



Aplicações evolutivas (2021/2022)

3. Desenvolvimento de drogas, enzimas e vias metabólicas de interesse agroindustrial

3.1. Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz.

3.2. Evolução de moléculas em laboratório.

Conceitos

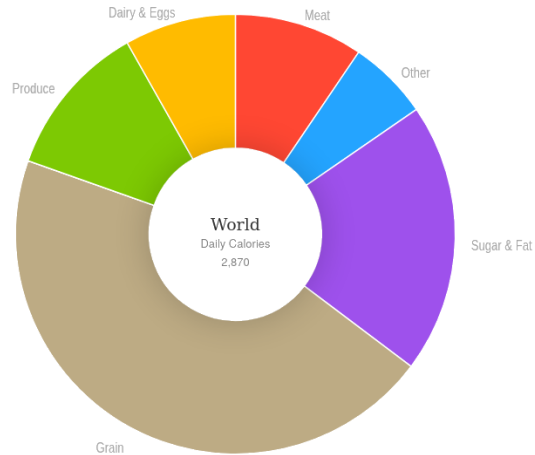
Biologia Evolutiva de sistemas; design racional e seleção dirigida; coeficiente seletivo; probabilidade de fixação; seleção e deriva



Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz

O problema – produtividade prevista inferior às necessidades alimentares

Consumo diário individual de calorias por tipo de alimento



Varição da produtividade e necessidades previstas para 2050



Henry & Nevo (2014). Exploring natural selection to guide breeding for agriculture. *PlantBiotechJ*



Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz

O problema II – fotorrespiração reduz produtividade

Table 1 Current and future predictions of mean global CO₂ and temperatures according to the IPCC Fifth Assessment Report (38)

Scenario	Ambient CO ₂	Temperature increase	Average model temperature
Current conditions	400 ppm	0.0°C	22.4°C
RCP 2.6	450 ppm	1.0°C	23.4°C
RCP 8.5	1,000 ppm	3.7°C	26.1°C

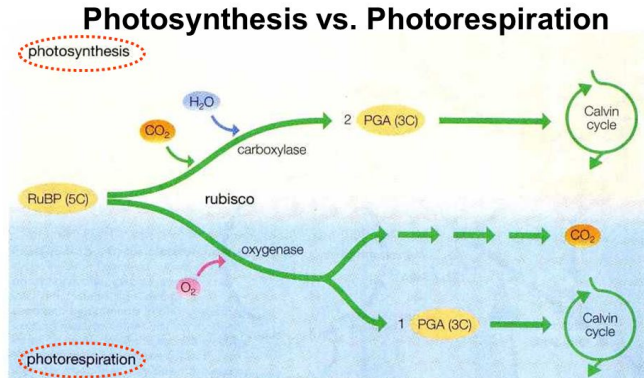


Table 2 Modeled production gain to eliminate photorespiration under current and future climates for the top US C₃ crops

Crop	With PR			Without PR		
	Current conditions	RCP 2.6	RCP 8.5	Current conditions	RCP 2.6	RCP 8.5
Average yield (bu/ac)						
Soybean	37.8	44.6	63.4	65.7	66.3	78.0
Wheat	39.1	42.8	60.0	48.8	52.7	65.3
Total production (Gbu)						
Soybean	2.35	2.71	3.78	3.70	3.74	4.50
Wheat	1.87	2.02	2.81	2.33	2.49	3.07
Total calories (TC)						
Soybean	211	243	339	332	335	404
Wheat	111	120	167	138	148	182
Total	322	363	506	470	483	586
Loss to PR	31%	25%	14%	NA		

Walker et al (2016) The costs of photorespiration to food production now and in the future. *AnnuRevPlantBiol*



Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz

Plantas C3

- Cevada
- Aveia
- Arroz
- Trigo
- Alfafa
- Algodão
- Girassol
- Soja
- ...

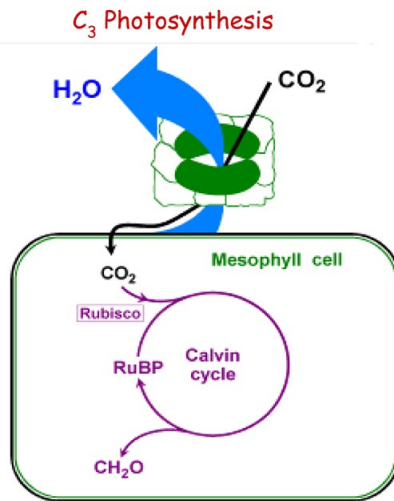
Plantas C4

- Milho
- Cana-de-açúcar
- Sorgo
- Painço/Milhete
- ...



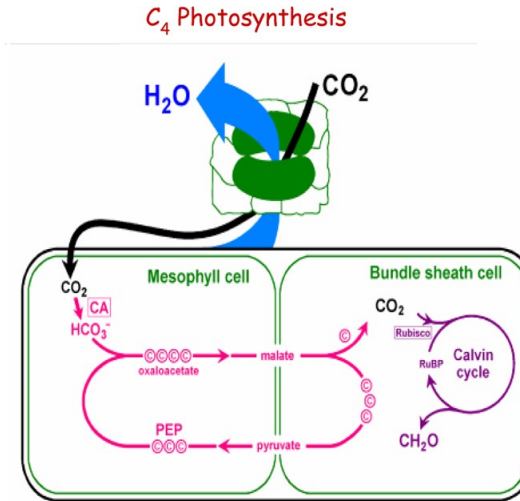
Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz

Plantas C3



Fixação do CO₂ em células do mesófilo vs células do feixe vascular
Mecanismo de concentração de CO₂ em plantas C4

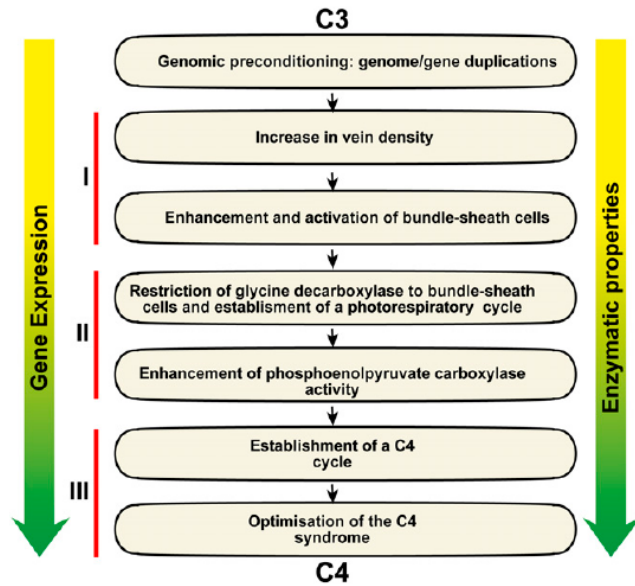
Plantas C4



Anatomia Kranz (2 células)



Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz



Gowik & Westoff (2011). The path from C3 to C4 photosynthesis. *PlantPhysiol*

A evolução de C3 em C4 é polifilética

Todos os genes necessários a C4 já existem em plantas C3

Expressão génica de folhas C3 e C4 difere apenas 3%



Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz

Table 1 A selection of systems-based analyses of C₄ Kranz anatomy and C₄ cycle integration (augmented from Fouracre *et al.*, 2014)

Author	Species	Experiment	Biological system	Methodology	Developmental stage
Li <i>et al.</i> (2010)	Maize	Developmental gradient of expanding foliar leaf (including BS and M cell isolates)	Transcriptome	Illumina sequencing	BS and M cell specification, C ₄ cycle integration
Majeran <i>et al.</i> (2010)	Maize	Developmental gradient of expanding foliar leaf (including BS cell isolates)	Proteome	LC-MS, MS-MS	BS and M cell specification, C ₄ cycle integration
Friso <i>et al.</i> (2010)	Maize	Leaf tip chloroplasts specific to BS & M cell	Proteome	LC-MS, MS-MS	C ₄ cycle integration
Dal'Molin <i>et al.</i> (2010)	Maize, sugarcane, sorghum	Metabolic model of BS and M cells	Metabolome, proteome	Computational modelling	C ₄ cycle integration
Pick <i>et al.</i> (2011)	Maize	Developmental gradient of expanding foliar leaf	Transcriptome, metabolome	Microarray, GC-MS, LC-MS	BS and M cell specification, C ₄ cycle integration
Bräutigam <i>et al.</i> (2011)	<i>Cleome</i> (C ₃ , C ₄)	Fully mature leaves	454 sequencing	Transcriptome	C ₄ cycle integration
Gowik <i>et al.</i> (2011)	<i>Flaveria</i> (C ₃ , C ₃ -C ₄ , C ₄)	Fully mature leaves	454 sequencing	Transcriptome	C ₄ cycle integration
Furumoto <i>et al.</i> (2011)	<i>Cleome</i> (C ₃ , C ₄), <i>Flaveria</i> (C ₃ , C ₄)	Fully mature leaves	Transcriptome	differential complementary DNA screening, NGS of mRNA	C ₄ cycle integration
Chang <i>et al.</i> (2012)	Maize	BS & M cells from mid- section of expanded leaf	Transcriptome	Illumina sequencing	BS and M cell specification, C ₄ cycle integration
Heckmann <i>et al.</i> (2013)	<i>Flaveria</i> (C ₃ , C ₃ -C ₄ , C ₄), <i>Moricandia</i> (C ₃ -C ₄), <i>Panicum</i> (C ₃ -C ₄ , C ₄)	Metabolic model of C ₄ evolution	Metabolome	Computational modelling	C ₄ cycle integration
Liu <i>et al.</i> (2013b)	Maize	Pooled embryonic leaves	Transcriptome	Illumina sequencing	Procambium initiation; BS and M cell specification
Wang <i>et al.</i> (2013)	Maize	Foliar and husk leaf primordia plus expanding and expanded leaves	Transcriptome	Illumina sequencing	Procambium initiation; BS and M cell specification, C ₄ cycle integration
Aubry <i>et al.</i> (2014)	<i>G. gynandra</i>	Developmental gradient of leaf	Transcriptome	Illumina sequencing	BS and M cell specification C ₄ cycle integration
John <i>et al.</i> (2014)	<i>Setaria viridis</i>	BS and M cells from mid- section of expanded leaf	Transcriptome	Computational modelling	BS and M cell specification C ₄ cycle integration
Külahoglu <i>et al.</i> (2014)	<i>G. gynandra</i> (C ₄) and <i>Tarenaya hassleriana</i> (C ₃)	Expanded leaves	Transcriptome	Illumina sequencing	BS and M cell specification C ₄ cycle integration
Bräutigam <i>et al.</i> (2014)	<i>Megathyrsus maximus</i> (C ₄) <i>Dichanthelium clandestinum</i> (C ₃)	3 rd expanded leaf	Transcriptome	Illumina sequencing	C ₄ cycle integration
Wang <i>et al.</i> (2014a)	Rice, maize	Developmental leaf gradient	Transcriptome; metabolome	Illumina sequencing; computational modelling	BS and M cell specification; C ₄ cycle integration; Candidate <i>cis</i> -regulatory elements for BS and M cell-specific expression
Li <i>et al.</i> (2015)	<i>Haloxylon ammodendron</i> cotyledons (C ₃) and shoot (C ₄)	Cotyledons and 10-day-old assimilating shoots	Transcriptome	Illumina sequencing	Procambium initiation; BS and M cell specification, C ₄ cycle integration

Biologia de sistemas utilizada para identificar quais os componentes (genes) essenciais para o fenótipo C₄

- Modelação computacional
- Rede metabólica da fotossíntese C₄
- Estimação de fluxos metabólicos
- Estimação da energia necessária



Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz

Engenharia de C4 a partir de plantas C3

Concentração de CO₂ no cloroplasto de *Hydrilla*

Clonagem de genes de milho em arroz

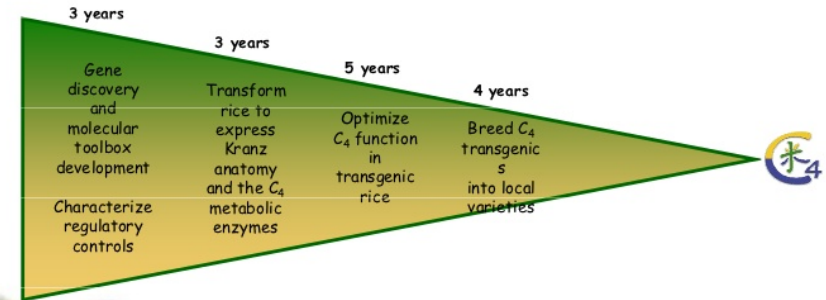
Sub-expressão de genes de arroz

Transferência da fotorrespiração para as células do feixe vascular

Dificuldades com a alteração de genes com efeitos pleiotrópicos

The Timeline for C4 Rice

It will likely take a minimum of 15 years of coordinated research carried out in the laboratories of the C4 Rice Consortium to deliver C4 rice to plant breeders in the developing world.

