



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



DANIELLI BATISTA BEZERRA CAJUEIRO

**ANCORAGEM DE ANTÍGENOS VIRAIS NA SUPERFÍCIE CELULAR DE
*Saccharomyces cerevisiae***

Recife
2022

DANIELLI BATISTA BEZERRA CAJUEIRO

**ANCORAGEM DE ANTÍGENOS VIRAIS NA SUPERFÍCIE CELULAR DE
*Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas

Área de concentração: Sistemas Biológicos

Orientador (a): Diogo Ardaillon Simões

Coorientador (a): Fernanda Cristina Bezerra Leite

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Cajueiro, Danielli Batista Bezerra

Ancoragem de antígenos virais na superfície celular de *Saccharomyces cerevisiae*
/ Danielli Batista Bezerra Cajueiro. – 2022.

73 f. : il.

Orientador: Diogo Ardaillon Simões.

Coorientadora: Fernanda Cristina Bezerra Leite.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife,
2022.

Inclui referências.

1. Fungos. 2. Leveduras. 3. Vacinas. I. Simões, Diogo Ardaillon
(orientador). II. Leite, Fernanda Cristina Bezerra (coorientadora). III.
Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-199

DANIELLI BATISTA BEZERRA CAJUEIRO

**ANCORAGEM DE ANTÍGENOS VIRAIS NA SUPERFÍCIE CELULAR DE
*Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 23/05/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Carvalho Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr^a. Isabelle Freire Tabosa Viana
IAM - Fiocruz

Dr^a. Anna Jéssica Duarte Amaral
Universidade Federal de Pernambuco

Esta tese é dedicada a minha saudosa irmã Patrícia.
Saudade eterna.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por trilhar meus caminhos e entregar meu destino nas mãos de pessoas que tanto amo e admiro.

Ao meu amado esposo Roberto, por toda paciência, amor, carinho e palavra de coragem.

Ao meu filho Lucas, por ser luz na minha vida e me dar alegria em todos os momentos, e por sempre me inspirar a ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais Roberto e Djane, por guiar meus passos até aqui, pela dedicação e amor a mim e a meu filho.

Ao meu irmão André, por estar sempre ao meu lado e me fortalecer diante das circunstâncias da vida. A minha eterna e a amada irmã Patrícia, por ser meu porto seguro e saber que aonde estiver estará feliz pelas minhas conquistas.

A todos os meus familiares, sobrinhas (Letícia e Isabelle) e amigos especiais que rezaram e me deram forças pra chegar até aqui.

Ao meu orientador Diogo Simões, pela oportunidade, apoio, ensinamentos e exemplo de profissional.

A minha co-orientadora Fernanda Leite, por todos os ensinamentos nesta longa caminhada desde a minha iniciação científica, por ser exemplo de mulher, mãe e profissional.

Aos meus colegas de laboratório Alícia, Eduardo e em especial a Crislaine, por transformar o laboratório num ambiente de amizade e apoio. Cris, obrigada por cada conversa, discussão e risadas, com você tudo se tornou mais fácil e leve.

Ao professor Roberto Lins, Isabelle Viana e Danilo Coêlho do Instituto Aggeu Magalhães, pelas colaborações e apredizagens.

Ao grupo LEMTE através do professor Antônio Carlos de Freitas e Anna Jéssica, por todo apoio prestado e colaborações técnicas.

Aos laboratórios do Departamento de Bioquímica e professores responsáveis, por todo apoio técnico e equipamentos utilizados ao longo da tese.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, através da professora Márcia e Thiago, por todo apoio e ensinamento.

A CAPES pelo apoio financeiro.

“Eis que fizeste meus dias da largura de palmos, e a duração da minha vida é quase nada diante de ti; todo ser humano, seja quem for, não passa de um breve sopro”. (Salmo, 38).

RESUMO

A ancoragem de proteínas à superfície celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser empregada como forma alternativa de produzir proteínas heterólogas para diversos fins. Tal abordagem pode ser empregada no desenvolvimento de vacinas e imunoreagentes, uma vez que a exposição de proteínas na superfície da levedura se mostra uma ferramenta eficiente tanto para a apresentação de antígenos ao sistema imune, como também para a triagem de anticorpos. Neste trabalho, construímos linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* para ancorar na superfície celular antígenos virais. Nessas linhagens, a proteína heteróloga está fusionada a uma proteína nativa da parede da levedura que funciona como âncora (α -aglutinina). Para isto utilizamos o kit comercial EBY100/pYD1, o qual utiliza um vetor episomal para realizar a expressão. O epítipo 2F5 do vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi ancorado na superfície celular da levedura a fim de demonstrar o uso da ancoragem para a utilização em imunoreagentes. Este, por sua vez, demonstrou ter uma diferença significativa nos imunoenaios quando utilizado o anticorpo anti-2F5 para detecção do epítipo 2F5 ancorado na levedura, em comparação à levedura hospedeira. Além disto, foi possível comparar a expressão por dois sistemas de clonagem, episomal (multicópia) e integrativa (monocópia), para obter a melhor detecção do oncogene E6 do Papilomavírus Humano (HPV). Como resultado foi possível observar que o uso de estratégias de clonagem multicópia parece ser a melhor escolha, pois através dos imunoenaios utilizando o anticorpo anti-E6 para detecção do antígeno E6 ancorada na superfície celular da levedura, observamos uma diferença significativa quando comparado à levedura hospedeira. As linhagens aqui construídas podem ser úteis em futuras estratégias para imunoreagentes e vacinais, sendo necessários estudos adicionais de análise da expressão e ancoragem dessas proteínas, bem como ensaios imunológicos para verificar suas propriedades imunogênicas.

Palavras-chave: Levedura; Ancoragem; Vacinas; Imunoreagentes; Epítipos.

ABSTRACT

The anchoring of proteins to the cell surface of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* can be used as an alternative way to produce heterologous proteins for different purposes. Such an approach can be used in the development of vaccines and immunoreagents, since the exposure of proteins on the surface of the yeast proves to be an efficient tool both for the presentation of antigens to the immune system, as well as for the screening of antibodies. In this work, we constructed recombinant strains of *S. cerevisiae* to anchor viral antigens on the cell surface. In these strains, the heterologous protein is fused to a native protein of the yeast wall that functions as an anchor (α -agglutinin). For this, we used the commercial kit EBY100/pYD1, which uses an episomal vector to perform the expression. The 2F5 epitope of the human immunodeficiency virus (HIV) was anchored to the cell surface of yeast in order to demonstrate the use of the anchor for use in immunoreagents. This, in turn, was shown to have a significant difference in immunoassays when the anti-2F5 antibody was used to detect the 2F5 epitope anchored in yeast, compared to the yeast host. Furthermore, it was possible to compare the expression by two cloning systems, episomal (multicopy) and integrative (monocopy), to obtain the best detection of the Human Papillomavirus (HPV) E6 oncogene. As a result, it was possible to observe that the use of multicopy cloning strategies seems to be the best choice, because through immunoassays using the anti-E6 antibody to detect the E6 antigen anchored on the yeast cell surface, we observed a significant difference when compared to the yeast host. The strains constructed here may be useful in future strategies for immunoreagents and vaccines, requiring additional studies to analyze the expression and anchoring of these proteins, as well as immunological assays to verify their immunogenic properties.

Keywords: Yeast; Anchoring; Vaccine; Immunoreagent; Epitope.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Processamento de proteína em levedura	17
Figura 2 – Estrutura da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Figura 3 – Tipos de proteínas âncoras	20
Figura 4 – Visão geral das aplicações de ancoragem de proteína na superfície de levedura	21
Figura 5 – Sistema EBY100/pYD1	23
Figura 6 – Etapas do ensaio de yeast-ELISA	27
Figura 7 – Microscopia de fluorescência de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
Figura 8 – Método de engenharia de DNA <i>USER-Phusion</i>	31
Figura 9 – Método <i>EasyClone-MarkerFree</i>	32

ARTIGO I: DETECÇÃO POR YEAST-ELISA DO SCAFFOLD-EPÍTOPO TOP7-2F5 ANCORADO NA SUPERFÍCIE CELULAR DA LEVEDURA

Figura 1 – Esquema geral da montagem e verificação das linhagens recombinantes	40
Figura 2 – yeast-ELISA anti-His em diferentes tempos de indução	41
Figura 3 – Microscopia de fluorescência	42
Figura 4 – Yeast-ELISA com anti-His	43
Figura 5 – Yeast-ELISA com anti-2F5	44

ARTIGO II: DETECÇÃO DA ANCORAGEM DA ONCORPROTEÍNA E6 DE HPV-16 POR YEAST-ELISA ATRAVÉS DE EXPRESSÃO MONOCÓPIA E MULTICÓPIA

Figura 1 – Desenho comparativo entre a construção de linhagem episomal e integrativa	55
Figura 2 – Esquema de verificação de integração cromossômica	56
Figura 3 – Yeast-ELISA com anti-His	59

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Principais biofármacos produzidos na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Tabela 2 – Aplicações mais recentes do sistema EBY100/pYD1	23
Tabela 3 – Aplicação dos sistema de expressão de proteínas recombinantes em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para produção de vacinas	25

ARTIGO II: DETECÇÃO DA ANCORAGEM DA ONCORPROTEÍNA E6 DE HPV-16 POR YEAST-ELISA ATRAVÉS DE EXPRESSÃO MONOCÓPIA E MULTICÓPIA

Tabela 1 – Lista de primers utilizados para montagem e verificação dos vetores espissomais e integrativo	53
Tabela 2 – Plasmídeos e linhagens construídas	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 GERAL	14
2.2 ESPECÍFICO	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 A LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO ORGANISMO MODELO	15
3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA	15
3.3 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E CONSTITUIÇÃO DAS ÂNCORAS NATIVAS	18
3.4 ANCORAGEM DE PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO ESTRATÉGIA PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS	20
3.5 USO DA ANCORAGEM NA SUPERFÍCIE DA LEVEDURA PARA A TRIAGEM DE ANTICORPOS E NA PRODUÇÃO DE VACINAS	24
3.6 MÉTODOS PARA VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ANCORAGEM DE PROTEÍNAS EM LEVEDURA	26
3.6.1 Yeast-ELISA	26
3.6.2 Citometria de fluxo e microscopia de fluorescência	28
3.7 SISTEMA DE MODIFICAÇÃO GENÉTICA EM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 ARTIGO 1: DETECÇÃO POR YEAST-ELISA DO SCAFFOLD-EPÍTOPO TOP7-2F5 ANCORADO NA SUPERFÍCIE CELULAR DA LEVEDURA	34
4.2 ARTIGO 2: DETECÇÃO DA ANCORAGEM DA ONCORPROTEÍNA E6 DE HPV-16 POR YEAST-ELISA ATRAVÉS DE EXPRESSÃO MONOCÓPIA E MULTICÓPIA	50
5 CONCLUSÕES	64
6 SÚMULA CURRICULAR	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de levedura, a *Saccharomyces cerevisiae* é reconhecida como organismo modelo para estudos de manipulação genética e amplamente utilizada como hospedeira em estratégias de expressão de proteínas heterólogas. Além das vantagens já estabelecidas, existe o fato de ser um organismo reconhecido como seguro (*GRAS – Generally Regarded as Safe*) e ser capaz de realizar modificações pós-traducionais tipicamente associadas a eucariotos, como a glicosilação, por exemplo. Sistemas alternativos de expressão de proteínas recombinantes têm sido desenvolvidos, um destes utilizando a levedura como plataforma de produção de proteínas através da sua ancoragem na superfície celular (*YSD – Yeast Surface Display*). O advento de tais sistemas pode facilitar e acelerar grandemente a utilização da expressão heteróloga em *S. cerevisiae* para aplicações mais complexas, que exijam a construção de múltiplas linhagens, a exemplo de uma abordagem de *screening* de bibliotecas gênicas. Além dessas vantagens, é possível utilizar em *S. cerevisiae* o sistema de ancoragem de proteína visando o desenvolvimento de vacinas e imunorreagentes, uma vez que a exposição de epítomos na superfície da levedura se mostra uma ferramenta eficiente tanto para apresentação de antígenos ao sistema imune, como também para a triagem de soros com base na ligação ao seu anticorpo específico.

Visando estabelecer uma plataforma de expressão e ancoragem de proteínas recombinantes em *S. cerevisiae*, optamos por utilizar o sistema EBY100/pYD1, desenvolvido por Boder e Witrupp (1997), e o sistema de integração cromossômica *EasyClone-MarkerFree* baseado em CRISPR-Cas9, desenvolvido por Jessop-Fabre *et al.* (2016). O sistema EBY100/pYD1 utiliza um vetor episomal pYD1 que permite a clonagem de uma sequência heteróloga que resulta em fusão à extremidade C-terminal da proteína nativa Aga2p, a qual se liga por pontes dissulfeto à proteína que está na membrana, a Aga1p de *S. cerevisiae* (Invitrogen, 2002). Por outro lado, o sistema *EasyClone-MarkerFree* permite a integração sítio-dirigida de sequências gênicas de interesse mediada pela endonuclease Cas-9 e tem facilitado e acelerado a obtenção das linhagens recombinantes, conferindo maior estabilidade genética a estas linhagens. Desta forma, é possível utilizar estes sistemas para diversas abordagens e aplicações, por exemplo como vacina de célula inteira e no desenvolvimento de imunógenos.

No manuscrito intitulado **“Detecção por yeast-ELISA do scaffold-epítopo Top7-2F5 ancorado na superfície celular da levedura”** foi demonstrada a construção da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* expressando o epítopo 2F5 de HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) ancorado à sua superfície celular e seu eficaz reconhecimento por anticorpo específico anti-2F5 em ensaios do tipo yeast-ELISA. Estes resultados posicionam o sistema de ancoragem aqui utilizado como bastante promissor para acelerar a avaliação *in vivo* de antígenos do tipo scaffold-epítopo concebidos *in silico*.

Com o objetivo de comparar linhagens recombinantes construídas a partir do uso de sistemas de expressão episomal e por integração cromossômica, foram construídas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* expressando a oncoproteína E6 do Papilomavírus humano (HPV). Os resultados estão apresentados no manuscrito **“Detecção da ancoragem da oncoproteína E6 de HPV-16 por yeast-ELISA através de expressão monocópia e multicópia”** e indicam o sistema de clonagem multicópia como mais eficiente para a ancoragem desta oncoproteína, a partir da detecção realizada por anticorpo anti-E6 em ensaios do tipo yeast-ELISA. As linhagens aqui construídas poderão ser futuramente avaliadas como estratégia vacinal terapêutica.

Além disto, foi ainda possível aprimorar a técnica de avaliação da ancoragem da proteína na membrana da levedura por meio de ensaios de yeast-ELISA, visando reduzir custo e tempo para a triagem sorológica e, conseqüentemente, o diagnóstico de doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Construção de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* baseados na ancoragem de proteínas à superfície celular da levedura.

2.2 ESPECÍFICOS

- Construir a linhagem recombinante contendo o epítipo 2F5 de HIV ancorado à superfície celular, visando a produção de imunorreagente;
- Verificar a ancoragem do epítipo 2F5 bem como sua funcionalidade utilizando o reconhecimento específico pelo anticorpo anti-2F5.
- Construir duas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* contendo a proteína E6 de HPV ancorada à superfície celular, utilizando as técnicas de clonagem epissomal e integrativa;
- Comparar a eficiência de ancoragem entre as linhagens construídas pelos métodos de modificação genética: epissomal e integrativa;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* COMO ORGANISMO MODELO

Saccharomyces cerevisiae é um fungo unicelular que possui 12.068 quilobases (kb) de DNA organizado em 16 cromossomos. Seu genoma foi completamente sequenciado por um consórcio de pequenos laboratórios, com cerca de 600 pesquisadores envolvidos, no qual encontraram 6.000 genes, sendo 5.570 previstos para codificar proteínas (Goffeau *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2001). *S. cerevisiae* é utilizada extensivamente na fermentação de alimentos e bebidas, na qual tem um valor comercial bastante elevado. No que diz respeito a indústria de bebidas, a levedura está envolvida na produção de muitas delas, como o vinho, a cerveja, a sidra e em bebidas destiladas (Walker e Stewart, 2016). Em relação a aplicação em indústria de panificação, a *S. cerevisiae* é a espécie de fermento mais comum, usada desde o século 19 (Heitman *et al.*, 2018). Além disso, é utilizada também na indústria de bioetanol, o qual é produzido a partir de fermentação de açúcares provenientes de diversas fontes, principalmente substratos ricos em sacarose, como cana-de-açúcar, beterraba, milho, arroz, trigo, etc (Mohd Azhar *et al.*, 2017).

Na biotecnologia moderna, esta levedura tem sido extensivamente aplicada a diversos fins devido a características vantajosas como: genética bem estabelecida, taxa de crescimento rápido, necessidade nutricional simples e são consideradas geralmente seguras (GRAS), status estabelecido pela *US Food & Drug Administration* (Yang e Blenner, 2020). Desta forma, diversas aplicações foram desenvolvidas visando a produção de proteínas heterólogas destinadas a indústria farmacêutica (Paddon e Keasling, 2014), biocombustíveis (Ryu e Karim, 2011; Liu *et al.*, 2016), vacinas baseadas em leveduras (Shibasaki e Ueda, 2016; Lei *et al.*, 2020; Cen *et al.*, 2020), triagem de anticorpos (Mathew *et al.*, 2018) entre outros usos (Grzeschik *et al.*, 2017; Jemli *et al.*, 2016).

3.2 *S. cerevisiae* COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante em 1972, novas possibilidades para produzir proteínas em sistemas heterólogos vem sendo desenvolvidas ao longo dos anos, com o objetivo de obter maiores rendimentos na produção de proteínas heterólogas. Atualmente, vários sistemas de expressão de

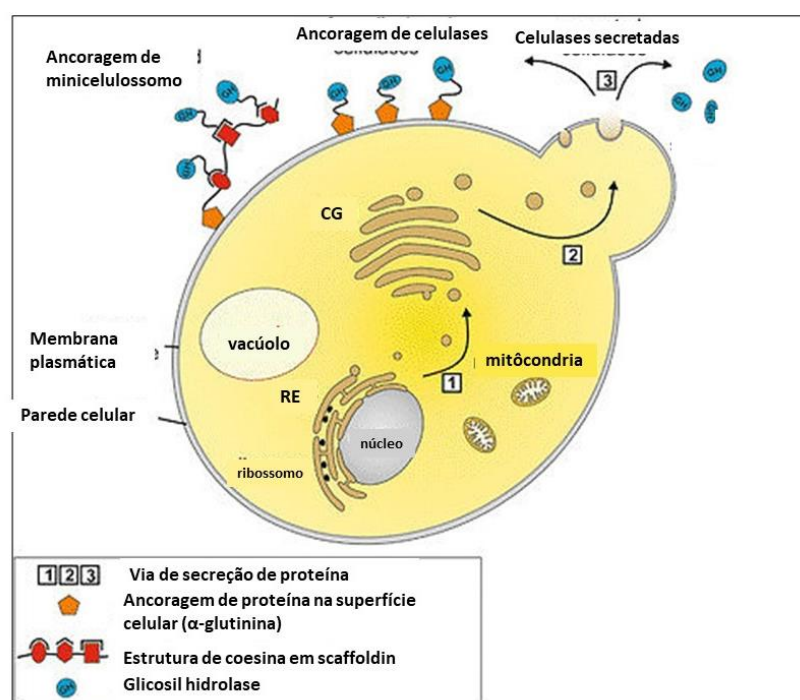
levedura são utilizados para produzir proteínas recombinantes, com maior ênfase nas aplicações industriais e médicas (Nicaud *et al.*, 2002; Celik e Calik, 2012; Ergun *et al.*, 2019). A praticidade no uso de levedura se dá pelo fato de, além das características já mencionadas, possuir a capacidade de modificações pós-traducionais eucarióticas e a disponibilidade de ferramentas para manipulações genéticas (Baghban *et al.*, 2019). Assim, *S. cerevisiae* tem sido estabelecida como uma das espécies de levedura mais bem caracterizadas e o hospedeiro mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes (Thak *et al.*, 2020). Devido a seu status de organismo modelo e uso na indústria para a produção de proteína recombinante, muitos estudos têm se dedicado à biologia molecular da secreção de proteínas heterólogas buscando compreender a trajetória desde a expressão gênica à secreção das proteínas (Hou *et al.*, 2012).

Em relação a secreção de proteínas, várias etapas são necessárias e centenas de proteína estão envolvidas neste processo. Em *S. cerevisiae*, as funções essenciais de secreção, incluindo translocação através da membrana do retículo endoplasmático, glicosilação, processamento e controle de qualidade, são semelhantes aos encontrados em eucariotos superiores (Delic *et al.*, 2013) (Figura 1). Os processos de modificações pós traducionais são importantes, pois resulta na estrutura tridimensional da proteína recombinante. Exemplos de modificações pós traducionais consistem na adição reversível de um grupo químico como fosfato, carboidratos em glicosilação e polipeptídeos em ubiquitinação (Prabakaran *et al.*, 2012). Essas modificações estão frequentemente relacionadas à atividade da proteína recombinante e seu deslocamento no interior da célula. Em leveduras, a glicosilação é um dos principais desafios na produção de proteínas recombinantes em leveduras. Como aproximadamente 60% das proteínas recombinantes aprovadas para uso terapêutico são glicoproteínas, é fundamental que haja um padrão de glicosilação adequado quando se utiliza leveduras como hospedeiros (Lagassé *et al.*, 2017). Outra etapa importante é o direcionamento do processamento da proteína através das champeronas, esta é uma etapa fundamental no processo de maturação da proteína, uma vez que o processamento incorreto leva ao seu acúmulo no retículo endoplasmático e, portanto, reduz a quantidade de proteína secretada (Gasser *et al.*, 2008).

