**CLONAGEM, IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO
DE UM GENE DE RESISTÊNCIA A NISTATINA DE
Saccharomyces cerevisiae.**

JUAN LUCAS ARGÜESO GOMES DE ALMEIDA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **FLAVIO CESAR ALMEIDA TAVARES**

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Almeida, Juan Lucas Argüeso Gomes de

Clonagem, identificação e sequenciamento de um gene de resistência a nistatina de *Saccharomyces cerevisiae* / Juan Lucas Argüeso Gomes de Almeida. - Piracicaba, 1997.

80 p.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Clonagem 2. Gene resistente 3. Levedura 4. Melhoramento I. Título

CDD 589.23

**CLONAGEM, IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO
DE UM GENE DE RESISTÊNCIA A NISTATINA DE
Saccharomyces cerevisiae.**

JUAN LUCAS ARGÜESO GOMES DE ALMEIDA

Aprovada em 11.08.1997

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho

ESALQ/USP

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

IB/UNICAMP

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares
Orientador

Dedico este modesto trabalho a toda minha querida família, aos meus amigos e a todo mundo que me quer bem. A quem, de alguma maneira, me tenha ajudado nestes quase sete anos em Piracicaba. Espero ter correspondido com amor, amizade e dedicação ao apoio de vocês.

Muito Obrigado, mesmo!

Agradecimentos,

Ao Dr. Flavio Tavares, pelo valor dos muitos ensinamentos que guardarei comigo por toda minha carreira.

Ao Dr. Gonçalo Pereira, pela ajuda imprescindível durante a execução deste trabalho, pela amizade e pelo apoio aos nossos sonhos.

Aos Drs. Charles Lindsey e Luiz Coutinho pela disponibilização dos sequenciadores automáticos em seus laboratórios na Escola Paulista de Medicina/UNIFESP e na ESALQ/USP.

A Rui Cosme Serafim, pela grande ajuda no sequenciamento e também pela gratificante amizade. A Dirce Carraro Pereira, pela ajuda nos experimentos de eletroporação e pelas valiosas "dicas" durante a construção da biblioteca genômica.

À minha querida Cristiana, pelo apoio, companheirismo e muito amor que nos tem feito crescer juntos.

Ao meu amigo e companheiro Luiz H. Gomes, por me ensinar a fazer do trabalho intenso e dedicado, uma atividade prazerosa e feliz.

A Marilia Della Vechia, pela grande ajuda nos últimos dias do trabalho, quando foi necessário fazer mais do que eu poderia sozinho.

Aos amigos Ana, Beto, Conti, Felipe, Irving, Jupará, Keila, Marilia, Max e Tatá do Laboratório de Genética de Leveduras.

Aos meus queridos Pais, que tornaram possível minha vinda para Piracicaba e aos muitos amigos que fiz aqui, por tornarem esta estadia tão mais divertida!

À CAPES pela oportunidade de poder iniciar a carreira vendo o mundo com outros olhos, estendendo meu horizonte muito além daquele que eu poderia sem a participação no PET. Agradeço pela bolsa de estudos PET, pela bolsa de mestrado e por me premiar com a chance de ir ainda mais adiante no doutorado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	iv
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Ilustração do mapa do vetor YEp352	26
2	Gel de agarose com produtos de digestão parcial do DNA de M606.1c com a endonuclease <i>Sau3AI</i>	41
3	A - Gel de agarose para seleção de frações de DNA de M606.1c digerido parcialmente; B - Gel de agarose mostrando em detalhe as frações 18, 19, 20 e 21	43
4	Gel de agarose com os produtos da digestão de plasmídios amostrados da biblioteca genômica com <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i>	46
5	A - Mapa de restrição de YEpNYS1; B - Gel de agarose com produtos da digestão de YEpNYS1 com enzimas de restrição em corte único; C - Gel de agarose com produtos da digestão de YEpNYS1 com enzimas de restrição em cortes únicos e combinados	51
6	A - Sequência dos primeiros 380 nucleotídeos da extremidade 5' de NYS1; B - Alinhamento de sequências entre NYS1 e a região do cromossomo XIV de <i>S. cerevisiae</i>	53
7	A - Tabela de conteúdo da região do cromossomo XIV correspondente a NYS1; B - Mapa de NYS1 com as possíveis ORF's	56
8	Placa de seleção de subclones em IPTG/XGAL	57
9	Esquema da subclonagem de NYS1	59
10	A - Gel de agarose para determinação da orientação dos subclones NYS3; B - Mapa dos subclones NYS3+ e NYS3-	61
11	Cromatograma de sequenciamento automático de DNA	64
12	Sequência completa do gene de resistência a nistatina <i>NYS</i>	65
13	Esquema do sequenciamento do gene <i>NYS</i>	66
14	Espectro de absorbância em luz U.V. dos extratos não saponificáveis das linhagens de levedura estudadas	68
15	Comparação entre os espectros de absorção em luz U.V. no extrato não saponificável de M606.1c e de <i>nys3</i>	70
16	Representação das estruturas moleculares do ergosterol e do colesterol 5,7,22,24-tetraenol	70

LISTA DE TABELAS

	Página
1	Efeito da fosfatase alcalina sobre a capacidade de religação das extremidades do vetor YEp352desfosforilação sobre o veto 44
2	Teste de marcas genéticas dos quatro clones resistentes a nistatina selecionados a partir da biblioteca genômica 49
3	Teste de resistência a nistatina em células transformadas com subclones do fragmento NYS1 58
4	Teste de resistência a nistatina em células transformadas com os plasmídios YEpNYS3+ e YEpNYS3- 61
5	Teores de ergosterol nas linhagens de levedura estudadas 68

CLONAGEM, IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE DE RESISTÊNCIA A NISTATINA DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Autor: Juan Lucas Argüeso Gomes de Almeida

Orientador: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

RESUMO

O híbrido de *Saccharomyces cerevisiae* M606 é uma levedura de aplicação industrial que alia alta capacidade de produção de etanol a resistência ao antibiótico poliênico nistatina. Com o objetivo de isolar o gene que confere a esse organismo a capacidade de se multiplicar na presença dessa substância, tóxica a leveduras e à maioria dos fungos, foi construída uma biblioteca genômica com o DNA de uma linhagem segregante de M606, M606.1c. Um plasmídeo episomal de levedura contendo um fragmento genômico da biblioteca de 5900 pares de bases foi capaz de conferir resistência a linhagens sensíveis quando introduzido por transformação. A determinação da sequência de nucleotídeos desse fragmento de DNA, designado NYS1, permitiu a sua localização no braço longo do cromossomo XIV de *Saccharomyces cerevisiae*. A subclonagem do fragmento NYS1 revelou que o gene responsável pela resistência é o quadro de leitura aberta (ORF) conhecido como YNL231C, que passa a ser denominado NYS, gene de resistência a nistatina de *Saccharomyces cerevisiae*. O gene NYS foi subclonado em um fragmento de 1337 pares de bases, que foi nomeado NYS3.

