

## **Processo 01200.003590/2009-85**

Assunto: Pedido de liberação comercial de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) geneticamente modificada para produção de farneseno cepa Y1979

Requerente: Amyris Crystalsev Pesquisa e Desenvolvimento de Biocombustíveis Ltda.

### **Parecer Técnico**

#### **Fundamentação técnica**

O produto que trata a presente liberação comercial é “farneseno” sintetizado pela linhagem geneticamente modificada - Y1979, da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, usando a cana de açúcar como matéria prima. A levedura foi modificada por engenharia genética pela inserção de um gene que codifica a farneseno sintase, oriundo da planta medicinal *Artemisia annua*. Esta enzima é necessária para a conversão de um metabólito secundário natural, o farnesil difosfato (FPP) em  $\beta$ -farneseno na rota do mevalonato citoplasmático, mostrada a seguir:

Açúcar de cana → Piruvato → Acetil CoA → Mevalonato → FPP → Farneseno → Diesel

O produto final é secretado pela célula da levedura na forma de um diesel derivado de  $\beta$ -farneseno (formula  $C_{15}H_{24}$ ), a partir de processos de hidrogenação industrial. É recomendado para uso em veículos automotores e, segundo a empresa requerente, o diesel de cana de açúcar mostra um desempenho tão bom quanto o diesel derivado do petróleo e deverá reduzir as emissões de gás de efeito estufa, por ser um hidrocarboneto purificado.

#### **Caracterização do OGM**

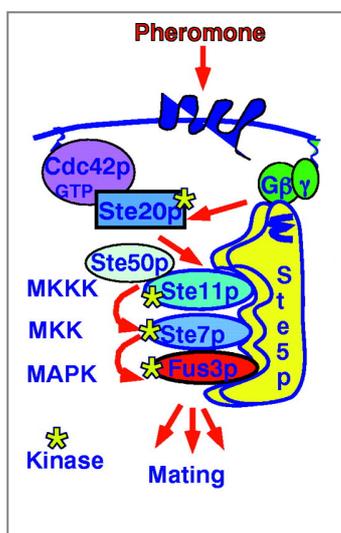
A linhagem industrial Y1198 (ou PE-2) foi induzida à esporulação para obtenção uma tétrade de quatro esporos haplóides dos quais um (MAT $\alpha$ ) foi engenheirado. A

modificação chave foi a introdução de um gene, *FS*, que codifica a enzima farneseno sintase, a qual converte o farnesil difosfato (FPP) em farneseno na rota do mevalonato. Além disso, foram inseridos os genes endógenos da rota do mevalonato arranjados *in tandem*, de tal sorte a aumentar o fluxo de carbono dentro da rota provendo mais substrato FPP para a FS do que proveria somente a rota nativa, visando ampliar o rendimento e a síntese do produto de interesse. A superexpressão desses genes foi obtida após a transformação da linhagem receptora com cassetes de integração específicos. Estes cassetes foram obtidos após a seleção dos seus elementos (genes, promotores e terminadores, além de marcadores de seleção) em uma biblioteca plasmidial. Para ligar estes elementos *in tandem* adotou-se uma estratégia chamada construção modular que é ilustrada nas páginas 19 a 21 do processo. A integração de todos os elementos genéticos da rota se fez em etapas e é complexa. **Resumidamente, a primeira integração se deu em um loco específico do cromossomo 13, onde foram inseridos todos os genes necessários para converter a acetil-CoA citoplasmática em mevalonato (ERG10, ERG13, tHMG1). As outras integrações se deram em locos específicos dos cromossomos 3 e 8 e incluem todos os elementos necessários para converter o mevalonato citoplasmático em FPP. Todas as integrações ocorreram por recombinação homóloga. Importante dizer que os marcadores de seleção de resistência a antibióticos usados em cada etapa (HygR, cromossomo 13; NatR, cromossomo 3; KanR, cromossomo 8) foram removidos ou nocauteados pela integração dos cassetes contendo o gene da farneseno sintase dirigido pelo promotor GAL7, a enzima que converte o FPP citoplasmático em farneseno.**