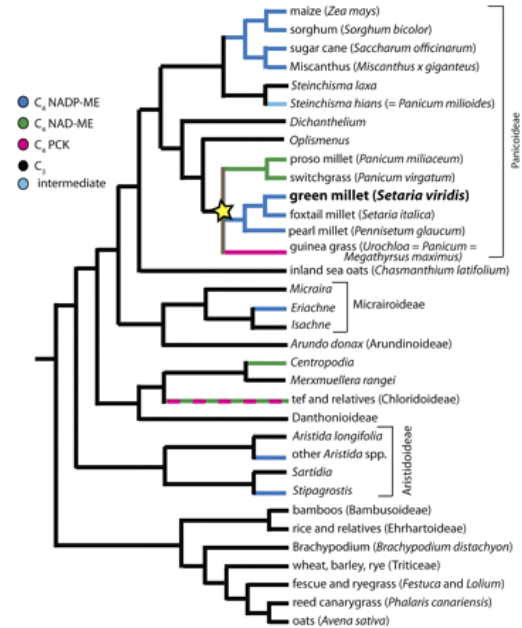




Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz

Evolução dirigida

1. Edição de genomas/transformação génica (genes de *sister taxa*)

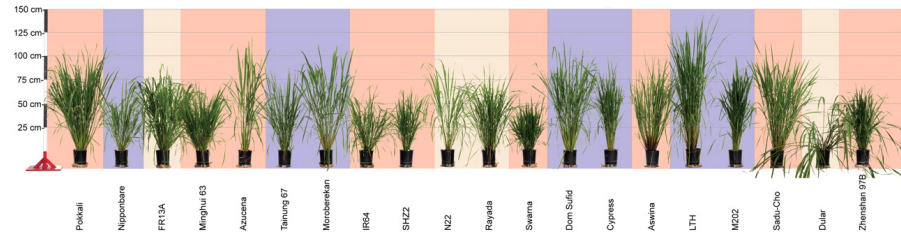




Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz

Evolução dirigida

1. Edição de genomas/transformação génica (genes de *sister taxa*).
2. Screening de linhas com maior biomassa em condições de baixo CO₂.

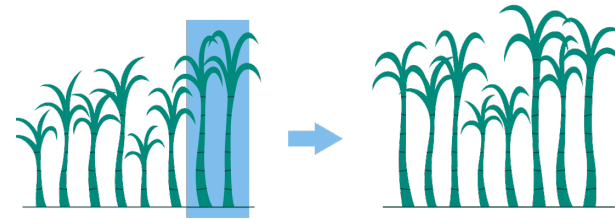




Conversão de metabolismo C3 em C4 em arroz

Evolução dirigida

1. Edição de genomas/transformação génica (genes de *sister taxa*).
2. Screening de linhas com maior biomassa em condições de baixo CO₂.
3. Seleção artificial para performance fotossintética e/ou anatomia Kranz.





Evolução de moléculas em laboratório

O problema – como obter novas moléculas de interesse?

“Thus (directed protein) evolution becomes a search on a new fitness landscape, where fitness is performance and is defined by the artificial selection I impose” (Frances H. Arnold, Nobel lectures 2019)

Design racional

Evolução dirigida



Evolução de moléculas em laboratório

O problema – como obter novas moléculas de interesse?

Evolução dirigida

- mutação + screening

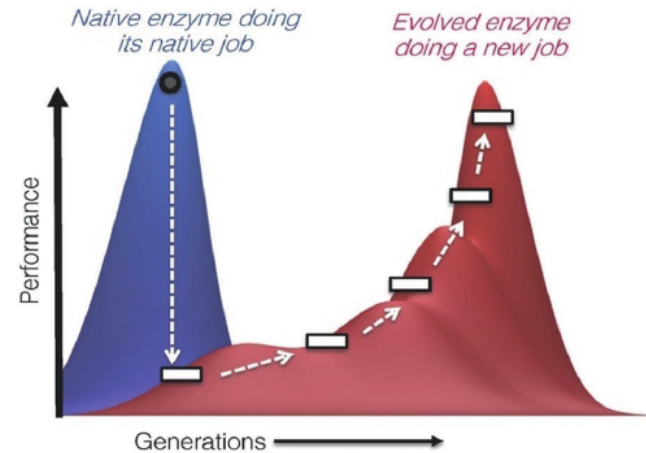
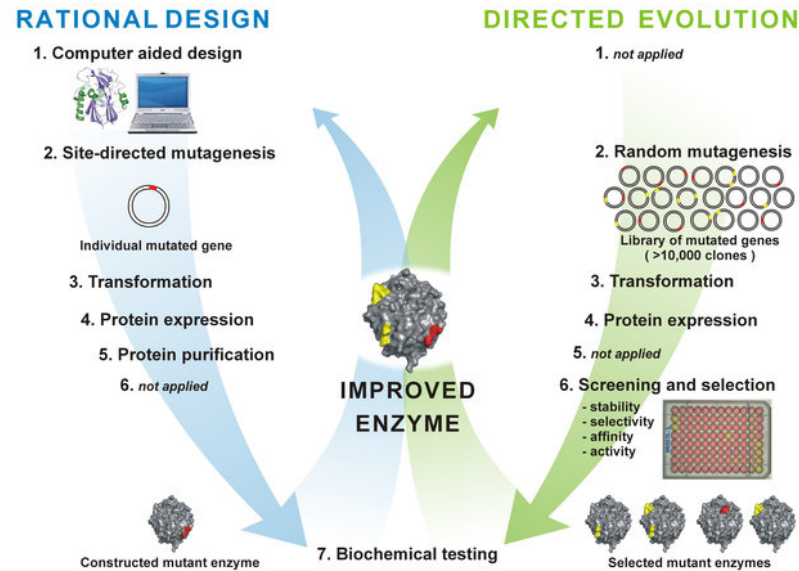


Figure 1. An enzyme whose function is optimized for its native job generally performs poorly in a new role. Directed evolution through rounds of mutation and screening can discover changes in sequence that improve performance, climbing a new fitness peak.



Evolução de moléculas em laboratório

O problema – como obter novas moléculas de interesse?