Esse plasmídeo foi utilizado para transformar linhagens sensíveis, conferindo-lhes resistência. Sua sequência de nucleotídeos foi integralmente determinada e comparada com o Banco de Dados do Genoma de *Saccharomyces cerevisiae* para a identificação das diferenças ao nível do DNA entre os mutantes *NYS* e o tipo selvagem sensível a nistatina. Não foram identificadas diferenças de sequência entre o tipo selvagem e o gene clonado. Esse dado sugere que o gene clonado não é o mesmo que é responsável pela resistência de M606.1c. M606.1c apresentou o derivado de ergosterol *cholesta-5,7,22,24-tetraenol*, que parece estar ligado à resistência. As leveduras transformadas com o gene *NYS* não apresentaram a formação desse composto, sendo este mais um dado que sugere a clonagem de um segundo gene de resistência. A provável explicação para a resistência conferida por um gene selvagem seria o alto número de cópias em que ele se apresenta nos transformantes. O desequilíbrio na dosagem do produto gênico de *NYS*, possivelmente teria tido como efeito alguma alteração na membrana plasmática que levou à resistência a nistatina.

CLONING, IDENTIFICATION AND SEQUENCING OF THE *Saccharomyces cerevisiae* NYSTATIN RESISTANCE GENE.

Author: Juan Lucas Argüeso Gomes de Almeida

Adivisor: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

SUMMARY

The hybrid strain M606 of *Saccharomyces cerevisiae* is an industrial yeast that displays high ethanol production capacity and resistance to the polienyc antibiotic nystatin. To isolate the resistance gene, a genomic library was constructed from a M606 segregant strain, M606.1c. A yeast episomal plasmid, harboring a genomic DNA fragment of 5900 base pairs, promoted resistance to nystatin when transformed into sensitive strains. The determination of part of the nucleotide sequence of this DNA fragment, allowed its location in the long arm of the chromosome XIV of *Saccharomyces cerevisiae*. Subcloning of this fragment, named NYS1, revealed that the resistance gene corresponds to the yeast Open Reading Frame (ORF) YNL231C, renamed *NYS*, the *Saccharomyces cerevisiae* nystatin resistance gene. The *NYS* gene was subcloned into a 1300 base pairs fragment, named NYS3, that makes sensitive host strains become resistant. Its complete nucleotide sequence was determined and compared to *Saccharomyces* Genome Database to identify the differences in DNA between *NYS* mutants and

sensitive wild type strains. No differences were found between these two sequences, indicating that *NYS* is a wild type gene. This data suggests that *NYS* is not the same gene that encodes nystatin resistance in M606.1c. M606.1c accumulates in its plasma membrane the ergosterol derivate cholesta-5,7,22,24-tetraenol. The transformed strains did not present this compound, another reason to suppose that *NYS* is responsible for a second resistance mechanism. The probable explanation for the *NYS* resistance is that this gene was introduced in many copies in each transformant cell. Perhaps the excessive dose of the *NYS* protein, could cause alterations in the plasma membrane that would lead to nystatin resistance.

1. INTRODUÇÃO:

O gene de resistência a nistatina, *NYS*, de *Saccharomyces cerevisiae* é aplicado ao desenvolvimento de um processo de fermentação alcoólica livre de contaminações por leveduras selvagens. O processo utiliza o antibiótico fungistático nistatina como agente inibidor do crescimento de leveduras selvagens indesejáveis, e uma levedura híbrida, portadora do gene *NYS*, de elevada capacidade de produção de etanol. Durante a multiplicação do fermento, ou quando se detectam leveduras contaminantes, aplica-se a nistatina que elimina as células indesejáveis sem afetar o híbrido de alta performance. Assim, durante uma safra inteira pode-se manter o controle da população microbiana evitando os prejuízos causados pelos contaminantes e favorecendo o rendimento do processo (Tavares, 1995).

A levedura híbrida M606 empregada nesse processo, foi obtida após um longo trabalho de melhoramento genético da capacidade de produção de etanol, visto que os mutantes originais produziam quantidades de etanol muito aquém das desejadas. O processo foi otimizado, sua patente concedida e hoje se encontra depositada em nome da Universidade de São Paulo como "Processo de produção de etanol com o controle de leveduras contaminantes" PI 8903744 - INPI/RJ 27/07/89 .

A etapa de desenvolvimento do processo industrial despertou o interesse em investigar o mecanismo celular que permite ao híbrido M606

crescer em concentrações de nistatina 30 vezes superiores a aquelas letais para a maioria das leveduras. A elevada resistência e evidências de dominância da mutação para resistência (*NYS*) permitiram supor um mecanismo celular de resistência diferente do que se relata na literatura. Adicionalmente, o gene de resistência dominante *NYS* poderia ser aplicado para outras finalidades como marcador seletivo de transformantes. Portanto, esta pesquisa inicialmente compreende a investigação molecular fina do gene de resistência a nistatina *NYS*, envolvendo sua clonagem, mapeamento e sequenciamento completo. Com isso, três linhas de estudo foram abertas com a finalidade de: primeiro, efetuar a análise do seu produto gênico e dos seus efeitos sobre a fisiologia celular que levam à resistência a nistatina. Segundo, estudar a transferência do gene *NYS* por transformação para outras leveduras industriais de interesse, com avaliação de sua expressividade, considerando que o problema de contaminação não é exclusivo da produção de etanol. Finalmente, desenvolver a construção de um novo vetor de clonagem bifuncional contendo o gene *NYS* como marcador seletivo de transformantes, para permitir a transformação de leveduras industriais e de outras que normalmente não possuem os genótipos auxotróficos requeridos pelos vetores convencionais.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1. Marcadores dominantes na transformação de leveduras.

A disponibilidade de vetores de clonagem contendo marcadores seletivos de resistência a antibióticos foi um dos pontos mais importantes para o desenvolvimento de sistemas de transformação de *Escherichia coli* e da rápida disseminação da tecnologia do DNA recombinante no final da década de 70. Este recurso tornou a seleção de transformantes por antibióticos ou marcadores dominantes simples e efetiva. O sucesso de sua aplicação depende apenas da capacidade do vetor em conferir às células transformadas a resistência ao agente inibidor de crescimento. As células não transformadas devem morrer ou pelo menos ter seu crescimento reduzido. Uma característica interessante desta metodologia é o fato de que qualquer organismo sensível ao antibiótico, ou agente tóxico, pode ser selecionado após a transformação independente de uma combinação específica genótipo-vetor.