Todas as seqüências nucleotídicas dos cassetes introduzidos referentes à rota endógena, assim como a seqüência exógena da farneseno sintase de *Artemisia annua* otimizada para expressão em *S. cerevisiae* constam do processo. Toda a rota se passa no citoplasma e, segundo informações prestadas pela empresa em resposta a questionamentos por mim encaminhados a Secretaria Executiva da CTNBio, não se tem conhecimento se o farneseno é transportado ativamente para fora da célula por uma proteína de transporte ou se é exportado por difusão passiva através da membrana, no meio de fermentação.

**Também, foram nocauteados os genes STE5 e IME1 gerando uma linhagem que não é capaz de se reproduzir sexualmente e de esporular. O gene *Ste5p* é requerido para**

a ativação da cascata de “mating MAPK” (veja figura e quadro explicativo<sup>1</sup>) em resposta a feromonios ou sinalizadores químicos sexuais. Linhagens em que STE5 é ausente mostraram uma redução na capacidade de se reproduzir em até seis ordens de magnitude<sup>2</sup>. Já o gene IME1 é o principal regulador transcricional da meiose e mutantes com esta deleção falham em esporular<sup>3</sup>.



Scaffold proteins play pivotal roles during signal transduction. In *Saccharomyces cerevisiae*, the Ste5p scaffold protein is required for activation of the mating MAPK cascade in response to mating pheromone and assembles a G protein-MAPK cascade complex at the plasma membrane. To serve this function, Ste5p undergoes a regulated localization event involving nuclear shuttling and recruitment to the cell cortex...Ste5p is also subject to two types of phosphorylation and increases in abundance as a result of MAPK activation. During vegetative growth, Ste5p is basally phosphorylated through a process regulated by the CDK Cdc28p. During mating pheromone signaling, Ste5p undergoes increased phosphorylation by the mating MAPK cascade. Multiple kinases of the mating MAPK cascade contribute to pheromone-induced phosphorylation of Ste5p, with the mating MAPKs contributing the most. Pheromone induction or overexpression of the Ste4p Gβ subunit increases the abundance of Ste5p at a post-translational step, as long as the mating MAPKs are present. Increasing the level of MAPK activation increases the amount of Ste5p at the cell cortex. Analysis of Ste5p localization mutants reveals a strict requirement for Ste5p recruitment to the plasma membrane for the pheromone-induced phosphorylation.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, os genes MAT asseguram que somente as células diplóides entrem em meiose enquanto as células haplóides entram em uma fase quiescente do ciclo celular, não metabólica, dita G0. Células diplóides entram em um programa de diferenciação, dito esporulação (veja figura retirada de Govin & Berger, 2009<sup>4</sup>). Em determinadas condições ambientais não favoráveis, as células entram em

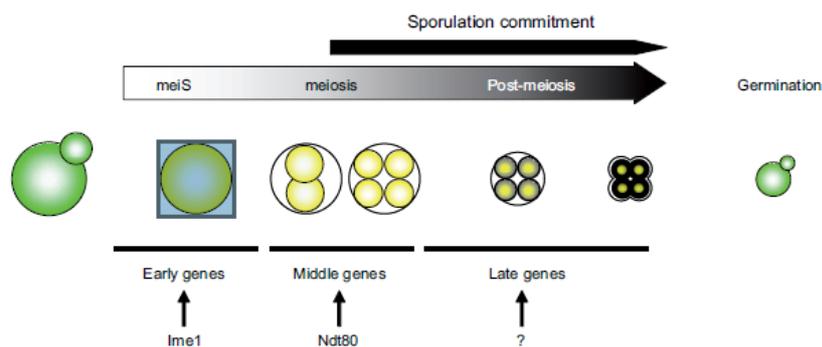
<sup>1</sup> Flotho, A. et al. Localized feedback phosphorylation of ste5p scaffold by associated mapk cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, v. 279: p. 47391-47401

<sup>2</sup> Elion, E.A. The Ste5p scaffold. *Journal of Cell Science*, 2001, v. 114 (22): p.3967-3978.

