the system to function, and no exogenous chromophores were required (Kaberniak et al., 2016). In *S. cerevisiae*, on the other hand, *HMX1* (a gene coding for the heme oxygenase that converts heme to biliverdin) is mostly expressed during iron starvation and is nearly undetectable at higher iron concentrations; this yeast is also known for having an inefficient heme catabolism (Protchenko and Philpott, 2003). It is unknown if the endogenous biliverdin level would allow yeasts to provide an adequate optogenetic response using this system. If this is not achieved, supplementation of biliverdin or engineering of the yeast to express higher levels of *HMX1* would be necessary.

1.3. Blue light-based systems

Systems induced by blue light typically do not have an inactivating wavelength; their proteins change conformation upon stimulation with blue light (440–450 nm) and return to their original state when in darkness. A popular example uses *Arabidopsis thaliana* cryptochromes, more specifically cryptochrome 2 (CRY2) and its interacting partner cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix (CIB1). This pair does not require an exogenous chromophore supply, since CRY2 binds endogenous flavins such as flavin mononucleotide and flavin adenine

dinucleotide. CRY2 dimerizes with CIB1 upon absorbing blue light and dissociates from it in the absence of a light stimulus (Fig. 1b). In 2010, the first study using this system in yeast and mammalian cells demonstrated that association occurred in approximately 10 s after light exposure in mammalian cells while dissociation occurred after 10 min in the dark. This would allow for accurate temporal resolution of gene expression (Kennedy et al., 2010). Further investigation of the CRY2/CIB1 pair in *S. cerevisiae* combined these proteins with a split Gal4 (Gal4BD-CRY2 and Gal4AD-CIB1), and results indicated a strong dose-dependent expression of the *Snl1* reporter protein. Samples incubated in dim ambient light provided indistinguishable results from those incubated in total darkness, which could reduce unwanted activation of the system and leakage (Kennedy et al., 2010; Pathak et al., 2014).

Other blue light optogenetic switches include proteins with LOV domains. Like CRY2, these also use flavins instead of PCB as chromophores. The LOV2 domain from *Avena sativa* phototropin 1 (AsLOV2) has a C-terminal Ja helix that is unfolded and exposed in the presence of blue light (Losi et al., 2018; Figueroa et al., 2021). Therefore, a peptide of interest can be attached to this Ja helix for optogenetic control of peptide photocaging. TULIPs (Tunable Light-Controlled Interacting Protein Tags) have made use of this property by attaching a PDZ-binding peptide to the AsLOV2 domain, achieving protein interaction only in the presence of blue light. These tools have a fast photocycle, being able to associate within seconds and dissociate in only a few minutes. Their kinetics is also tunable by mutations that alter the affinity between the Ja helix and the core LOV domain, enabling the generation of mutants with slower dissociation if needed (Strickland et al., 2012). The interaction between the *Escherichia coli* SsrA peptide and the SspB adaptor protein has also been explored using the AsLOV2 domain. By attaching

SrA to the J α helix, the ILID system was created as an optogenetic tool with the aim of triggering signaling pathways inside the cell (Gautam et al., 2015).

A fungal LOV domain has also been used for yeast optogenetics. The VVD protein from *Neurospora crassa* forms homodimers when exposed to blue light (Fig. 1b). The VVD dimerization kinetics is fast regarding protein association, but slow (hours) to dissociate (Losi et al., 2018). The yLightOn system, based on the previously developed LightOn switch (which controlled gene transcription by using fusion proteins containing LOV domains with DBD and AD) (Wang et al., 2012), consists of a single-component light-switchable transcription factor. It was able to provide more than 500-fold induction, extremely low leakage, as well as quantitative and spatiotemporal control of gene expression (Xu et al., 2018). Also based on the LOV domain, FUN-LOV was used in yeast based on the interaction between the white collar 1 protein (WC-1) and VVD, which is known to occur as part of the *Neurospora crassa* photoadaptation process (Salinas et al., 2018).

Another LOV-based optogenetic system is based on the blue light-activated EL222 gene expression system from *Erythrobacter litoralis* (Motta-Mena et al., 2014; Zhao et al., 2016). When exposed to blue light, EL222 homodimerizes and binds to the C120 promoter, activating gene expression in a reversible fashion (Zhao et al., 2018). In *S. cerevisiae*, examples of EL222-based switches are OptoEXP and OptoINVRT, which were used in the transcriptional activation and repression of gene expression, respectively (Zhao et al., 2018). Finally, the LOV domain of the stressosome protein YtvA from *Bacillus subtilis* was employed along with a histidine protein kinase domain in the construction of a chimeric kinase, constituting a two-component signal transduction system in *S. cerevisiae* (Bury and Hellingwerf, 2018). This two-step light input processing could be important to reduce undesired background noise in optogenetic circuits, since some signaling pathways are able to act as a low-pass filter that responds only to slow and constant changes in the induction signal (Hersen et al., 2008).

LOV domains have been used to control protein concentration and subcellular localization. These peptides were fused to the transmembrane domain of Mid2 to anchor ePDZ-fused proteins to the membrane when under blue light (Witte et al., 2017). A degradation-inducing sequence named degron was attached to the J α helix of the LOV2 domain in a way that the blue light-induced conformational change in LOV2 uncaged the degron, leading to protein degradation. This photosensitive degron was then fused to cell cycle proteins to investigate and control yeast growth (Rienicke et al., 2013).

1.4. UV light-based systems

A yeast-based optogenetic system using UV light has been developed using the *Arabidopsis thaliana* ultraviolet-B photoreceptor UVR8. This protein is present in homodimers and, once stimulated with UV light (280–315 nm), forms monomers that can interact with the constitutive photomorphogenesis protein 1 (COP1) (Fig. 1c). A group of tryptophan residues in UVR8 acts as the chromophore for this response, thus this protein does not require an exogenous chromophore. As for the photocycle, protein association takes seconds and is irreversible (Cretcoeur et al., 2013). This system could prove itself useful as an additional wavelength for multichromatic control (when each wavelength controls the expression of a different gene), as performed in mammalian cells with UV-B, red, and blue light (Muller et al., 2014).

1.5. Green light-based systems

Green light receptors with cobalamin-binding domains (CBDs) use cobalamin as chromophores for photoresponsiveness. A system currently employed in plants (Chatelle et al., 2018), mammalian cells, and zebrafish (Kainrath et al., 2017) uses the bacterial photoreceptor CarH, which forms tetramers after binding to the 5'-deoxyadenosylcobalamin chromophore (AdoCbl – a common form of vitamin

B12). When exposed to green light (530 nm), the 5'-deoxyadenosyl group is released, which dissociates the tetramers and results in CarH monomers (Padmanabhan et al., 2019). The nature of this reaction is irreversible, as the dissociated cobalamin does not return to the photosensitive AdoCbl form, which limits the use of this system in applications that require reversible light control. However, a positive aspect is that microorganisms endogenously synthesize AdoCbl (Baumschlager and Khammash, 2021), including yeast (Chen et al., 2020), thus there is no need for an exogenous chromophore supply.

The cyanobacterial system CcaS/CcaR uses PCB as a chromophore and has a dual-light control with red and green lights, classified as a two-component system (TCS). Green light (535 nm) activates the system by inducing autophosphorylation in CcaS, which then phosphorylates CcaR, while red light (672 nm) inactivates the system (Hilrose et al., 2009; Baumschlager and Khammash, 2021). When optimized for transcription regulation in *Escherichia coli*, this system achieved up to 593-fold gene expression (Ong and Tabor, 2018). Another cyanobacterial TCS uses the UirS/UirR photoreceptor pair for activation with UV light (382–405 nm) and inactivation with green light (535 nm) (Baumschlager and Khammash, 2021). This system also uses PCB as a chromophore and has been implemented for transcription regulation in *Escherichia coli* (Ramtakrishnan and Tabor, 2016). A third cyanobacterial system of possible interest uses the PixJ1 photoreceptor, which has been shown in *Escherichia coli* to alternate between a blue light-absorbing form (Pb) and a green light-absorbing form (Pg) (Yoshihara et al., 2004). These dual-light systems could be convenient when combining switches with matching activation/inactivation wavelengths.