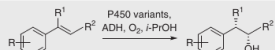


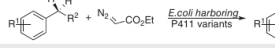


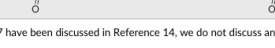




Evolução de moléculas em laboratório

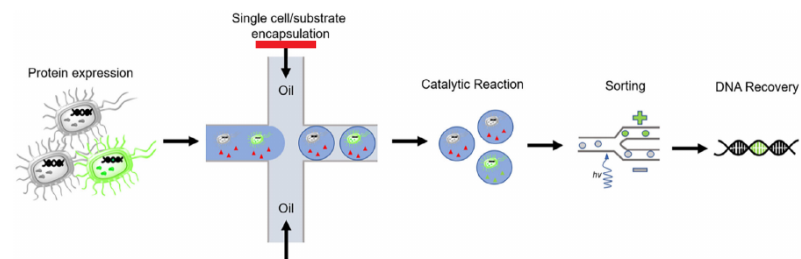
Evolução dirigida na geração de novas reacções (ou otimização)

TABLE 1 List of evolved proteins with abiotic/artificial activities

Proteins	Reaction	Reference
P450 variants, globin variants, myoglobin variants, cytochrome C variants, Ir, Mn Co-substituted myoglobin and P450 variants	Cyclopropanation, N-H insertion, S-H insertion, Si-H insertion, Doyle-Kirmse reaction, aldehyde olefination and C-H insertion; intramolecular C-H amination, sulfimination, aziridination, sulfimination/sigmatropic rearrangement, azide-to-aldehyde conversion and intermolecular C-H amination	11,13,14*
Anti-Markovnikov alkene oxidation		15
B-H insertion		16
Successive carbene insertion to unsaturated C-C		17
sp3 C-H functionalization		18
Olefin cyclopropanation		19
In vivo olefin metathesis		20
Reversible aldol reaction		21-23

*As the examples published before 2017 have been discussed in Reference 14, we do not discuss and cite those publications again in this review.

Desenvolvimento de high-throughput screening





Evolução de moléculas em laboratório

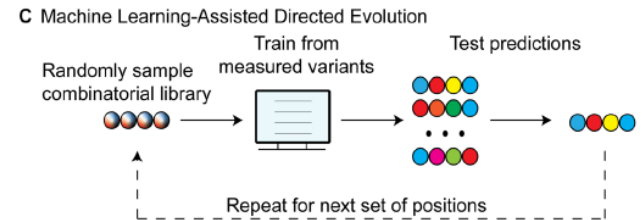
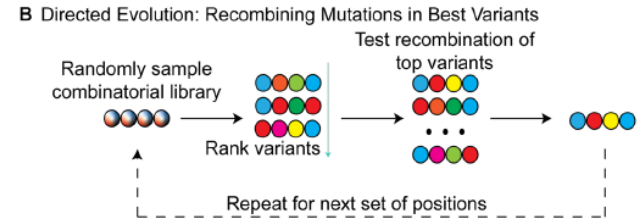
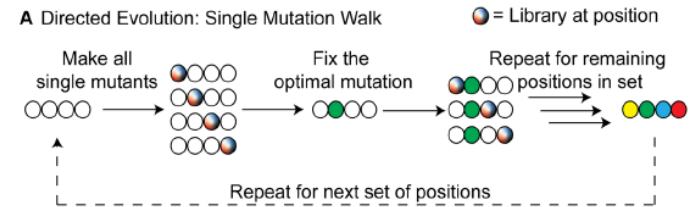
Evolução dirigida na geração de novas reacções (ou otimização)

Desenvolvimento de high-throughput screening

Aplicação de metodologias diversas de geração

de variabilidade

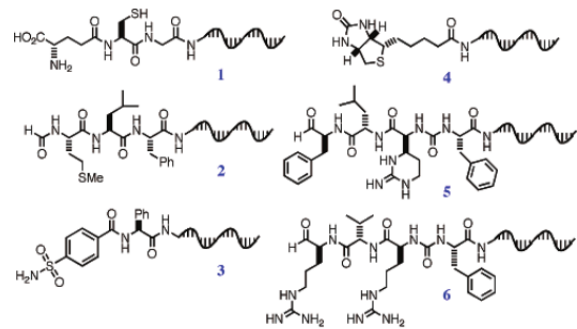
- Mutações individuais, N ciclos para N posições aa
- Recombinação de mutações
- Utilização de *machine-learning*





Evolução de moléculas em laboratório

Seleção *in vitro* de oligonucleótidos com aumento de afinidade



DNA-linked protein ligand	negative control	target protein	predicted activity	enrichment factor	sensitivity (mol)
1	2	glutathione S-transferase	$K_d = 10 \mu\text{M}^{4a}$	2,500	10^{-20}
3	2 or 4	carbonic anhydrase	$K_d = 0.9 \text{nM}^{4b}$	330	10^{-20}
4	2	streptavidin	$K_d = 40 \text{fM}^{4c}$	4,400	10^{-18}
5	4	papain	$\text{IC}_{50} = 14 \mu\text{M}^{4d}$	64	10^{-16}
5	4	chymotrypsin	$\text{IC}_{50} = 290 \text{nM}^{4d}$	76	10^{-16}
6	4	papain	$\text{IC}_{50} = 270 \text{nM}^{4d}$	98	10^{-18}
6	4	trypsin	$K_d = 100 \text{nM}^{4d}$	125	10^{-17}

Figure 1. Enrichment factors for a single affinity selection containing a 1:1000 ratio of protein-binding:nonbinding molecules are shown in column 5. Minimum quantities of protein-binding molecules to achieve an enrichment factor of at least 50-fold are listed in column 6.

Doyon *et al* (2003). *Highly Sensitive in Vitro Selections for DNA-Linked Synthetic Small Molecules with Protein Binding Affinity and Specificity.* JACS Communications