<sup>3</sup> Kassir, Y. et al. IME1, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell*, 1988, v.52: p. 853-862

<sup>4</sup> Govin, J. & Berger, SL. Genome reprogramming during sporulation. *Int. J. Dev. Biol.*, 2009. v. 53: p. 425-432

meiose a partir de uma fase diplóide, gerando células haplóides recombinantes. Este é um mecanismo natural de geração de variabilidade genética por recombinação. O estado pós-meiótico culmina na formação do esporo; ocorrem vários eventos associados à reorganização da cromatina, incluindo a execução de um programa transcricional que envolve cerca de mil genes em 10 *clusters* gênicos. O principal regulador de todo o processo é o gene *IME1* o qual induz à expressão de genes que codificam proteínas necessárias à fase S do ciclo celular. **As etapas do trabalho de nocaute dos genes *STE5* e *IME1* são detalhadamente descritas no processo. Por exemplo, o gene *IME1* foi nocauteado pelo cassete contendo *LEU2* e uma cópia do gene da *FS* dirigida pelo promotor *TDH3*.**



**Fig. 1. Sporulation overview.** Upon nutrient starvation, diploid yeast ceases vegetative growth (green cells) and induces sporulation (yellow cells). During the meiotic S phase (*meiS*), the genome is duplicated and prepared for meiosis. Meiosis generates four haploid cells, which differentiate into spores via compaction of the nucleus and the construction of the spore wall. When nutrients become available, spores germinate and begin a new vegetative cycle. Commitment describes a time frame when spores cannot start a new vegetative cycle without finishing the entire sporulation program, even if new nutrients become available. During sporulation, three main classes of genes, called early, middle and late genes, are induced in succession by several key transcription factors (*Ime1* and *Ndt80*). It remains unclear how late genes are induced.

Foram nove etapas para finalizar a geração da linhagem engenheirada, sendo a última delas caracterizada pela transformação transitória pela inserção independente dos plasmídeos *HO* e *STE5*, visando permitir a linhagem tornar-se competente para o cruzamento (*MAT $\alpha$*  X *MAT $\alpha$* ). Colônias advindas desta co-transformação foram cultivadas em meio não seletivo e aqueles diplóides sensíveis e PCR-positivos para os genes introduzidos foram selecionados, de tal sorte que a linhagem final – Y1979 – é um diplóide de núcleos idênticos.

## **Análise de risco**

O primeiro aspecto a ser comentado diz respeito à espécie *Artemisia annua* como organismo doador do gene que codifica a farneseno sintase e o seu produto  $\beta$ -farneseno. Não há evidências na literatura que essa planta seja tóxica, sendo, inclusive, usada como medicinal, assim como a enzima em questão não oferece toxicidade. O  $\beta$ -farneseno é um feromônio natural, secretado em doses baixas por afídeos mediante situações de perigo, não é persistente no ambiente, sendo volátil no ambiente<sup>5</sup>. A planta, por sua vez, ao emitir o farneseno repele esses afídeos.

Igualmente, há muitas evidências de que a levedura de panificação é segura, sendo a principal delas a sua ampla utilização para a produção de pães, cerveja e vinho há séculos e, mais recentemente, para a produção industrial de etanol.

O órgão norte americano NIH (*National Institutes of Health*) considera este microrganismo tão seguro que dispensa certos procedimentos de avaliação de risco, conforme explicitado no Appendix C-III. *Saccharomyces* Host-Vector Systems (veja [http://oba.od.nih.gov/oba/rac/guidelines\\_02/NIH\\_Guidelines\\_Apr\\_02.htm](http://oba.od.nih.gov/oba/rac/guidelines_02/NIH_Guidelines_Apr_02.htm)).