2. Genetic engineering strategies

The yeast genome contains no photoreceptors; therefore, light-responsive elements must be included through genetic engineering. Choosing the ideal optogenetic components and constructs for yeast transformation is crucial for the development of robust systems for heterologous protein production that provide better yields. For the initial cloning step, different methods have been proven useful, involving restriction digestion and ligation, recombination, and PCR-based methods (Oldenburg et al., 1997; Hartley et al., 2000; Nour-Eldin et al., 2006; Engler et al., 2008; Gibson et al., 2009; Jemen et al., 2014; An-Adrekkun et al., 2020).

Most plasmids used in yeast are shuttle vectors that can be constructed in *Escherichia coli* and used in *S. cerevisiae* or *K. phaffii* (Ma et al., 1987). These yeasts have a variety of available commercial vectors and molecular tools, which facilitates their transformation with optogenetic components (Krivovuchko et al., 2011; Da Silva and Srikrishnan, 2012; Siddiqui et al., 2012; Jensen et al., 2014). In addition to the components of the optogenetic system (photoresponsive elements fused to the domains of interest), red light-based systems may also require the enzymes necessary for PCB synthesis, which could result in a substantial amount of exogenous DNA to be transferred into yeast strains.

The expression of light-responsive proteins is typically controlled by constitutive promoters such as *ADHI*, which provides a continuous supply of proteins to participate in light-induced responses (Pathak et al., 2014). On the other hand, the gene selected to be regulated by light must be placed under the control of an inducible promoter that responds to the transcription factor domains used in the optogenetic system, i.e., a *GAL* promoter is controlled by optogenetic components that carry a Gal4-DBD (Shimizu-Sato et al., 2002). The large size of some optogenetic elements, including the PhyB photosensory domain (908 amino acid residues) and GIGANTEA (1173 residues), may hamper the cloning of these sequences into yeast expression vectors (Strickland et al., 2012). As a solution, reduced versions of these proteins, such as the N-terminal of PhyB (PhyBNT) which contains residues 1–621, can be employed with no significant loss of effectiveness (Shimizu-Sato et al., 2002; Pathak et al., 2014). Systems with smaller domains can also be used, such as CRY2/CIB1 (498 and 170 residues, respectively) and LOV-based systems

(125 residues) (Kennedy et al., 2010; Strickland et al., 2012).

Yeast transformation is usually performed using one of three main types of plasmids: (1) integrative vectors; (2) low-copy centromeric vectors; and (3) high-copy episomal vectors (Lee et al., 2015). A few studies have successfully used episomal vectors to express photoresponsive components and reporter proteins (Shimizu-Sato et al., 2002; Pathak et al., 2014). The PhiReX system used genomically integrated genes encoding photoresponsive proteins and enzymes for PCB biosynthesis, while the reporter gene was expressed from an episomal plasmid (Hochrein et al., 2017). A system designed for isobutanol production also had integrated photoresponsive components but used a combination of vectors for the optogenetically controlled genes of interest: multiple-copy integrative and episomal plasmids (Zhao et al., 2018).

In the study by An-Adirekku et al., less variability between replicates was observed when the optogenetic components were genomically integrated than when episomal plasmids were used. This is in accordance with the hypothesis that episomal vectors are not very stable and therefore integration-based strategies might be preferable (An-Adirekku et al., 2020). Even though chromosomal integrations tend to be more stable (Lee et al., 2015), instability due to recombination can occur if the introduced cassette shares homology with other genomic loci or if it is positioned in the form of multiple-copy tandem arrays (Wang et al., 1996; Lee and Da Silva, 1997).

In addition to vector type, the control of protein levels is achieved in optogenetic constructs by exploring different promoters, terminators, and protein degradation rates (Lee et al., 2015). Excessive protein production may cause a metabolic burden for the cell to a point where it can no longer grow efficiently (Gorgens et al., 2001). Therefore, constructs must be designed in a way that accomplishes the system's goal (maximum heterologous protein yield or fine-tuned control) while not significantly impairing cell growth. A recent study with a synthetic split transcription factor suggested that the concentrations and ratio of optogenetic components (DBD [fused to CRY2] and AD [fused to CIB1]) were important for the system to function (An-Adirekku et al., 2020). These concentrations were controlled using a variety of promoters with different strengths. The combination between a strong and a medium-strength promoter yielded maximal expression of the reporter gene, but caused a growth defect (An-Adirekku et al., 2020); on the other hand, a combination of two medium-strength promoters resulted in a lower yield, but eliminated the growth defect. A comparison of yield results obtained by all the promoter combinations revealed the existence of an optimal ratio between the two optogenetic components, demonstrating that optimizing protein concentration could be a path for improving dimerizing systems.

In summary, when selecting an optogenetic system, one should carefully consider the selection markers, plasmids, strains, and genes of interest to provide an adequate balance of each of the system's components. Particularly in biotechnological applications, DNA components should be designed considering an adequate cell growth rate and high product yields, in addition to a genetically stable strain for enduring large-scale processes.

3. Illumination devices and strategies

An appropriate, reproducible, and controlled delivery of light is of utmost importance in optogenetic applications (Tucker et al., 2014; Salinas et al., 2017; Sweeney et al., 2019). Initial devices developed for optogenetic induction were simple and hand-made, but recently the number and quality of these systems have grown due to the need for user-friendly equipment to provide illumination to cells (Gerhardt et al., 2016; Sweeney et al., 2019). In addition, new optogenetic devices should allow the use of different wavelengths in complex synthetic biology strategies. When it comes to culture size, most yeast optogenetic studies have so far been conducted at laboratory scale. Taking advantage of the ability of yeasts such as *S. cerevisiae* and *K. phaffii* to grow in microplates, test tubes, and culture flasks, small-scale studies are used

for optimizing growth conditions and developing optogenetic systems. Once the right conditions are established, optogenetic switches as inducers of protein production can be further explored in larger scales such as stirred-tank fermentations.

Different growth strategies have been reported in the development of optogenetic switches, from shake flasks to larger vessels, and from manual to automatic systems (Sorokina et al., 2009). Hand-made strategies include the use of LED strips, which are attached to the incubators (Yunerefendi et al., 2015) or wrapped around tube racks to illuminate a set of samples (Yunerefendi et al., 2016). Constructing this kind of set-up requires basic knowledge on electrics, and these devices can be adjusted for duration, interval, and intensity of light pulses (Tucker et al., 2014).

Some commercial systems are already available, such as the Snap-Lite LED modules (Quantum Devices, Barneveld, WI, USA) that provide controllable illumination of up to 2 wavelengths. The Light Plate Apparatus (LPA) is compatible with various optogenetic systems and model organisms, presenting low device and consumable costs, high scalability and throughput potentials, and offering an alternative for laboratories that do not have hardware expertise (Gerhardt et al., 2016; Geller et al., 2019). The LPA is programmable regarding timing, intensity, and duration of illumination in each well, and can be used to quantitatively compare the spectral and dynamical properties, as well as the intensity dependence of different optogenetic systems using various organisms (Gerhardt et al., 2016). When evaluating the activation and deactivation kinetics ($88.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 467 nm) and performing forward (ground state) action spectra experiments (LEDs between 382 and 549 nm and outputs of $88.80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Gerhardt et al. concluded that the LPA was compatible with yeast cultures (Gerhardt et al., 2016).

Regarding illumination protocols, different studies have attempted to quantify light-controlled gene expression systems to optimize their efficiency and productivity and contribute to the establishment of future optogenetic biotechnological systems. Firstly, background expression levels should be controlled in order to achieve the best induction levels with minimal basal expression (Shimizu-Sato et al., 2002; Hochrein et al., 2017). Other aspects to be considered may include preincubation times for photoinduction, the distance between the plate or shake flasks and the light source, as well as other factors such as flask geometry and culture volume. In addition to the culture optimization process usually performed in biotechnological processes using yeast strains, the ideal on-off illumination interval should be investigated on a case-by-case basis, considering if the optogenetic interaction is inactivated in the dark or by other light wavelengths (Pathak et al., 2014). Moreover, light intensity should be carefully dosed since it is known that excessively intense blue light triggers a stress response in *S. cerevisiae* cells (Logg et al., 2009; Pathak et al., 2014); some blue light-based strategies for inducing gene expression have thus been developed to be activated by short on-off light periods (Tucker et al., 2014).