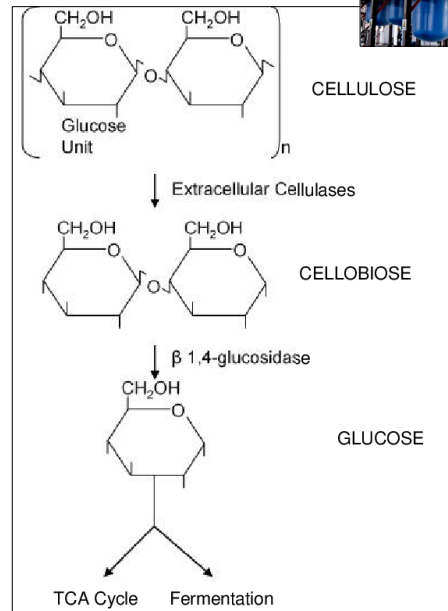
Evolução de moléculas em laboratório

O problema – melhorar enzimas de interesse industrial



Celulose

- o polímero mais abundante
- inibição de celulases por celobiose



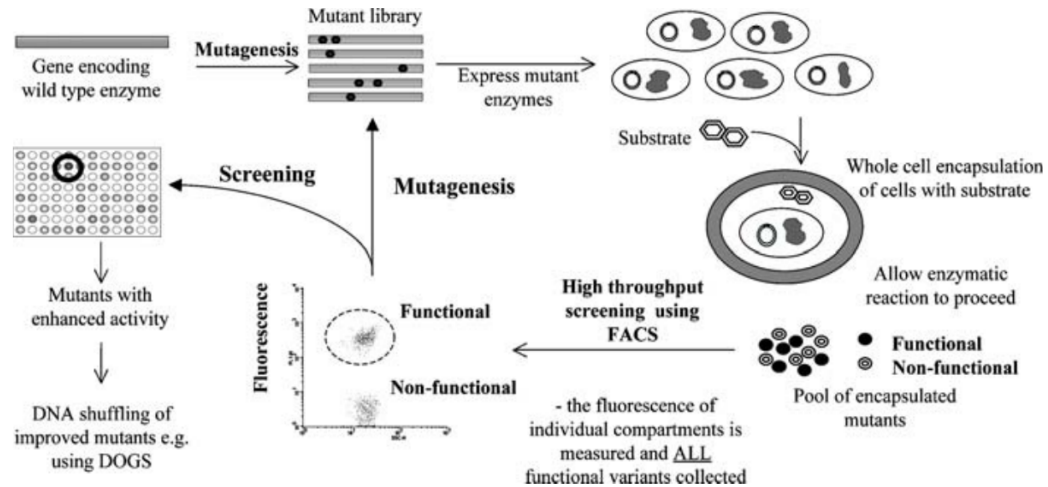


Evolução de moléculas em laboratório

O problema – melhorar actividade de β -glucosidade

Random drift mutagenesis process

Hardiman et al (2010). Directed evolution of a thermophilic B-glucosidase for cellulosic bioethanol production. *ApplBiochemBiotech*



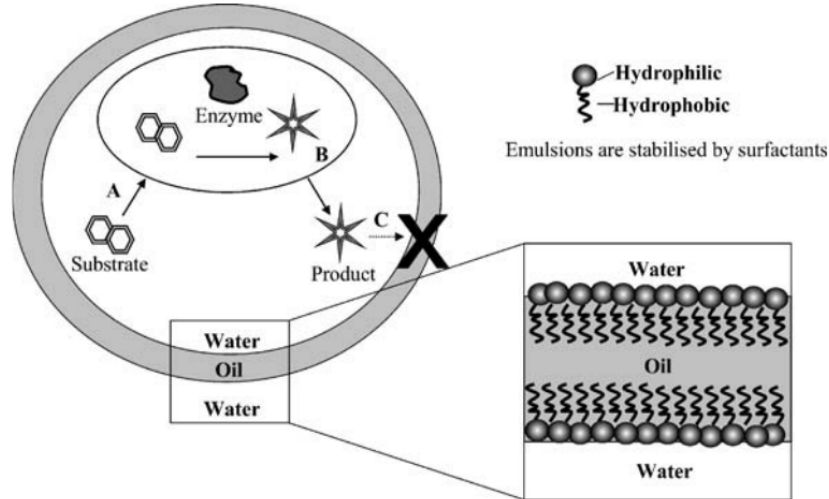


Evolução de moléculas em laboratório

O problema – melhorar actividade de β -glucosidade

Encapsulação numa emulsão

Hardiman et al (2010). Directed evolution of a thermophilic B-glucosidase for cellulosic bioethanol production. ApplBiochemBiotech





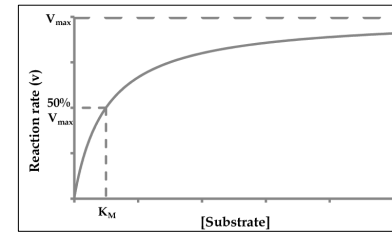
Evolução de moléculas em laboratório

O problema – melhorar actividade de β -glucosidade

Resultados – eficiência (K_{cat}/K_M)

Table 2 Summary of kinetic parameters of wild-type and mutant E1.

Substrate	Enzyme	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M
pNPGlu	WT	0.40 ± 0.03	154 ± 2	384
	E1	0.25 ± 0.02	177 ± 3	710
pNPGal	WT	1.92 ± 0.12	181 ± 4	94
	E1	1.76 ± 0.07	203 ± 3	115
Cellobiose	WT	7.2 ± 0.8	275 ± 12	39
	E1	7.3 ± 0.8	311 ± 13	44
Lactose	WT	101 ± 12	742 ± 52	7
	E1	83 ± 6	985 ± 38	12





Evolução de moléculas em laboratório

O problema – melhorar actividade de β -glucosidade

Resultados – inibição

Table 3 Inhibition constants (K_i) for wild-type and mutant E1 enzymes.

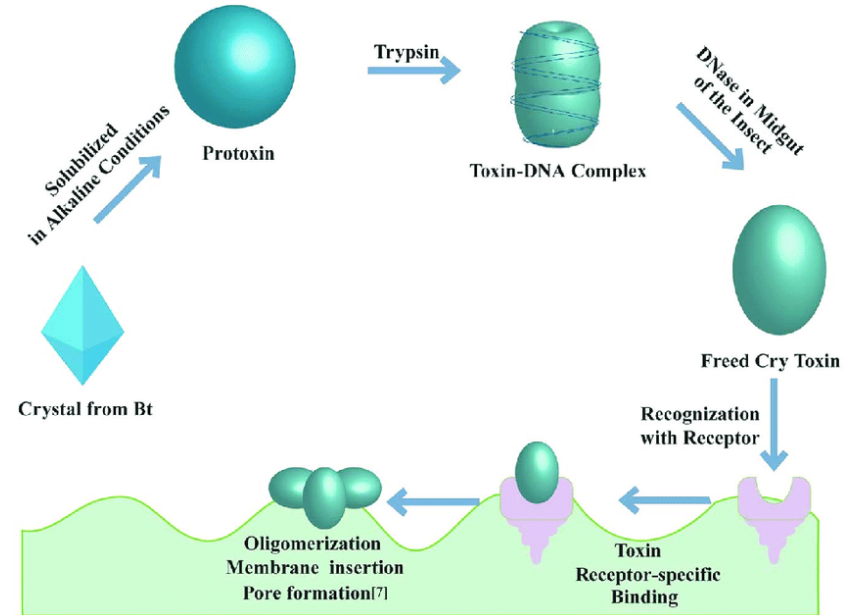
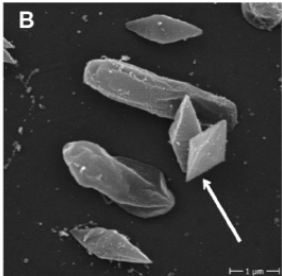
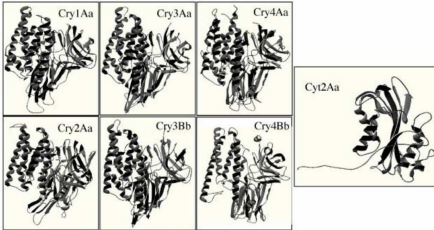
Enzyme	K_i (mM)			
	Products		Substrate	
	Glucose	Galactose	Cellobiose	Lactose
WT	75±4	92±5	27±2	39±5
E1	69±4	153±10	31±3	92±13