Tradicionalmente, os vetores de clonagem de leveduras possuem, como marcadores seletivos, os alelos selvagens que complementam auxotrofias nas células receptoras. As células receptoras do DNA devem conter a mutação auxotrófica (ex. *ura3*, *his3*, *trp1* e *leu2*) correspondente à marca do vetor para que seja possível a complementação, e com isso a recuperação da atividade fisiológica, possibilitando seu crescimento em meio mínimo. Assim, a seleção dos transformantes se faz em meio que não contenha o aminoácido, nucleotídeo ou vitamina que está sendo empregado para seleção. As células

que receberam o vetor com o alelo selvagem durante a transformação, conseguem crescer neste meio e formam colônias isoladas, enquanto as células que não receberam o vetor não se multiplicam.

Para uso de marcadores dominantes, as mutações auxotróficas são dispensáveis nas células a serem transformadas. Em outras situações, mutações auxotróficas são indesejáveis, por exemplo, quando se deseja transformar linhagens industriais. Estas são normalmente prototróficas e a sua mutagenização pode comprometer sua performance. Ainda na seleção com marcadores auxotróficos é necessária a utilização de meio de cultura mínimo de maior preço, livre de aminoácidos, vitaminas ou bases nitrogenadas. O uso de mutações auxotróficas na produção industrial é inviável e o problema se agrava ainda mais quando se deseja manter a estabilidade mitótica de um plasmídeo numa fermentação em escala industrial, em que grandes quantidades de meio de cultura são necessárias, aumentando ainda mais o custo do processo. Em contrapartida, a seleção com marcadores dominantes pode ser feita em meio completo de custo mais baixo, estendendo o baixo custo a processos em escala aumentada.

Desde o início da década de 80 tem-se tentado introduzir esse tipo de gene de seleção em vetores de clonagem bifuncionais de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. Atualmente já se conhece um grande número deles, e novos genes continuam a ser identificados.

Um dos primeiros marcadores dominantes a serem descritos foi o gene de resistência ao cobre. Os efeitos tóxicos dos metais pesados em *S. cerevisiae* são atenuados pela presença do gene da metalotioneína, *CUP1*. Utilizando esse mecanismo, linhagens do tipo selvagem podem tolerar níveis de cobre de até 3 mM no meio de cultura. Este gene codifica uma proteína de baixo peso molecular rica em cisteína, que possui afinidade por metais, e cuja expressão é induzida pela presença de íons de cobre. Mutantes resistentes a 12 mM de cobre foram isolados (Fogel & Welch, 1982) e a análise genética

mostrou que eles possuíam 15 cópias do gene *CUP1* por célula. O mesmo efeito de resistência por dosagem gênica foi obtido pela clonagem de *CUP1* em um vetor de multicópia por Henderson et al., 1985. A partir desse estudo surgiu o interesse de se usar o gene *CUP1* como marcador seletivo semi-dominante para inserção em plasmídios de *S. cerevisiae*. Hottiger et al., 1995, desenvolveram vetores contendo esse gene e ainda contendo um cassete de expressão gênica regulado pelo promotor de *CUP1*, considerando que a presença desse gene em um vetor episomal teria relação direta com o número de cópias do plasmídio por célula. Ao mesmo tempo, o cobre presente no meio atuaria como indutor da expressão do gene a ser fusionado com o promotor *CUP1*. Os vetores mostraram estabilidade mitótica de 100% em meio seletivo em linhagens sensíveis ao cobre, entretanto tal estabilidade foi muito prejudicada quando se retirou o cobre do meio de cultura. O vetor de expressão contendo o gene e o promotor *CUP1* se mostrou bastante eficiente na produção de altas quantidades de hirudina biologicamente ativa. Os níveis de expressão foram diretamente proporcionais ao aumento do teor de cobre no meio, resultado tanto do aumento do número de cópias do vetor como do aumento da transcrição a partir do promotor *CUP1*.

A levedura *S. cerevisiae* é sensível a alguns antibióticos, entre eles o aminoglicosídeo G418, que inibe a tradução nos ribossomos 80S de eucariotos. Jimenez & Davies demonstraram em 1980 que *S. cerevisiae* era capaz de expressar gene de resistência a canamicina de *E. coli*, tendo como resultado a insensibilidade ao G418. A expressão dessa fosfotransferase de aminoglicosídeos bacteriana no citoplasma da levedura pôde protegê-la dos efeitos inibitórios do G418. Essa enzima fosforila o antibiótico com um grupo fosfato 5' do ATP naturalmente presente na célula, neutralizando a sua ação inibitória (Hadfield et al., 1993).

Em 1983, Webster & Dickson desenvolveram um novo sistema para seleção de transformantes de levedura, sem a necessidade de

complementação de marcadores auxotróficos. Nesse efetuaram a construção de vetores de clonagem bifuncionais, contendo como marcador seletivo para *S. cerevisiae* o gene Km^r do Tn903 de *E. coli*. Entretanto, além de não se conseguir uma seleção regular de transformantes em meio mínimo, havia a necessidade de uma longa incubação (12 a 18h) em meio sem G418 para expressar a resistência e melhorar a eficiência de transformação.

Ainda entre os primeiros sistemas de seleção dominante testados, está o gene *hph* de resistência a higromicina B, que codificada a higromicina B fosfotransferase de *E. coli*. A higromicina B é um antibiótico produzido por *Streptomyces hygroscopicus*, que atua em eucariotos e procariotos como inibidor da síntese protéica. Em 1983, esse gene foi identificado e sequenciado por Gritz & Davies, revelando-se com 1026 pares de bases e sendo traduzido em uma proteína de 39 KDa. Este gene foi utilizado para construir um vetor bifuncional de clonagem no qual a expressão de *hph* foi controlada pelo promotor do gene *CYC1* de *S. cerevisiae*. Desta forma, o vetor se mostrou versátil por permitir o uso da marca de resistência para seleção de transformantes tanto de *E. coli* como de *S. cerevisiae*.