However, light intensity is frequently reported by different studies using different measurement units and culture conditions, hence comparing protocols is a difficult task, as well as weighting and evaluating the different properties of each optogenetic system. To date, only one study has compared different optogenetic systems side-by-side (Pathak et al., 2014). Table 1 illustrates some of the monitored parameters and the main results as reported by different studies using yeast optogenetics for gene expression and metabolic engineering.

The control of target protein expression can also be achieved by means of feedback signals and modeling approaches. Melendez et al. constructed feedback loops that integrated product measurement and upstream optogenetic signals to regulate gene expression (and ultimately, product accumulation). A fluorescent reporter was used as the input signal, with a threshold that controlled blue light illumination at laboratory scale (Melendez et al., 2014). Computational modeling is increasingly being used for characterizing biological processes, since the input/output (I/O) analogies originally adopted by synthetic biologists

Table 1
Parameters and main results reported by different studies using yeast optogenetics for gene expression and metabolic engineering.

Optogenetic system	Chromophore (conc.)	Reporter gene /POI	Culture conditions	Culture volume	Light intensity	Main results	Reference
Red light-based systems							
PhyB/PIF3 (PhyBNT-GBD/PIF3-GAD)	PCB (25 μM)	<i>lacZ</i>	Preincubation in the dark with PCB/continuous red light	Not mentioned	$40 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	1000-fold induction or more	Shimizu Goto et al., 2002
PhyB/PIF3 (PhyBNT-Cestrin/PIF3-Nextein)	PCB (25 μM)	maltose binding protein/Flag tag	90 min of red light stimulation/90 min in the dark	Not mentioned	1 mW	4-fold increase in the amount of spliced product	Tyzkiewicz & Muir, 2008
PhyB/PIF3 (PhyBNT-GalDBD/GalAD-PIF3)	PCB (2–40 μM)	β -galactosidase YFP (destabilized version with a half-life of ~1 h)	5–120-s pulses of red light or pulses every 30 min–1 h	Not mentioned	2.8 mW cm^{-2}	2 μM of PCB was sufficient for maximal activation 5-s and 2-min light pulses provided similar results 5 h was the best incubation time protein levels correlated linearly with light dosage	Hughes et al., 2012
PhyB/PIF3 (PhyBNT-GalDBD/PIF3-GalAD) PhyB/PIF6	PCB (10 μM)	β -galactosidase	60-s red light pulses every 30 min	Not mentioned	$2.8 \mu\text{W cm}^{-2}$	PhyB/PIF3 presented higher activation and extremely low background when compared with PhyB/PIF6	Pathak et al., 2014
PhyB/PIF3 (DeLight-PhyB-mCherry-Tom7/Bem1-mCitrine-PIF)	PCB (31.25 μM)	mCherry, mCitrine	2-min intervals of alternating red and infra-red light	100 μl (384-well plates)	Not mentioned	Fast and reversible effect ($t_{1/2}$ of roughly 30 s)	Jost and Weiner, 2013
PhyB/PIF3 (PhyBNT-synTALE [DBD]/PIF3-VP64[AD])	PCB (25 μM)	<i>yEGFP</i>	30-s pulse of red light, followed by 10-s pulses every 30 min for 16 h	1 ml (12-well plates) or 20 ml (100-ml flask)	2.8 mW cm^{-2}	PhiReX 1.0: 11-fold induction PhiReX 1.1: up to 41-fold induction	Hochrein et al., 2017
Blue light-based systems							
CRY2/CIB1 (Gal4DBD-CRY2PHR/GalAD-CIB1)	–	β -galactosidase	3 h in the dark/4 h of blue light	Not mentioned	1.9 mW	~10-fold induction	Kennedy et al., 2010
CRY2/CIB1 (Gal4DBD-CRY2/Gal4AD-CIB1)	–	YFP (destabilized version with a half-life of ~1 h)	5 h of blue light pulses or flashes (2 s every 4 min)	Not mentioned	2.7 mW cm^{-2}	Blue light pulses induced the accumulation of the YFP reporter	Hughes et al., 2012
CRY2/CIB1 (CRY2-Gal4DBD/CIB1-Gal4AD)	–	β -galactosidase	90–190 min of blue light	Not mentioned	Up to $70 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Blue light of the same fluence rate but for a longer duration exhibited higher activity	Liu et al., 2012
CRY2/CIB1 (Gal4DBD-CRY2 [full-length or PHR] and GalAD-CIB1)	–	β -galactosidase	1-s pulses every 3 min	Not mentioned	$5.8 \mu\text{W cm}^{-2}$	CRY2PHR had better activity results, but with significantly increased background in the dark	Pathak et al., 2014
AsLOV2: TULIPs (Gal4DBD-ePDZb1 and GalAD-LOV μ pep [WT or V416I])	–	β -galactosidase	700-ms pulses every 12 s	Not mentioned	$5.8 \mu\text{W cm}^{-2}$	Similar results to CRY2/CIB1 (Gal4DBD-CRY2 [full length or PHR] and GalAD-CIB1)	Pathak et al., 2014
CRY2/CIB1 (LexA-CRY2/VP16-CIB1)	–	LexA(3xop)- <i>lacZ</i>	1-s blue light pulses every 3 min	Not mentioned	$5.8 \mu\text{W cm}^{-2}$	~100-fold induction	Pathak et al., 2014
AsLOV2 (LINX)	–	β -galactosidase	2 h in the dark/4 h of blue light	2 ml	$500 \mu\text{W cm}^{-2}$	5 times lower activity compared to cells kept in the dark	Younisfendi et al., 2016
VVD (LightOn, LexA-VVD-Gal4AD/LexA-VVD-Gal4AD)	–	<i>Hu3</i> and <i>4thSite1</i> <i>GpX</i> and <i>CypP</i>	4 h in the dark/blue light induction	1 ml (48-well plates)	4 W m^{-2} or 2.5 W m^{-2}	251-fold in AH109 cells 573-fold in BY4742 cells (containing Gal80)	Xu et al., 2018
EL222 (OptoEXP, VP16-EL222 and OptoINVRT)	–	GFP	8 h under blue light 46 h of blue light/4 h of dark/4 h of blue light. Duty cycle of 45 min blue light and 7 h 15 min dark.	1 ml (24-well plates) 0.5 l (2-l photobioreactor)	55 to $134 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (average: $77.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	43-fold expression (comparable to the <i>ADHI</i> promoter) Titer of $0.49 \pm 0.31 \text{ g l}^{-1}$ of isobutanol and $2.30 \pm 0.06 \text{ g l}^{-1}$ of 2-MBOH	Zhao et al., 2018

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Optogenetic system	Chromophore (conc.)	Reporter gene /POI	Culture conditions	Culture volume	Light intensity	Main results	Reference
WC-1/VVD (FUN-LOV; WC-1-Gal4DBD/VVD-Gal4AD)	–	Limonene synthase	Constant white light or constant darkness	50 ml (in flasks) or 200 μ l (96-well plates)	100 μ mol $m^{-2} s^{-1}$ for white light	Maximum gene expression at 20 μ mol $m^{-2} s^{-1}$ of blue light 2.5 times higher expression than galactose induction	Salinas et al., 2018
AsLOV2 (opto-4EBPs, cLIPS1, and cLIPS2)	–	eIF4E	Two 10-s pulses separated by 10 s in the dark	300 μ l (96-well plates), 200 ml (1-l flask)	0.06 μ W cm^{-2} , 0.09 μ W cm^{-2} , and 50 μ W cm^{-2}		Able to bind human eIF4E in vitro and inhibit translation
Lu et al., 2019 CRY2/CIB1 (ZDBD-CRY2PFR/VP16AD-CIB1; yOTK)	–	yEYenus, mRaby2	12 h of continuous light 20-min periods: 5% (1 min on/19 min off) to 100% (constant light).	Glass culture tubes or a Light Plate Apparatus	15 μ W cm^{-2}	ZDBD-CRY2PFRmedium/VP16AD-CIB1medium similar results to Gal4BD-CRY2PFR/Gal4AD-CIB1 Tunable as a function of the light duty cycle.	(Au) Adirekkan et al., 2020
UVRS/COP1 LexADBD-UVRS/ Gal4AD-COP1 ^{CR48}	–	β -galactosidase	16 h of UV-B light	Not mentioned	1.5 μ mol $m^{-2} s^{-1}$	77.9 Miller Units (UV light) vs. 0.12 Miller Units (dark)	Corduneus et al., 2013

are frequently not able to fully represent the real-world kinetics of biological functions. Redundant pathways, complex intracellular signaling, and the various processes involved in protein translation kinetics are examples of challenges faced by scientists when constructing computational simulation models for biological systems (Olson and Tabor, 2014). Some examples of optogenetic system characterization include a bidirectional promoter system developed by Jayaraman et al., who used a blue light-based gene expression system to simultaneously activate and repress 2 synthetic promoters in bacterial cells, modeling activation or repression responses over time and establishing a light intensity threshold. This work showed that accurately predicting the responses expected from optogenetic systems could be important for the fine-tuning of protein expression and dynamic control of metabolic pathways (Jayaraman et al., 2016). An example of successfully interpreting and modeling protein expression in *Escherichia coli* was performed by Milias-Argetis et al., who established a feedback-control strategy that achieved completely automatic regulation of both biomass concentration and protein expression in continuous cultures, even in the presence of environmental perturbations (Milias-Argetis et al., 2016).