Evolução de moléculas em laboratório

A evolução de uma arma molecular

Proteínas Cry – ação insecticida

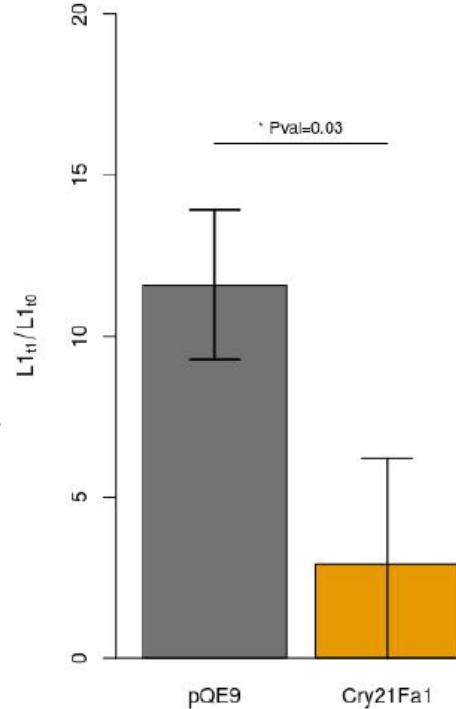
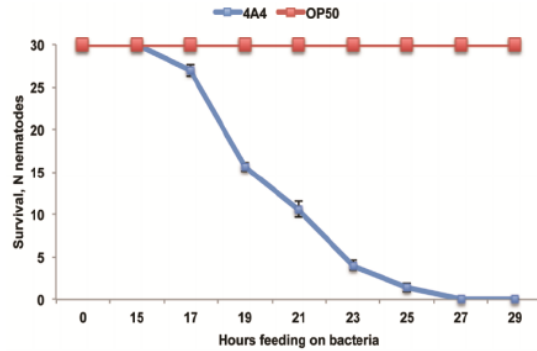
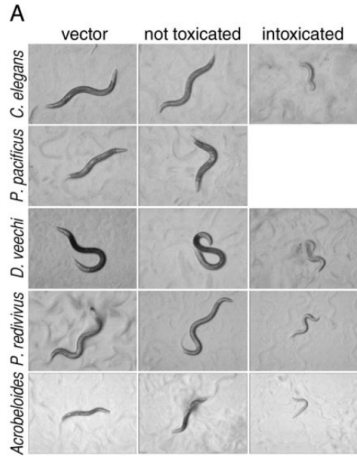




Evolução de moléculas em laboratório

A evolução de uma arma molecular

Proteínas Cry – ação insecticida e nematicida



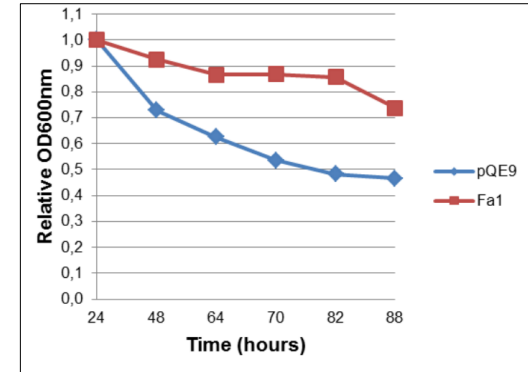
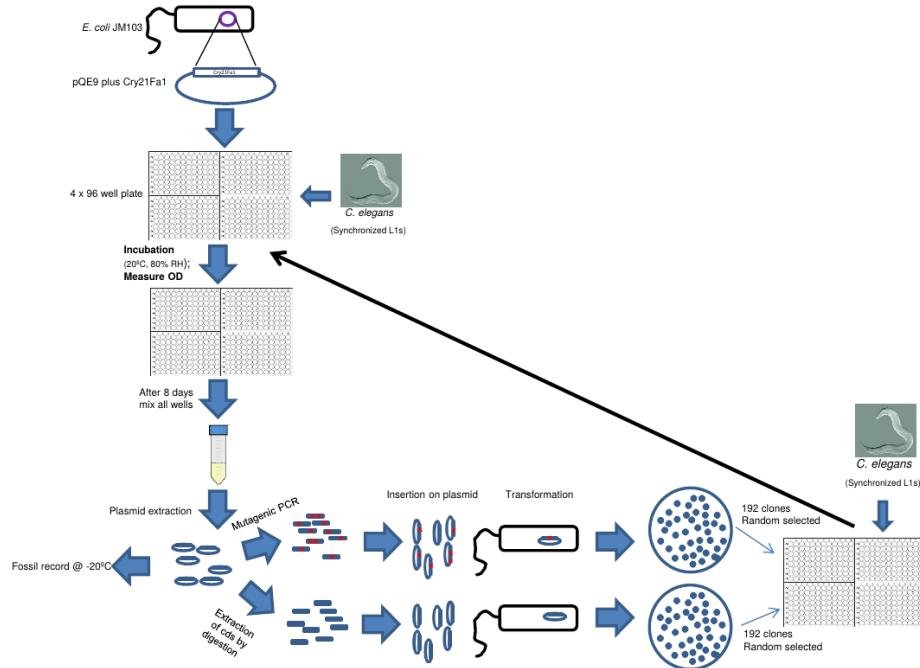
A expressão de Cry21Fa1 afecta o crescimento e sobrevivência de *C. elegans* em condições laboratoriais