Portanto, as leveduras são hospedeiros microbianos preferidos para a produção de proteínas recombinantes, principalmente se tratando de proteínas que se originam de eucariotos superiores (Yoo *et al.*, 2019). Além disso, a secreção de

proteínas recombinantes pelas células de leveduras simplifica o processo de purificação, oferecendo uma vantagem para produção industrial em grande escala. Os biofármacos, por exemplo, são proteínas recombinantes obtidas por processos biotecnológicos e o uso de tecnologias mais avançadas, vem contribuindo para o crescimento e surgimento de novas proteínas no mercado (Thak *et al*, 2020). Na Tabela 1, por exemplo, estão elencadas as principais proteínas recombinantes produzidas em *S. cerevisiae* em uso terapêutico, demonstrando a larga aplicação desta levedura para a produção e biossíntese proteica.

Figura 1 - Célula de levedura mostrando as principais organelas envolvidas no processamento de proteínas recombinantes. As setas indicam a via secretora, no qual as proteínas são expressas no RE (retículo endoplasmático) (1) e secretadas através do complexo de Golgi (2) por meio de vesículas secretoras (3). As proteínas são secretadas para o exterior da célula ou ancoradas em superfície por meio de uma proteína âncora (como a α -glutininina). RE: retículo endoplasmático; CG: complexo de Golgi.



Fonte: Lambetz *et al.*, 2014, com modificações

Tabela 1 - Principiais biofármacos produzidos na levedura *S. cerevisiae* a partir da expressão de proteínas recombinantes.

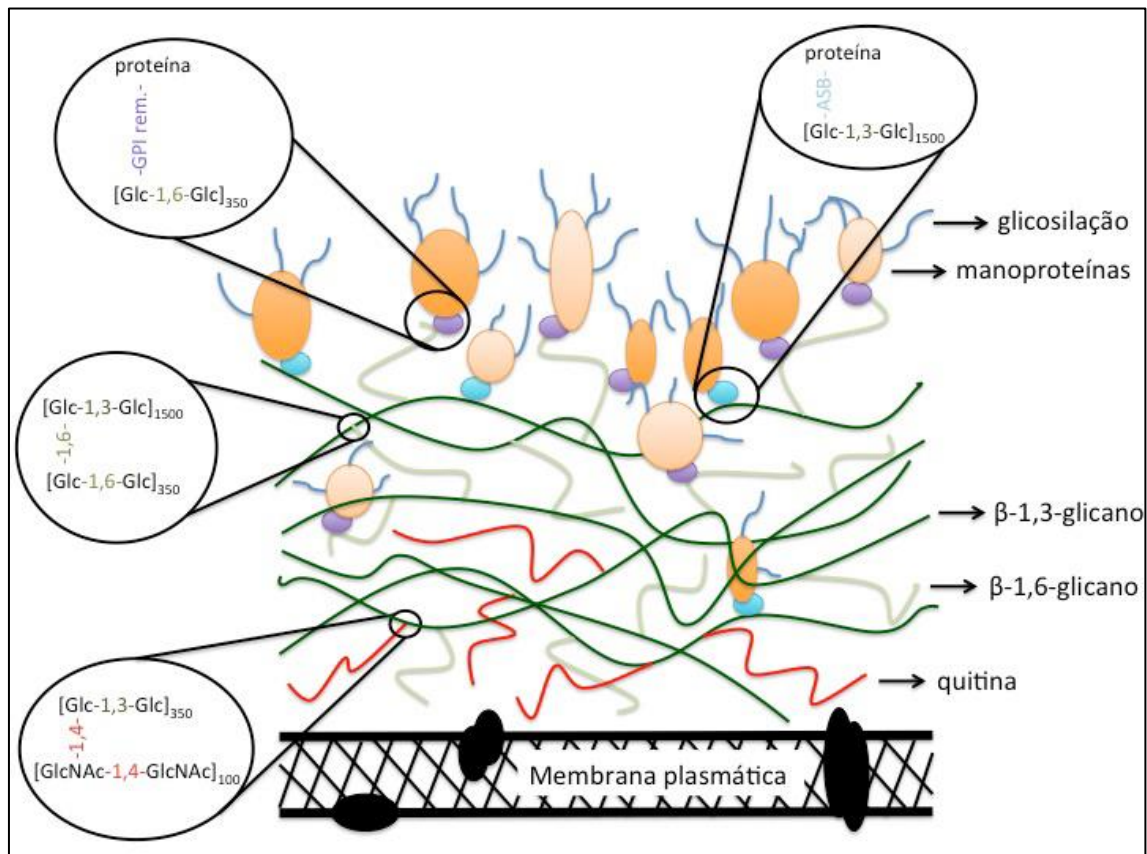
Proteína recombinante	Nome comercial	Uso clínico	Referência
Albumina	Recombumin	Para terapia em humanos	Bauer, 2014.
Proteína L1 (HPV 6, 11, 16, 18)	Gardasil	Vacina contra o vírus HPV	Bryan, 2007
Peptídeo de Glucagon	Victoza	Tratamento de diabetes mellitus	Zhang, <i>et al.</i> , 2016
Insulina	Humulin, Novolin, Protaphane	Tratamento de diabetes mellitus	Thim, <i>et al.</i> , 1986
Fator de crescimento derivado de plaquetas	Regranex	Tratamento de úlcera diabética	Wang, <i>et al.</i> , 2009.
Hormônio de paratireoide	Preos, Preotract	Tratamento de osteoporose e hipoparatireoidismo	Kang, <i>et al.</i> , 1998.
Somatropina	Valtropin	Tratamento de deficiência de hormônio de crescimento	Tomoko, <i>et al.</i> , 1985.
Fonte: Jozala <i>et al.</i> , 2016 (com modificações).			

3.3 COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR DE *S. cerevisiae* E CONSTITUIÇÃO DAS ÂNCORAS NATIVAS

Cerca de 30% do peso seco da célula de *S. cerevisiae* é devido a parede celular e esta é composta em grande parte por polissacarídeos (~85%) e proteínas (~15%) (Lesage e Bussey, 2006). A parede celular da levedura é composta de uma camada interna de glucanos e quitina, e uma camada externa de manoproteínas. A camada externa inclui as estruturas mais ramificadas compostas por β -1,6-glucano e manoproteínas solúveis (Van de Vaart *et al.*, 1995). A maioria das proteínas

incorporadas na parede externa se ligam covalentemente à β -1,6-glucano via glicosilfosfatidil inositol (GPI) pela região C-terminal rica em serina e treonina (Matsuoka *et al.*, 2014; Smits *et al.*, 1999) (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura da parede celular de *S. cerevisiae*. Glc: resíduo de glicose; GlcNAc: N-acetilglicosamina; GPI rem: remanescente da âncora GPI; ASB: ponte sensível a pH alcalino

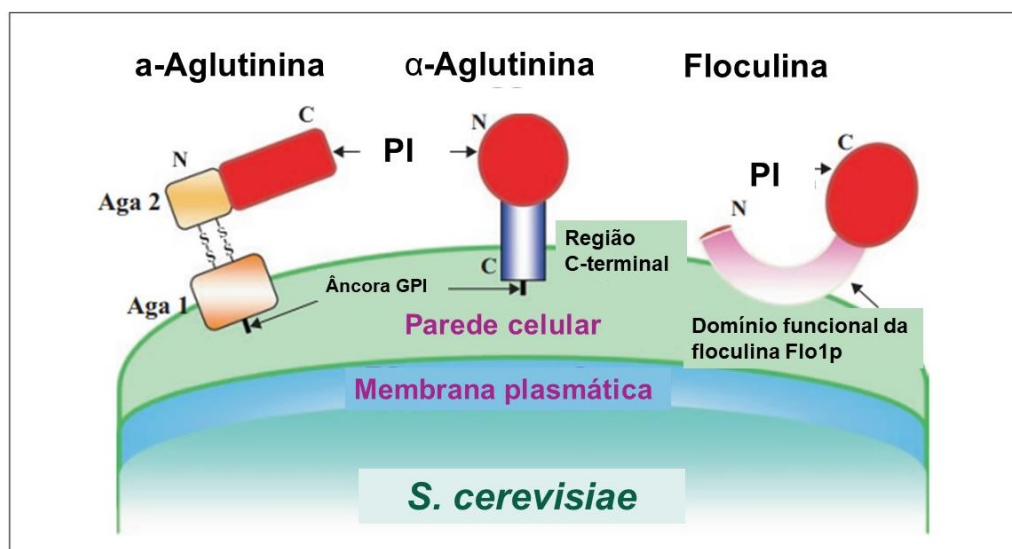


Fonte: Baptista, 2013

Entre as manoproteínas podemos destacar as aglutininas específicas de acasalamento que medeiam a adesão célula-célula e se apresentam por componentes menores da parede celular da levedura (Lipke e Kurjan, 1992). Células de leveduras contendo tipos de acasalamento "a" e "α" expressam a-aglutinina e α-aglutinina, respectivamente (Terrence, 1971; Cappellaro *et al.*, 1991). Tanto a α-aglutinina quanto o complexo a-aglutinina possuem uma região de sinal de secreção, rica em serina e treonina e um sinal de fixação de âncora de GPI (Cappellaro *et al.*, 1991; de Lesage e Bussey, 2006). A proteína Flo1p, é um outro exemplo de proteína da parede celular ancorada por GPI e está envolvida na floculação. Tanto a-aglutinina e Flo1p são âncoras nativas que podem ser utilizadas para ancoragens de proteínas heterólogas na sua porção N ou C terminal (Figura 3) (Boder e Wittrup, 1997; Wang

et al., 2005; Sato *et al.*, 2002).

Figura 3 - Representação dos três principais tipos de proteínas âncoras que podem ser utilizadas em sistemas de ancoragem de proteínas em *S. cerevisiae*. A-aglutinina representada pelo complexo de proteínas Aga1p e Aga2p ligadas por ponte dissulfeto, em vermelho a proteína fusionada na porção C-terminal da âncora, podendo estar também ancorada na porção N-terminal. O sistema α -aglutinina ligado na sua porção C-terminal na parede celular da levedura e, em vermelho a proteína fusionada na porção N-terminal. A proteína de flocculação Flo1p, podendo a proteína ser fusionada na porção N ou C-terminal, em vermelho a proteína está fusionada na porção C-terminal. PI: proteína de interesse.



Fonte: Ueda, 2016, com modificações.

Outras proteínas de parede celular ancoradas por GPI (Cwp1p, Cwp2p, Tip1, Sed1, YCR89w e Tir1p) tem potencial de atuar como domínios de ancoragem à parede celular, porém são utilizadas em menor frequência devido ao desempenho bem-sucedido de sistemas baseados em aglutininas (Van der Vaart *et al.*, 1995).

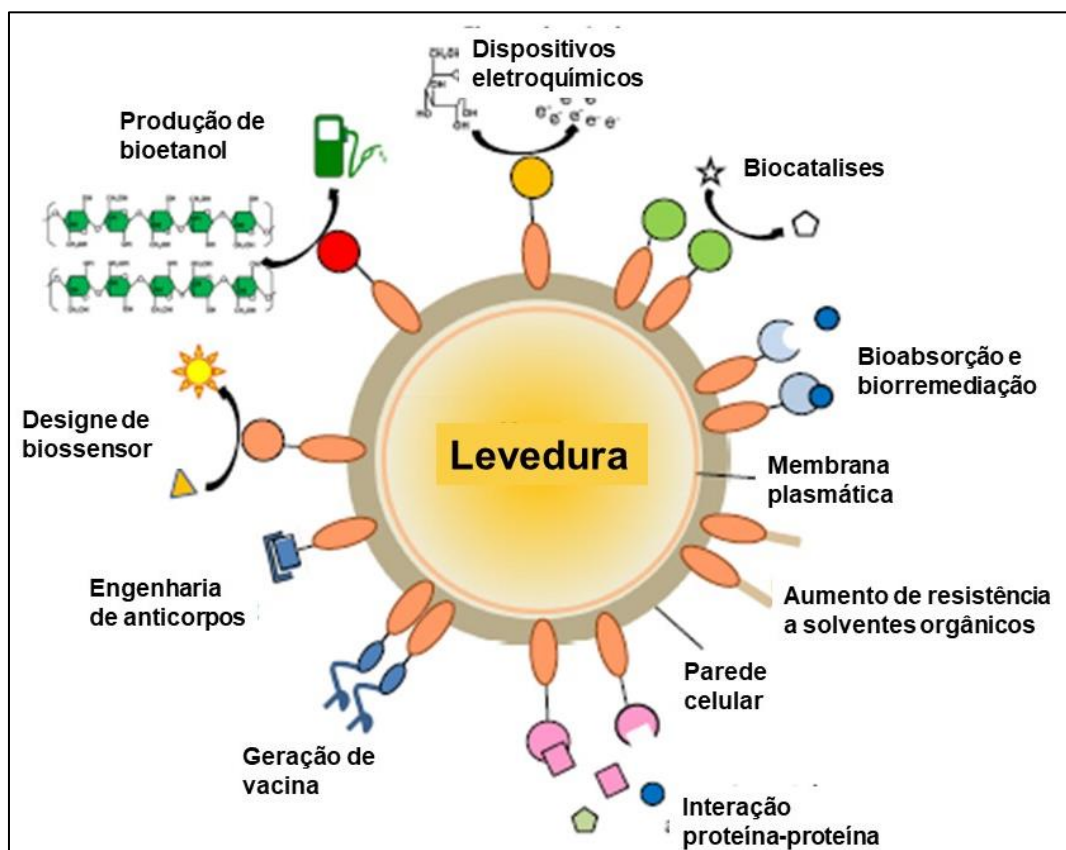
3.4 ANCORAGEM DE PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE *S. cerevisiae* COMO ESTRATÉGIA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS.

A tecnologia de ancoragem em superfície foi descrita pela primeira vez como ancoragem de pequenas proteínas por fusão com a proteína do capsídeo de fago, num trabalho realizado por Smith (1985). A partir de então, várias outras abordagens de ancoragem microbiana de proteínas heterólogas foram surgindo (Ueda, 2016). Esta estratégia tem uma ampla aplicação, incluindo: seleção de proteínas (Gera *et al.*, 2013), produção de anticorpos (Grzeschik *et al.*, 2017), ancoragem de enzimas para biocatálise (Jemli *et al.*, 2016; Schüürmann *et al.*, 2014; Ryu e Karim, 2011),

bioadsorção (Shibasaki e Ueda, 2014), biorrefinaria para produção de etanol de segunda geração (Liu *et al.*, 2016) e produção de vacinas e imunorreagentes (Lei *et al.*, 2020; Cen *et al.*, 2020; Mathew *et al.*, 2018) (Figura 4). Dentre os microrganismos hospedeiros para utilização desta tecnologia, a levedura vem demonstrando ser mais atraente para o desenvolvimento de plataformas de ancoragem de proteínas na superfície celular, pois possui características como:

- I) Tamanho celular grande, o que permite a ancoragem de um número maior de proteínas heterólogas.
- II) A segurança biológica da levedura (*status GRAS*) que permite o uso em indústrias de alimentos, medicamentos e para uso vacinal.
- III) Processamento pós-traducional da proteína a ser secretada, incluindo glicosilação e ligações dissulfeto, permitindo um processamento mais próximo de organismos superiores.
- IV) Características fisiológicas da levedura bem estabelecidas e fácil cultivo, permitindo o crescimento em altas densidades celulares.

Figura 4 - Visão geral das aplicações de ancoragem de proteínas na superfície de levedura



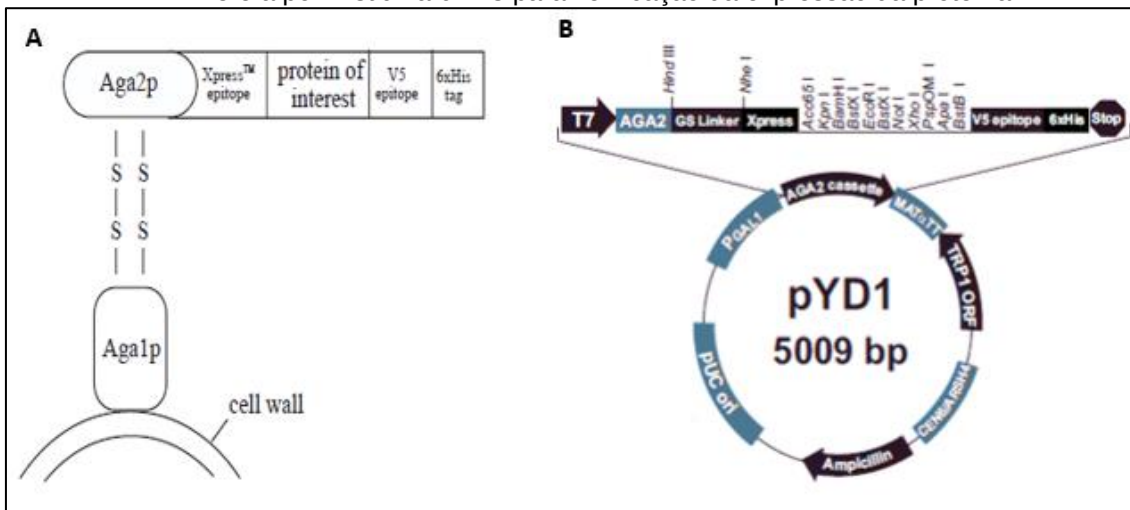
Fonte: Andreu e Olmo, 2018.

Além destas características, a levedura possui uma estrutura adequada para a ancoragem de proteínas, pois possui uma parede celular rígida de cerca de 200 nm de espessura, possui bicamada externa composta de manoproteínas e um esqueleto interno de glicanos (Kondo e Ueda, 2004). O sistema de ancoragem de proteínas possui três principais características (Smith *et al.*, 2015):

- a) Um peptídeo sinal que tem como função dirigir a proteína de interesse à proteína âncora;
- b) Uma proteína âncora de superfície na qual será conjugada a proteína de interesse e, assim ancorar de forma estável na superfície celular;
- c) Uma ou mais *tags* de detecção para a verificação da correta ancoragem.

As proteínas âncoras ligadas por GPI são amplamente utilizadas em sistemas de ancoragem em superfície celular de levedura, dentre as quais a α -Aglutina é a mais utilizada, tendo sido aplicada ao sistema de ancoragem composto pelo vetor pYD1 e pela linhagem hospedeira *S. cerevisiae* EBY100, desenvolvido por Boder e Wittrup (1997). A linhagem EBY100 foi geneticamente modificada para promover a substituição da região promotora do gene AGA1, pelo promotor pGAL1, tornando sua expressão indutível por galactose. O vetor pYD1 (Figura 5B) contém o gene AGA2, também sob controle do promotor pGAL1 e, a fusão do gene de interesse a esta sequência, permite a secreção e ancoragem da proteína de interesse (PI) na porção externa da parede da levedura. Quando a linhagem EBY100, transformada com o vetor pYD1 recombinante contendo o gene de interesse, é incubada em meio contendo galactose, as proteínas Aga1p e a fusão Aga2p-PI são expressas, secretadas e ancoradas simultaneamente. Como resultado, a fusão Aga2p-PI se liga à proteína Aga1p por pontes dissulfeto e, portanto, resulta em sua ancoragem na superfície celular (Figura 5A). O gene TRP1 (envolvido no metabolismo do aminoácido triptofano) contido no vetor é usado como marcador seletivo nutricional para complementar a auxotrofia da linhagem EBY100 (Li *et al.*, 2014). Além disso o vetor possui *tags* (*X-Press*, V5 e 6xHis) que estarão fusionadas na PI e, dependendo da estratégia de clonagem, podem ser utilizadas para verificar a ancoragem da proteína com o uso de anticorpos que se ligam de forma específica a estes marcadores.

Figura 5 - Sistema EBY100/pYD1. A) Ancoragem de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae* utilizando o vetor pYD1 (Invitrogen, 2012). B) Esquema do vetor pYD1 contendo as principais regiões para modificação e clonagem da proteína de interesse. O cassete AGA2 contém os sítios de restrições, no qual pode ser inserido o gene de interesse. Também possui as tags Xpress, o epítipo V5 e a poli-histidina 6xHis para verificação da expressão da proteína.



Fonte: Invitrogen, 2012

A Tabela 2 exemplifica as principais aplicações desta plataforma e demonstra como este sistema tem sido utilizado para ancorar diferentes tipos de proteínas com aplicabilidade em várias áreas da biotecnologia, incluindo a produção de imunorreagentes.

Tabela 2 - Aplicações mais recentes do sistema EBY/pYD1 no desenvolvimento de estratégias em diversos ramos biotecnológicos.