Although most modeling studies have been performed using *Escherichia coli*, the knowledge produced on the kinetics of biological functions could serve as a basis for future studies using yeast. Altogether, controlling protein expression in a yeast platform through an optogenetic strategy is a complex achievement and will depend on the characteristics of the yeast strain, culture conditions, and protein of interest.

4. Scale-up

So far, the use of optogenetic induction systems in yeast aiming at biotechnological applications has been performed primarily on laboratory strains and proof-of-principle studies (Shimizu-Sato et al., 2002; Kennedy et al., 2010; Pathak et al., 2014). In order to meet biotechnological needs, the scale-up of these processes will depend on factors that include process costs, medium and strain characteristics, and downstream processing. Firstly, the use of physical inducers of protein expression such as heat or light reduces costs related to the otherwise needed chemical inducers while also mitigating risks of toxicity and interferences in cell metabolism or downstream processing (Shimizu-Sato et al., 2002; Valdez-Cruz et al., 2010; Salinas et al., 2017; Salinas

et al., 2018). In addition, some chemical inducers require freezing for long-term storage, which increases process costs and reduces the possibilities of protein production in remote places, which would also be overcome by using light as an inducer (Cao et al., 2017). Finally, the optogenetic control of gene expression offers a fast and easily tunable way of switching molecular circuits on and off in bioreactors (Scott et al., 2019), representing an advantage for complex metabolic engineering strategies. The use of light-induced protein expression in large-scale bioprocesses could thus bring economic and practical advantages over other induction systems (Chang et al., 2017; Hochrein et al., 2017). On the other hand, the optogenetic regulation of protein expression per se may require the simultaneous production of several heterologous proteins (dimerization modules, PCB-producing pathway). Therefore, the use of optogenetically regulated systems should be carefully evaluated in terms of an additional burden for biotechnological processes, especially when considering metabolic engineering strategies that require the expression of multiple enzymes.

The development of an illumination system able to activate, with the required temporal precision, protein expression in the whole cell content of a large fermentation bioreactor is a challenging task and an important requisite for the scale-up of optogenetic bioprocesses. Light penetration in large fermentation vessels is a challenge faced by optogenetic gene regulation in different microbial cultures (Brockman and Prather, 2015; Zhao et al., 2018; Pouzet et al., 2020), and yeast fermentative processes can reach high cell densities; this could hamper light penetration in the fermenter vessel (Milias-Argetis et al., 2016; Pouzet et al., 2020). Conversely, the light intensity required by optogenetic gene regulation is relatively modest and sometimes even intermittent (Milias-Argetis et al., 2011), and yeast OD₆₀₀ values of up to 50 have been considered acceptable in 5-l bioreactors (Zhao et al., 2018). Together, these aspects indicate that the scale-up of light sources could be performed with feasible power levels, which should be evaluated in terms of efficiency regarding total process costs.

Optogenetic devices must also resist the sterilization process, unless used on the exterior of a bioreactor. Therefore, studies of hardware development and the scale-up of light-controlled systems are required for promoting optogenetic applications in the biotechnology industry.

Zhao et al. grew *S. cerevisiae* in glass stirred-tank bioreactors wrapped in blue LED strips that covered 73% of the exposed surface of the fermentation broth (Zhao et al., 2018). Glass bioreactors wrapped in LED strips have also been used to optogenetically induce protein

production in *Escherichia coli* cultures of up to 7.5 l (Ding et al., 2020). The use of external illumination should take into consideration the need for heat control systems that cover the bioreactor vessel, such as cooling jackets. Other examples of laboratory solutions include LED panels and fiber optic light sources (Ye et al., 2011; Pilizota and Yang, 2013). It is important to note that even these modern light sources produce a certain amount of heat and could interfere with optogenetic processes, especially in applications that require precise temperature control (Owen et al., 2019). Large-scale fermentations typically produce much heat, and the effect of added lamps should be considered when dimensioning cooling systems (Deparis et al., 2017).

Biotechnological processes that traditionally use light for cell growth include microalgae and photosynthetic cyanobacteria. These cultures use photobioreactors, which are available in various designs and made of transparent materials using external or submersible lamps, fiber optics, or light guides. Some reactors also use recirculation systems that allow cell flow through an illuminated section (Johnson et al., 2018). Yeast cultures are able to thrive in different bioreactor set-ups and have even been grown in coculture with microalgae for lipid production using a bubble column photobioreactor (Zhang et al., 2014), as well as in a symbiotic CO₂-recycling manner using a stirred-tank photobioreactor, both with external lighting (La et al., 2019). Photobioreactors usually employed in microalgae cultures can reach volumes of up to hundreds of

liters, and some examples of photobioreactors that could be studied for yeast optogenetic applications have been reviewed by Huang et al. (2017). Important aspects to be carefully considered when studying this adaptation include specific requirements of mixing, mass transfer, and culture conditions (Huang et al., 2017). The wide available range of photobioreactor set-ups could thus provide insights for the design of optogenetic systems to be used in biotechnological applications with yeast.

5. Applications of optogenetic switches in yeast

Optogenetic systems developed for the control of gene expression in yeast present clear advantages when compared to other induction methods (Shimizu-Sato et al., 2002; Hughes et al., 2012; Pathak et al., 2014). These systems have mostly been used to express reporter genes, whereas more recent studies have used light to control different cellular processes (Jost and Weiner, 2015; Salinas et al., 2018; Zhao et al., 2018). In this section, we will present examples of optogenetic systems that were applied to yeast cultures with the aim of developing biotechnological processes that include heterologous protein expression and metabolic engineering.

Optogenetic switches that control transcription can be used to separate growth and production phases and to avoid the accumulation of