O cloranfenicol é outro antibiótico que inibe a tradução nos ribossomos 70S, presentes nas mitocôndrias de células eucariotas. O crescimento de *S. cerevisiae* pode ser interrompido pelo cloranfenicol se essas células estiverem se desenvolvendo apenas pela via aeróbica, como quando, por exemplo, o glicerol é fornecido como única fonte de carbono. A resistência ao cloranfenicol pode ser obtida pela expressão da acetiltransferase do cloranfenicol (CAT) bacteriana no citoplasma de leveduras. Essa enzima acetila o cloranfenicol, utilizando o acetil-CoA como doador do grupo acetil, neutralizando a ação desse antibiótico. Hadfield et al., 1986, construíram um vetor bifuncional, contendo o gene Cm^r de resistência ao cloranfenicol de *E. coli* como marcador seletivo dominante, tanto para *S. cerevisiae* como para *E. coli*. Esse vetor obteve tanto na sua versão episomal, como na versão

integrativa, eficiências de transformação comparáveis às obtidas em seleção por marcadores como *HIS3*, *LEU2* e *TRP1*. Nessa publicação os autores descrevem a seleção de transformantes de leveduras industriais, selecionados em meio completo mais cloranfenicol em um sistema único até então.

A ciclohexamida é outro inibidor da síntese protéica que atua se ligando à subunidade 60S dos ribossomos eucarióticos, bloqueando passos de iniciação e translocação durante a tradução. A resistência a esse agente foi conseguida por del Pozo et al., 1991, de duas fontes diferentes. A primeira fonte de resistência foi obtida de um mutante de *Candida maltosa* que tem seus ribossomos modificados impedindo a ligação da ciclohexamida. A introdução desse gene em *S. cerevisiae* resultou em transformantes resistentes, cujos ribossomos eram modificados e insensíveis à ação da ciclohexamida. A outra fonte de resistência foi conseguida por uma mutação no gene *CYH2* de *S. cerevisiae* que resultou em uma alteração na proteína ribossomal L29, que reduz drasticamente a afinidade entre a ciclohexamida e a subunidade 60S. Esse alelo mutante permitiu a seleção de transformantes resistentes, quando introduzido por transformação em células sensíveis.

A resistência ao metotrexato em *S. cerevisiae* pode ser obtida pela introdução do gene da dihidrofolato redutase de camundongo em multi-cópia, nas células de levedura. O metotrexato inibe o crescimento, quando a síntese *de novo* do dihidrofolato é inibida pela sulfanilamida. Se a concentração de metotrexato usada no meio de cultura é suficiente para inibir a dihidrofolato redutase endógena torna-se necessária uma maior quantidade dessa enzima para que o crescimento seja possível. Genes adicionais de dihidrofolato redutase de camundongo (*Mdhfr*), em por um vetor multi-cópia, a célula transformante consegue realizar esse passo metabólico, enquanto que as células não transformadas continuam inibidas (Miyajima et al., 1984; Zhu et al., 1986).

Gatignol et al., 1987, descreveram o transposon de *E. coli* Tn5ble, como um marcador dominante que confere resistência a bleomicina em *S. cerevisiae*. Wenzel et al., 1992, testaram a transformação de leveduras com um vetor contendo esse elemento, visando a avaliação de seu potencial em vetores bifuncionais de clonagem. Uma incubação de 6 horas em meio não seletivo foi necessária para que a resistência se manifestasse nas células transformadas, sem que a eficiência de transformação fosse comprometida (10^5 transformantes por μg de DNA).

O mais recente vetor de clonagem para leveduras contendo um marcador dominante foi descrito em 1993 por Wehner & Brendel. Seu vetor YFRp1 contém o gene *SFA* de resistência ao formaldeído como marcador dominante. Os autores destacam como vantagens desse vetor o baixo custo da seleção por formaldeído, usado em baixas concentrações (3 a 5mM), e a alta estabilidade do vetor em meio completo.

A resistência a herbicidas em leveduras também foi estudada. O metil sulfometuron inibe o crescimento de *S. cerevisiae* pela sua ação sobre a enzima acetolactato sintase, componente da via de biossíntese de valina e isoleucina, codificada pelo gene *ILV2*. Mutantes resistentes dominantes, possuem uma mutação pontual no gene *ILV2*, que resulta numa substituição de um único aminoácido que torna a enzima insensível ao metil sulfometuron. Quando o alelo dominante é introduzido por transformação, confere à célula hospedeira resistência ao herbicida, tanto em cópia única como em multi-cópia (Casey et al., 1988). Um outro marcador dominante de resistência a herbicidas foi recentemente clonado e mapeado no cromossomo XV de *S. cerevisiae*, o gene *MTC1* de resistência ao metolachlor (Echeverrigaray et al., 1991; Silva, 1995).

2.2. Resistência a nistatina

Os estudos sobre a resistência a nistatina em *Saccharomyces cerevisiae* sempre estiveram ligados à via biossintética do ergosterol. O ergosterol é o principal esterol da membrana plasmática de *S. cerevisiae*, sendo responsável pela fluidez da membrana plasmática, conseqüentemente afetando o movimento lateral das proteínas que ali se encontram "ancoradas" (van der Rest et al., 1995). Há muito se conhece a relação existente entre resistência a nistatina e teores de ergosterol na membrana (Hamilton-Miller, 1974). Os mutantes resistentes a nistatina apresentavam níveis baixos ou completa ausência de ergosterol, indicando que esse composto estava diretamente ligado à sensibilidade.

Informações de muitos estudos, demonstraram que células incapazes de completar a síntese de ergosterol eram resistentes a nistatina, pois não tinham ergosterol suficiente para a ação desse antibiótico. Os antibióticos do grupo dos poliênicos, ao qual pertence a nistatina, interagem com o ergosterol na membrana plasmática de leveduras formando canais através dos quais os componentes do citoplasma extravasam, resultando em morte celular (Lees et al., 1995). Segundo van der Rest et al., 1995, a nistatina se complexa com o ergosterol e também desarranja a dupla camada de fosfolípidios. Enzimas da membrana como a quitina sintase, que se encontra inserida em regiões ricas em ergosterol, tem sua atividade grandemente reduzida na presença de nistatina. Apesar desses trabalhos postularem mecanismos de ação para a nistatina, não se conhecem ainda os detalhes do processo de interação nistatina-ergosterol.

Apesar de não se tratar de um organismo patogênico, não sendo alvo do uso terapêutico da nistatina, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi usada como o principal modelo para a elucidação da via de biossíntese do ergosterol (Lorenz & Parks, 1992; Parks et al., 1995). Nesse organismo, foi possível a identificação da maioria dos genes responsáveis pelas enzimas envolvidas no

metabolismo do ergosterol. *Saccharomyces cerevisiae* tem a vantagem de possuir um sistema de análise genética bem definido e bastante prático, o que não está disponível nos organismos patogênicos, como *Candida albicans*. Nesse último organismo, o progresso do estudo da biossíntese de ergosterol foi bem mais lento e dependente dos avanços derivados do conhecimento adquirido em *S. cerevisiae*. A descoberta dos passos dessa via metabólica foi feita pela caracterização de mutantes resistentes a nistatina e a alguns outros antibióticos do mesmo grupo.