Aplicação biotecnológica	Proteína ancorada	Referência
Biocontrole de doença do tomate por <i>Botrytis cinera</i>	Flagelina	Zhao <i>et al.</i> , 2020.
Vacina oral de peixes carpas contra o herpes vírus (KHVD)	CyHV-3 (subunidade da proteína de envelope pORF65)	Ma <i>et al.</i> , 2020.
Antimicrobiano contra <i>Staphylococcus aureus</i>	Endolisina (LysSA11)	Chun <i>et al.</i> , 2020.
Triagem de epítipo para uso terapêutico	Peptídeo de insulina	Jeong <i>et al.</i> , 2019
Vacina oral da influenza H5N1 em galinhas	Hemaglutinina A (HA)	Lei <i>et al.</i> , 2016.
Desenvolvimento de imunógeno para HIV	Env (gp120 e gp140)	Mathew <i>et al.</i> , 2018
Minicelulossoma projetado para fermentação de bioetanol	Co-expressão de monooxigenase e celobiase desidrogenase	Tian <i>et al.</i> , 2019

Fonte: a autora, 2022

3.5 USO DA ANCORAGEM NA SUPERFÍCIE DE LEVEDURA PARA A TRIAGEM DE ANTICORPOS E NA PRODUÇÃO DE VACINAS

Os epítomos (pequenas porções de proteínas que geram respostas imunológicas) estão sendo cada vez mais usados em diversas aplicações terapêuticas, diagnósticos, triagem de bibliotecas e na triagem sorológica (Koutsopoulos, 2017). Suas principais características são: (I) tamanho pequeno (2-50 aminoácidos de comprimento), (II) podem ser sintetizados quimicamente, (III) facilmente modificados, (IV) baixa toxicidade e alta antigenicidade (Linciano *et al.*, 2019). Vários métodos para identificação de epítomos já foram realizados como, por exemplo a varredura de fragmentos peptídicos expostos a anticorpos (Geysen *et al.*, 1984) ou expressão de bibliotecas de peptídeos em bacteriófago (Petersen *et al.*, 1999), *E. coli* (Christmann *et al.*, 2001) e *S. cerevisiae* (Chao *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 2007). No entanto, esses métodos requerem passos de extração e purificação que são bastante laboriosos. Uma abordagem alternativa envolve ancorar na superfície da levedura uma biblioteca de epítomos candidatos a serem testados como vacina e, assim, servir como triagem para identificação de anticorpos específicos (Boder e Wittrup, 1997; Chao *et al.*, 2006; Mathew *et al.*, 2018; Mata-Fink *et al.*, 2013).

Uma das aplicações do sistema de ancoragem para apresentação de peptídeos está na identificação sorológica de anticorpos a partir de proteínas recombinantes, este método está sendo muito utilizado em doenças tumorais e, levou a identificação de novos antígenos marcadores de cânceres tumorais (Li *et al.*, 2004). Trabalhos recentes também mostraram o ágil mapeamento de epítomos para anticorpos contra o HIV (gp-120), mostrando que a plataforma baseada em levedura permitiu a triagem rápida de imunógenos e análises de amostras de soro (Mata-Fink *et al.*, 2013; Mathew *et al.*, 2018). Além de aplicação no desenvolvimento de imunoreagente na detecção do vírus da Dengue (Farokhainejad *et al.*, 2021).

Muitas proteínas heterólogas, incluindo a primeira vacina recombinante comercializada, a vacina contra a hepatite B, foram produzidas em *S. cerevisiae*, (Valenzuela *et al.*, 1982). Muitos trabalhos recentes têm demonstrado que a ancoragem de proteínas em levedura está sendo usadas como vacina profilática. Por exemplo, uma vacina oral contra candidíase foi produzida usando sistema de ancoragem de proteína em *S. cerevisiae* (Shibasaki e Ueda, 2016) e, cerca de 60%

dos camundongos testados foram protegidos contra a candidíase. Em outro caso, a proteína E2 do envelope do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) ancorada na superfície celular de *S. cerevisiae* foi capaz de estimular a produção de CXCL-8 ou interleucina 8 (principal mediador da resposta imune inata) em macrófagos. O mesmo estudo também mostrou que a própria levedura foi importante na estimulação de células T, resultando na produção de anticorpos (Patterson *et al.*, 2012).

Estudos que utilizaram o sistema EBY100/pYD5 demonstraram que a vacinação oral em camundongos na ausência de adjuvantes químicos, provoca uma resposta imune humoral e celular significativa contra o vírus H7N9, sendo capaz de fornecer proteção imunológica contra o vírus, dando suporte ao desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes contra o vírus da influenza aviária (Lei *et al.*, 2020). Estudo ainda mais recente demonstrou o uso do sistema de expressão e ancoragem de EBY100/pYD1 para o desenvolvimento de uma vacina oral contra *Helicobacter pylori*. Os camundongos que receberam administração via oral produziram respostas IgG e IgA (anticorpos necessários para resposta imune eficaz) significativas e reduziram a carga de bactéria no animal (Cen *et al.*, 2020).

Outros estudos, como demonstrado na Tabela 3, exemplificam os avanços acerca da utilização da levedura *S. cerevisiae* como hospedeira para expressão de proteínas heterólogas utilizando diferentes tipos de estratégias de expressão na produção de vacinas.

Tabela 3 - Aplicação do sistema de expressão de proteínas recombinantes em *S. cerevisiae* para produção de vacinas

Doença/Agente causador	Antígeno/ imunógeno	Estratégia de expressão	Referência
Papilomavirus humano	HPV16 oncoproteína E7	– Partícula viral	Pumpens <i>et al.</i> , 2002
Papilomavirus humano	HPV16 proteína L1	– Proteína purificada	Park <i>et al.</i> , 2008
Hepatite B	Antígenos HBV, superfície (S) e Core.	– Levedura recombinante inteira	King <i>et al.</i> , 2014
Hepatite C	Proteína fusionada – NS3-Core	Levedura recombinante inteira	Haller <i>et al.</i> , 2007
Vírus da encefalite japonesa	Proteína envelope	do Ancoragem de proteína (YSD)	Upadhyaya e Manjunath, 2009

Vírus da Dengue	Domínio III do envelope vírus	Proteína purificada	Nguyen <i>et al.</i> , 2013
HIV-1/AIDS	Envelope de HIV-1 (Env) – glicoproteína	Ancoragem de proteína (YSD)	Wang <i>et al.</i> , 2018a
<i>P. falciparum</i> /Malária	Falc2.3, p195A, SERAI, Pfs25	Proteína purificada	Bathust <i>et al.</i> , 1993
<i>T. gondii</i> /Toxoplasmose	Proteína 16 – Micronema	Ancoragem de proteína (YSD)	Wang <i>et al.</i> , 2018b
<i>A. Pleuropneumoniae</i> /Pleuropneumonia	ApxIA	Levedura recombinante inteira (aplicação oral)	Shin <i>et al.</i> , 2003
Câncer de Testículo/Melanoma	Antígeno ESO-1	NY- Ancoragem de proteínas (YSD) – em fase clínica I para vacina	Mischo <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Kumar e Kumar, 2019

3.6 MÉTODOS PARA A VERIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ANCORAGEM DE PROTEÍNAS EM LEVEDURAS

Os ensaios para avaliação da ancoragem de proteínas podem ser qualitativos, demonstrado a presença ou ausência da proteína ancorada e comprovando sua funcionalidade, ou quantitativos, capazes de determinar a quantidade de proteína ancorada por célula. Ambos os métodos são importantes na investigação e análise da ancoragem proteica. Abaixo estão alguns métodos usados na verificação e quantificação de proteínas ancoradas em levedura e suas principais aplicações mais recentes.

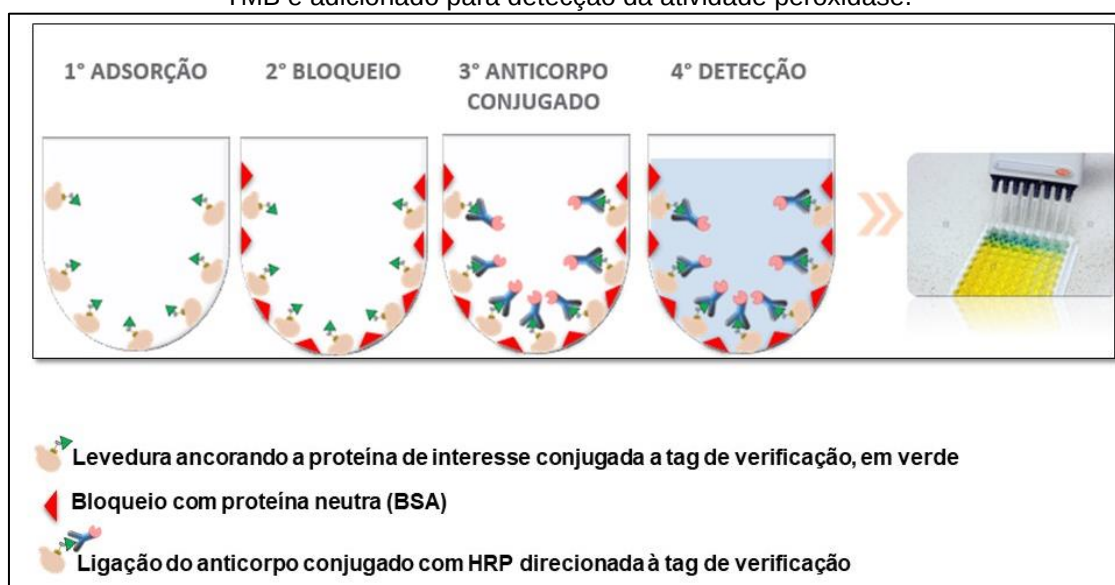
3.6.1 Yeast-ELISA

Os ensaios de yeast-ELISA são baseados na técnica de ELISA (*Enzyme-Liked Immunosorbent Assay*) ou ensaio de imunoabsorção enzimática. A análise é obtida medindo a atividade de um marcador (enzima peroxidase, por exemplo) que estará conjugada ao anticorpo que se liga de forma específica à proteína ou peptídeo a ser analisado. A atividade deste marcador enzimático é detectada através da síntese de um composto colorimétrico mensurável a partir de um substrato específico (Darwich, 2006). Os métodos de imunoensaio têm sido bastante utilizados em muitas áreas importantes como: análises farmacêuticas, no diagnóstico de doenças, na

triagem de anticorpos e em estudos clínicos.

O *yeast-ELISA*, por sua vez, é uma adaptação desta técnica, na qual a levedura contendo as proteínas de interesse ancorada na superfície, são diretamente adsorvidas em placas de polietileno de 96 poços ou em microtubos (*ependorf*). Para os ensaios em placas de ELISA, a levedura recombinante contendo a proteína de interesse ancorada na superfície, são incubadas nos poços e, após o bloqueio (adição de uma proteína neutra), são inseridos os anticorpos para detecção de um marcador conjugado à proteína, por exemplo uma *tag* 6xHis ou direcionado diretamente à proteína de interesse. O procedimento de detecção pode ser realizado por dois modos: direta, quando o anticorpo primário já está conjugado com a enzima peroxidase ou indireta, quando o anticorpo primário se liga primeiramente e depois é necessário a adição de um segundo anticorpo e este conterá a enzima para detecção colorimétrica. Após as incubações dos anticorpos, o substrato colorimétrico é adicionado e, após a reação, a coloração produzida pode ser mensurada através de espectrofotometria (Figura 6).

Figura 6 - Etapas do ensaio de *yeast-ELISA* direto utilizando um anticorpo conjugado com a enzima peroxidase. 1° etapa: adsorção das células recombinantes; 2° etapa: bloqueio utilizando uma proteína neutra – é colocado no poço para se ligar nas regiões que não foram preenchidas pela levedura; 3° etapa: incubação do anticorpo conjugado com peroxidase; 4° etapa: detecção: substrato cromógeno TMB é adicionado para detecção da atividade peroxidase.



Fonte: Rocha (2021), com modificações.

O *yeast-ELISA* é um método desenvolvido para que a levedura ancorando a proteína em sua superfície possa ser aplicada diretamente na detecção do anticorpo ao invés da proteína solúvel, diminuindo o tempo e o custo na obtenção das proteínas,

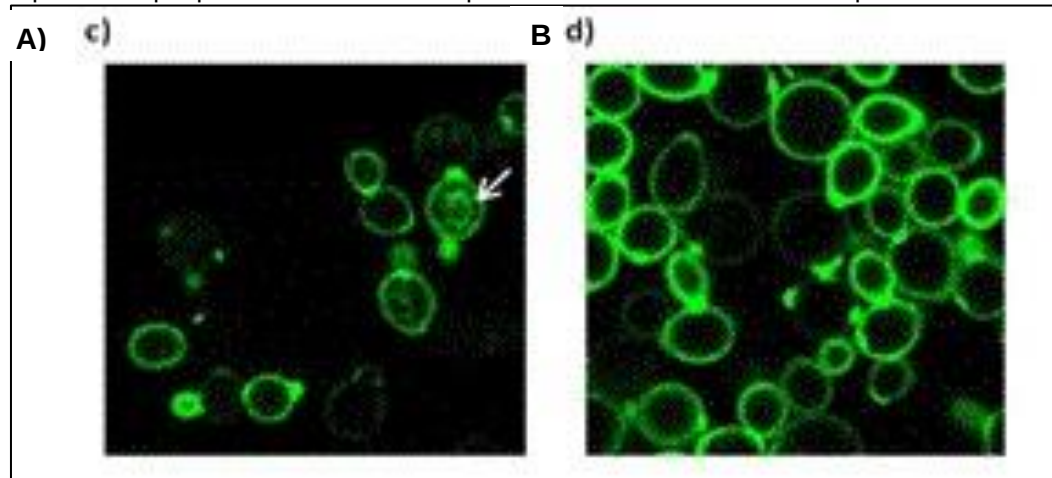
pois estas já estão disponíveis na superfície da levedura. Apesar de ser um método de análise bastante promissor, poucos relatos na literatura ainda são encontrados. No entanto, nos trabalhos que utilizaram esta metodologia, foram observadas razões de até três vezes no sinal detectado entre uma levedura recombinante, ancorando uma proteína de interesse, e uma levedura selvagem (levedura não transformada, não contendo a proteína de interesse), demonstrando que este ensaio consegue mensurar com precisão a presença de proteínas recombinantes, e, portanto, pode ser utilizado para fins de diagnóstico e/ou triagem sorológica (Ananphongmanee *et al.*, 2015; Karbanowicz *et al.*, 2017).

3.6.2 Citometria de Fluxo e Microscopia de Fluorescência

Seleção de células marcadas por fluorescência (FACS, *Fluoresce-activated cell sorting*) em combinação com ancoragem de proteínas em superfície de leveduras tornou-se uma das ferramentas mais utilizadas para uma série de métodos de análises para verificação da ancoragem de proteínas recombinantes. Uma das principais características do uso da técnica de FACS está na sensibilidade da técnica e na possibilidade de quantificação de células marcadas através do uso de anticorpo conjugado a um fluoróforo numa população amostral (Weaver-Feldhaus *et al.*, 2004). Geralmente os dados apresentados em artigos que usam a técnica de citometria como método para a verificação de ancoragem, mostram duas populações distintas, sendo uma a população de células não marcadas, não contendo a proteína ancorada, e a outra como células marcadas, indicando a correta ancoragem das proteínas de interesse.

Assim como o FACS, a microscopia de imunofluorescência também permite a marcação de proteínas específicas através de anticorpos conjugados a fluoróforos, indicando a localização exata da ancoragem da proteína de interesse, por exemplo, se a proteína de fato está na parede celular da levedura ou se existe algum problema no transporte e ancoragem. Estudo recente visando otimizar ancoragem de proteínas através de modificações genéticas de plasmídeos, demonstrou que algumas proteínas permaneciam no interior das células, ou seja, não conseguiam ser transportadas para a parede celular da levedura, porém após as modificações genéticas, conseguiram aumentar a eficiência de transporte destas proteínas para a parede celular (Zahradnik *et al.*, 2021) (Figura 7).

Figura 7 - Imagens de microscopia de fluorescência de *S. cerevisiae* demonstrando a localização de ancoragem da proteína marcada. (A) imagem mostrando que algumas proteínas não conseguem se deslocar para a parede celular da levedura (seta mostrando). (B) Após as modificações, é possível perceber que praticamente todas as proteínas estão ancoradas na superfície celular.



Fonte: Zahradnik et al, 2021

3.7 SISTEMAS DE MODIFICAÇÃO GENÉTICA EM *S. cerevisiae*

A produção de proteínas recombinantes em *S. cerevisiae* pode ser feita usando vetores plasmidiais ou por integração cromossômica de cassete de expressão. Em relação ao uso de plasmídeos episomais, estes são reconhecidos como vetores auto-replicáveis e podem apresentar um alto número de cópias por célula, e dependem de uma origem de replicação autônoma oriunda de um vetor nativo da levedura, 2 microns (2µm) (Gelissen e Hollenberg, 1997). A necessidade do uso de marcadores auxotróficos nas linhagens mais comumente utilizadas podem conferir uma desvantagem de seu uso devido à instabilidade da permanência do plasmídeo ao longo das gerações, bem como o uso em larga escala, pois requer meios selecionáveis para evitar a perda plasmidial.

Em relação à estratégia de modificação genética por integração genômica de cassetes de expressão, esta deve conter: (i) extremidades contendo regiões de homologia com o genoma da levedura, a fim de permitir a inserção do cassete em locus desejável por recombinação homóloga; (ii) uma região promotora; (iii) o gene de interesse; (iv) um gene marcador permitindo a seleção das células transformantes (Fraczek et al., 2018). No entanto, há limitações associadas à própria montagem do(s) cassete(s) de expressão, a qual geralmente requer inúmeras etapas de digestão/ligação, e pode ser inviabilizada por uma incompatibilidade entre as sequências dos fragmentos e os sítios de clonagem disponíveis nos plasmídeos. A complexidade da montagem do cassete pode ainda aumentar se for necessário incluir

pequenas sequências homólogas flanqueando o gene marcador, a fim de permitir sua posterior excisão do genoma e sua reutilização em uma nova transformação da mesma linhagem, a exemplo do sistema Cre-LoxP (Carter e Delneri, 2010; Guldener *et al.*, 1996).

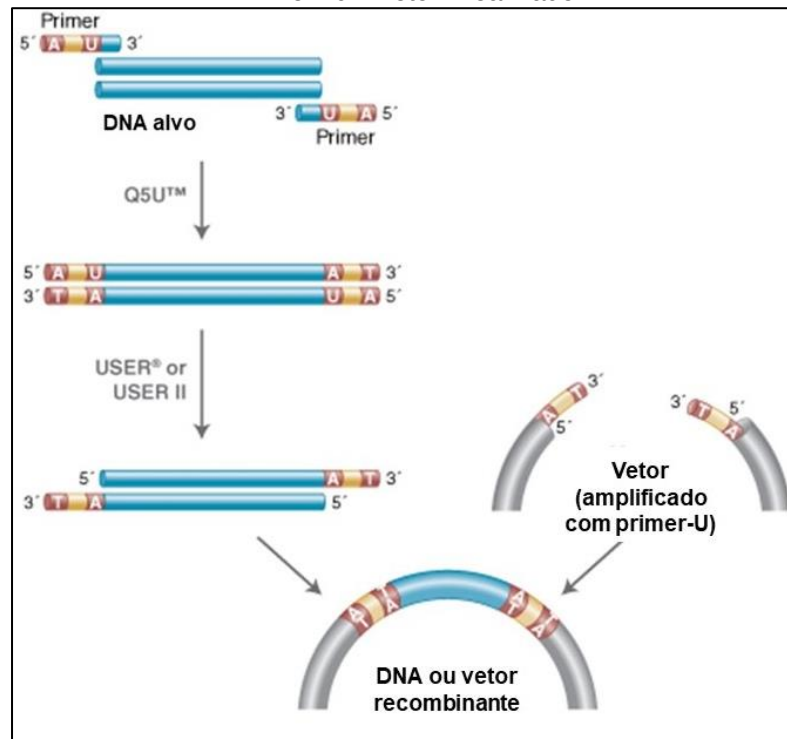
A grande maioria das ferramentas de biologia sintética de leveduras foram desenvolvidas em *S. cerevisiae* devido ao seu genoma bem estabelecido, e facilidade geral de uso (Wagner e Alper, 2016). A primeira modificação de DNA desenvolvida e ainda a mais utilizada baseia-se no uso de enzimas de restrição e DNA ligase, que corresponde a técnica de clonagem convencional. Embora possa ser demorado e tecnicamente desafiadora a depender do tamanho do fragmento de DNA a ser clonado, é uma técnica ainda empregada em muitos laboratórios (Vieira Gomes, 2018).

Neste sentido, novas estratégias de engenharia genética têm sido propostas para facilitar e acelerar a construção de linhagens geneticamente modificadas de *S. cerevisiae* (Apel *et al.*, 2017; Fraczek *et al.*, 2018). Dentre estas, destacam-se tecnologias de fusão, como por exemplo a que se denomina *USER-fusion* e o sistema CRISPR-Cas9.

- *USER-fusion*

Essa técnica simplifica grandemente as construções, pois permite realizar numa única etapa a fusão de múltiplos fragmentos de DNA gerados por PCR e sua posterior ligação a um vetor de expressão sem a utilização de enzimas de restrição e DNA ligases. Além de simplificar as montagens, a técnica amplia a aplicabilidade dos sistemas de modificação genética, pois evita quaisquer limitações quanto à disponibilidade de sítios de clonagem nos vetores e/ou eventuais incompatibilidades entre os vetores e insertos. Apesar de publicada desde 2007, apenas nos últimos anos a estratégia *USER-fusion* conquistou seu espaço entre as ferramentas promissoras para a engenharia genética. Uma grande vantagem é o baixo custo dos insumos de biologia molecular necessários para sua utilização (Unger *et al.*, 2010) (Figura 8).

Figura 8 - Método de engenharia de DNA USER-Phusion. As moléculas de DNA alvo e o vetor de clonagem são amplificados por PCR utilizando primers contendo um resíduo de Uracila. Após tratamento com o reagente USER, cria-se uma lacuna de nucleotídeo em cada extremidade, resultando extremidades coesivas que permitem a montagem direta e direcional de moléculas de DNA em um vetor linearizado.



Fonte: New England Biolabs – disponível em: <https://international.neb.com/products/m0515-q5u-hot-start-high-fidelity-dna-polymerase#Product%20Information>.