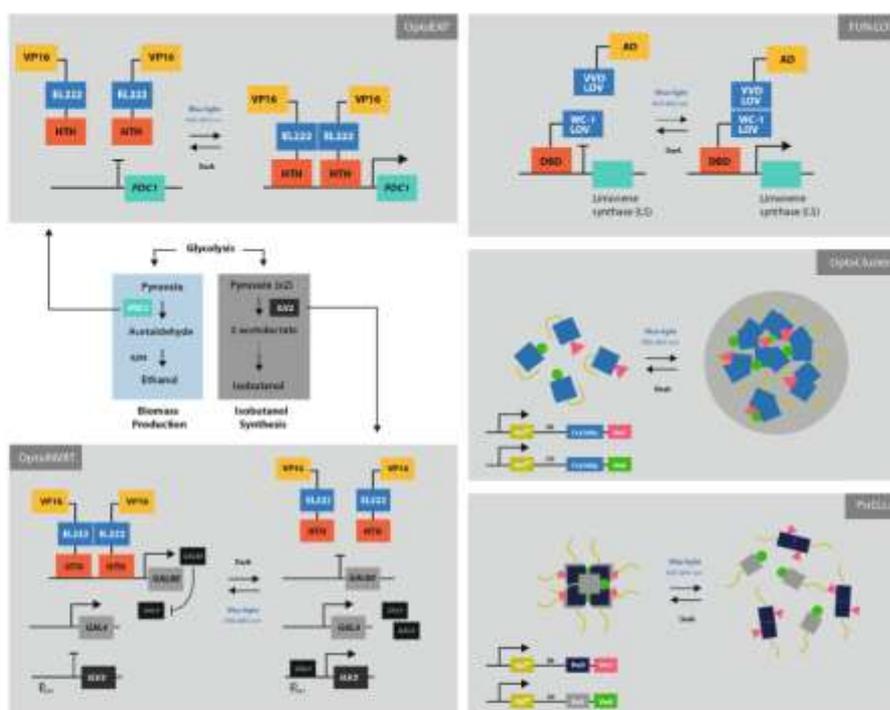


Fig. 2. Examples of optogenetic applications in yeast. In the work performed by Zhao et al. (2018), the *PDC1* gene was controlled by the OptoEXP system, directly induced by blue light, while the *ILV2* gene was under the control of the OptoINVRT system and was repressed by the same wavelength. The OptoINVRT system was based on the GAL40 regulator protein, which bound to the GAL4 transcription factor and inhibited *ILV2* expression in the presence of blue light. In the dark, GAL40 was not expressed and *ILV2* was normally produced. This way, the ethanol-producing and biomass growth phase was induced by blue light and the isobutanol-producing phase was induced in the dark. The same rationale was applied to lactate production using *LDH* instead of the *ILV2* gene under the control of the OptoINVRT system. The FUN-LOV system, based on the interaction between the white collar 1 protein (WC-1) and the YVD LOV domain, was used for inducing the expression of limonene synthase, an important enzyme in the industrial production of limonene. The OptoCluster system used FUS^N-CRY2olig fusions that also contained fluorescent domains (fusion red [FR] and citrine [Cit]) and enzymes involved in the synthesis of deoxy-violacein (VioC and VioE). These constructs led to protein clustering in the presence of blue light (450 nm), bringing together related enzymes, and diffusion in the dark. PixELL used the same enzymes in an opposite framework: blue light stimulated protein solubilization, while the dark state consisted of clusters of enzymes kept together by FUS^N-PixE (monomers) and FUS^N-PixD (dimers) fusions. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

toxic components. These systems can reach substantial yields with minimal background expression simply through an external light source, eliminating the need for costly chemical inducers. The FUN-LOV system, for example, has been used in the successful experimental expression of limonene synthase (LS) using a *Cannabis sativa* LS gene. This enzyme is involved in the synthesis of limonene, an important compound for cleaning products and food industries (Salinas et al., 2018). As for metabolic engineering purposes, the associated genetic manipulation usually aims at the overexpression of an enzyme of interest and/or the knockout/strict repression of endogenous enzymes that reduce carbon flow towards by-product formation. These approaches can interfere with cell metabolism by reducing growth rates, increasing cytotoxicity due to intermediate metabolites, and dysregulating endogenous cellular processes. As such, the fine control of carbon flow through metabolic branches is extremely important in industrial applications for achieving the desired yield without substantial drawbacks (Avalos et al., 2013; Salinas et al., 2017; Zhao et al., 2018). Optogenetic systems offer different ways of regulating metabolic pathways by controlling enzyme localization, quantity, and clustering, as well as the transcription of genes involved in the desired pathway. Fig. 2 shows established optogenetic switches and examples of applications of this technology.

A 2018 study by Zhao et al. on optogenetic isobutanol production pioneered the implementation of optogenetic toolkits in yeast with the aim of producing industrially valuable products. The authors developed a bidirectional switch to control the mitochondrial isobutanol pathway and produce lactate, isobutanol, and 2-methyl-1-butanol in glucose-fed yeast. In their engineered strains, pyruvate could be modified by pyruvate decarboxylase 1 (Pdc1) to produce ethanol, by lactate dehydrogenase (Ldh) to produce lactate, and by acetolactate synthase (Ilv2) to produce isobutanol; ethanol production thus competed with that of lactate and isobutanol. The authors used the OptoEXP system to express *PDC1* under blue light, whereas the OptoINVRT system repressed *LDH* expression in blue light and strongly activated it in the dark. This way, blue light induced the growth phase with ethanol production, while darkness induced the isobutanol or lactate production phase. Using constant illumination for fermentation induction and switching to the production phase with periodic light pulses to maintain NAD^+ pools, OptoEXP and OptoINVRT together increased isobutanol and 2-methyl-1-butanol production levels (8.49 g l⁻¹ and 2.38 g l⁻¹, respectively) (Zhao et al., 2018).

More recently, OptoINVRT7 was used in *S. cerevisiae* to control the expression of the *LDH* gene for lactic acid production. This is the fastest OptoINVRT circuit to date, showing robust control over engineered metabolic pathways, and it is ready to be used in light-controlled microbial chemical production (Zhao et al., 2020). These systems have the advantage of allowing the dynamic control of competing pathways, such as those involved in cell growth and metabolite production, through the use of intermittent light/dark states.

Light-controlled genetic circuits have also been used to bring together, within membraneless organelles, enzymes that participate in the same metabolic pathway (Zhao et al., 2019; Reed et al., 2020). The idea of gathering such biomolecular machinery was developed with the aim of increasing product yield and reducing byproduct formation without the need to knock out endogenous genes; this strategy could also be employed in a time-controllable fashion and potentially control metabolic flux. The stable protein aggregation using a light-induced transition (SPLIT) tool designed by Reed et al. promoted the condensation of proteins upon light stimulus within seconds of a single 405-nm light pulse, but the membraneless organelles did not disassemble in the dark. This system was based on the RGG domain of *Caenorhabditis elegans* and MBP of *Escherichia coli*, separated by the light-cleavable PhoCl (Reed et al., 2020). The OptoDroplet/OptoCluster (Taslami et al., 2014; Shin et al., 2017) and PixELL (Dine et al., 2018) systems fused the FUS protein to light-responsive domains (Shin et al., 2017). OptoDroplet used FUS^N-CRY2 fusion proteins, which presented a great capacity to alternate between the clustered and diffused states, while OptoCluster included a

mutation in CRY2 (named CRY2oligo), making the fusions less permissive to subunit diffusion. Both proteins were also fused to different enzymes of a same pathway in a way that, upon blue light illumination, droplets containing the biocatalysts were formed and drove metabolic flux towards a specific branch (Zhao et al., 2019). PixELL, on the other hand, used light as a stimulus for protein solubilization, while its dark state maintained clusters of enzymes together by FUSn-PixE and FUSn-PixD fusion constructs (Dine et al., 2018). PixD and PixE are *Synechocystis* sp. proteins that associate in the dark, forming multi-subunit complexes; in the presence of blue light, these complexes dissociate into PixD dimers and PixE monomers (Dine et al., 2018).

Zhao et al. used these three systems in the bioconversion of desired molecules through branched pathways. An OptoCluster system was designed for deoxy-violacein (DV) production by clustering the VioE and VioC enzymes upon blue light stimulation, favoring DV formation and reducing the spontaneous non-enzymatic production of prodeoxy-violacein (PDV). On the other hand, PixELL was applied with an inverted logic, where the VioE/VioC cluster was maintained in the dark. This system was also used for promoting carbon flow towards DV formation (through VioE and VioC) rather than through the competing branch involving VioD, which resulted in different products. Results indicated that the dark state increased DV formation, while blue light favored the VioD branch, showing the possibility of switching pathway branches using this system (Zhao et al., 2019).

Considering the available systems and examples of applications for optogenetic switches, the use of light as a regulatory input for the fermentation industry has potential to be applied in multiple biotechnological processes, whether by strongly and rapidly inducing the expression of a gene of interest, regulating and redirecting specific pathways, or reducing the formation of byproducts and toxic intermediates.

6. Conclusions

In the context of bioprocess development, optogenetics represents a fine addition to the yeast genetic toolbox. The growing interest for this topic has given rise to a wide range of studies employing this technique for regulating countless cellular processes in laboratory-scale fermentation. In this review, we have covered different aspects of the whole process, from selecting an appropriate optogenetic system, genetically engineering this toolbox into yeast strains, and selecting the appropriate light and growth conditions in order to achieve diverse biotechnological goals. We have presented new possibilities for applying the existing knowledge in this field into new processes, as well as possible paths for future studies that aim to develop optogenetic processes at commercial scales. The scale-up and application of optogenetic systems to industrial-scale fermentation is bound to become a reality in the upcoming future and should foster the development of new bioreactors, as well as upstream and downstream processing technologies, in addition to reducing the costs and chemical waste of induced biotechnological processes. Finally, the advantages of yeast-based manufacturing processes along with the new prospects brought by light-induced systems should contribute to the development of biotechnological processes that further expand the limits of heterologous protein production and metabolic engineering.