Os genes responsáveis por nove das onze enzimas que fazem a conversão do esqualeno até o ergosterol, já foram clonados e caracterizados. Uma revisão detalhada sobre a clonagem e peculiaridades de cada um deles pode ser encontrada em Lees et al., 1995. Os mutantes que são incapazes de produzir alguma dessas enzimas, terminam por não formar ergosterol. Não formando o ergosterol, eles se tornam resistentes a nistatina, e acumulam como principal esterol um dos intermediários da via biossintética. Cada um dos 11 genes de síntese de ergosterol pode, por mutação, dar origem a um alelo recessivo de resistência a nistatina. O metabolismo do ergosterol é um dos mais bem conhecidos geneticamente, bem como o processo de resistência a nistatina ligado ao ergosterol.

A biossíntese de esteróis segue em muitos organismos os mesmos passos metabólicos, sendo essa via bem conservada entre os fungos. Mutações em genes homólogos aos descritos em *S. cerevisiae*, também foram descritas como responsáveis pela resistência a nistatina em vários outros fungos e leveduras. Grindle & Farrow, 1978, descreveram mutantes de *Neurospora crassa* deficientes em três diferentes passos da via de biossíntese de ergosterol, onde todos os mutantes apresentaram o mesmo fenótipo de resistência a nistatina. Mutantes de *Rhodotorula gracilis* resistentes a nistatina obtidos por Höfer et al., 1982, apresentaram deficiência na produção de ergosterol, acumulando o último intermediário da via, o 5,6-dihidroergosterol,

indicando que a mutação ocorreu no gene homólogo ao gene *ERG4* de *S. cerevisiae*. Outro exemplo que comprova que essa via metabólica é bastante conservada, até mesmo em relação a organismos superiores, foi demonstrado por Gachotte et al., 1996, que isolou um cDNA de *Arabidopsis thaliana* por complementação da mutação *erg3* em *S. cerevisiae*. Os mutantes $\Delta erg3$ não possuem a enzima C-5 esterol desaturase ativa, conseqüentemente não conseguem completar a síntese de ergosterol e são resistentes a nistatina. O cDNA de *A. thaliana* que codifica a 7-esterol-C-5-desaturase complementou a mutação $\Delta erg3$, eliminando a resistência a nistatina, recuperando a formação de ergosterol.

Entretanto, também existem relatos de organismos resistentes a nistatina que não apresentam alterações no seu conteúdo de ergosterol. Em 1968, Patel & Johnston publicaram o isolamento de mutantes dominantes resistentes a nistatina em *Candida albicans*, e apesar de não mencionarem dados a respeito do conteúdo de esteróis nessas células, esses mutantes não deviam ter deficiências na via do ergosterol, como os anteriormente descrito. Todos os mutantes descritos até essa época eram mutantes recessivos, com inabilidade de produzir ergosterol. Sendo incoerente pensar que um mutante dominante possa causar a falta de um produto celular, supõe-se que os mutantes de Patel & Johnston apresentavam um mecanismo alternativo de resistência.

HsuChen & Feingold em 1974 descreveram em *Candida albicans*, duas classes de mutantes resistentes a nistatina. Três desses mutantes tinham deficiência, mas outros dois exibiam níveis normais na produção de ergosterol. Esses autores sugeriram, pela primeira vez, que alterações na permeabilidade e fluidez da membrana causadas pela interação nistatina-ergosterol, poderiam não ser as únicas causas da inibição de crescimento. Em *Torulopsis glabrata*, Fryberg et al., 1975, isolaram novamente duas classes de mutantes resistentes, sendo a primeira com células sem qualquer quantidade de ergosterol e com os

mesmos tipos de ácidos graxos encontrados no tipo selvagem sensível, e outra classe que continha baixos níveis de ergosterol, mas uma composição de ácidos graxos distinta da encontrada no tipo selvagem. Esses autores ainda descreveram um efeito conhecido como treinamento para a resistência. Após cultivos sucessivos em meio com concentrações crescentes de nistatina, as células sensíveis foram se tornando cada vez mais resistentes.

Quatro mutantes de *Candida albicans* foram isolados em meio contendo nistatina por Pierce et al., 1978. Os mutantes mostraram resistência cruzada com outros três tipos de antibióticos poliênicos: anfotericina B, lucensomycina e candicidina. Três desses mutantes apresentavam alterações no conteúdo de ergosterol, mas também mostravam alterações na composição de ácidos graxos. Novamente foi sugerido que um outro processo, além da interação com o ergosterol, poderia ser responsável pela ação da nistatina. Recentemente, Joseph-Horne et al., 1996, descreveram dois mutantes resistentes a nistatina e anfotericina B de *Ustilago maydis* com níveis normais de ergosterol. Segundo esse estudo, os dados afastam as alterações na biossíntese de ergosterol como causa da resistência.

Grunwald-Raij & Margalith, 1990, obtiveram quatro mutantes de *S. cerevisiae* resistentes a nistatina e os avaliaram quanto ao conteúdo de esteróis e à capacidade de produção de etanol. Eles identificaram dois mutantes com teores de ergosterol normais e notaram que a capacidade fermentativa dessas células foi praticamente a mesma das células do tipo selvagem. Um desses dois mutantes, nomeado *nys3*, apresentou na sua composição de esteróis além do ergosterol um segundo esterol, o cholesta-5,7,22,24-tetraenol. O outro mutante, *nys6*, não apresentou alteração de esteróis em relação ao tipo selvagem. Infelizmente, esses autores não fizeram a caracterização da herança dessas mutações quanto à dominância ou recessividade.