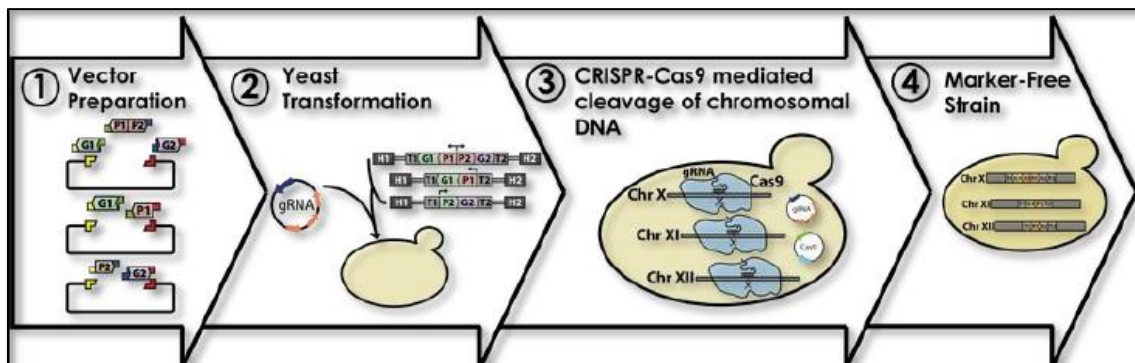
- Integração cromossômica por CRISPR-Cas9

O sistema de transformação *EasyClone*, desenvolvido por Jensen et al. (2014) facilitou a construção de linhagens com múltiplas modificações, ao permitir a integração gênica em onze diferentes regiões-alvo previamente validadas, distribuídas por todo o genoma de *S. cerevisiae*. Sistemas como o recentemente desenvolvido por Apel et al. (2017) acrescentaram outras vinte regiões identificadas como seguras para integração. O sistema *EasyClone* também utiliza a tecnologia *USER-fusion* para a montagem dos cassetes, e recentemente foi disponibilizada uma nova versão, denominada *EasyClone-MarkerFree*, que utiliza o sistema *CRISPR-Cas9* para realizar a inserção dos cassetes de integração nas mesmas regiões-alvo validadas anteriormente, com a vantagem de dispensar a utilização de genes marcadores (Jessop-Fabre et al., 2016). Segundo os autores, o sistema permite a integração de até seis genes numa única etapa, mediante a co-transformação das células com três cassetes de integração distintos, cada um deles contendo dois genes associados a

um promotor bidirecional (Figura 9).

Figura 9 - Método EasyClone-MarkerFree. Os genes e promotores (biobricks) são gerados por amplificação utilizando primers contendo resíduo uracil. 1) Os Biobricks são utilizados para a montagem dos vetores de integração via clonagem USER. (2) Os cassetes de integração são obtidos por digestão enzimática e utilizados para transformar células de *S. cerevisiae* que, expressando Cas9, juntamente com o vetor de gRNA auxiliar, que causam quebras de fita dupla nos locais de integração designados (3). (4) As células de levedura são selecionadas em placas contendo geneticina (G418) e Sulfato de Estreptotricina (clonNAT). A integração correta é confirmada por PCR.

Os vetores gRNA e Cas9 podem ser eliminados por crescimento em meio não seletivo



Fonte: Jessop-Fabre et al., 2016

A utilização do sistema CRISPR-Cas9 para modificação genômica, possibilitou: deleções de genes, substituições gênicas, modificação de base única e até construção ou modificação de vias metabólicas em diferentes organismos eucariotos (Mao *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2013; Friedland *et al.*, 2013; Gratz *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2013; Komor *et al.*, 2016). A utilização desse sistema facilita e acelera o tempo requerido para desenvolver linhagens modificadas de *S. cerevisiae*.

O advento de tais sistemas pode facilitar grandemente a utilização da expressão heteróloga em *S. cerevisiae* para aplicações mais complexas, que exijam a construção de um grande número de linhagens recombinantes (para o screening de biomoléculas) ou que requeiram a co-expressão de vários genes heterólogos numa mesma célula recombinante (para a introdução de uma nova via metabólica, ou para a apresentação de vários epítomos na superfície celular).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra a construção de linhagens recombinantes de leveduras expressando proteínas virais utilizando o sistema de ancoragem à superfície celular. Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados no formato de dois artigos:

- 1) O primeiro manuscrito demonstra uma aplicação em diagnóstico baseada em ensaio de *yeast-ELISA* ancorando à superfície celular da levedura *S. cerevisiae* o *scaffold*-epítipo Top7-2F5 utilizando o sistema EBY100/pYD1.
- 2) O segundo manuscrito descreve, a partir de duas estratégias de expressão: epissomal e integrativa, a ancoragem da oncoproteína E6 de HPV baseada em ensaios de *yeast-ELISA*.

Além disso, os resultados deste trabalho constituem a reunião de um conjunto de ferramentas para a construção de linhagens recombinantes bem como de métodos para a análise de expressão e ancoragem de proteínas heterólogas em superfície celular de *S. cerevisiae*, podendo ser aplicado a diversas finalidades, além das exploradas no presente trabalho.

4.1 ARTIGO 1 - DETECÇÃO POR YEAST-ELISA DO SCAFFOLD-EPÍTOPO TOP7-2F5 ANCORADO NA SUPERFÍCIE CELULAR DA LEVEDURA

Resumo

A ancoragem de antígenos à superfície celular de levedura tem sido crescentemente utilizada para a detecção e seleção de anticorpos e para o desenvolvimento de estratégias vacinais. A utilização da região reconhecida por um anticorpo específico (epítipo) no desenvolvimento de imunorreagentes pode requerer o seu transplante em uma proteína aceptora (*scaffold*) a fim de assegurar a estabilização da sua conformação nativa para o reconhecimento pelo anticorpo específico. Visando uma aplicação em diagnóstico baseada em ensaio de *yeast*-ELISA, o *scaffold*-epítipo Top7-2F5 foi ancorado à superfície celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando o sistema EBY100/pYD1. A ancoragem da proteína quimérica na parede celular foi confirmada em microscopia de fluorescência utilizando anticorpo conjugado com FITC e dirigido à *tag* 6xHis fusionada à região C-terminal da proteína. O *scaffold*-epítipo ancorado foi eficazmente reconhecido pelo anticorpo específico anti-2F5 em ensaio de *yeast*-ELISA. Entretanto, resultados de ELISA realizados com uma proteína Top7-2F5 solúvel produzida em sistema procarioto apresentaram uma razão sinal/ruído mais favorável, o que pode ser devido à falta de padronização dos ensaios. O sistema apresentado neste estudo é promissor para acelerar a avaliação *in vivo* de antígenos do tipo *scaffold*-epítipo concebidos *in silico*.

1. Introdução

O uso de antígenos para a detecção de anticorpos específicos é uma das abordagens mais utilizadas no diagnóstico clínico. Para isso é necessário, em primeiro lugar, identificar um epítipo que seja reconhecido eficazmente pelo anticorpo contido no soro de um paciente e, então, estabelecer o uso desse epítipo como imunorreagente para fins de diagnóstico (Lei *et al.*, 2020). No caso do vírus da imunodeficiência humana – HIV, foram identificados epítipos reconhecidos por anticorpos capazes de neutralizar um grande número de linhagens virais, os quais além de servirem a estratégias vacinais, podem se mostrar úteis para fins de diagnóstico. Um desses epítipos é o 2F5, situado na região proximal à membrana do ectodomínio da proteína gp41 do envelope do vírus (Ofek *et al.*, 2004), cuja sequência

é bastante conservada (Muster *et al.*, 1993). O epítopo 2F5 está situado numa região conformacionalmente flexível da proteína gp41 e já se demonstrou que a sua utilização em estratégias vacinais ou para fins de diagnóstico é facilitada se a sequência for transplantada em uma proteína aceptora (*scaffold*), a fim de assegurar uma exposição adequada do epítopo na sua conformação nativa (Ofek *et al.*, 2010). Nessa direção, Vianna *et al.* (2013) projetaram computacionalmente uma proteína quimérica contendo o epítopo 2F5 enxertado no *scaffold* Top7, a qual se mostrou capaz de conferir ao epítopo maior estabilidade e reconhecimento específico pelo anticorpo monoclonal em ensaios de ELISA (Vianna *et al.*, 2013; Coêlho *et al.*, 2019).

O diagnóstico preciso é crucial não apenas para oferecer um tratamento adequado, mas também para permitir uma rápida resposta aos surtos com medidas de contenção da disseminação viral. Atualmente, a metodologia considerada como padrão-ouro para a detecção de doenças virais é o ensaio de imunoabsorção enzimática ou ELISA (Roberto e Yolken, 1980; Boonham *et al.*, 2014), o qual requer uma cuidadosa padronização de todas as etapas, desde a expressão e purificação do antígeno até o estabelecimento da quantidade que deve ser adsorvida na placa. A bactéria *Escherichia coli* é frequentemente utilizada para a expressão heteróloga de antígenos virais em grandes quantidades (Wetzel *et al.*, 2019; Marcekova *et al.*, 2009; Magalhães *et al.*, 2021; Quironga *et al.*, 2019). Porém, a produção de proteínas funcionais nesse hospedeiro pode ser difícil ou inviável, por necessitarem de modificações pós-traducionais não realizadas pela bactéria, como, por exemplo, as N- ou O-glicosilações envolvidas no reconhecimento de alguns anticorpos neutralizantes anti-HIV (Mathew *et al.*, 2018). Nesses casos, sistemas de expressão utilizando hospedeiros eucariotos podem se provar mais eficazes para a produção de antígenos virais (Ananphongmanee *et al.*, 2015; Mata-Fink *et al.*, 2013).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* emerge como um microrganismo unicelular eucarioto capaz de produzir proteínas heterólogas de forma eficaz e rápida (Xie *et al.*, 2018). Ela tem crescimento rápido, utiliza meios de cultivos baratos e é geneticamente bem descrita (Parapouli *et al.*, 2020). Outra vantagem desta levedura é a possibilidade de utilizar seus sistemas nativos de ancoragem de proteínas à parede celular para a ancoragem de proteínas heterólogas (Boder e Wittrup, 1997). Essa estratégia de ancoragem de proteínas recombinantes na superfície da levedura é conhecida como *Yeast Surface Display* (YSD) e tem sido amplamente utilizada, incluindo aplicações em biocatálise (Tang *et al.*, 2018), produção de vacinas (Lei *et*

al., 2020; Shibasaki *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2012; Cen *et al.*, 2020) e imunorreagentes (Mathew *et al.*, 2018; Blarcom *et al.*, 2018; Mata-Fink *et al.*, 2013) ou a obtenção de bibliotecas de epítomos virais visando a triagem de anticorpos (Zhu *et al.*, 2019; Mathew *et al.*, 2018). O sistema de expressão EBY100/pYD1, um dos mais utilizados para a ancoragem de proteínas heterólogas à parede celular da levedura, é baseado na âncora nativa da proteína α -aglutinina, constituída por duas subunidades, Aga1p e Aga2p. Nesse sistema, a proteína heteróloga é expressa em fusão com a região C-terminal da subunidade Aga2p, a qual se liga por pontes dissulfeto à proteína Aga1p. Desse modo, a proteína de interesse resulta ancorada externamente à parede celular da levedura (Boder e Wittrup, 1997).

Neste trabalho, utilizamos o sistema EBY100/pYD1 para ancorar a proteína quimérica Top7-2F5 na superfície celular de levedura a fim de avaliar sua funcionalidade em ensaio ELISA utilizando um anticorpo monoclonal anti-2F5.

2. Materiais e métodos

2.1 Linhagens, plasmídeo e meios de cultura

A linhagem DH5 α de *Escherichia coli* foi usada como hospedeira para amplificação *in vivo* dos plasmídeos recombinantes em meio LB acrescido de 100 μ g/ml de ampicilina. Para expressão e ancoragem das proteínas heterólogas em levedura, foi utilizada a linhagem EBY100 (*MATa ura3-52 trp1 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 pep4:HIS3 prb1 Δ 1.3R can1 GAL*) de *Saccharomyces cerevisiae*, obtida junto à American Type Culture Collection (ATCC® MYA-4941™). As células de EBY100 foram mantidas em meio YPD contendo 2% de ágar, quando necessário. A linhagem EBY100 juntamente com o vetor pYD1 compõem o sistema de expressão e ancoragem EBY100/pYD1 (Boder e Wintrup, 1997). No vetor pYD1, a expressão da proteína heteróloga fusionada a Aga2p está sob controle do promotor GAL1 indutível por galactose, sendo mantido na linhagem hospedeira EBY100 por supressão da auxotrofia para o triptofano. Os transformantes de EBY100 foram selecionados em placas com meio seletivo YNB w/o AA (Sigma-Y0626) suplementado com 60 μ g/ml de leucina.

2.2 Construção dos vetores e linhagens recombinantes

A sequência codificante para a proteína quimérica Top7-2F5 foi otimizada para expressão em levedura e sintetizada por um fornecedor comercial (*GeneScript*). No gene sintético, a sequência Top7-2F5 está ladeada por sítios de restrição *NheI* e

*Xho*I os quais foram utilizados para sua clonagem no vetor pYD1, originando o vetor recombinante pYD1/Top7-2F5. A correta construção do vetor foi confirmada por PCR de colônia, utilizando os primers de verificação descritos no manual do sistema EBY100/pYD1 (Invitrogen, 2002), e também por sequenciamento de DNA. A linhagem EBY100 foi transformada com o vetor pYD1/Top7-2F5 pelo método de acetato de lítio (Gietz e Woods, 2002).

2.3 Indução da expressão e ancoragem das proteínas heterólogas

Para a expressão e ancoragem da proteína, a linhagem recombinante e a linhagem hospedeira utilizada como controle negativo (EBY100) foram cultivadas em meio indutor contendo galactose. Para obter a biomassa utilizada no ensaio de indução, algumas colônias foram inicialmente crescidas em 10 ml de meio seletivo contendo glicose por 16 h, a 30°C. Em seguida, as células foram utilizadas para inocular 50 ml do mesmo meio contendo glicose de modo a se ter uma DO inicial de 0,3 e incubadas até atingir DO entre 3 a 5. Para a indução, as células foram centrifugadas a 3000 rpm em tubos de 15 ml, lavadas com solução NaCl 0,9%, ressuspensas em 100 ml de meio seletivo contendo 2% de galactose e incubadas a 20°C por 40 h. Após a indução, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão PBS de modo a se obter uma concentração de 10^9 células/ml. As suspensões assim obtidas foram utilizadas para os imunoenaios descritos a seguir. Nesses experimentos, células da linhagem hospedeira EBY100 foram utilizadas como controle negativo de expressão e ancoragem de proteínas.

2.4 Ensaio de yeast-ELISA

- Ensaio para confirmar a ancoragem da proteína

Para a confirmação da expressão e ancoragem da proteína de interesse na superfície celular, foram realizados ensaios de yeast-ELISA utilizando um anticorpo anti-His dirigido à região C-terminal da proteína (anti-His *mouse* HRP *conjugate* 200301382, Rockland USA). O ensaio foi realizado segundo Karbanowicz et al. (2017). Para a adsorção, 100 µl de uma suspensão contendo 10^8 células em tampão PBS (Ananphongmanee et al., 2015; Nakamura et al., 2001) foram incubados em placas de poliestireno de 96 poços (Corning-3690), *overnight* a 20°C numa rotação de 160 rpm. Os poços contendo as células adsorvidas foram lavados com 100 µl de

tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20 (ThermoFisher, cat: 003005) (PBS-T) por três vezes. Para o bloqueio, os poços foram preenchidos com 100 µl de PBS-T contendo 5% de BSA (albumina sérica bovina) e, após incubação por duas horas à temperatura ambiente, os poços foram novamente lavados com PBS-T três vezes. Os poços contendo as células foram incubados com 50 µL de uma diluição 1:1000 do anticorpo anti-His camundongo conjugado com peroxidase por uma hora e a seguir lavados três vezes com PBS-T. Para a detecção, 50 µL do substrato TMB (KPL-*Sure Blue Reserve*TM, *Sigma-Aldrich*, T0440, USA) foram adicionados aos poços e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos, quando a reação foi interrompida por adição de HCl 1 M. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Bio-Rad xMark, Hercules, California, USA) em 450 nm. Para o controle positivo da detecção, foram utilizados poços previamente incubados com 100 µL de uma solução da proteína Top7 purificada, numa concentração de 0,02 ng/µl. Essa proteína contém a marca 6xHis em sua porção N-terminal (Viana *et al.*, 2013). Os ensaios foram realizados em triplicata.

- Ensaio para confirmar a funcionalidade da proteína

Para confirmação da funcionalidade da proteína ancorada na superfície celular, foi realizado o ensaio de yeast-ELISA utilizando o anticorpo monoclonal anti-2F5 (NIH AIDS Research and reference reagent program, ARP-1475). O ensaio até a etapa de bloqueio segue conforme descrito anteriormente. Os poços contendo as células foram incubados por duas horas à temperatura ambiente com 50 µl de uma diluição 1:3000 do anticorpo anti-2F5. Após lavagem com PBS-T, foi adicionado aos poços 50 µl de uma diluição 1:35.000 do anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (*Jackson Immune Research*, cat: 109-036-003, USA) e incubados por uma hora à temperatura ambiente. Para detecção e leitura segue como descrito anteriormente. A proteína Top7-2F5 expressa em bactéria e purificada conforme descrito em Viana *et al.* (2013), foi utilizada como controle positivo do ensaio.

2.5 Análise dos dados

A análise estatística dos resultados de yeast-ELISA foi realizada no programa *GranPad Prim* 8.0.1 utilizando o teste t para definir a diferença significativa entre as linhagens testes e controles.

2.6 Microscopia de fluorescência

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados como descrito no manual do vetor pYD1 (Invitrogen, 2002). Resumidamente, 250 μ l de célula numa concentração de 2×10^7 células/ml expressando as proteínas heterólogas foram incubados com 1 mg/ml de BSA e com 1 μ g de monoclonal anti-poliHistidina de camundongo (anti-His) (*Sigma-Aldrich*®, cat: H1029) diluído em PBS por uma hora no gelo. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas no mesmo volume em PBS contendo 1 mg/ml de BSA e o segundo anticorpo anti-*mouse* IgG conjugado com FITC (*Invitrogen*, cat: 31569) numa diluição de 1:500 e incubadas por uma hora, no gelo e no escuro. Após esta incubação, as células foram novamente lavadas com PBS por três vezes e ressuspensas em 40 μ l de PBS. Um volume de 5 a 10 μ l foi colocado nas lâminas e deixadas secar ao ar. As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Leica DMLB, DMi8, Wetzlar, Germany).

3. Resultados e discussão

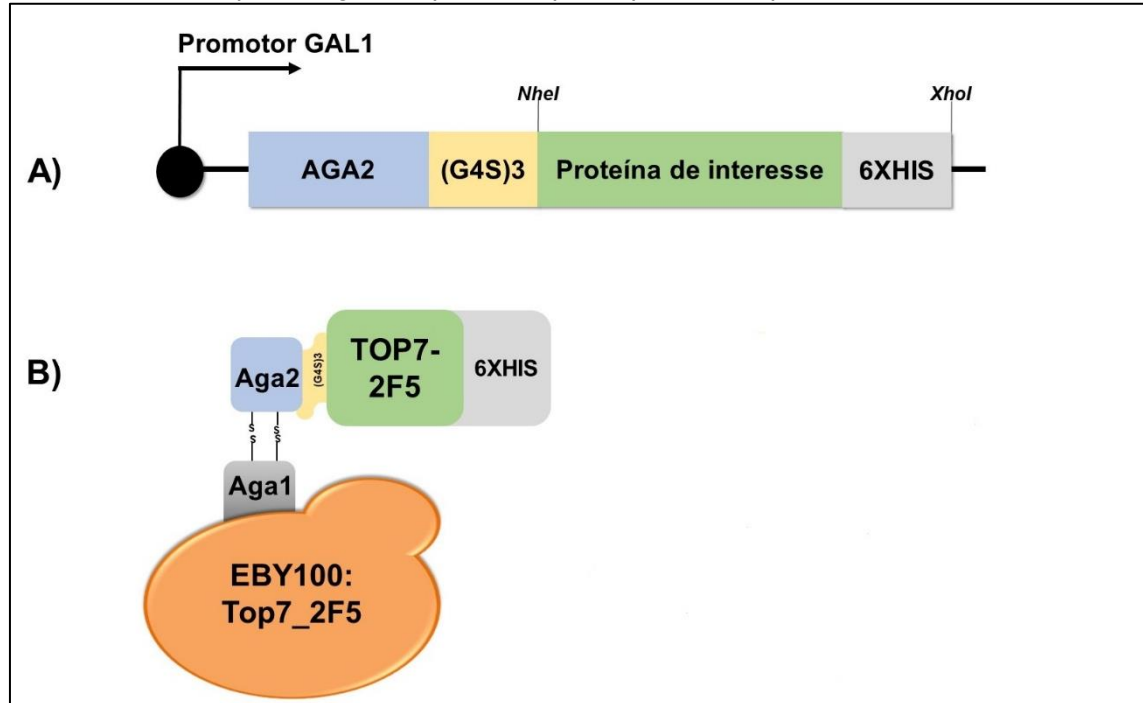
3.1 Construção das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*

Estratégias vacinais baseadas na exposição do epítopo 2F5 com frequência não conseguiram obter imunidade protetora a longo prazo (Bomsel *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2014; Safrit *et al.*, 2016), refletindo a dificuldade de mimetizar a estrutura nativa do epítopo. Entretanto, Viana *et al.* (2013) selecionaram computacionalmente um antígeno *scaffold*-epítopo (Top7-2F5) capaz de estabilizar o epítopo na sua estrutura nativa, favorecendo a adequada exposição. Produzida na forma solúvel em *E. coli*, a proteína quimérica Top7-2F5 demonstrou ser reconhecida especificamente pelo anticorpo monoclonal anti-2F5 em ensaios de ELISA.