Author information

Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Bloco K, 1º andar. Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, Brazil. 70910-900.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

ALAP, JPCF, and LCP received fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

References

- An-Adirekhan, J.M., Stewart, C.J., Geller, S.H., Patel, M.T., Melesder, J., Coates, B.L., Noyes, M.B., McClean, M.N., 2020. A yeast optogenetic toolkit (yOTK) for gene expression control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 117, 886–893. <https://doi.org/10.1002/bit.27234>.
- Araya-Garay, J.M., Feijoo-Siota, L., Rosa-dos-Santos, F., Veiga-Crespo, P., Villa, T.G., 2012. Construction of new *Pichia pastoris* X-33 strains for production of lycopenes and beta-carotene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2483–2492. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3764-7>.
- Avalos, J.L., Fink, G.R., Stephanopoulos, G., 2013. Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves the production of branched-chain alcohols. *Nat. Biotechnol.* 31, 335–341. <https://doi.org/10.1038/nbt.2509>.
- Baumshlager, A., Khanmush, M., 2021. Synthetic biological approaches for optogenetics and tools for transcriptional light-control in bacteria. *Adv. Biol. (Weinb.)* 5, e2000256. <https://doi.org/10.1002/adbi.202000256>.
- Boydca, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K., 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>.
- Brockman, I.M., Prather, K.L., 2015. Dynamic metabolic engineering: new strategies for developing responsive cell factories. *Biotechnol. J.* 10, 1360–1369. <https://doi.org/10.1002/biot.201400422>.
- Bury, A., Hellingwerf, K.J., 2012. Design, characterization and in vivo functioning of a light-dependent histidine protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express* 2, 53. <https://doi.org/10.1186/s13560-012-0532-7>.
- Byrne, L.J., O'Callaghan, K.J., Tuise, M.P., 2005. Heterologous gene expression in yeast. *Methods Mol. Biol.* 308, 51–64. <https://doi.org/10.1385/1-59259-922-2-051>.
- Cao, J., Packier, J.S., Ramani, V., Cosanovici, D.A., Hryniak, C., Dana, R., Qiu, X., Lee, C., Furlan, S.N., Steemers, F.J., Adey, A., Waterston, R.H., Trapnell, C., Scheudrich, J., 2017. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science* 357, 661–667. <https://doi.org/10.1126/science.1259440>.
- Celli, E., Caldi, P., 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol. Adv.* 30, 1105–1110. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011>.
- Chang, F., Zhang, X., Paa, Y., Lu, Y., Fang, W., Fang, Z., Xiao, Y., 2017. Light induced expression of beta-glucosidase in *Escherichia coli* with autolysis of cell. *BMC Biotechnol.* 17, 74. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0402-1>.
- Chatelle, C., Ochoa-Fernandez, R., Engesser, R., Schneider, N., Beyer, H.M., Jones, A.R., Timmer, J., Zachariggen, M.D., Weber, W., 2018. A green-light-responsive system for the control of transgene expression in mammalian and plant cells. *ACS Synth. Biol.* 7, 1349–1358. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00450>.
- Chen, R., Yang, S., Zhang, L., Zhou, Y.J., 2020. Advanced strategies for production of natural products in yeast. *Science* 23, 100879. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100879>.
- Chernov, K.G., Redchuk, T.A., Ouellet, E.S., Verkhusha, V.V., 2017. Near-infrared fluorescent protein biosensors, and optogenetic tools engineered from phytochromes. *Chem. Rev.* 117, 6423–6446. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00790>.
- Crefocour, R.P., Yiu, R., Ullm, R., Halazonetis, T.D., 2013. Ultraviolet-B-mediated induction of protein-protein interactions in mammalian cells. *Nat. Commun.* 4, 1779. <https://doi.org/10.1038/ncomms2600>.
- Da Silva, N.A., Srikrishnan, S., 2012. Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 12, 197–214. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00769.x>.
- Deisseroth, K., 2011. Optogenetics. *Nat. Methods* 8, 26–29. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1324>.
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewski, A.K., Miesenböck, G., Ting, A., Schnitzer, M.J., 2006. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J. Neurosci.* 26, 10300–10306. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006>.
- Deparis, Q., Claes, A., Foulquie-Moreno, M.R., Thevelein, J.M., 2017. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res.* 17. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fyx036>.
- Dine, E., Gil, A.A., Uribe, G., Brangwynne, C.P., Toettcher, J.E., 2015. Protein phase separation provides long-term memory of transient spatial stimuli. *Cell Syst.* 6 (655–663), e655. <https://doi.org/10.1016/j.celsys.2015.05.002>.
- Ding, Q., Ma, D., Liu, G.Q., Li, Y., Guo, L., Cao, C., Hu, C., Ye, C., Liu, J., Lin, L., Chen, X., 2020. Light-powered *Escherichia coli* cell division for chemical production. *Nat. Commun.* 11, 2262. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16154-3>.
- Engler, C., Kandzia, R., Marillonnet, S., 2006. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 3, e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>.
- Figueras, D., Rojas, V., Romero, A., Larrondo, L.F., Salinas, F., 2021. The size and shine of yeast optogenetics. *Yeast* 38, 131–146. <https://doi.org/10.1002/yea.3529>.
- Geller, S.H., Anwi, E.B., Di Ventura, B., McClean, M.N., 2019. Optogenetic repressors of gene expression in yeasts using light-controlled nuclear localization. *Cell. Mol. Bieng.* 12, 511–528. <https://doi.org/10.1007/s12195-019-00590-9>.
- Gerhardt, K.P., Olson, E.J., Castillo-Hair, S.M., Hartough, L.A., Landry, B.P., Elmen, F., Yokoo, R., Gomez, E.J., Ramakrishnan, P., Suh, J., Savage, D.F., Taber, J.J., 2016. An open-hardware platform for optogenetics and photobiology. *Sci. Rep.* 6, 35363. <https://doi.org/10.1038/srep35363>.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison 3rd, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- Gogens, J.F., van Zyl, W.H., Knoetze, J.H., Hahn-Hagerdal, B., 2001. The metabolic burden of the PGK1 and ADHI2 promoter systems for heterologous xylanase production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 238–245. <https://doi.org/10.1002/bit.10356>.
- Guntar, G., Hallett, R.A., Zimmerman, S.P., Williams, T., Yumerefendi, H., Bear, J.E., Kuhlman, B., 2015. Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 112–117. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417910112>.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., Branch, M.A., 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 10, 1788–1795. <https://doi.org/10.1101/ga.143000>.
- He, J., Deng, J., Zheng, Y., Gu, J., 2006. A synergistic effect on the production of S-adenosyl-L-methionine in *Pichia pastoris* by knocking in of S-adenosyl-L-methionine synthase and knocking out of cystathionine-beta synthase. *J. Biotechnol.* 126, 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.009>.
- Herren, P., McClean, M.N., Mahadevan, L., Ramanathan, S., 2006. Signal processing by the HOG MAP kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7165–7170. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710770105>.
- Hirose, Y., Shimada, T., Nariwaka, R., Katayama, M., Ikeuchi, M., 2008. Cyanobacteriochrome Cca5 is the green light receptor that induces the expression of phycochrome linker protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9520–9533. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801826105>.
- Hochwain, L., Marthen, F., Messerschmidt, K., Mueller-Roeber, B., 2017. PhiREx: a programmable and red light-regulated protein expression switch for yeast. *Nucleic Acids Res.* 45, 9193–9205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx610>.
- Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., Yang, C., 2017. Design of Photobioreactors for mass cultivation of phototrophic organisms. *Engineering* 3, 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2017.03.020>.
- Hughes, R.M., Bolger, S., Tapadia, H., Tucker, C.L., 2012. Light-mediated control of DNA transcription in yeast. *Methods* 58, 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.06.004>.
- Jayarajan, P., Devurajan, K., Chua, T.K., Zhang, H., Gunawan, E., Poh, C.L., 2016. Blue light-mediated transcriptional activation and repression of gene expression in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 44, 6994–7005. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx548>.
- Jensen, N.B., Struck, T., Kildegaard, K.R., David, F., Mairy, J., Mortensen, U.H., Forster, J., Nielsen, J., Boedding, L., 2014. EasyClone: method for iterative chromosomal integration of multiple genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 14, 238–248. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12113>.
- Johnson, T.J., Kuvshinov, S., Anderson, G.A., Gu, L., Zhou, R., Gibbons, W.R., 2018. Photobioreactor cultivation strategies for microalgae and cyanobacteria. *Biotechnol. Prog.* 34, 811–827. <https://doi.org/10.1002/btpr.2025>.
- Jost, A.P., Weiner, O.D., 2015. Probing yeast polarity with acute, reversible, optogenetic inhibition of protein function. *ACS Synth. Biol.* 4, 1077–1085. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00033>.
- Kabemaki, A.A., Shemetov, A.A., Verkhusha, V.V., 2016. A bacterial phytochrome-based optogenetic system controllable with near-infrared light. *Nat. Methods* 13, 591–597. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3864>.
- Kalnath, S., Stadler, M., Reichardt, E., Ditzel, M., Jannjok, H., 2017. Green-light-induced inactivation of receptor signaling using cobalamin-binding domains. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 56, 4608–4611. <https://doi.org/10.1002/anie.201611998>.
- Kawano, F., Suzuki, H., Furuya, A., Sato, M., 2015. Engineered pair of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. *Nat. Commun.* 6, 6256. <https://doi.org/10.1038/ncomms7256>.
- Kennedy, M.J., Hughes, R.M., Peteya, L.A., Schwartz, J.W., Ehlers, M.D., Tucker, C.L., 2010. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat. Methods* 7, 973–975. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1524>.
- Kim, H., Yoo, S.J., Kang, H.A., 2015. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Res.* 15, 1–16. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12195>.
- Kivvorukho, A., Stewer, V., Nielsen, J., 2011. Opportunities for yeast metabolic engineering: lessons from synthetic biology. *Biotechnol. J.* 6, 262–276. <https://doi.org/10.1002/biot.201000306>.
- La, A., Perez, P., Tañi, B., 2019. Process for symbiotic culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Chlorella vulgaris* for in situ CO₂ mitigation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 731–745. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9506-3>.
- Lee, F.W., Da Silva, N.A., 1997. Sequential delta-integration for the regulated insertion of cloned genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* 13, 368–373. <https://doi.org/10.1021/bp70055d>.
- Lee, M.E., DeLoache, W.C., Cervantes, B., Dueber, J.E., 2015. A highly characterized yeast toolkit for modular, multipart assembly. *ACS Synth. Biol.* 4, 975–986. <https://doi.org/10.1021/acs500386v>.
- Levkaya, A., Weiner, O.D., Lin, W.A., Voigt, C.A., 2009. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* 461, 997–1001. <https://doi.org/10.1038/nature08446>.
- Liu, H., Gomez, G., Lin, S., Lin, S., Liu, C., 2012. Optogenetic control of transcription in zebrafish. *PLoS One* 7 (11), e50738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050738>.
- Logg, K., Bodvard, K., Blomberg, A., Ekl, M., 2009. Investigations on light-induced stress in fluorescence microscopy using nuclear localization of the transcription factor Mx2p as a reporter. *FEMS Yeast Res.* 9, 875–884. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00536.x>.