Rao et al., 1985, publicaram um estudo que contribuiu decisivamente para a corrente que defende a ação da nistatina sobre o conjunto de componentes da membrana e não apenas sobre os esteróis. Os autores cultivaram linhagens tipo selvagem de *S. cerevisiae* em meio de cultura suplementado com diferentes fosfolipídios, causando uma alteração na composição da membrana plasmática dessas células. As células enriquecidas em fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanolamina, adquiriram resistência a nistatina mesmo mantendo teores altos de ergosterol na membrana. Nesse trabalho, também pôde-se notar que o efeito de proteção contra a nistatina e outros poliênicos não foi obtido pela alteração dos ácidos graxos, mas exclusivamente pela diferença da composição de fosfolipídios. Nagai et al., 1981, já haviam descrito que mutantes resistentes de *S. cerevisiae* com deficiências na produção de esteróis absorviam maiores quantidades de ácidos graxos do meio de cultura, o que parece coerente com a hipótese da proteção pelos fosfolipídios. Novas observações a esse respeito, foram relatadas em dois trabalhos realizados com o fungo *Aspergillus niger* publicados pelo mesmos autores (Mazumder et al., 1987 e Mazumder et al., 1990). Eles notaram, nesse fungo, um aumento nos níveis de fosfatidilcolina e diminuição nos níveis de fosfatidiletanolamina em células deficientes na produção de ergosterol. A razão esteróis/fosfolipídios teve um decréscimo em relação ao tipo selvagem por diminuição da produção de ergosterol e pelo aumento do teor de fosfolipídios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos Utilizados

3.1.1. *Escherichia coli*:

Nome	Genótipo	Origem
DH5 α F'	F' $\Delta(lacZYA-argF)$ <i>recA1</i>	Laboratório de Genética de Leveduras, ESALQ/USP.

3.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*:

Nome	Genótipo	Origem
M 606	2n , NYS NYS	Laboratório de Genética de Leveduras ESALQ/USP
M 606.1c	<i>MATα</i> , NYS	Laboratório de Genética de Leveduras ESALQ/USP
HD 93.15d	<i>MATα</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i>	Dr. Gonçalo Pereira, IB/UNICAMP

3.2. Vetores de Clonagem.

Nome	Cedido por
YEp352 (Hill et al., 1986)	Prof. Dr. Gonçalo Pereira, IB, UNICAMP
pBluescript SK (Stratagene)	Prof. Dr. Gonçalo Pereira, IB, UNICAMP

3.3. Meios de Cultura

3.3.1. Meio completo para *Saccharomyces cerevisiae* (YEPD).

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Dextrose	2% (p/v)

Para meio sólido acrescentou-se agar 2% (p/v).

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos.

3.3.2. Meio mínimo para *Saccharomyces cerevisiae* (YNB).

YNB sem aminoácidos	0.67% (p/v)
Sulfato de Amônio	0.5% (p/v)
Dextrose	2% (p/v)

O pH foi ajustado para 6.8.

Para meio sólido acrescentou-se agar purificado Difco 2% (p/v).

Esterilizado por autoclavagem a 0.5 atm por 30 minutos.

3.3.2.1. Soluções para suplementação de meio YNB

L-Leucina 200x	4 mg/ml	estocada a -20°C
L-Histidina 200x	4 mg/ml	estocada a -20°C
L-Triptofano 200x	4 mg/ml	estocada a -20°C
Uracila 200x	4 mg/ml	estocada a -20°C

Esterilizado por filtração em membrana 0.22µm.

3.3.3. Meio de esporulação enriquecido para *S. cerevisiae*

Acetato de Potássio	1%
Extrato de levedura	0.1%
Dextrose	0.05%
Agar	2%

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos.

3.3.4. Meio de cultura para *Escherichia coli* Luria e Bertani (LB)

Extrato de Levedura	0.5% (p/v)
Triptona	1% (p/v)
Cloreto de Sódio	1% (p/v)

pH foi ajustado para 6.8.

Para meio sólido acrescentou-se agar 2% (p/v).

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos.

3.3.5. Meio LB de baixo teor salino para eletroporação

Extrato de levedura	0.5%
Triptona	1%
Cloreto de sódio	0.25%

O pH foi ajustado para 6.8.

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos.

3.4. Soluções

3.4.1. Solução para gradiente de sacarose STE

NaCl	0.8 M
Tris-HCl	20 mM
EDTA	10 mM

O pH foi ajustado para 8.0.

3.4.2. Solução SCE

Sorbitol	1.0 M
Citrato de Sódio	0.1 M
EDTA	60 mM

O pH foi ajustado para 7.0.

3.4.3. Solução de lise

SDS	3% (p/v)
Tris-HCl	0.5 M, pH 9.0
EDTA	0.2 M

3.4.4. Solução de parada

Glicerol	30% (v/v)
Azul de Bromofenol	0.25% (p/v)
EDTA	0.2 M

3.4.5. TE

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

O pH foi ajustado para 8.0.

3.4.6. Solução de sacarose a 10% para fracionamento

Sacarose	10% (p/v)
NaCl	1 M
Tris-HCl	20 mM (pH 7.5)
EDTA	5 mM

3.4.7. Solução de sacarose a 40% para fracionamento

Sacarose	40% (p/v)
NaCl	1 M
Tris-HCl	20 mM (pH 7.5)
EDTA	5 mM

3.4.8. Solução I para extração de plasmídios.

Tris-HCl	25mM
EDTA	10mM

O pH foi ajustado para 8.0.

3.4.9. Solução II para extração de plasmídios.

Hidróxido de sódio	0.2N
SDS	1%

2.4.10. Solução III para extração de plasmídios.

Acetato de potássio	3M
Ácido acético	10%

2.4.11. Solução de DNA carreador.

DNA de esperma de salmão	10µg/µl
--------------------------	---------

Após a dissolução em TE do DNA para sua fragmentação, a solução foi passada por seringa com agulha 19G por várias vezes. Alíquotas de 100µl foram amostradas e estocadas a -20°C. Antes do uso, as alíquotas foram deixadas a 100°C por 10 minutos e imediatamente colocadas no gelo.

2.4.12. Solução estoque de acetato de lítio (10x).

Acetato de lítio	1M
------------------	----

Esterilizada por filtração em filtro 0.22µm.

2.4.13. Solução estoque de PEG.

PEG (Polietilenoglicol)	50% (p/v)
-------------------------	-----------

Esterilizada por filtração em filtro 0.22µm.

2.4.14. Solução de lise para extração de plasmídios.

Triton X-100	2% (v/v)
SDS	1% (v/v)
Cloreto de sódio	100mM
Tris-HCl	10mM (pH 8.0)
EDTA	1mM

2.4.15. Solução estoque de IPTG (500x).

IPTG	100mg/ml
------	----------

Estocada a -20°C.

2.4.16. Solução estoque de XGAL (500x).

XGAL	20mg/ml
------	---------

Preparada em dimetilformamida e estocada a -20°C.

2.4.17 Solução estoque de ampicilina (1000x).

Ampicilina sódica	100 mg/ml
-------------------	-----------

Estocada a -20°C.

2.4.18. Solução estoque de nistatina (500x).

Nistatina (5758 U/mg)	5 mg/ml
-----------------------	---------

Preparada em etanol absoluto e estocada a 4°C.