Wei et al (2003). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. PNAS



Evolução de moléculas em laboratório

A evolução de uma arma molecular – design experimental

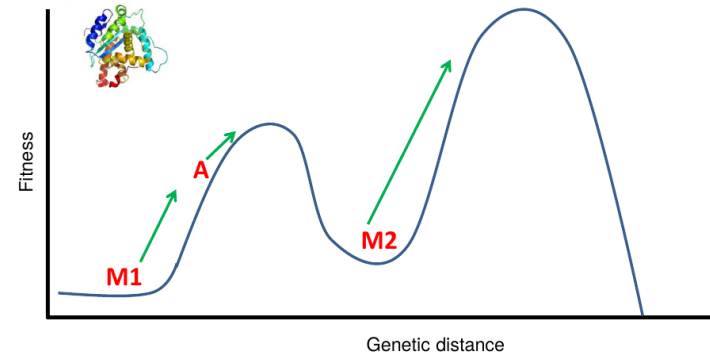
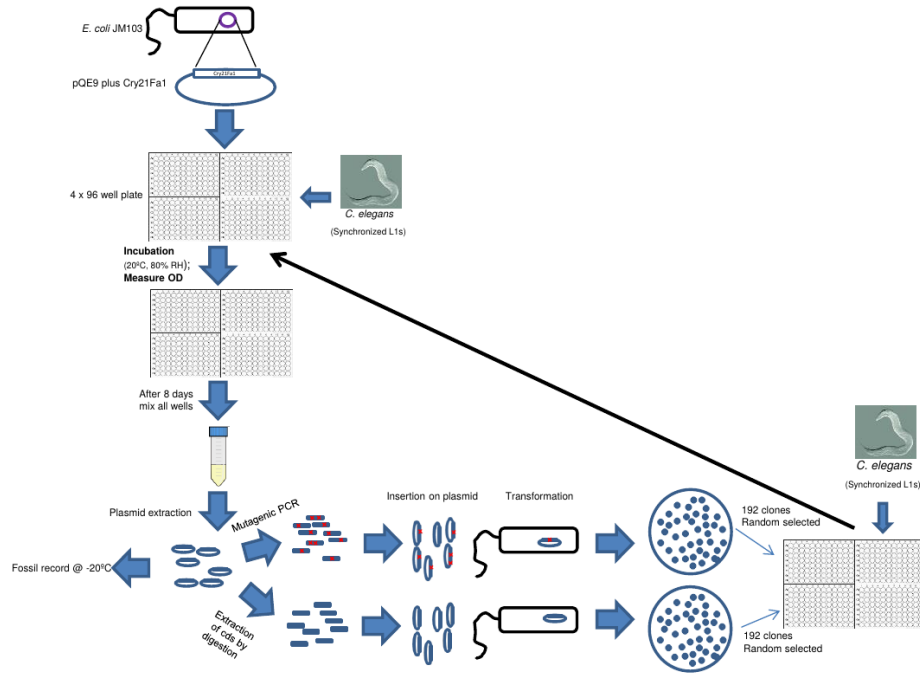


A morte de nemátodes reduz o consumo de bactérias que expressam Cry21Fa1, mantendo ODs elevadas



Evolução de moléculas em laboratório

A evolução de uma arma molecular – design experimental

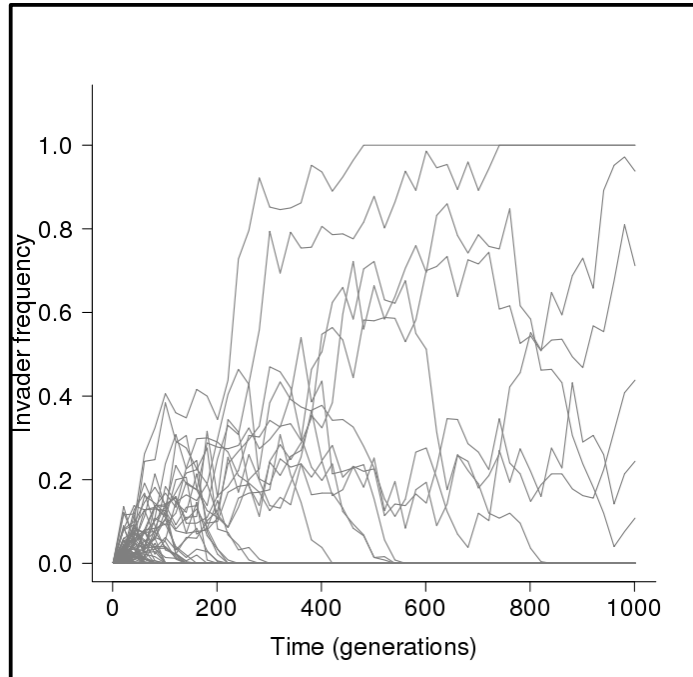


Iniciar o processo de seleção a partir de Wt (Ancestral) e de diferentes mutantes



Evolução de moléculas em laboratório

Capacidade de seleccionar variantes de interesse



Mudança de frequências alélicas

$$\Delta p_{\text{total}} = \Delta p_{\text{seleção}} + \Delta p_{\text{deriva}}$$

$$E(\Delta p) = sp(1-p)/(1+sp)$$

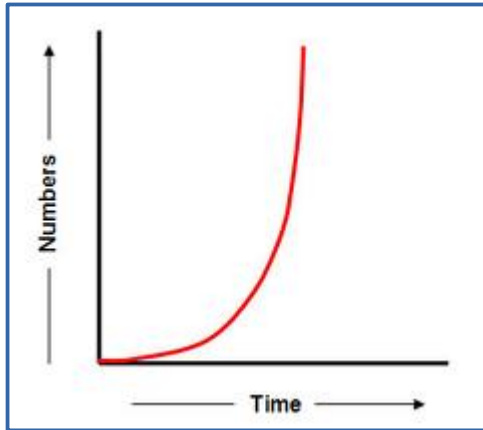
$$E(\Delta p) = 0, \\ \text{Var}(\Delta p) = f(Ne)$$



Evolução de moléculas em laboratório

Capacidade de seleccionar variantes de interesse

Crescimento
 $r_1 = e^1$, $r_2 = e^{1+s}$



Mudança de frequências alélicas

$$\Delta p_{\text{total}} = \Delta p_{\text{seleção}} + \Delta p_{\text{deriva}}$$

$$E(\Delta p) = sp(1-p)/(1+sp)$$

$$E(\Delta p) = 0, \\ \text{Var}(\Delta p) = f(Ne)$$

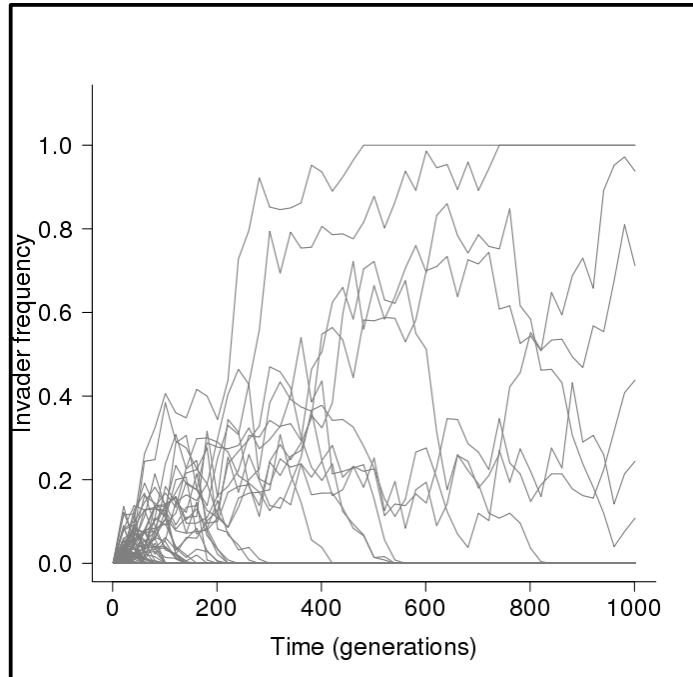
Fitness (w) e coeficiente seletivo (s)

$$w_1 = 1, w_2 = 1+s$$



Evolução de moléculas em laboratório

Capacidade de seleccionar variantes de interesse



Mudança de frequências alélicas

$$\Delta p_{\text{total}} = \Delta p_{\text{seleção}} + \Delta p_{\text{deriva}}$$

$$E(\Delta p) = sp(1-p)/(1+sp)$$

$$E(\Delta p) = 0, \\ \text{Var}(\Delta p) = f(Ne)$$



Evolução de moléculas em laboratório

Deriva genética

1. As frequências alélicas tendem a mudar devido a efeitos de amostragem.

Podemos definir uma distribuição de probabilidades para as gerações seguintes mas não as frequências exatas

2. Não existe uma direcionalidade nas frequências alélicas ao longo do tempo.

As frequências alélicas podem tanto aumentar como diminuir.