- Loisi, A., Gardner, K.H., Moglich, A., 2018. Blue-light receptors for optogenetics. *Chem. Rev.* 118, 10659–10709. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00163>.
- Lu, H., Mazumder, M., Jaikaran, A.S.I., Kumar, A., Leis, E.K., Xu, X., Altmann, M., Cochran, A., Woolley, G.A., 2019. A yeast system for discovering optogenetic inhibitors of eukaryotic translation initiation. *ACS Synth. Biol.* 8, 744–757. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00386>.
- Ma, H., Kimer, S., Schatz, F.J., Betzstein, D., 1967. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene.* 50, 201–216. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(67\)90276-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(67)90276-3).
- Melander, J., Patel, M., Oakes, B.L., Xu, P., Morton, F., McClean, M.N., 2014. Real-time optogenetic control of intracellular protein concentration in microbial cell cultures. *Integr. Biol. (Camb.)* 6, 366–372. <https://doi.org/10.1039/c3ib40102b>.
- de Mena, L., Rink, P., Rincón-Limas, D.E., 2018. Bringing light to transcription: the optogenetic repertoire. *Front. Genet.* 9, 518. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00518>.
- Millar-Argenteis, A., Summers, S., Stewart-Orenstein, J., Zuleta, L., Pirrut, D., El-Samad, H., Khammash, M., Lygeros, J., 2011. In silico feedback for in vivo regulation of a gene expression circuit. *Nat. Biotechnol.* 29, 1114–1116. <https://doi.org/10.1038/nbt.2010>.
- Millar-Argenteis, A., Rullas, M., Aoki, S.K., Buchmann, P., Khammash, M., 2016. Automated optogenetic feedback control for precise and robust regulation of gene expression and cell growth. *Nat. Commun.* 7, 12546. <https://doi.org/10.1038/ncomms12546>.
- Mokdad-Gargouri, R., Abdelmeziou-Soussi, S., Hadji-Abbes, N., Amor, I.Y., Borchani-Chelchouh, I., Gargouri, A., 2012. Yeast as a tool for heterologous gene expression. *Methods Mol. Biol.* 824, 359–370. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-439-9_18.
- Motta-Mena, L.B., Resde, A., Mallory, M.J., Glantz, S., Weiner, O.D., Lynch, K.W., Gardner, K.H., 2014. An optogenetic gene expression system with rapid activation and deactivation kinetics. *Nat. Chem. Biol.* 10, 196–202. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1430>.
- Müller, K., Engesser, R., Timmer, J., Zurbriggen, M.D., Weber, W., 2014. Orthogonal optogenetic triple-gene control in mammalian cells. *ACS Synth. Biol.* 3, 796–801. <https://doi.org/10.1021/bb500305v>.
- Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Eateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E., Hegemann, P., 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296, 2395–2398. <https://doi.org/10.1126/science.1072660>.
- Nielsen, J., 2013. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered* 4, 207–211. <https://doi.org/10.4161/bieng.22856>.
- Nispek, D., Weiler, F., Rosenzweig, J., Eick, R., Di Ventura, B., 2016. Optogenetic control of nuclear protein export. *Nat. Commun.* 7, 10624. <https://doi.org/10.1038/ncomms10624>.
- Nour-Eldin, H.H., Hansen, B.G., Notholm, M.H., Jensen, J.K., Halkier, B.A., 2006. Advancing small-fragment based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res.* 34, e122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj385>.
- O'Brien, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S., Paddon, C., 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res.* 25, 451–452. <https://doi.org/10.1093/nar/25.3.451>.
- Olson, E.J., Tabor, J.J., 2014. Optogenetic characterization methods overcome key challenges in synthetic and systems biology. *Nat. Chem. Biol.* 10, 502–511. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1550>.
- Ong, N.T., Tabor, J.J., 2015. A miniaturized *Escherichia coli* green light sensor with high dynamic range. *ChemBiochem.* 19, 1255–1258. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100007>.
- Owen, S.F., Liu, M.H., Kreitzer, A.C., 2019. Thermal constraints on in vivo optogenetic manipulation. *Nat. Neurosci.* 22, 1061–1065. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0423-3>.
- Paddon, C.J., Keasling, J.D., 2014. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 355–367. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3240>.
- Padmanabhan, S., Perez-Castano, R., Elias-Arnanz, M., 2019. B12-based photoreceptors: from structure and function to applications in optogenetics and synthetic biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 57, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.csi.2019.01.020>.
- Pathak, G.P., Strickland, D., Vrana, J.D., Tucker, C.L., 2014. Benchmarking of optical dimerizer systems. *ACS Synth. Biol.* 3, 532–538. <https://doi.org/10.1021/bb500291a>.
- Pillizota, T., Yang, Y.T., 2018. “do it yourself” microbial cultivation technique for synthetic and systems biology: cheap, fun, and flexible. *Front. Microbiol.* 9, 1666. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01666>.
- Pouret, S., Boudrens, A., Le Bec, M., Lautier, T., Truan, G., Heren, P., 2020. The promise of Optogenetics for bioproduction: dynamic control strategies and scale-up instruments. *Bioengineering (Basel)* 7. <https://doi.org/10.3390/bioeng7040151>.
- Protschenko, O., Philpott, C.C., 2003. Regulation of intracellular heme levels by HMX1, a homolog of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 36582–36587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306504200>.
- Ramakrishna, P., Tabor, J.J., 2016. Repurposing synochocystis POC6803 Uir5-UirR as a UV-violet/green photoconvertible transcriptional regulatory tool in *E. coli*. *ACS Synth. Biol.* 5, 733–740. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00068>.
- Reed, E.H., Schuster, B.S., Good, M.C., Hamner, D.A., 2020. SPLIT: stable protein Conservation using a light induced transition. *ACS Synth. Biol.* 9, 500–507. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00503>.
- Remicke, C., Schuster, D., Usherenko, S., Eisen, L.O., Taxis, C., 2013. A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function. *Chem. Biol.* 20, 619–626. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.09.005>.
- Salinas, F., Rojas, V., Delgado, V., Agosin, E., Larroondo, L.F., 2017. Optogenetic switches for light-controlled gene expression in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2629–2640. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8170-8>.
- Salinas, F., Rojas, V., Delgado, V., Lopez, J., Agosin, E., Larroondo, L.F., 2018. Fungal light-oxygen-voltage domains for optogenetic control of gene expression and flocculation in yeast. *mBio* 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00626-18>.