2.4.19. Tampão de eletroforese TBE (5x).

Tris	500mM
EDTA	25mM
Ácido Bórico	500mM

2.4.20. Solução estoque de Brometo de etídio.

Brometo de etídio	10 mg/ml
-------------------	----------

3.5. Construção da Biblioteca Genômica do DNA de M606.1c.

3.5.1. Preparação do DNA genômico para ligação ao vetor de clonagem.

3.5.1.1. Extração de DNA de alto peso molecular de *S. cerevisiae*.

Para a construção de uma biblioteca genômica é desejável que o DNA genômico utilizado tenha a maior integridade possível (Ausubel et al. 1994). Os métodos de extração de DNA convencionais envolvem muitas manipulações, como extrações de proteínas com fenol e clorofórmio que causam a quebra das fitas do DNA, diminuindo a qualidade do material obtido ao final do protocolo. Para evitar a quebra excessiva do DNA genômico e assegurar a qualidade do material obtido, optou-se pelo protocolo de extração descrito por Stucka & Feldmann, 1994. Esse protocolo permite a recuperação de altas quantidades de DNA genômico de *S. cerevisiae* através da purificação por gradiente de concentração de sacarose gerado por ultracentrifugação.

3.5.1.1.1. Preparo do gradiente de concentração de sacarose.

O primeiro passo do procedimento para extração do DNA de M606.1c, foi o preparo do gradiente de concentração de sacarose em ultracentrífuga. Duas soluções de sacarose foram usadas para a formação de um gradiente de concentração. A primeira solução continha 50% de sacarose em solução STE e a segunda continha 15% de sacarose também em solução STE. Inicialmente foram adicionados 13ml de solução 15% de sacarose aos tubos de centrifugação. Em seguida 1.5ml de solução 50% de sacarose foram lentamente adicionados ao fundo dos tubos, de tal maneira que, as duas soluções não se misturassem. Os tubos fechados e balanceados foram

cuidadosamente colocados no rotor, evitando que o seu conteúdo fosse agitado. Esse material foi centrifugado por 4 horas a 85.000g (26000rpm) a 20°C para que se formasse um gradiente crescente de concentrações de sacarose do topo para o fundo dos tubos. O equipamento utilizado foi a centrífuga Beckman modelo L7 e rotor SW 30.

3.5.1.1.2. Preparo do lisado celular de *S. cerevisiae*.

A biblioteca genômica foi preparada a partir do DNA da linhagem haplóide M606.1c, resistente a nistatina. M606.1c é um segregante obtido por micromanipulação de ascospores do híbrido M606 (diplóide, homozigoto para o gene *NYS*) no Laboratório de Genética de Leveduras da ESALQ/USP. A linhagem M606.1c foi multiplicada em 400ml de meio YEPD líquido por 18 horas a 30°C. A cultura resultante foi centrifugada a 1500g por 10 minutos, o meio de cultura descartado e a massa celular pesada. O peso da massa celular fresca obtida foi medido e em seguida, foi iniciada a etapa de protoplastização das células. Para cada grama de massa fresca foram adicionados 2ml de solução SCE, 1mg de enzima lítica de suco gástrico de caramujo e 15µl de β-mercaptoetanol. As células foram ressuspensas nessa mistura e incubadas a 37°C por 3 horas com agitação ocasional. A protoplastização foi monitorada ao microscópio.

Em seguida foi iniciada a etapa de rompimento das células adicionando-se 3.5ml de solução de lise por grama de massa fresca inicial. Essa mistura foi incubada a 65°C por 15 minutos, quando foi possível notar que a suspensão adquiriu consistência pegajosa, confirmando o rompimento das membranas celulares.

3.5.1.1.3. Separação do DNA por ultracentrifugação.

Após cumprido o tempo de formação do gradiente de concentração de sacarose, a centrífuga foi desligada e os tubos contendo o

gradiente foram cuidadosamente retirados do rotor e abertos. Adicionou-se lentamente 5ml de lisado celular sobre a parte superior de cada tubo. O lisado permaneceu na parte superior, não se misturando de imediato ao gradiente de sacarose. Os tubos foram novamente balanceados, fechados e recolocados no rotor. Novamente a centrífuga foi ligada e as amostras foram centrifugadas por 3 horas a 85.000g (26000 rpm) a 20°C, quando então os tubos foram lentamente retirados do interior do rotor. Com o auxílio de uma bomba peristáltica e de um tubo plástico, foram recolhidos 2ml do fundo de cada tubo. A ponta do tubo de sucção foi totalmente mergulhada no gradiente e a bomba foi acionada para permitir que apenas o material presente no fundo do tubo fosse sugado. Os 2 ml de cada tubo foram reunidos e prosseguiu-se a purificação.

3.5.1.1.4. Precipitação e quantificação do DNA genômico.

A solução recolhida do gradiente foi dialisada em TE por 18 horas, para remoção do excesso de sacarose. Em seguida, foi feita uma extração com um volume igual da mistura clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1. Foram acrescentados 5% do volume total de uma solução de acetato de sódio 3M, pH 4.8, e a mistura foi homogeneizada lentamente. Finalmente foram acrescentados dois volumes de etanol absoluto gelado, e após agitação cuidadosa pôde-se observar a precipitação dos ácidos nucléicos. Devido à quantidade e integridade do material, o precipitado formou um “novelo” bastante grande e facilmente visível. O precipitado foi recolhido com o auxílio de um pequeno gancho de vidro e transferido para um outro tubo contendo etanol a 70%. Após a lavagem em etanol 70%, o precipitado foi novamente recolhido com o gancho e transferido para um tubo limpo. Deixou-se que o material secasse por 30 minutos a temperatura ambiente e em seguida acrescentou-se 500µl de TE. O material ressuspendido foi avaliado em gel de agarose a 0.5% visando a determinação do peso molecular.

3.5.1.2. Digestão parcial do DNA genômico com a endonuclease de restrição *Sau3AI*.

Uma vez obtido o DNA com as características desejáveis, iniciou-se a preparação dos fragmentos a serem ligados ao vetor de clonagem. A endonuclease de restrição *Sau3AI*, de *Staphylococcus aureus*, foi enzima utilizada para a fragmentação do DNA genômico. Considerando que a enzima reúne duas propriedades que a tornam indicada para a construção de bibliotecas genômicas. A primeira delas é a curta sequência do seu sítio de corte no DNA, de apenas 4 pares de bases, fazendo com que essa enzima tenha cortes bastante frequentes. A frequência de corte dessa enzima, calculada por probabilidade, é de um corte a cada 256 pares de bases ($1/4^4$). Essa propriedade é bastante desejável, principalmente quando se deseja obter na biblioteca clones com sobreposições. A sua segunda propriedade advém do fato de que *Sau3AI* gera terminações nas extremidades da dupla fita de DNA compatíveis para ligação com a enzima *BamHI*. Como *BamHI* é uma endonuclease presente em praticamente todos os vetores de clonagem como enzima de sítio único de restrição, a combinação com *Sau3AI* facilita a manipulação. Utilizando-se essas duas enzimas pode-se digerir o DNA genômico com corte frequente (*Sau3AI*) e o vetor com corte único, e finalmente ligar os dois fragmentos através de suas extremidades compatíveis.