*Segurança ambiental: sobrevivência da Y1979, capacidade de produção de esporos e ecotoxicidade*

A Amyris realizou diversas avaliações de risco para comparar o comportamento da linhagem Y1979 comparativamente à linhagem PE-2, da qual é derivada por engenharia genética e que é comumente usada no Brasil para a produção de etanol industrial. Y1979 mostrou-se menos apta que PE-2, com índices de sobrevivência mais baixos.

Quando as linhagens Y1979 e PE-2 são cultivadas em meio indutor de esporulação, durante 7 dias, 95% das células PE-2 mostram-se sob a forma de tétrades

---

<sup>5</sup> Qiao, H. *et al.* Discrimination of alarm pheromone (E)- $\beta$ -farnesene by aphid odorant-binding proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, v. 39, p. 414-419 (DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.03.004)

resultantes da meiose, enquanto Y1979 não sofre esporulação e, portanto, não entra em processo meiótico. Isto é resultante das deleções provocadas nos genes STE5 e IME1.

Certas análises de risco foram realizadas pela Amyris, porém outros estudos foram realizados em laboratórios independentes, contratados pela Amyris, cujos resultados se encontram em Anexos do processo. Não foram detectadas diferenças significativas entre as linhagens Y1979 e PE-2 relativamente a sua ação no solo, sobre a qualidade da água de rio ou doméstica ou em organismos que incluem aves, microcrustáceos, peixes e a microbiota de solo.

Os transgenes inseridos na Y1979 têm origem na própria levedura com exceção do gene que codifica a FS, que é originário de artemísia e não mostram homologia a alérgenos ou toxinas conhecidas e não há efeitos adversos atribuídos a estes genes para a saúde humana e animal.

Ensaio para avaliar a possível ação da Y1979 comparativamente a da PE-2 em plantações de cana de açúcar irrigadas com as respectivas vinhaças mostraram que não há diferenças entre as linhagens da levedura GM e não GM sobre as plantações e sobre a decomposição e as propriedades químicas do solo.

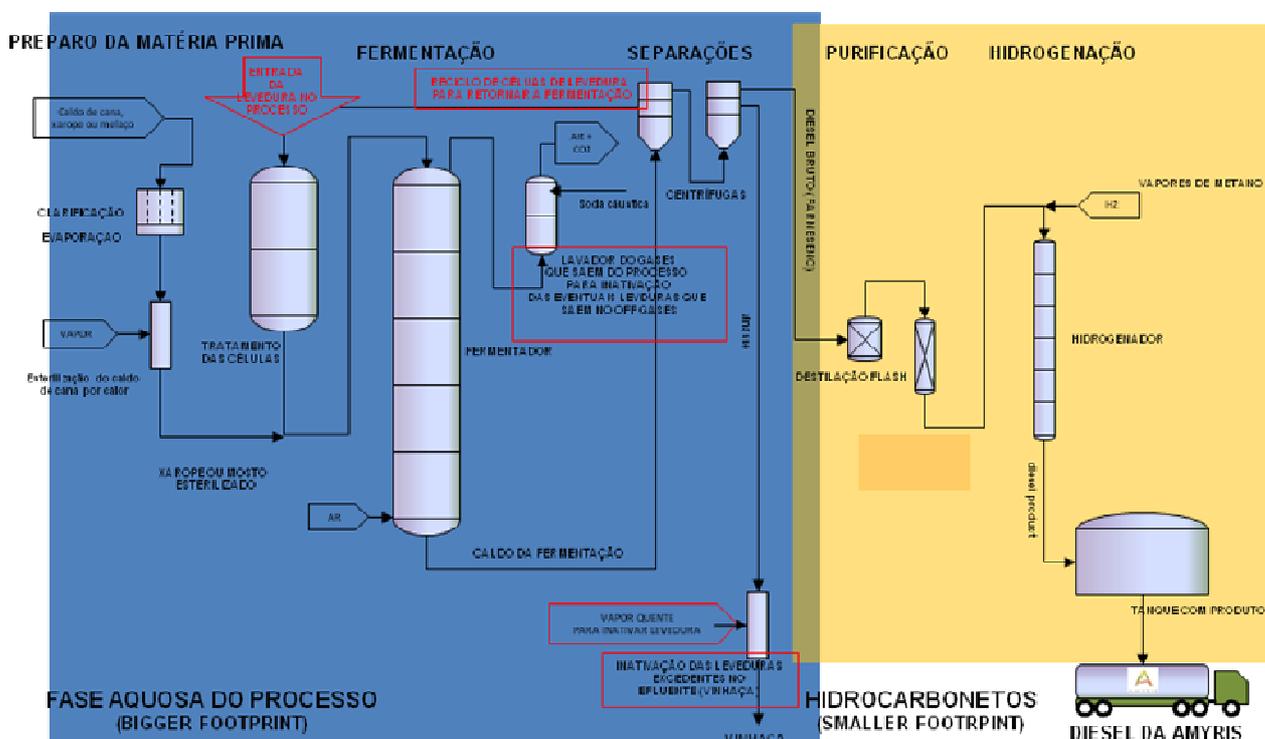
#### *Segurança do processo industrial e do produto a ser liberado*