No presente trabalho, foi avaliada a funcionalidade da proteína Top7-2F5 quando ancorada à superfície celular de *S. cerevisiae*, com utilização do sistema EBY100/pYD1 (Boder e Wittrup, 1997). A linhagem EBY100 transformada com o plasmídeo pYD1/Top7-2F5 (EBY100:Top7_2F5), quando induzida por galactose, expressa o cassete AGA2-(G4S)₃-Top7_2F5-6xHis e, desta forma, a proteína de interesse resulta fusionada à região C-terminal da âncora Aga2, seguida da *tag* de

histidina (6xHis) para a detecção da ancoragem (Figura 1).

Figura 1 - Esquema geral da montagem e verificação da linhagem recombinante EBY100:Top7_2F5. A) representação esquemática da montagem da região codificante do plasmídeo recombinante pYD1 e B) ancoragem da proteína após expressão do promotor GAL1.

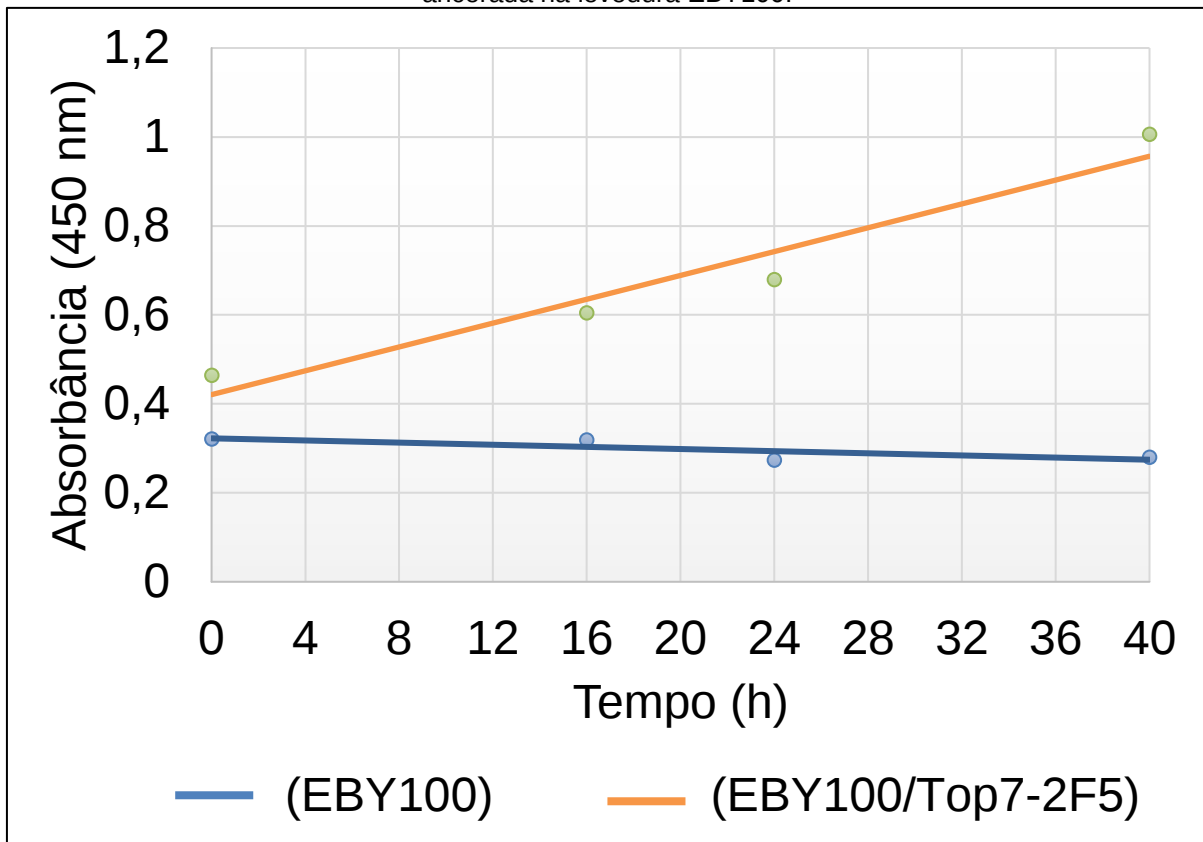


Fonte: A autora (2022)

3.2 Avaliação da ancoragem das proteínas recombinantes

Para avaliar a expressão e ancoragem da proteína Top7-2F5 à superfície da levedura, células de EBY100:Top7_2F5 foram submetidas à indução em meio com galactose, com durações compreendidas entre 16 e 40 horas, e em seguida utilizadas em ensaio de yeast-ELISA, com um anticorpo dirigido à tag 6xHis. A partir de 20h já é possível detectar a tag 6xHis das proteínas ancoradas, sendo o tempo de 40h aquele em que se observa uma maior detecção (Figura 2). Nenhuma detecção é observada quando se utilizam células da linhagem hospedeira EBY100 no ensaio, o que mostra que não há ligação inespecífica do anticorpo anti-His à superfície da levedura. Para outras proteínas recombinantes expressas com o sistema EBY100/pYD1 também se observou produção crescente ao longo de 48 horas de indução em meio contendo galactose (Mathew *et al.*, 2018; Andreu e Olmo, 2013; Dong *et al.*, 2020; Patterson *et al.*, 2012).

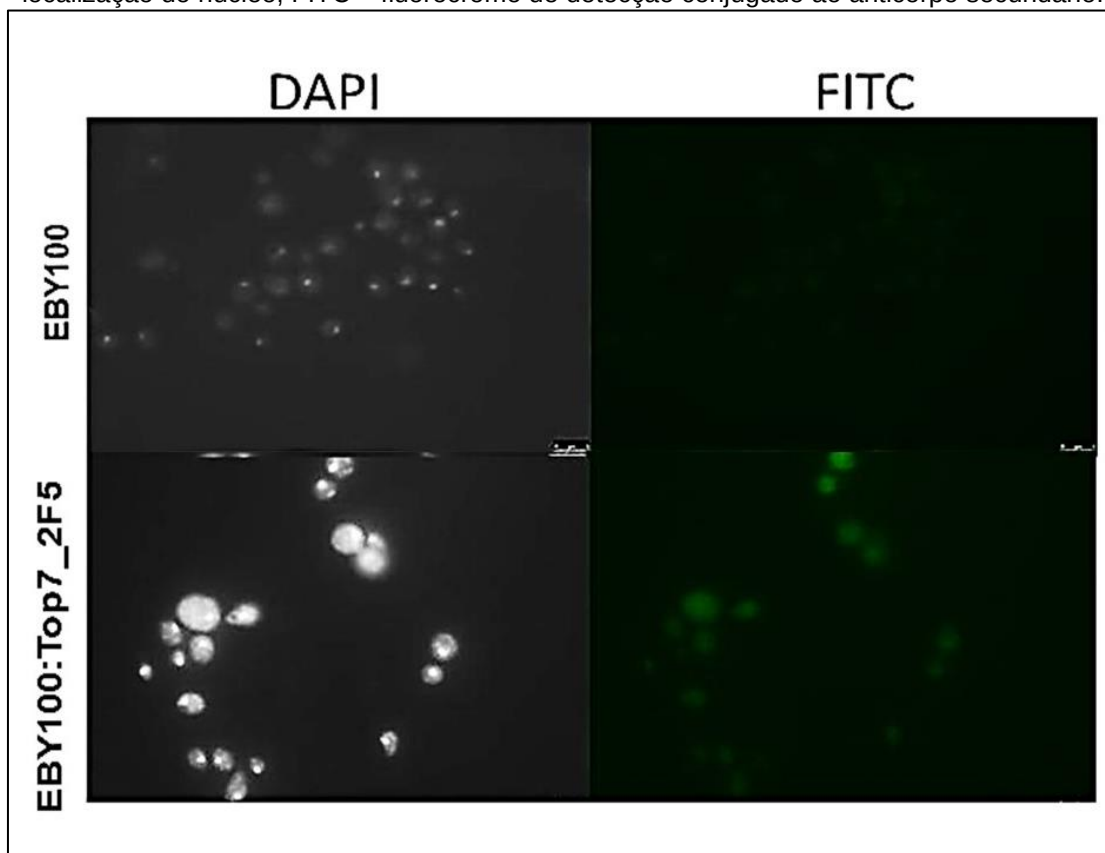
Figura 2 - Yeast-ELISA realizado a partir de diferentes períodos de indução, utilizando o anticorpo anti-His conjugado com peroxidase para detecção da tag 6XHis fusionada à proteína Top7-2F5 ancorada na levedura EBY100.



Fonte: A autora (2022)

A ancoragem da proteína recombinante Top7-2F5 à parede celular da levedura foi também avaliada em microscopia de fluorescência. Células de EBY100 e EBY100:Top7_2F5 foram induzidas por 40 horas e a seguir marcadas com um anticorpo anti-His conjugado com o fluoróforo FITC. A ligação do anticorpo à tag 6xHis da proteína recombinante foi visualizada nas células de EBY100:Top7_2F5, mas não nas células da linhagem hospedeira EBY100, confirmando a correta ancoragem das proteínas recombinantes à parede celular (Figura 3). A visualização do antígeno *scaffold*-epítipo Top7-2F5 demonstrada nesse ensaio é comparável à conseguida na ancoragem de outros antígenos virais na superfície de *S. cerevisiae* (Mojica, 2015; Lei *et al.*, 2020; Patterson *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2016).

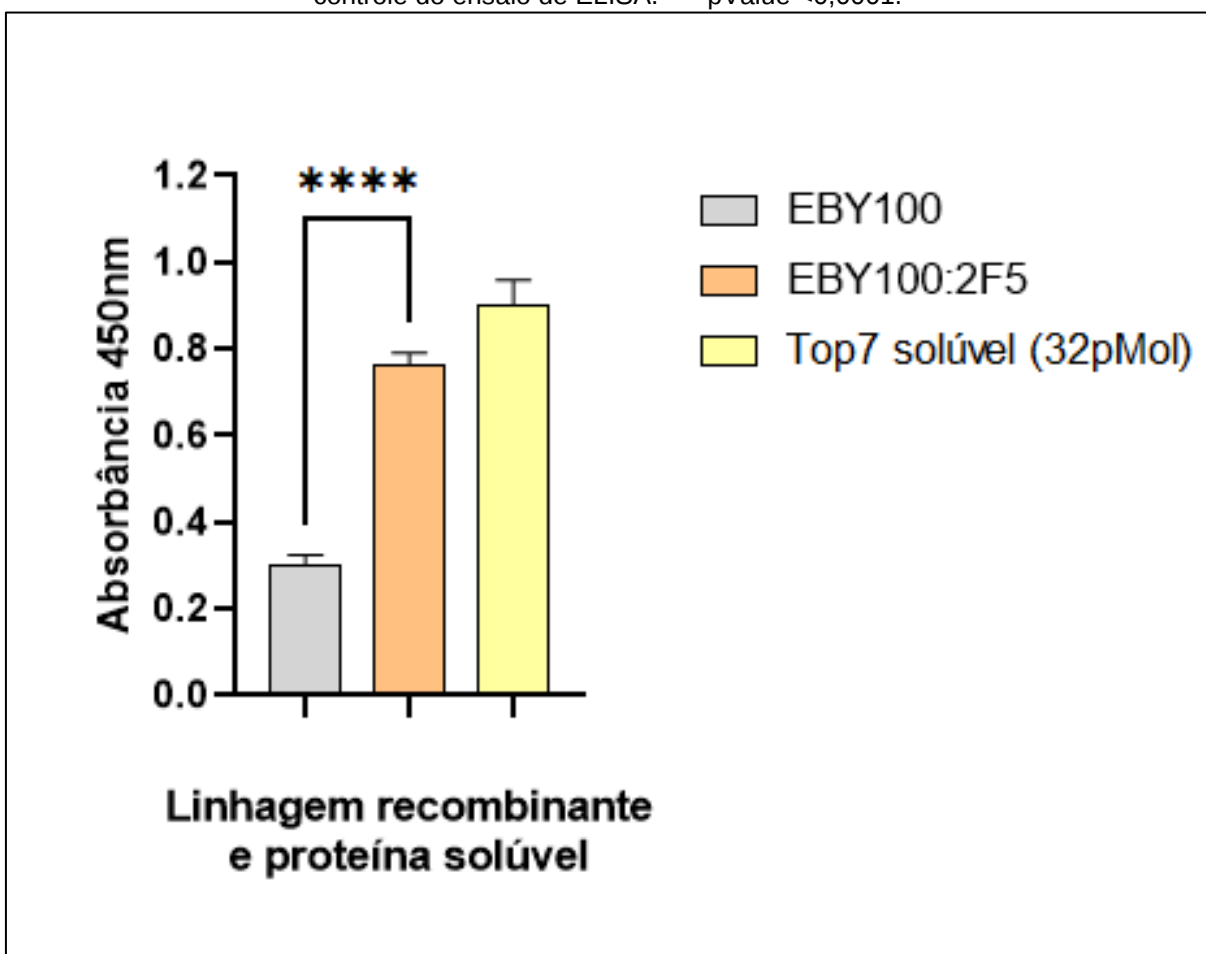
Figura 3 - Microscopia de fluorescência da linhagem recombinante EBY100:Top7_2F5 utilizando o anticorpo primário anti-His (1:250) e anticorpo secundário conjugado com FITC anti-IgG-camundongo (1:500). A linhagem EBY100 foi utilizada como controle de ligação inespecífica. DAPI – corante para localização do núcleo; FITC – fluorocromo de detecção conjugado ao anticorpo secundário.



Fonte: A autora (2022)

Após confirmação do tempo de indução que passou a ser de 40 horas, as células de EBY100 e EBY100:Top7_2F5 foram testadas em yeast-ELISA, utilizando o anticorpo anti-His conjugado com peroxidase. É possível visualizar a detecção da proteína quimérica, com uma razão de 2,6 entre os sinais medidos com as células contendo o antígeno Top7-2F5 ancorado e as células hospedeiras EBY100 (Figura 4). A partir deste ensaio foi possível utilizar as mesmas células para obter os resultados da funcionalidade da proteína ancorada, visto que o *scaffold*-epítipo foi indentificado a partir da tag 6XHis no qual está fusionada à proteína quimérica.

Figura 4 - *Yeast-ELISA* com a linhagem recombinante EBY100:Top7_2F5 (coluna laranja). Ensaio realizado com o anticorpo anti-His (1:1000) conjugado com peroxidase. EBY100 (coluna cinza) foi utilizada como controle de ligação inespecífica e a proteína solúvel Top7 (coluna amarela) como controle do ensaio de ELISA. ****pValue <0,0001.



Fonte: A autora (2022)

3.2 Avaliação da funcionalidade do *scaffold*-epítipo Top7-2F5 ancorado

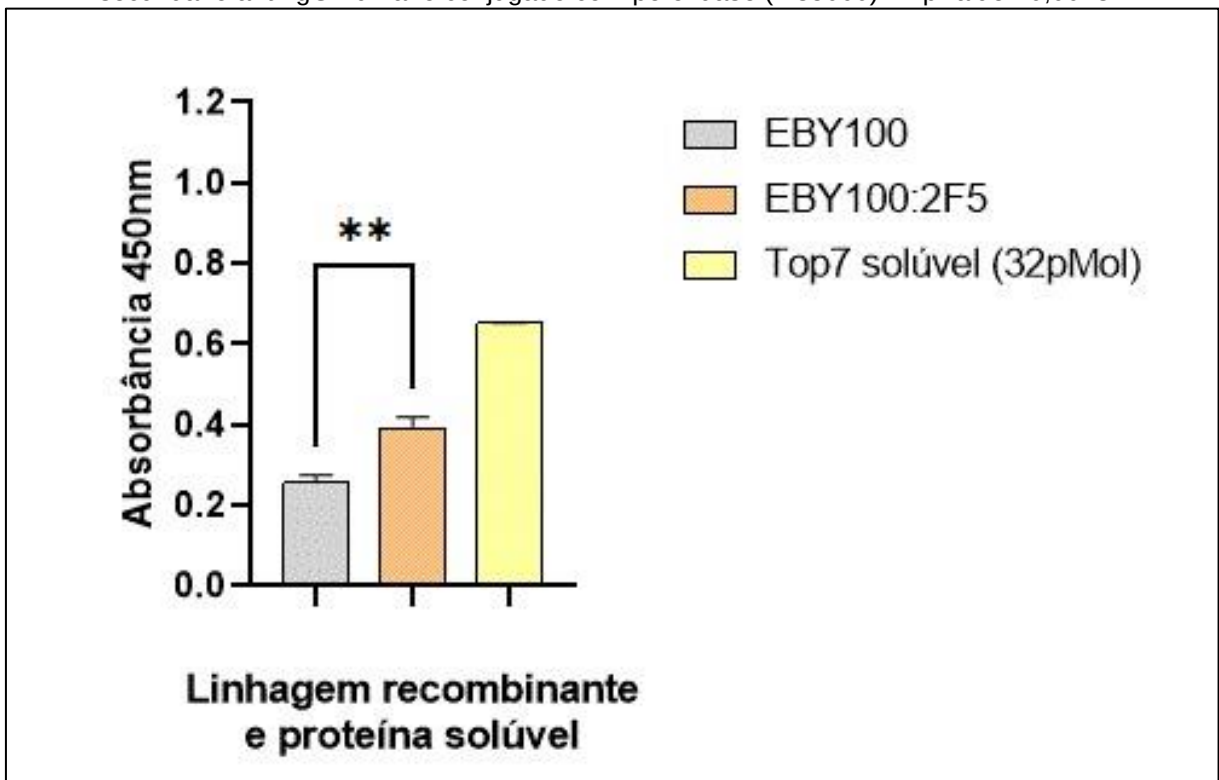
Viana *et al.* (2013) mostraram que o *scaffold*-epítipo Top7-2F5 produzido em forma solúvel em sistema de expressão procarioto é eficazmente reconhecido por um anticorpo específico em ELISA, sugerindo que o transplante de 2F5 na proteína *scaffold* Top7 estabiliza o epítipo na sua estrutura nativa. A fim de confirmar que o *scaffold*-epítipo ancorado na superfície da levedura está adequadamente exposto para o reconhecimento pelo anticorpo específico, um ensaio de *yeast-ELISA* indireto foi realizado com células de EBY100:Top7_2F5 utilizando um monoclonal anti-2F5 como anticorpo primário (Figura 5). Células de EBY100 foram utilizadas como controle negativo e a proteína Top7-2F5 expressa em *E. coli* como controle positivo do ensaio.

Houve diferença significativa entre as reatividades observadas com as células de levedura contendo o antígeno Top7-2F5 ancorado e as células de EBY100 ($p < 0,05$), embora a razão de 1,6 observada entre os respectivos sinais de absorbância

seja relativamente pequena. Apesar de utilizar as mesmas células do ensaio anterior em yeast-ELISA dirigido à *tag* 6xHis, uma detecção mais nítida da proteína quimérica foi observada, com uma razão de 2,6 entre os sinais medidos com as células contendo o antígeno Top7-2F5 ancorado e as células hospedeiras EBY100 (Figura 4). O resultado sugere que é preciso ser realizado uma padronização adicional para diminuir o sinal/ruído na linhagem hospedeira EBY100 e, conseqüentemente, aumentando a sensibilidade do anticorpo específico anti-2F5 à proteína quimérica ancorada na levedura. Alguns fatores podem ser importantes para a padronização como por exemplo:

- aumentar ou diminuir a concentração do anticorpo primário (anti-2F5);
- aumentar ou diminuir a concentração do anticorpo secundário (anti-IgG humano);
- aumentar ou diminuir a quantidade de levedura por poço.

Figura 5 - Yeast-ELISA com anticorpo específico anti-2F5 para demonstrar a funcionalidade da proteína Top7-2F5. A linhagem recombinante EBY100:Top7_2F5 (coluna laranja) foi incubada em placa de ELISA juntamente com o controle de ligação inespecífica EBY100 (coluna cinza). A proteína solúvel Top7-2F5 com 32pMol, foi utilizada como controle de ensaio (coluna amarela). As células e proteína foram incubadas primeiramente com o anticorpo anti-2F5 (1:3000) e depois com o anticorpo secundário anti-IgG-humano conjugado com peroxidase (1:35000). **pValue <0,0023.



Fonte: A autora (2022)

Outro fator a ser considerado é no estabelecimento da quantificação de proteínas ancorada na superfície celular da levedura, pois, desta maneira, é possível controlar a concentração de exposição de proteína a cada experimento de yeast-ELISA e, portanto, uniformizar os próximos ensaios.

Até onde sabemos, este é o primeiro relato em que foram demonstradas a ancoragem e a reatividade de um antígeno do tipo *scaffold*-epítipo na superfície celular da levedura, utilizando como *scaffold* uma proteína não-natural. Embora ainda deva ser objeto de aprimoramentos para aumentar a razão sinal/ruído, o sistema apresentado nesse estudo poderá acelerar a avaliação *in vivo* de antígenos do tipo *scaffold*-epítipo concebidos *in silico*.