- Schmidt, D., Cho, Y.K., 2015. Natural photoreceptors and their application to synthetic biology. *Trends Biotechnol.* 33, 90–91. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.007>.
- Scott, T.D., Sweeney, K., McClean, M.N., 2019. Biological signal generators: integrating synthetic biology tools and in silico control. *Curr. Opin. Syst. Biol.* 14, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.csi.2019.02.007>.
- Sharrock, R.A., 2009. The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biol.* 9, 250. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-250>.
- Shimizu-Sato, S., Hou, E., Tepperman, J.M., Quail, P.H., 2002. A light-switchable gene promoter system. *Nat. Biotechnol.* 20, 1041–1044. <https://doi.org/10.1038/nbt734>.
- Shin, A.Y., Han, Y.J., Song, P.S., Kim, J.I., 2014. Expression of recombinant full-length plant phytochromes assembled with phytochromeobilin in *Pichia pastoris*. *FERS Lett.* 588, 2964–2970. <https://doi.org/10.1016/j.letslat.2014.05.050>.
- Shin, Y., Berry, J., Pannucci, N., Hstajaj, M.P., Teotcher, J.E., Brangwynne, C.P., 2017. Spatiotemporal control of intracellular phase transitions using light-activated optoDroplets. *Cell* 169 (159–171), e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.054>.
- Siddiqui, M.S., Thodey, K., Trenchard, L., Smolke, C.D., 2012. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. *FEMS Yeast Res.* 12, 144–170. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00774.x>.
- Sokolina, O., Kapus, A., Tereckik, K., Dixon, L.E., Kosma-Bognar, L., Nagy, F., Millar, A.J., 2009. A switchable light-input, light-output system modelled and constructed in yeast. *J. Biol. Eng.* 3, 15. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-15>.
- Strickland, D., Liu, Y., Wagner, E., Hope, C.M., Zayner, J., Antoniou, C., Sonnick, T.R., Weis, E.L., Grotzer, M., 2012. TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology. *Nat. Methods* 9, 379–384. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1904>.
- Sweeney, K., Moreno-Mocales, N., Burnmeister, Z., Nimmo-Graham, A.J., McClean, M.N., 2019. Easy calibration of the light plate apparatus for optogenetic experiments. *MethodsX* 6, 1480–1488. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.06.000>.
- Tadimi, A., Vrana, J.D., Chen, D., Boriskaya, S., Mayer, B.J., Kennedy, M.J., Tucker, C.L., 2014. An optimized optogenetic clamping tool for probing protein interactions and function. *Nat. Commun.* 5, 4925. <https://doi.org/10.1038/ncomms4925>.
- Tucker, C.L., Vrana, J.D., Kennedy, M.J., 2014. Tools for controlling protein interactions using light. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 64, 17–16.11–20. <https://doi.org/10.1002/celld.143036.ch1716a64>.
- Tyzkiewicz, A., Muir, T., 2008. Activation of protein splicing with light in yeast. *Nat. Methods* 5, 303–305. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1109>.
- Valdez-Cruz, N.A., Caspeta, L., Perez, N.O., Ramirez, O.T., Trujillo-Roldan, M.A., 2010. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda_{td} pl and/or pR promoters. *Microb. Cell Factories* 9, 18. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-18>.
- Wang, X., Hoelstern, M.F., DeBaggio, A.J., Dhillo, N., Vancura, A., Kuret, J., Johnston, G.C., Singer, R.A., 1996. Purified isoform of yeast cox11 kinase I, including the novel Vck3p, suppresses the *gcr1* blockage of cell proliferation from stationary phase. *Mol. Cell Biol.* 16, 5375–5385. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.10.5375>.
- Wang, X., Chen, X., Yang, Y., 2012. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat. Methods* 9, 266–269. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1592>.
- Witte, K., Strickland, D., Grotzer, M., 2017. Cell cycle entry triggers a switch between two modes of Cdc42 activation during yeast polarization. *Elife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.26722>.
- Xu, X., Du, Z., Liu, R., Li, T., Zhao, Y., Chen, X., Yang, Y., 2018. A single-component optogenetic system allows stringent switch of gene expression in yeast cells. *ACS Synth. Biol.* 7, 2045–2053. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00180>.
- Ye, H., Daoud-EI Baba, M., Peng, R.W., Fussenegger, M., 2011. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science* 332, 1565–1568. <https://doi.org/10.1126/science.1203535>.
- Yoshikawa, S., Katayama, M., Geng, X., Iseuchi, M., 2004. Cyanobacterial phytochrome-like PixJ1 holoprotein shows novel reversible photoconversion between blue- and green-absorbing forms. *Plant Cell Physiol.* 45, 1729–1737. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch234>.
- Yuzerfeldt, H., Dickinson, D.J., Wang, H., Zimmerman, S.P., Bear, J.E., Goldstein, B., Hahn, K., Kuhlman, B., 2015. Control of protein activity and cell fate specification via light-mediated nuclear translocation. *PLoS One* 10, e0120443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120443>.
- Yuzerfeldt, H., Lerner, A.M., Zimmerman, S.P., Hahn, K., Bear, J.E., Strahl, B.D., Kuhlman, B., 2018. Light-induced nuclear export reveals rapid dynamics of epigenetic modifications. *Nat. Chem. Biol.* 12, 399–401. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2065>.
- Zhang, Z., Ji, H., Gong, G., Zhang, X., Tan, T., 2014. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodospirillum rubrum* and microalgae *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields. *Bioresour. Technol.* 164, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.029>.

A.L.A. Pérez et al.

Biotechnology Advances xxx (xxxx) xxx

Zhao, E.M., Zhang, Y., Mehl, J., Park, H., Labeani, M.A., Toettcher, J.E., Avalos, J.L., 2018. Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production. *Nature*. 555, 653–657. <https://doi.org/10.1038/nature26141>.

Zhao, E.M., Seeh, N., Wilson, M.Z., Dine, E., Parrocchi, N.L., Gital, Z., Avalos, J.L., Toettcher, J.E., 2019. Light-based control of metabolic flux through assembly of

synthetic organelles. *Nat. Chem. Biol.* 15, 589–597. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0204-8>.

Zhao, E.M., Labeani, M.A., Lovelett, E.J., Garcia-Echauri, S.A., Hoffman, S.M., Gonzalez, C.L., Toettcher, J.E., Kevrekidis, I.G., Avalos, J.L., 2020. Design and characterization of rapid optogenetic circuits for dynamic control in yeast metabolic engineering. *ACS Synth. Biol.* <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00385>.