Durante o processo fermentativo na indústria devem-se levar em consideração os riscos de escape da levedura GM ao ambiente. As células se multiplicam vegetativamente nos fermentadores e a empresa se propõe a adotar um protocolo no qual a linhagem GM é inativada por calor, gerado por vapor a altas temperaturas, após a fermentação. Isto visa minimizar a liberação de células vivas no ambiente industrial.

O processo produtivo, desde a alimentação do pré-fermentador (que é o tanque para multiplicação e preparo do inóculo), passando pela alimentação das dornas de fermentação, até as centrífugas de separação, tudo é feito em sistema absolutamente fechado, cujo fluxo se dá por tubulações e bombas de alimentação. As leveduras oriundas do processo fermentativo são recicladas e retroalimentam as dornas. As células excedentes e todo o efluente de fermentação (que é conhecido por *vinhaça*) serão inativadas por calor. Dados apresentados no processo às folhas 112 a 114 mostram que

Y1979 deixa de se multiplicar quando aquecida a 66°C por 120 s, independente se suspensas em água ou em vinhaça. Uma vez que o calor gerado no processo industrial é da ordem de 120°C, isto garante, praticamente, a morte de 100% das células.

O fluxograma dos fermentadores foi enviado pela empresa em resposta à solicitação por mim encaminhada à Secretaria Executiva da CTNBio. Segue-se um esquema do processo industrial, ilustrando este parecer.



Por fim, tenho a relatar que a requerente contratou a empresa *MB Research Laboratories* (localizada em Spinnerstown, PA, USA) para realizar testes de sensibilidade de camundongos ao farneseno como DL50, sensibilidade dermal e dos olhos. Os resultados desses testes se encontram nos Anexos B1 (toxicidade oral aguda), B2 (toxicidade dermal aguda), B3 (irritação aguda aos olhos), B4 (ensaio de mutação reversa) e B5 (ensaio com linfonodos) e indicam ser baixa a toxicidade do β-farneseno.

Em escala comercial, o diesel da Amyris será misturado ao diesel do petróleo o que deve resultar em uma baixa exposição dos frentistas ao farneseno. Recomenda-se

evitar contato com a pele, olhos, ingestão e inalação do produto, a exemplo do que é recomendado para outras substâncias voláteis similares.

### **Parecer final**

*Diante do exposto, me manifesto favorável à liberação comercial da linhagem Y1979 de Saccharomyces cerevisiae, geneticamente modificada para a produção industrial de farneseno pela empresa **Amyris Pesquisa e Desenvolvimento de Biocombustíveis**, por julgar que a referida liberação atende às normas preconizadas na lei brasileira de biossegurança.*