REFERÊNCIAS

- ANANPHONGMANEE, Vorawit et al. Yeast surface display of two proteins previously shown to be protective against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. **Plos one**, v. 10, n. 6, p. e0128764, 2015.
- ANDREU, C.; DEL OLMO, M. Yeast arming by the Aga2p system: effect of growth conditions in galactose on the efficiency of the display and influence of expressing leucine-containing peptides. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 9055-9069, 2013.
- ARAÚJO, A. P. U. et al. Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocatechol 1, 2-dioxygenase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 272, n. 2, p. 480-484, 2000.
- BLARCOM, Thomas Van et al. Epitope mapping using yeast display and next generation sequencing. **Epitope Mapping Protocols**, p. 89-118, 2018.
- BOMSEL, Morgane et al. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 269-280, 2011.
- BOONHAM, Neil et al. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. **Virus research**, v. 186, p. 20-31, 2014.
- CARSON, Mike et al. His-tag impact on structure. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 63, n. 3, p. 295-301, 2007.
- CEN, Qianhong et al. Immune evaluation of a *Saccharomyces cerevisiae*-based oral vaccine against *Helicobacter pylori* in mice. **Helicobacter**, v. 26, n. 1, p. e12772, 2021.
- COÊLHO, Danilo F. et al. The influence of biotinylation on the ability of a computer designed protein to detect B-cells producing anti-HIV-1 2F5 antibodies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 93, p. 107442, 2019.
- DONG, Mosi et al. Optimization of production conditions of rice α -galactosidase II displayed on yeast cell surface. **Protein Expression and Purification**, v. 171, p. 105611, 2020.
- ELIZONDO-QUIROGA, Darwin et al. An *Escherichia coli*-expressed porcine reproductive and respiratory syndrome virus chimeric protein induces a specific immunoglobulin G response in immunized piglets. **Viral Immunology**, v. 32, n. 9, p. 370-382, 2019.
- GIETZ, R. Daniel; WOODS, Robin A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods in enzymology**, v. 350, p. 87-96, 2002.
- INVITROGEN. pYD1 yeast display vector kit - user manual (2002). Disponível em: <https://www.yumpu.com/en/document/view/49535338/pyd1-yeast-display-vector-kit>.

Acessado em: 17/12/2021.

KARBANOWICZ, Thomas et al. Extracellular expression of the HT1 neurotoxin from the Australian paralysis tick in two *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Toxicon**, v. 140, p. 1-10, 2017.

LEI, Han et al. Yeast display platform technology to prepare oral vaccine against lethal H7N9 virus challenge in mice. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2020.

LEI, Han et al. Yeast surface-displayed H5N1 avian influenza vaccines. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.

LOWN, Patrick S. et al. Extended yeast surface display linkers enhance the enrichment of ligands in direct mammalian cell selections. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 34, 2021.

MAGALHÃES, Ilana CL et al. Non-structural protein 1 from Zika virus: Heterologous expression, purification, and potential for diagnosis of Zika infections. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 186, p. 984-993, 2021.

MAJOREK, Karolina A. et al. Double trouble—Buffer selection and H is-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. **protein science**, v. 23, n. 10, p. 1359-1368, 2014.

MARCEKOVA, Zuzana et al. Heterologous expression of full-length capsid protein of porcine circovirus 2 in *Escherichia coli* and its potential use for detection of antibodies. **Journal of virological methods**, v. 162, n. 1-2, p. 133-141, 2009.

MATA-FINK, Jordi et al. Rapid conformational epitope mapping of anti-gp120 antibodies with a designed mutant panel displayed on yeast. **Journal of molecular biology**, v. 425, n. 2, p. 444-456, 2013.

MATHEW, Elizabeth et al. Display of the HIV envelope protein at the yeast cell surface for immunogen development. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0205756, 2018.

MOJICA, Ismael. Expression of HA1 fragment of H1N1 swine influenza viral protein, hemagglutinin, on the surface of yeast *Saccharomyces cerevisiae* using pYD5 shuttle vector. 2015.

MUSTER, Thomas et al. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. **Journal of virology**, v. 67, n. 11, p. 6642-6647, 1993.

NAKAMURA, Y. et al. Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 57, n. 4, p. 500-505, 2001.

OFEK, Gilad et al. Elicitation of structure-specific antibodies by epitope scaffolds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 42, p. 17880-17887, 2010.

OFEK, Gilad et al. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. **Journal of virology**, v. 78, n. 19, p. 10724-10737, 2004.

PANEK, Anna et al. Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 2, 2013.

PARAPOULI, Maria et al. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2020.

PATTERSON, Robert et al. Yeast-surface expressed BVDV E2 protein induces a Th1/Th2 response in naïve T cells. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 37, n. 1, p. 107-114, 2012.

SAFRIT, Jeffrey T. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for HIV-1. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2921-2925, 2016.

SERRANO, Soraya et al. Structure and immunogenicity of a peptide vaccine, including the complete HIV-1 gp41 2F5 epitope: implications for antibody recognition mechanism and immunogen design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 10, p. 6565-6580, 2014.

SHIBASAKI, Seiji; UEDA, Mitsuyoshi. Oral vaccine development by molecular display methods using microbial cells. **Vaccine Design**, p. 497-509, 2016.

TANG, Hongting et al. Efficient yeast surface-display of novel complex synthetic cellulosomes. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2018.

THIELGES, Megan C. et al. Influence of histidine tag attachment on picosecond protein dynamics. **Biochemistry**, v. 50, n. 25, p. 5799-5805, 2011.

VIANA, Isabelle FT et al. De novo design of immunoreactive conformation-specific HIV-1 epitopes based on Top7 scaffold. **Rsc Advances**, v. 3, n. 29, p. 11790-11800, 2013.

WASHIDA, M. et al. Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 5, p. 681-686, 2001.

WETZEL, David et al. Display of malaria transmission-blocking antigens on chimeric duck hepatitis B virus-derived virus-like particles produced in *Hansenula polymorpha*. **PLoS One**, v. 14, n. 9, p. e0221394, 2019.

XIE, Ying; HAN, Xiao; MIAO, Yansong. An effective recombinant protein expression and purification system in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current protocols in molecular biology**, v. 123, n. 1, p. e62, 2018.

YOLKEN, Robert H. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a practical tool for rapid diagnosis of viruses and other infectious agents. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 53, n. 1, p. 85, 1980.

ZHU, Hong et al. Identification of variant HIV envelope proteins with enhanced affinities for precursors to anti-gp41 broadly neutralizing antibodies. **PloS one**, v. 14, n. 9, p. e0221550, 2019.

4.2 ARTIGO 2 - DETECÇÃO DA ANCORAGEM DA ONCORPROTEÍNA E6 DE HPV-16 POR YEAST-ELISA ATRAVÉS DE EXPRESSÃO MONOCÓPIA E MULTICÓPIA

Resumo

Genes heterólogos são expressos e ancorados na superfície celular de *Saccharomyces cerevisiae* através da transformação de plasmídeos que podem permanecer no organismo hospedeiro seja por plasmídeos episomais (resultando em expressão multicópia) ou por integração ao genoma da levedura, resultando na expressão de uma única cópia do gene recombinante. No entanto, nem sempre o nível de expressão a partir de integração genômica é suficiente para promover uma resposta a sistemas de detecção imunológica, como no caso do yeast-ELISA. A quantidade de proteínas, neste caso, é um fator importante para a verificação de proteínas heterólogas que estejam ancoradas na superfície celular da levedura. Por esta razão, optamos por escolher as duas formas de expressão e ancoragem da proteína E6 do Papilomavírus Humano (HPV-16), e definir a melhor estratégia para o uso da linhagem em estudos futuros, como, por exemplo, aplicação em vacinas profiláticas contra o HPV. Para isto, usamos o sistema EBY100/pYD1 que utiliza a âncora α -aglutina (Aga1p e Aga2p) para promover a ancoragem de proteínas na superfície celular de *S. cerevisiae*. As linhagens construídas foram utilizadas para comparar as duas metodologias de modificação gênica por meio da ligação do anticorpo direcionado a *tag* de Histidina. Os resultados obtidos demonstraram que através da clonagem episomal houve uma maior expressão da proteína e, consequentemente, maior detecção através da técnica de imunoensaio yeast-ELISA.

Introdução

A ancoragem na superfície celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma plataforma usada para expressão de proteínas recombinantes e vem sendo frequentemente utilizada para diversas finalidades como: produção de bioetanol (Tang *et al.*, 2018), triagem sorológica (Mathew *et al.*, 2018; Mata-Fink *et al.*, 2013; Kajiwara *et al.*, 2020) e no desenvolvimento de vacinas orais (Patterson *et al.*, 2015; Cen *et al.*, 2020). O sucesso do sistema de ancoragem depende de vários fatores, um deles é a escolha do sistema de expressão, que pode ser de forma episomal ou integrativa,

devendo permitir a conformação correta da proteína com reprodutibilidade (Routledge *et al.*, 2016; Piraine *et al.*, 2021). Normalmente os vetores plasmidiais são a primeira opção, porém a escolha de uma construção integrativa é promissora para tornar a expressão mais estável (Piraine *et al.*, 2021). Os plasmídeos episomais, por exemplo, possuem replicação autônoma e por isso fornece um número maior de cópia do gene heterólogo, por outro lado, quando os cassetes de integração são usados, normalmente apenas uma única cópia do gene é integrada de forma estável no genoma (Teymennet-Tamirez *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2012).

Algumas proteínas virais como o da hepatite B (Schreuder *et al.*, 1996) e o vírus da diarreia epidêmica suína (Park *et al.*, 2007), foram expressos com sucesso na superfície celular da levedura para o desenvolvimento de vacinas orais. Porém, outras proteínas virais importantes, como o papilomavírus humano (HPV), até onde sabemos, não possui estudos acerca da ancoragem das proteínas responsáveis pela infecção viral, a exemplo da oncoproteína E6. Esta proteína é composta por 150-160 aminoácidos codificando uma proteína de 18,27 kDa (Zanier *et al.*, 2012). Junto com E7, desempenha o papel central na condução das células para a oncogênese, induzindo todas as características de uma célula cancerosa (Pal e Kundu, 2020). Por isso representa um alvo eficaz para vacinas terapêuticas, pois pode garantir a eliminação das células cancerígenas do colo do útero. Portanto, compreender primeiramente como esta proteína é expressa e ancorada na superfície celular da levedura é promissor para estudos futuros no desenvolvimento de uma vacina terapêutica.

Para isto, utilizamos o sistema de ancoragem EBY100/pYD1 (Boder e Wittrup, 1997) que se baseia no uso da âncora nativa a-aglutinina, onde o gene heterólogo é fusionado à âncora Aga2p, esta por sua vez se liga por ponte dissulfeto à proteína Aga1p que está na superfície celular da levedura. Este sistema utiliza o plasmídeo pYD1 (Invitrogen, 2012) como vetor episomal para expressão, mas para a obtenção dos cassetes de integração e construção das linhagens integrativas, utilizamos o sistema *EasyClone-MarkerFree*, baseado em *CRISPR-Cas9* (Miranda *et al.*, 2020). Sendo assim, este trabalho demonstra a avaliação comparativa entre duas linhagens capazes de ancorar o oncogene E6 de HPV-16, usando a ferramenta yeast-ELISA para a verificação da ancoragem, cujas linhagens foram construídas utilizando vetor episomal ou integração cromossômica.

Materiais e métodos

2.1 Linhagens, plasmídeos e meios de cultura

A linhagem DH5 α de *Escherichia coli* foi usada como hospedeira para amplificação *in vivo* dos plasmídeos recombinantes em meio LB acrescido de 100 μ g/ml de ampicilina. Para expressão e ancoragem das proteínas heterólogas em levedura, foi utilizada a linhagem EBY100 (*MATa ura3-52 trp1 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 pep4:HIS3 prb1 Δ 1.3R can1 GAL*) de *Saccharomyces cerevisiae*, obtida junto à *American Type Culture Collection* (ATCC® MYA-4941™). As células de EBY100 foram mantidas em meio YPD contendo 2% de ágar, quando necessário. A linhagem EBY100 juntamente com o vetor pYD1 compõem o sistema de expressão e ancoragem EBY100/pYD1 (Boder e Wintrup, 1997). No vetor pYD1, a expressão da proteína heteróloga fusionada a Aga2p está sob controle do promotor GAL1 indutível por galactose, sendo mantido na linhagem hospedeira EBY100 por supressão da auxotrofia para o triptofano. Os transformantes de EBY100 foram selecionados em placas com meio seletivo YNB w/o AA (Sigma-Y0626) suplementado com 60 μ g/ml de leucina. Para a seleção dos transformantes contendo os vetores pCfB3048 (para expressão do RNA-guia) e pCfB2312 (para expressão da endonuclease Cas9), foi utilizado o meio de cultura YPD suplementado com 100 mg/L de nourseotricina (ClonNAT) e 200 mg/L de geneticina (KanMX).

2.2 Construção dos vetores recombinantes

- Vetor pYD1-E6

Para obtenção do vetor episomal o gene E6-HPV-16 foi amplificado do vetor pAE cedido pelo professor Antônio Carlos de Freitas (UFPE/Recife-PE) contendo o genoma completo de HPV-16. Os sítios de restrição *NheI* e *XhoI* contidos nos primers de amplificação E6_F e E6_R (Tabela 1) foram utilizados para a clonagem no vetor pYD1 (Figura 1).

- Vetor pCFB3039

Para a construção do vetor integrativo, o cassete de expressão (*biobrick*) foi amplificado a partir do vetor pYD1-E6 utilizando a polimerase U tolerante (Thermo Scientific) com primers contendo uracila na região 5' (Tabela 1), necessária a

clonagem por fusão USER. As reações de PCR foram tratadas com *Dpn1* por 2h a 37°C, seguido por inativação a 80°C por 20 minutos. Para a construção do vetor pCfB3039-PGAL-E6-HPV16, foram utilizados, numa proporção de 3:1, 30ng do vetor pCfB3039 componente do kit comercial *EasyClone-MarkerFree* (Miranda *et al.*, 2020) e 10 ng do inserto PGAL-E6_HP16, e incubados em presença do reagente USER (New England Biolab). Após incubação, a reação foi utilizada para transformar células de bactéria quimiocompetentes DH5 α . O vetor resultante pCfB3039-PGAL-E6-HPV16 foi linearizado com a enzima *NotI* e, junto com o RNA-guia correspondente, foi utilizado para transformar linhagem EBY100-Cas9 de *S. cerevisiae*, a qual expressa a endonuclease Cas9 (Figura 1).

Tabela 1 - Lista de primers utilizados para a montagem e verificação dos vetores recombinantes episomais e integrativos

Primer	Sequência*	TA**	Uso
E6_F ¹	GGTACCAGCTAGCG TTT TAGCAGCAGAAA <u>TGCACCAAAGAGAA</u> <u>CTGCAAT</u>	60°C	Amplificação do gene E6
E6_R ¹	TCTAGACTCGAGTCA ATGATGATGATG <u>ATG</u> <u>ATGGGATCCGAATTC</u> <u>CAGCTGGGTTTCTCT</u> <u>ACGTG</u>		
pYD1_F ²	AGTAACGTTTGTCAG TAATTGC	55°C	Verificação de clonagem nos vetores episomais
pYD1_R ²	TCGATTTTGTTACAT CTACAC		
EC_F ¹	<u>ATCGCGTGCA</u> <u>U</u> TCAT CCGCTCTAACCGAAA AGG	55°C	Amplificação dos vetores <i>EasyClone</i>
EC_R ¹	<u>ATCGCACGCA</u> <u>U</u> TCCG TTGGTAGATACGTTGT TGAC		

AGVR1_pYD1 ¹	<u>ATGCGTGCGA</u> UACGG ATTAGAAGCCGCCGA GC	55°C	Amplificação da sequência pGAL1_AGA2_E6_6xH is de pYD1/E6
AGVR2_pYD1 ¹	<u>ATGCACGCGA</u> UCACT GTTGTTATCAGATCAG CG		
ADH1_test_fw ¹	GAAATTCGCTTATTTA GAAGTGTC	55°C	Verificação da clonagem no vetor <i>EasyClone</i>
CYC1_test_rv ¹	CTCCTTCCTTTTCGGT TAGAG		
2221 ³	GTTGACACTTCTAAAT AAGCGAATTTC	50°C	Amplificação do locus 2 da região UP do cromossomo XII
893-XII-2-UP ³	CGAAGAAGGCCTGCA ATTC		
2220 ³	CCTGCAGGACTAGTG CTGAG	50°C	Amplificação do locus 2 DOWN do cromossomo XII
894-XII-2- DOWN ³	GGCCCTGATAAGGTT GTTG		
*As sequências sublinhadas representam as caudas dos primers contendo uracila. **Temperatura de anelamento utilizada nas reações de PCR ¹Primers construídos a partir da sequência do gene E6 ²Primers descritos pelo manual pYD1 (Invitrogen, 2012) ³Primers descritos por Jessop-Fabre <i>et al.</i>, 2016			

2.3 Construção das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*

- Linhagem recombinante com vetor episomal

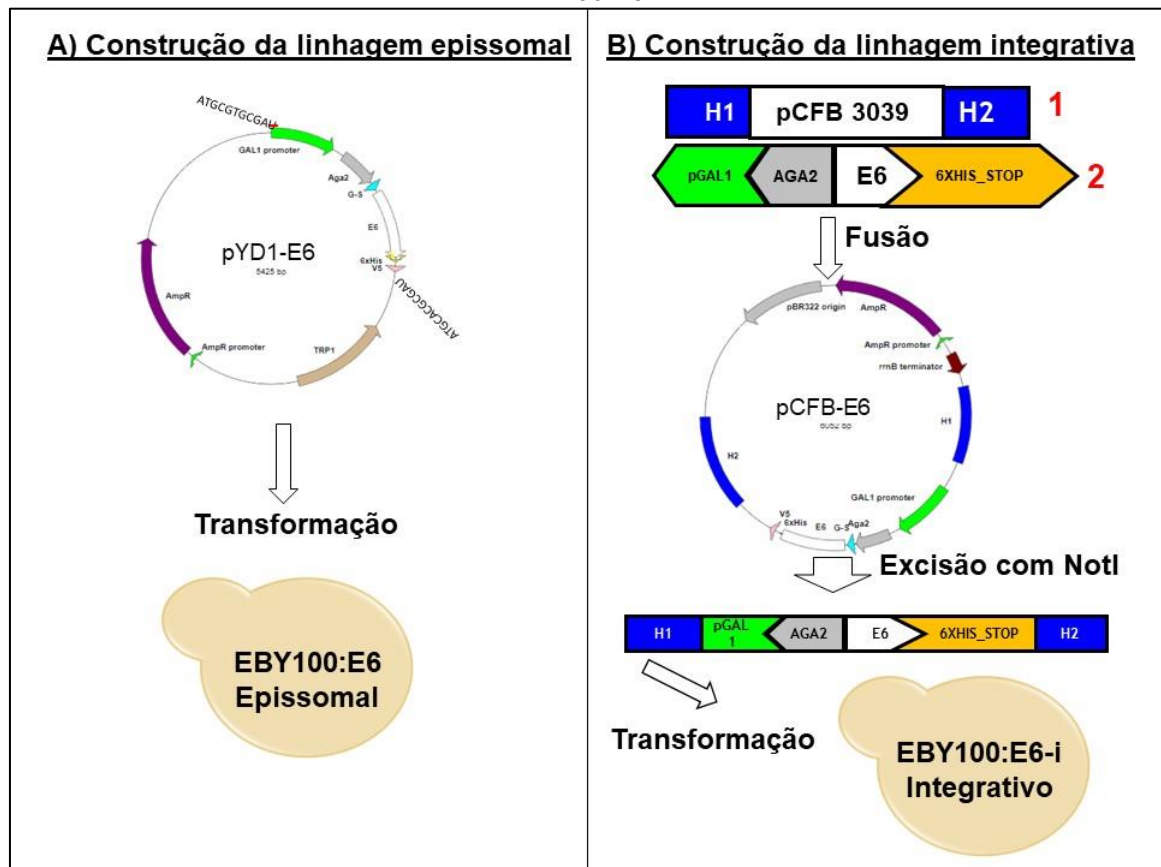
A linhagem EBY100 foi transformada com o vetor episomal pYD1-E6 segundo o método de acetato de lítio de acordo com Gietz e Woods (2002) resultando, na linhagem EBY100:E6.

- Linhagem recombinante por integração cromossômica

Após linearização pela enzima *NotI*, o cassete obtido foi utilizado para transformar a levedura EBY100 contendo o vetor pCFB2312 que expressa a endonuclease Cas9, anteriormente obtidas por transformação por eletroporação

(Benatuil *et al.*, 2010) (Figura 1). Células de EBY100_pCAS9 foram transformadas com 100 ou 500 ng do cassete de integração linear e 500ng do vetor pCFV3048 para expressão do respectivo RNA-guia dirigido ao locus 2 de integração do cromossomo XII, resultando na linhagem EBY100:E6-i. As colônias transformantes foram confirmadas através de PCR de colônia utilizando primers desenhados para ladear a região de integração, descrito por Jessop-Fabre *et al.*, 2016 (Figura 2).

Figura 1 - Desenho esquemático comparativo entre a construção de linhagens epissomal e integrativa. A) Após clonagem do gene E6 de HPV no plasmídeo pYD1, resultando no vetor pYD1/E6, a levedura EBY100 é transformada, gerando então a linhagem EBY100:E6. (B) Para obter o cassete integrativo, foi realizada a PCR da porção pGAL1-AGA2-E6-6xHis, a partir do vetor pYD1/E6 (1), e também do vetor pCFB3039, com primers para fusão USER (2). Estes fragmentos são clonados por fusão-USER e em seguida é utilizado a enzima *NotI* para obter o cassete de integração linear. O cassete então é utilizado para transformar a levedura EBY100, gerando a linhagem recombinante EBY100:E6-i.