3. Os alelos fixar-se-ão nas populações a não ser que sejam novamente introduzidos por mutação ou migração

Seleção natural

A seleção natural pode introduzir um enviesamento nas alterações das frequências alélicas

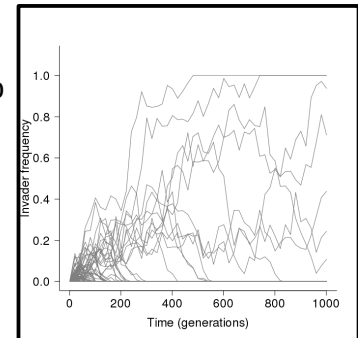
Alelos favorecidos tendem a aumentar de frequências e eventualmente são fixados.

Mudança de frequências alélicas

$$\Delta p_{\text{total}} = \Delta p_{\text{seleção}} + \Delta p_{\text{deriva}}$$

$$E(\Delta p) = sp(1-p)/(1+sp)$$

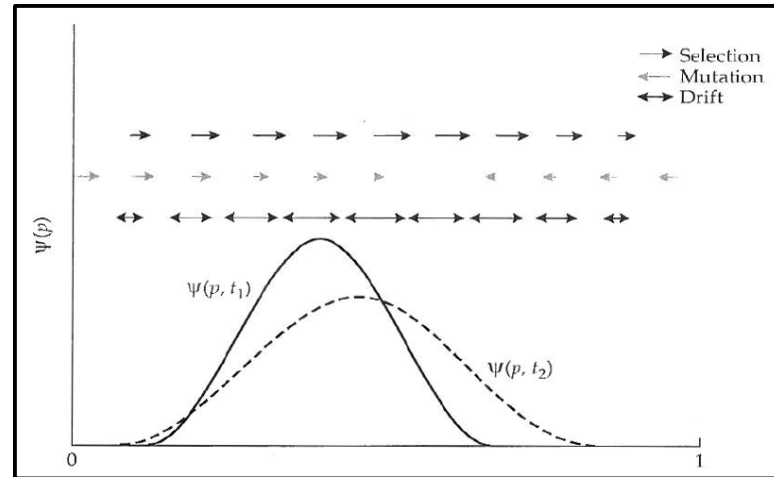
$$E(\Delta p) = 0, \\ \text{Var}(\Delta p) = f(Ne)$$





Evolução de moléculas em laboratório

Evolução de frequências alélicas como um processo de difusão



- Populações grandes

- Seleção fraca

} Δp pode ser aproximado por um processo contínuo estocástico

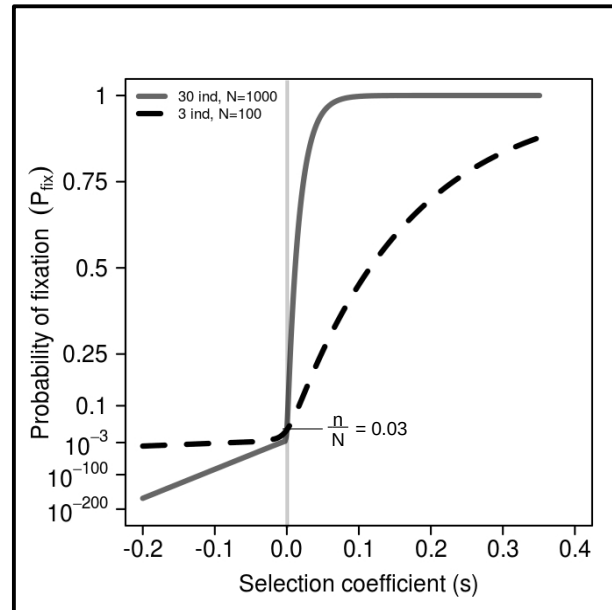


Evolução de moléculas em laboratório

Probabilidade de fixação a partir de um processo de difusão

$$P_1(p) = \frac{1 - e^{-2N_e s p}}{1 - e^{-2N_e s}}$$

(Kimura 1957,1962)



$p = 0.03$
 $N = 100$

A deriva reduz a probabilidade de fixação de alelos benéficos e aumenta a probabilidade de fixação de alelos deletérios



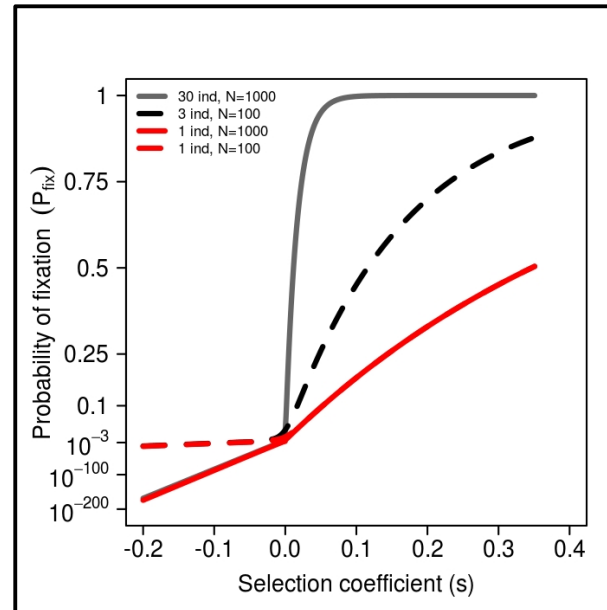
Evolução de moléculas em laboratório

Probabilidade de fixação a partir de um processo de difusão

$$P_1(p) = \frac{1 - e^{-2N_e s p}}{1 - e^{-2N_e s}}$$

(Kimura 1957,1962)

= $2s$, para $p=1/N$



Mesmo alelos benéficos tendem a perder-se por deriva enquanto estão a frequências baixas



Menor capacidade de seleccionar variantes de interesse



3. Desenvolvimento de drogas, enzimas e vias metabólicas de interesse agroindustrial

Questões