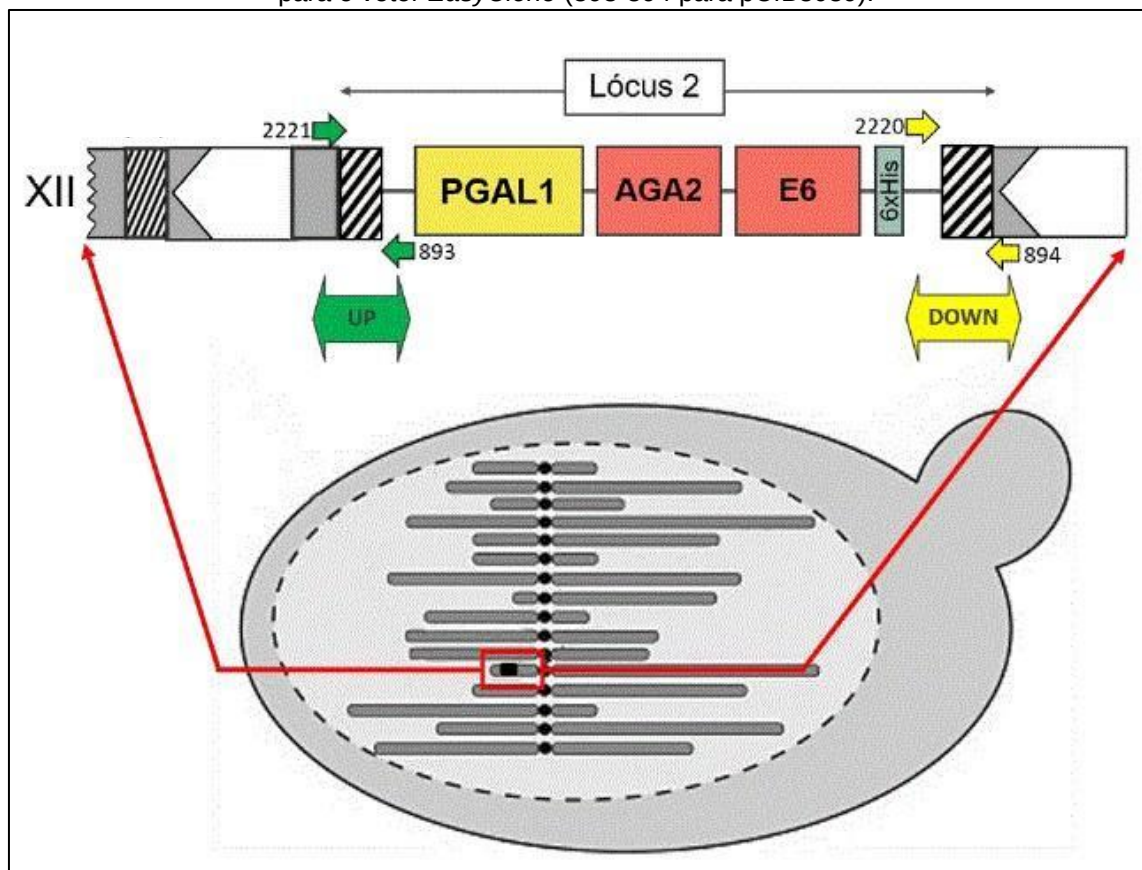
Fonte: A autora (2022)

2.4 Indução e expressão das proteínas heterólogas

Para a expressão e ancoragem das proteínas, as linhagens recombinantes e a linhagem hospedeira utilizada como controle negativo (EBY100) foram cultivadas em meio indutor contendo galactose. Para obter a biomassa utilizada no ensaio de indução, algumas colônias foram inicialmente crescidas em 10 ml de meio seletivo

contendo glicose por 16 h, a 30°C. Em seguida, as células foram utilizadas para inocular 50 ml do mesmo meio contendo glicose de modo a se ter uma DO inicial de 0,3 e incubadas até atingir DO entre 3 a 5. Para a indução, as células foram centrifugadas a 3000 rpm em tubos de 15 ml, lavadas com solução NaCl 0,9%, ressuspensas em 100 ml de meio seletivo contendo 2% de galactose e incubadas a 20°C por 40 h. Após a indução, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão PBS de modo a se obter uma concentração de 10^9 células/ml. As suspensões assim obtidas foram utilizadas para os imunoenaios descritos a seguir. Nesses experimentos, células da linhagem hospedeira EBY100 foram utilizadas como controle negativo de expressão e ancoragem de proteínas.

Figura 2 - Esquema de verificação da integração cromossômica. Linhagem *S. cerevisiae* EBY100 contendo o cassete de integração com o gene E6 no locus 2 do cromossomo XII. A verificação correta é alcançada pela amplificação das regiões UP e DOWN que ladeiam o cassete de integração utilizando primers que anelam anterior ao locus (2220 ou 2221) combinados com primers específicos para o vetor *EasyClone* (893-894 para pCfB3039).



Fonte: Rocha, 2019, baseada em Mikkelsen *et al.*, 2012.

2.5 Ensaio yeast-ELISA

Para a confirmação da expressão e ancoragem da proteína de interesse na superfície celular, foram realizados ensaios de yeast-ELISA utilizando um anticorpo anti-His dirigido à região C-terminal da proteína (anti-His *mouse* HRP *conjugate* 200301382, *Rockland* USA). O ensaio foi realizado segundo Karbanowicz *et al.* (2017). Para a adsorção, 100 µl de uma suspensão contendo 10^8 células (Ananphongmanee *et al.*, 2015; Nakamura *et al.*, 2001) foram incubados em placas de poliestireno de 96 poços (*Corning*-3690), *overnight* a 20°C numa rotação de 160 rpm. Os poços contendo as células adsorvidas foram lavados com 100 µl de tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20 (ThermoFisher, cat: 003005) (PBS-T) por três vezes. Para o bloqueio, os poços foram preenchidos com 100 µl de PBS-T contendo 5% de BSA (albumina sérica bovina) e, após incubação por duas horas à temperatura ambiente, os poços foram novamente lavados com PBS-T três vezes. Os poços contendo as células foram incubados com 50 µL de uma diluição 1:1000 do anticorpo anti-His camundongo conjugado com peroxidase por uma hora e a seguir lavados três vezes com PBS-T. Para a detecção, 50 µL do substrato TMB (*KPL-Sure Blue Reserve*TM, *Sigma-Aldrich*, T0440, USA) foram adicionados aos poços e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos, quando a reação foi interrompida por adição de HCl 1 M. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Bio-Rad xMark, Hercules, California, USA) em 450 nm.

2.6 Análise dos dados

A análise estatística dos resultados de yeast-ELISA foi realizada no programa *GranPad Prim* 8.0.1 utilizando o teste t para definir a diferença significativa entre as linhagens testes e controles.

3. Resultados e discussão

3.1 Construção das linhagens recombinantes

Para avaliar a expressão e ancoragem da proteína E6 de HPV-16 a partir de estratégias de modificação genética epissomal e integrativa, as linhagens EBY100:E6 (epissomal) e EBY100:E6-i (integrativa) foram construídas com a utilização do sistema

EBY100/pYD1 (Boder e Wittrup, 1997), as linhagens e construções estão listadas na Tabela 2. A linhagem EBY100 transformada com o plasmídeo pYD1:AGA2-E6 (EBY100:E6), quando induzida por galactose, expressa o cassete AGA2-(G₄S)₃-E6-6xHis e, desta forma, a proteína de interesse resulta fusionada à região C-terminal da âncora Aga2, seguida da *tag* de histidina (6xHis) para a detecção da ancoragem.

Para obter a linhagem recombinante integrativa EBY100:E6-i, foi construído o *biobrick* a partir da amplificação do vetor *EasyClone* pCfB3039 e amplificação do inserto a partir da clonagem obtida anteriormente (pYD1:AGA2-E6). Utilizando a clonagem baseada em fusão USER dos *biobricks*, foi obtida a construção do vetor *EasyClone* pCfB3039 com inserto contendo o gene que codifica E6 de HPV-16. O inserto contendo o gene E6 é ladeado na porção 5' pelo gene AGA2 que codifica a proteína Aga2p, a qual faz parte da âncora nativa de *S. cerevisiae* a-aglutinina e, ladeado na porção 3' pela *tag* de verificação 6xHis, a construção AGA2_E6_6xHis está sob o controle do promotor GAL1. O sistema *Easyclone-MarkerFree*, baseado em *CRISPR-Cas9*, foi utilizado, promovendo a integração do cassete pCfB3039_PGAL1_AGA2_E6 no locus 2 do cromossomo XII (figura 2) (Miranda *et al.*, 2020).

Tabela 2 - Plasmídeos e linhagens construídas neste trabalho

Plasmídeo	Linhagem recombinante	Cassete de expressão	Finalidade
pYD1/E6	EBY100:E6	AGA2-(G ₄ S) ₃ -E6-6xHis	Linhagem com a proteína E6 a partir da expressão por vetor episomal.
pCfB3039/E6	EBY100:E6-i	AGA2-E6-6xHis	Linhagem com a proteína E6 a partir da expressão por integração cromossômica.

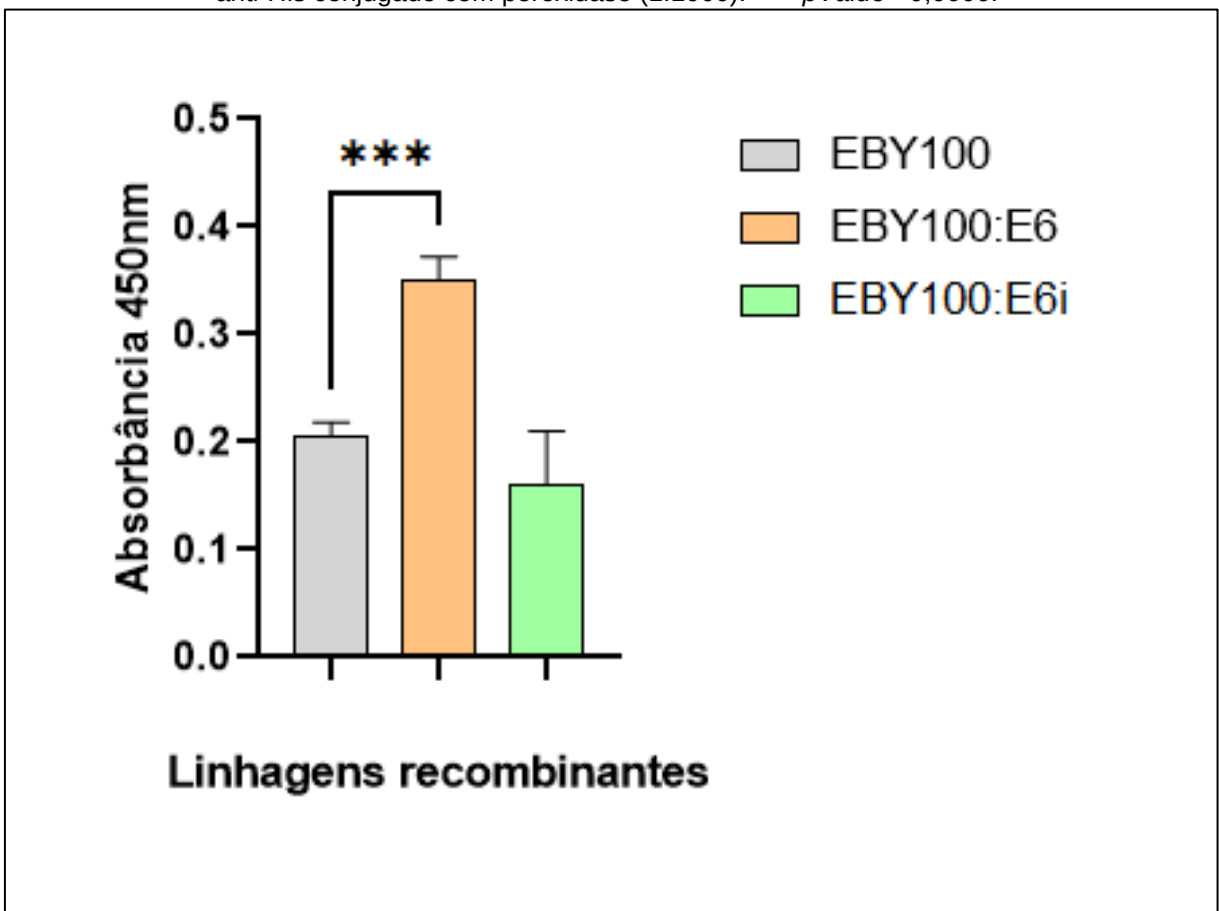
Fonte: A autora (2022)

3.2 Análise da ancoragem da proteína E6 à superfície celular de *S. cerevisiae*

Após indução por 40 horas, células de EBY100, EBY100:E6 e EBY100:E6-i foram adsorvidas às placas de ELISA, para ensaios utilizando anticorpo direcionado a marcação 6xHis. Os resultados obtidos demonstram que existe uma razão de duas vezes entre a linhagem episomal contendo a proteína E6 e a levedura EBY100 (Figura 3). Por outro lado, quando comparamos a ancoragem da linhagem

EBY100:E6-i com a EBY100 não se observa diferença significativa. Isto pode indicar, portanto, que a expressão a partir da integração monocópia não parece promover uma ancoragem satisfatória para o método de detecção por *yeast*-ELISA, pois, apesar de usar uma quantidade de 10^8 células/poço, as proteínas totais ancoradas não foram detectadas.

Figura 3 - Ensaio de Yeast-ELISA contendo as linhagens: EBY100 (controle de ligação inespecífica – coluna cinza), EBY100:E6 (coluna laranja) e EBY100:E6-i (coluna verde). Foi utilizado o anticorpo anti-His conjugado com peroxidase (1:1000). *****p*Value <0,0006.



Fonte: A autora (2022)

Em um estudo propondo ancoragem de celulosossomos em *S. cerevisiae*, também foi comparada o nível de expressão utilizando as duas técnicas de engenharia genética, epissomal e integrativa. Segundo o autor, o número de cópias do gene alvo afeta o rendimento da expressão da proteína, demonstrando que a linhagem com plasmídeo epissomal tem mais vantagem, cerca de 100 vezes mais de número de cópia em relação a linhagem integrativa (Yang *et al.*, 2020). Schreuder *et al* (1996) demonstrou através da ancoragem de determinantes antigênicos do vírus da hepatite B, que células transformadas com um plasmídeo monocópia (YCp) não foram detectados em ensaios de imunofluorescência. Porém quando transformadas com

plasmídeo multicópia (YEp), as células foram facilmente detectadas. Neste mesmo estudo, células com integração multicópia (MYR) obtiveram níveis mais baixos de fluorescência em comparação às células transformadas com YEp. No entanto a expressão com YEp resultou em uma distribuição desigual na população de células, certamente devido à instabilidade do plasmídeo, enquanto que a MYR resultou em um nível de expressão estável.

A instabilidade plasmidial resulta no aumento da frequência de perda de plasmídeo que pode ser atribuída à diminuição da replicação ou pela divisão segregacional da levedura (Gnugge e Rudolf, 2017; Kilonzo *et al.*, 2009). Como *S. cerevisiae* se multiplica por brotamento não uniforme, leva a uma segregação desigual dos plasmídeos das células mãe para as células filhas (Zhang *et al.*, 1996). A frequência de perda pode chegar em 5% por geração (Zeng *et al.*, 2021), e cerca de 50-60% das células perdem seu plasmídeo após 24 h de cultivo em meio não seletivo (Christianson *et al.*, 1992). É possível melhorar a estabilidade do plasmídeo, por exemplo, manipulando as condições do meio de crescimento (Kilonzo *et al.*, 2008; O'Kenedy e Patching, 1997; O'Kenedy *et al.*, 1995) e as taxas de diluição em culturas contínuas (Gupta *et al.*, 2001; Kilonzo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 1997).

Apesar da instabilidade numa transformação com plasmídeo episomal, é notável que existe uma vantagem em relação a quantidade de proteínas ancoradas na superfície celular da levedura em comparação a monocópia. A partir do método de yeast-ELISA, foi possível determinar uma célula com a proteína E6, mostrando a eficiência da técnica de imunoenensaio para identificação de células ancorando proteínas recombinantes.

Conclusão

A comparação entre a ancoragem da oncoproteína E6 de HPV16, em linhagens recombinantes construídas a partir de modificação genética episomal ou integrativa, demonstrou, para esta proteína, que o nível de expressão e ancoragem é um fator importante para sua detecção a partir de ensaios imunológicos, como é o caso do yeast-ELISA. Os resultados apresentados neste artigo demonstram que é necessário obter a expressão da proteína através de sistemas multicópias, pois, desta forma, gera uma quantidade maior de cópias da proteína, possibilitando um melhor reconhecimento imunológico.

REFERÊNCIAS

- ANANPHONGMANEE, Vorawit et al. Yeast surface display of two proteins previously shown to be protective against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. **Plos one**, v. 10, n. 6, p. e0128764, 2015.
- ARAUJO-ARCOS, Lilian Esmeralda et al. Molecular insights into the interaction of HPV-16 E6 variants against MAGI-1 PDZ1 domain. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2022.
- BENATUIL, Lorenzo et al. An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 23, n. 4, p. 155-159, 2010.
- BODER, Eric T.; WITTRUP, K. Dane. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. **Nature biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 553-557, 1997.
- CEN, Qianhong et al. Immune evaluation of a *Saccharomyces cerevisiae*-based oral vaccine against *Helicobacter pylori* in mice. **Helicobacter**, v. 26, n. 1, p. e12772, 2021.
- CHRISTIANSON, Thomas W. et al. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. **Gene**, v. 110, n. 1, p. 119-122, 1992.
- GIETZ, R. Daniel; WOODS, Robin A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods in enzymology**, v. 350, p. 87-96, 2002.
- GNÜGGE, Robert; RUDOLF, Fabian. *Saccharomyces cerevisiae* Shuttle vectors. **Yeast**, v. 34, n. 5, p. 205-221, 2017.
- GUPTA, Jagdish C.; PANDEY, Gaurav; MUKHERJEE, K. J. Two-stage cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to enhance plasmid stability under non-selective conditions: experimental study and modeling. **Enzyme and microbial technology**, v. 28, n. 1, p. 89-99, 2001.
- HOU, Jin et al. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 5, p. 491-510, 2012.
- INVITROGEN. pYD1 yeast display vector kit - user manual (2002). Disponível em: <https://www.yumpu.com/en/document/view/49535338/pyd1-yeast-display-vector-kit>. Acessado em: 17/12/2021.
- JESSOP-FABRE, Mathew M. et al. EasyClone-MarkerFree: A vector toolkit for marker-less integration of genes into *Saccharomyces cerevisiae* via CRISPR-Cas9. **Biotechnology journal**, v. 11, n. 8, p. 1110-1117, 2016.
- KAJIWARA, Kaho; AOKI, Wataru; UEDA, Mitsuyoshi. Evaluation of the yeast surface display system for screening of functional nanobodies. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

KARBANOWICZ, Thomas et al. Extracellular expression of the HT1 neurotoxin from the Australian paralysis tick in two *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Toxicon**, v. 140, p. 1-10, 2017.

KILONZO, Peter M.; MARGARITIS, Argyrios; BERGOUGNOU, Maurice A. Effect of medium composition on glucoamylase production during batch fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 2, p. 83-96, 2008.

KILONZO, Peter M.; MARGARITIS, Argyrios; BERGOUGNOU, Maurice A. Plasmid stability and kinetics of continuous production of glucoamylase by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in an airlift bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 1157-1169, 2009.

LIU, Yuqi et al. Determinants of stability for the E6 protein of papillomavirus type 16. **Journal of molecular biology**, v. 386, n. 4, p. 1123-1137, 2009.

LIU, Zihé et al. Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 5, p. 1259-1268, 2012.

MATA-FINK, Jordi et al. Rapid conformational epitope mapping of anti-gp120 antibodies with a designed mutant panel displayed on yeast. **Journal of molecular biology**, v. 425, n. 2, p. 444-456, 2013.

MATHEW, Elizabeth et al. Display of the HIV envelope protein at the yeast cell surface for immunogen development. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0205756, 2018.

MIKKELSEN, Michael Dalgaard et al. Microbial production of indolylglucosinolate through engineering of a multi-gene pathway in a versatile yeast expression platform. **Metabolic engineering**, v. 14, n. 2, p. 104-111, 2012.

MIRANDA, Paulo José Cunha et al. Correlation between human papillomavirus infection and histopathological diagnosis of women in Northeast Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 12, p. 3799-3806, 2020.

NAKAMURA, Y. et al. Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 57, n. 4, p. 500-505, 2001.

O'KENNEDY, R. D.; PATCHING, J. W. Effects of medium composition and nutrient limitation on loss of the recombinant plasmid pLG669-z and β -galactosidase expression by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 319-325, 1997.

O'KENNEDY, R.; HOUGHTON, C. J.; PATCHING, J. W. Effects of growth environment on recombinant plasmid stability in *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 1995.

PAL, Asmita; KUNDU, Rita. Human papillomavirus E6 and E7: the cervical cancer hallmarks and targets for therapy. **Frontiers in microbiology**, p. 3116, 2020.

PARK, Seung-Moon et al. Surface displayed expression of a neutralizing epitope of spike protein from a Korean strain of porcine epidemic diarrhea virus. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, n. 6, p. 690-695, 2007.

PATTERSON, Robert et al. Oral application of freeze-dried yeast particles expressing the PCV2b Cap protein on their surface induce protection to subsequent PCV2b challenge in vivo. **Vaccine**, v. 33, n. 46, p. 6199-6205, 2015.

PINTO-DE-OLIVEIRA, Ana et al. Expression of HPV16 E6 oncoprotein increases resistance to several stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 8, p. 777-787, 2005.

PIRAINE, Renan Eugênio Araujo et al. Expression cassette and plasmid construction for Yeast Surface Display in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 43, n. 8, p. 1649-1657, 2021.

ROUTLEDGE, Sarah J. et al. The synthesis of recombinant membrane proteins in yeast for structural studies. **Methods**, v. 95, p. 26-37, 2016.

SCHREUDER, M. P. et al. Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. **Vaccine**, v. 14, n. 5, p. 383-388, 1996.

TANG, Hongting et al. Efficient yeast surface-display of novel complex synthetic cellulosomes. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2018.

TEYMENNET-RAMÍREZ, Karla V.; MARTÍNEZ-MORALES, Fernando; TREJO-HERNÁNDEZ, María R. Yeast Surface Display System: Strategies for Improvement and Biotechnological Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021.

YANG, Zhiliang; BLENNER, Mark. Genome editing systems across yeast species. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 66, p. 255-266, 2020.

ZANIER, Katia et al. Solution structure analysis of the HPV16 E6 oncoprotein reveals a self-association mechanism required for E6-mediated degradation of p53. **Structure**, v. 20, n. 4, p. 604-617, 2012.

ZENG, Bo-Xuan et al. Endogenous 2 μ Plasmid Editing for Pathway Engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 208, 2021.

ZHANG, Z.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology advances**, v. 14, n. 4, p. 401-435, 1996.

ZHANG, Zhigen; SCHARER, Jenö M.; MOO-YOUNG, Murray. Plasmid instability kinetics in continuous culture of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in airlift bioreactor. **Journal of biotechnol**

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho possibilitou a obtenção de linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* possibilitando a ancoragem do *scaffold*-epítopo Top7-2F5 e da oncoproteína E6 de HPV-16. A correta ancoragem e funcionalidade através da ligação de anticorpos direcionados a *tag* 6xHis e à proteína ancorada, proporcionaram o uso para futuros trabalhos em imunoreagentes e na produção de vacinas virais. Importante salientar que o uso de *scaffold* artificial ancorado em levedura para permitir a correta conformação e estrutura nativa do epítopo, facilita os estudos a cerca da triagem de anticorpos *in vitro* e abre caminho para estudos com outros epítomos virais. Também foi possível observar que o uso de sistemas de expressão multicópia garante a detecção da proteína ancorada na superfície celular, levando a acreditar que é a melhor estratégia para produção de vacinas de célula inteira do tipo *Yeast Surface Display*.

Outro ponto importante foi a demonstração da técnica do ensaio yeast-ELISA, pois foi possível detectar eficazmente a proteína ancorada na superfície celular da levedura. Embora ainda deva ser objeto de aprimoramentos, esta técnica poderá acelerar a avaliação de antígenos e proteínas, visto que não é necessário a extração e purificação para uso em imunoreagentes. Além da vantagem de utilizar a levedura para expressão da proteína recombinante, permitindo modificações necessários para o correto reconhecimento de anticorpos específico.

6 SÚMULA CURRICULAR

- Minистраção de Minicurso intitulado “YEAST SURFACE DISPLAY: SISTEMA ALTERNATIVO PARA RÁPIDA PRODUÇÃO DE VACINAS E IMUNOREAGENTES” no II Simpósio de Biologia e Biomedicina da UFPE (2020).
- Minистраção de Minicurso intitulado “YEAST SURFACE DISPLAY: SISTEMA ALTERNATIVO PARA RÁPIDA PRODUÇÃO DE VACINAS E IMUNOREAGENTES” durante o III Simpósio de Genética e Biotecnologia da UFRPE (2021).
- Participante do “II INTERNATIONAL WORKSHOP ON CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY” pelo Programa de Biologia Celular e Molecular da UPE (2021).
- Participante do evento “CONGRESSO ACADÊMICO UNIFESP VIRTUAL 2020 – CIÊNCIA E UNIVERSIDADE: TRANSFORMAÇÕES PARA A SOCIEDADE” – UNIFESP/SP (2020).
- Participante do “I CONGRESSO ONLINE EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS E EMERGENTES” pelo Conselho Regional de Farmácia de Pernambuco (2019).
- Curso de extensão “ANTICORPOS MONOCLONAIIS: CONCEITO, DESENVOLVIMENTO E MERCADO” pela Pró-reitoria de Extensão e Cultura da UNIFESP/SP (2020).
- Curso sobre “SOLUÇÕES BIOTECNOLÓGICAS APLICADAS ÀS AÇÕES DE ENFRENTAMENTO À COVID-19” pela UFPE (2020).
- Curso de “PRODUÇÃO CIENTÍFICA” realizado pela Universidade Federal do Maranhão (2020).
- Curso de extensão “PRINCÍPIOS DE PRODUÇÃO DE VACINAS NO CONTEXTO DA COVID-19” realizado pela Pró-reitoria de Extensão e Cultura – UNIFESP/SP (2020).
- Avaliadora no “CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA: REDES PARA PROMOVER E DEFENDER OS DIREITOS HUMANOS” realizado pela Pró-reitoria de Extensão da Universidade Federal de Alfengas/MG (2021).

REFERÊNCIAS

- ANANPHONGMANEE, Vorawit et al. Yeast surface display of two proteins previously shown to be protective against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. **Plos one**, v. 10, n. 6, p. e0128764, 2015.
- ANDREU, Cecilia. Yeast arming systems: pros and cons of different protein anchors and other elements required for display. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2543-2561, 2018.
- AZHAR, Siti Hajar Mohd et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 10, p. 52-61, 2017.
- BAGHBAN, Roghayyeh et al. Yeast expression systems: overview and recent advances. **Molecular biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 365-384, 2019.
- BAPTISTA, Carolina Brêttas. Imobilização de enzimas na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol a partir de amido. 2013.
- BATHURST, Ian C. et al. An experimental vaccine cocktail for *Plasmodium falciparum* malaria. **Vaccine**, v. 11, n. 4, p. 449-456, 1993.
- BAUER, Chr. Blutverlust: Physiologische Anpassungsmechanismen und therapeutischer Ersatz. **AINS-Anästhesiologie· Intensivmedizin· Notfallmedizin· Schmerztherapie**, v. 34, n. 12, p. 76-3, 1999.
- BODER, Eric T.; WITTRUP, K. Dane. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. **Nature biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 553-557, 1997.
- BRYAN, Janine T. Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. **Vaccine**, v. 25, n. 16, p. 3001-3006, 2007.
- CAPPELLARO, Corinna et al. *Saccharomyces cerevisiae* α - and α -agglutinin: characterization of their molecular interaction. **The EMBO journal**, v. 10, n. 13, p. 4081-4088, 1991.
- CARTER, Zorana; DELNERI, Daniela. New generation of loxP-mutated deletion cassettes for the genetic manipulation of yeast natural isolates. **Yeast**, v. 27, n. 9, p. 765-775, 2010.
- ÇELİK, Eda; ÇALIK, Pınar. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 5, p. 1108-1118, 2012.
- CEN, Qianhong et al. Immune evaluation of a *Saccharomyces cerevisiae*-based oral vaccine against *Helicobacter pylori* in mice. **Helicobacter**, v. 26, n. 1, p. e12772, 2021.
- CHAO, Ginger et al. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. **Nature protocols**, v. 1, n. 2, p. 755-768, 2006.

CHAO, Ginger; COCHRAN, Jennifer R.; WITTRUP, K. Dane. Fine epitope mapping of anti-epidermal growth factor receptor antibodies through random mutagenesis and yeast surface display. **Journal of molecular biology**, v. 342, n. 2, p. 539-550, 2004.

CHO, Seung Woo et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 230-232, 2013.

CHRISTMANN, Andreas et al. Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by Escherichia coli cell surface display of gene-derived random peptide libraries. **Journal of immunological methods**, v. 257, n. 1-2, p. 163-173, 2001.

CHUN, Jihwan; BAI, Jaewoo; RYU, Sangryeol. Yeast surface display system for facilitated production and application of phage endolysin. **ACS synthetic biology**, v. 9, n. 3, p. 508-516, 2020.

DARWISH, Ibrahim A. Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. **International journal of biomedical science: IJBS**, v. 2, n. 3, p. 217, 2006.

DELIC, Marizela et al. The secretory pathway: exploring yeast diversity. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 6, p. 872-914, 2013.

FAROKHINEJAD, Fahimeh et al. Generation of Nanoyeast Single-Chain Variable Fragments as High-Avidity Biomaterials for Dengue Virus Detection. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 7, n. 12, p. 5850-5860, 2021.

FRACZEK, Marcin G.; NASEEB, Samina; DELNERI, Daniela. History of genome editing in yeast. **Yeast**, v. 35, n. 5, p. 361-368, 2018.

FRIEDLAND, Ari E. et al. Heritable genome editing in C. elegans via a CRISPR-Cas9 system. **Nature methods**, v. 10, n. 8, p. 741-743, 2013.

GASSER, Brigitte et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. **Microbial cell factories**, v. 7, n. 1, p. 1-18, 2008.

GELLISSEN, Gerd; HOLLENBERG, Cornelis P. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha and Kluyveromyces lactis-a review. **Gene**, v. 190, n. 1, p. 87-97, 1997.

GERA, Nimish; HUSSAIN, Mahmud; RAO, Balaji M. Protein selection using yeast surface display. **Methods**, v. 60, n. 1, p. 15-26, 2013.

GEYSEN, H. Mario; MELOEN, Rob H.; BARTELING, Simon J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 13, p. 3998-4002, 1984.

GOFFEAU, André et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.

GRATZ, Scott J. et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. **Genetics**, v. 194, n. 4, p. 1029-1035, 2013.

GRZESCHIK, Julius et al. A simplified procedure for antibody engineering by yeast surface display: Coupling display levels and target binding by ribosomal skipping. **Biotechnology journal**, v. 12, n. 2, p. 1600454, 2017.

GÜLDENER, Ulrich et al. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. **Nucleic acids research**, v. 24, n. 13, p. 2519-2524, 1996.

GÜNDÜZ ERGÜN, Burcu et al. Established and upcoming yeast expression systems. **Recombinant Protein Production in Yeast**, p. 1-74, 2019.

HALLER, Aurelia A. et al. Whole recombinant yeast-based immunotherapy induces potent T cell responses targeting HCV NS3 and Core proteins. **Vaccine**, v. 25, n. 8, p. 1452-1463, 2007.

HEITMANN, Mareile; ZANNINI, Emanuele; ARENDT, Elke. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 7, p. 1152-1164, 2018.

HOU, Jin et al. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 5, p. 491-510, 2012.

HWANG, Woong Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 227-229, 2013.

INVITROGEN. pYD1 yeast display vector kit - user manual (2002). Disponível em: <https://www.yumpu.com/en/document/view/49535338/pyd1-yeast-display-vector-kit>. Acessado em: 17/12/2021.

JEMLI, Sonia et al. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 246-258, 2016.

JENSEN, Niels B. et al. EasyClone: method for iterative chromosomal integration of multiple genes *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 14, n. 2, p. 238-248, 2014.

JEONG, Mi-Young; RUTTER, Jared; CHOU, Danny Hung-Chieh. Display of single-chain insulin-like peptides on a yeast surface. **Biochemistry**, v. 58, n. 3, p. 182-188, 2018.

JESSOP-FABRE, Mathew M. et al. EasyClone-MarkerFree: A vector toolkit for marker-less integration of genes into *Saccharomyces cerevisiae* via CRISPR-Cas9. **Biotechnology journal**, v. 11, n. 8, p. 1110-1117, 2016.

JOZALA, Angela Faustino et al. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 51-63, 2016.

KANG, H. A. et al. Efficient production of intact human parathyroid hormone in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in yeast aspartic protease 3 (YAP3). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 187-192, 1998.

KARBANOWICZ, Thomas et al. Extracellular expression of the HT1 neurotoxin from the Australian paralysis tick in two *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Toxicon**, v. 140, p. 1-10, 2017.

KING, Thomas H. et al. A whole recombinant yeast-based therapeutic vaccine elicits HBV X, S and Core specific T cells in mice and activates human T cells recognizing epitopes linked to viral clearance. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101904, 2014.

KOMOR, Alexis C. et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 420-424, 2016.

KONDO, A.; UEDA, M. Yeast cell-surface display—applications of molecular display. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 28-40, 2004.

KOUTSOPOULOS, Sotirios. Peptide applications in biomedicine, biotechnology and bioengineering. 2017.

KUMAR, Ravinder; KUMAR, Piyush. Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application. **FEMS yeast research**, v. 19, n. 2, p. foz007, 2019.

LAGASSÉ, HA Daniel et al. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. **F1000Research**, v. 6, 2017.

LAMBERTZ, Camilla et al. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2014.

LEI, Han et al. Yeast display platform technology to prepare oral vaccine against lethal H7N9 virus challenge in mice. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2020.

LEI, Han et al. Yeast surface-displayed H5N1 avian influenza vaccines. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.

LESAGE, Guillaume; BUSSEY, Howard. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 70, n. 2, p. 317-343, 2006.

LEVY, R. et al. Fine and domain-level epitope mapping of botulinum neurotoxin type A neutralizing antibodies by yeast surface display. **Journal of molecular biology**, v. 365, n. 1, p. 196-210, 2007.

- LI, Geng et al. Identification of tumour antigens by serological analysis of cDNA expression cloning. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, n. 3, p. 139-143, 2004.
- LI, Xiaobo et al. Construction and characterization of a thermostable whole-cell chitinolytic enzyme using yeast surface display. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 2577-2585, 2014.
- LINCIANO, Sara et al. Molecular evolution of peptides by yeast surface display technology. **MedChemComm**, v. 10, n. 9, p. 1569-1580, 2019.
- LIPKE, Peter N.; KURJAN, Janet. Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. **Microbiological reviews**, v. 56, n. 1, p. 180-194, 1992.
- LIU, Zhuo et al. Recent advances in yeast cell-surface display technologies for waste biorefineries. **Bioresource technology**, v. 215, p. 324-333, 2016.
- MA, Yanping et al. Oral vaccination using Artemia coated with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing cyprinid herpesvirus-3 envelope antigen induces protective immunity in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) larvae. **Research in veterinary science**, v. 130, p. 184-192, 2020.
- MAO, Yanfei et al. Application of the CRISPR–Cas system for efficient genome engineering in plants. **Molecular plant**, v. 6, n. 6, p. 2008-2011, 2013.
- MATA-FINK, Jordi et al. Rapid conformational epitope mapping of anti-gp120 antibodies with a designed mutant panel displayed on yeast. **Journal of molecular biology**, v. 425, n. 2, p. 444-456, 2013.
- MATHEW, Elizabeth et al. Display of the HIV envelope protein at the yeast cell surface for immunogen development. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0205756, 2018.
- MATSUOKA, Hiroyuki et al. Cell wall structure suitable for surface display of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 67-76, 2014.
- MISCHO, Axel et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad antibody responses in humans, a RAYS-based analysis. **International journal of oncology**, v. 39, n. 1, p. 287-294, 2011.
- NGUYEN, Ngoc-Luong et al. Expression and purification of an immunogenic dengue virus epitope using a synthetic consensus sequence of envelope domain III and *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, n. 2, p. 235-242, 2013.
- NICAUD, Jean-Marc et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **FEMS yeast research**, v. 2, n. 3, p. 371-379, 2002.
- PADDON, Chris J.; KEASLING, Jay D. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 355-367, 2014.

PARK, Min-A.; KIM, Hyoung Jin; KIM, Hong-Jin. Optimum conditions for production and purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein expression and purification**, v. 59, n. 1, p. 175-181, 2008.

PATTERSON, Robert et al. Yeast-surface expressed BVDV E2 protein induces a Th1/Th2 response in naïve T cells. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 37, n. 1, p. 107-114, 2012.

PETERSEN, Anne; JOSEPHSEN, Jytte; JOHNSEN, Mads G. TPW22, a lactococcal temperate phage with a site-specific integrase closely related to *Streptococcus thermophilus* phage integrases. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 22, p. 7034-7042, 1999.

PRABAKARAN, Sudhakaran et al. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 4, n. 6, p. 565-583, 2012.

PUMPENS, Paul et al. Evaluation of HBs, HBc, and frCP virus-like particles for expression of human papillomavirus 16 E7 oncoprotein epitopes. **Intervirology**, v. 45, n. 1, p. 24-32, 2002.

REIDER APEL, Amanda et al. A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic acids research**, v. 45, n. 1, p. 496-508, 2017.

RYU, Seunghyun; KARIM, Muhammad Nazmul. A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 529-542, 2011.

SATO, N. et al. Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 469-474, 2002.

SCHÜÜRMAN, Jan et al. Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 19, p. 8031-8046, 2014.

SHIBASAKI, Seiji; UEDA, Mitsuyoshi. Bioadsorption strategies with yeast molecular display technology. **Biocontrol Science**, v. 19, n. 4, p. 157-164, 2014.

SHIBASAKI, Seiji; UEDA, Mitsuyoshi. Oral vaccine development by molecular display methods using microbial cells. **Vaccine Design**, p. 497-509, 2016.

SHIN, Sung Jae et al. Expression of apxIA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of veterinary science**, v. 4, n. 3, p. 225-228, 2003.

SMITH, George P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, 1985.

SMITH, Mason R.; KHERA, Eshita; WEN, Fei. Engineering novel and improved biocatalysts by cell surface display. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 54, n. 16, p. 4021-4032, 2015.

SMITS, Gertien J. et al. Cell wall dynamics in yeast. **Current opinion in microbiology**, v. 2, n. 4, p. 348-352, 1999.

TERRENCE DOLAN, C. A practical approach to identification of yeast-like organisms. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 5, p. 580-590, 1971.

THAK, Eun Jung et al. Yeast synthetic biology for designed cell factories producing secretory recombinant proteins. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 2, p. foaa009, 2020.

THIM, Lars et al. Secretion and processing of insulin precursors in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 18, p. 6766-6770, 1986.

TIAN, S. et al. Design and construction of synthetic cellulosome with three adaptor scaffoldins for cellulosic ethanol production from steam-exploded corn stover. **Cellulose**, v. 26, n. 15, p. 8401-8415, 2019.

TOMOKO, Tokunaga et al. Expression of a synthetic human growth hormone gene in yeast. **Gene**, v. 39, n. 1, p. 117-120, 1985.

UEDA, Mitsuyoshi. Establishment of cell surface engineering and its development. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 80, n. 7, p. 1243-1253, 2016.

UNGER, Tamar et al. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. **Journal of structural biology**, v. 172, n. 1, p. 34-44, 2010.

UPADHYAYA, Bhaskar; MANJUNATH, Ramanathapuram. Baker's yeast expressing the Japanese encephalitis virus envelope protein on its cell surface: induction of an antigen-specific but non-neutralizing antibody response. **Yeast**, v. 26, n. 7, p. 383-397, 2009.

VALENZUELA, Pablo et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. **Nature**, v. 298, n. 5872, p. 347-350, 1982.

VAN DER VAART, J. MARCEL et al. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 11, p. 3104-3110, 1995.

VIEIRA GOMES, Antonio Milton et al. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. **Microorganisms**, v. 6, n. 2, p. 38, 2018.

WAGNER, James M.; ALPER, Hal S. Synthetic biology and molecular genetics in

non-conventional yeasts: current tools and future advances. **Fungal Genetics and Biology**, v. 89, p. 126-136, 2016.

WALKER, Graeme M.; STEWART, Graham G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 2016.

WANG, Hua et al. Epitope-focused immunogens against the CD4-binding site of HIV-1 envelope protein induce neutralizing antibodies against auto-and heterologous viruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 3, p. 830-846, 2018.

WANG, Long-jiang et al. Protective immune response against *Toxoplasma gondii* elicited by a novel yeast-based vaccine with microneme protein 16. **Vaccine**, v. 36, n. 27, p. 3943-3948, 2018b.

WANG, Y. et al. High-level secretory production of recombinant human platelet-derived growth factor-BB by *Saccharomyces cerevisiae* under the non-selective conditions. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 45, n. 2, p. 156-161, 2009.

WANG, Z. et al. A new yeast display vector permitting free scFv amino termini can augment ligand binding affinities. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 18, n. 7, p. 337-343, 2005.

WEAVER-FELDHAUS, Jane M. et al. Yeast mating for combinatorial Fab library generation and surface display. **FEBS letters**, v. 564, n. 1-2, p. 24-34, 2004.

WOOD, V. K. M. R. et al. A re-annotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, n. 3, p. 143-154, 2001.

YANG, Zhiliang; BLENNER, Mark. Genome editing systems across yeast species. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 66, p. 255-266, 2020.

YOO, Su Jin; MOON, Hye Yun; KANG, Hyun Ah. Screening and selection of production strains: secretory protein expression and analysis in *Hansenula polymorpha*. **Recombinant Protein Production in Yeast**, p. 133-151, 2019.

ZAHRADNÍK, Jiří et al. A protein-engineered, enhanced yeast display platform for rapid evolution of challenging targets. **ACS synthetic biology**, v. 10, n. 12, p. 3445-3460, 2021.

ZHANG, Zhongwei et al. Generation of glucagon-like peptide-2-expressing *Saccharomyces cerevisiae* and its improvement of the intestinal health of weaned rats. **Microbial biotechnology**, v. 9, n. 6, p. 846-857, 2016.

ZHAO, Shixue et al. Expression of flagellin at yeast surface increases biocontrol efficiency of yeast cells against postharvest disease of tomato caused by *Botrytis cinerea*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 162, p. 111112, 2020.