Os experimentos se iniciaram com a determinação da concentração ideal de *Sau3AI* para que fosse possível obter fragmentos de digestão parcial de tamanho apropriado para a clonagem. Assim, quantidades fixas de DNA foram tratadas com quantidades decrescentes de *Sau3AI* obtidas por diluições, até a determinação da quantidade da enzima capaz de gerar fragmentos de DNA na faixa de 3.0kb a 9.0kb. Nestas reações, utilizaram-se 2µg de DNA genômico em um volume total de 10µl, e após pré-aquecimento a 37°C, 1µl de amostras diluídas da enzima foram adicionados a cada tubo. As reações foram incubadas a 37°C por exatamente 15 minutos, após o que foram

interrompidas pela adição de 5µl de solução de parada. Após o término das reações, o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão foi avaliado em eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v). Todos os geis de agarose feitos durante o trabalho utilizaram tampão de corrida TBE, e submetidos a 3 V/cm e em seguida corados com brometo de etídio.

Uma vez determinada a condição ideal de digestão parcial, a escala da reação teste foi aumentada em 10 vezes. Foram feitas 10 repetições de digestões em escala aumentada do DNA genômico e esse material foi preparado para fracionamento.

3.5.1.3. Fracionamento dos fragmentos de DNA por ultracentrifugação em gradiente de sacarose.

O protocolo de fracionamento em gradiente de concentração de sacarose em ultracentrifugação (Ausubel et al., 1994) foi utilizado para o passo final de preparação dos fragmentos de DNA genômico para ligação ao vetor. O objetivo desse fracionamento foi obter a separação dos fragmentos de DNA de acordo com o seu peso molecular. Após a digestão parcial, a faixa de tamanho dos fragmentos foi de 3kb a 9kb, sendo considerada ideal a faixa de 5kb a 7kb a ideal para a clonagem em plasmídios.

O primeiro procedimento foi o preparo do gradiente linear de sacarose de 10% até 40%. O gradiente foi gerado com o auxílio de bomba peristáltica e de tubos de preparação de gradiente, contendo um tubo a solução 10% e outro tubo a solução 40%. A mistura das duas soluções foi lentamente depositada no tubo de centrifugação, evitando-se a mistura e desorganização do gradiente.

A amostra de DNA parcialmente digerido foi incubada a 65°C por 5 minutos, um procedimento visando assegurar que o DNA estivesse completamente dissolvido. Em seguida esse material foi cuidadosamente colocado sobre o gradiente, os tubos foram balanceados, fechados e colocados

no rotor SW30. A centrifugação foi feita a 26000rpm a 20°C por 18 horas. Concluída a centrifugação, os tubos foram abertos e o conteúdo retirado a partir do fundo com bomba peristáltica. Coletaram-se frações de 750µl que foram guardadas em gelo até a avaliação. Alíquotas de 50µl das frações foram analisadas em gel de agarose 0.8% e as frações contendo DNA no tamanho desejado foram identificadas. O volume de 700µl restante foi dividido em quatro tubos, contendo 175µl cada. Foram adicionados 325µl de água MilliQ e 1000µl de etanol absoluto, para precipitação dos fragmentos. Essa mistura foi deixada a -20°C por 18 horas e depois, centrifugada por 10 minutos a 13000rpm em microcentrífuga Microcentaur Hitachi. Ocorreu a deposição de um precipitado no fundo do tubo que foi lavado em etanol 70%, secado a temperatura ambiente e ressuspendido em 40ml de água MilliQ. Amostras de 1µl das frações concentradas foram novamente avaliadas em gel de agarose 0.8%, para confirmação da presença de DNA.

3.5.2. Preparação do vetor de clonagem YEp352

O vetor utilizado na construção da biblioteca foi o plasmídio bifuncional YEp352 construído por Hill et al., 1986. Esse vetor tem a mesma estrutura do vetor pUC18, acrescida da origem de replicação do plasmídio 2µm de *S. cerevisiae* e do gene *URA3*, o qual complementa a mutação *ura3* presente na linhagem receptora. Esse plasmídio encontra-se esquematizado na Figura 1.

Figura 1. Vetor de clonagem YEp352, plasmídeo bifuncional de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. Sua construção foi feita por Hill et al., 1986, a partir da estrutura do vetor pUC18 e da origem de replicação do plasmídeo 2 μ m, de ocorrência natural em *S. cerevisiae*. Esse replicon de levedura promove a manutenção da alta estabilidade mitótica e de grande número de cópias do plasmídeo por célula transformada.

3.5.2.1. Linearização do vetor com *Bam*HI

O vetor foi digerido com a endonuclease de restrição *Bam*HI de *Bacillus amyloliquefaciens*, a qual reconhece apenas um sítio de clivagem, linearizando a molécula circular de DNA. A digestão foi feita com excesso de enzima e de tempo de reação, para que a quantidade de vetor não digerido ao final da reação fosse a menor possível. Essa medida foi avaliada pela transformação de *E. coli* com amostras da molécula digerida e não digerida. A digestão só foi considerada satisfatória, quando o número de transformantes com a amostra digerida foi inferior a 5% do número de transformantes no controle não digerido.

3.5.2.2. Desfosforilação das extremidades 5' do vetor.

Com o objetivo de evitar um número excessivo de clones sem inserto na biblioteca, o vetor linearizado foi tratado com fosfatase alcalina de intestino de bezerro, "CIAP". Buscou-se utilizar a menor quantidade possível de enzima, visto que um excesso de fosfatase remanescente na solução do vetor poderia diminuir a eficiência de ligação na etapa seguinte da construção da biblioteca. Para a determinação da quantidade mínima, amostras do vetor linearizado foram tratadas com diferentes diluições de fosfatase, ligadas com T₄ DNA ligase e usadas para transformar *E. coli*. A menor concentração de fosfatase, capaz de evitar a religação do vetor, foi determinada pela avaliação do número de transformantes de *E. coli* resultantes.

A reação de desfosforilação foi conduzida a 37°C por 30 minutos. Em seguida a reação foi aquecida a 70°C por 10 minutos para inativação da enzima e foi feita uma extração de proteínas com um volume de fenol-cloroformio-álcool isoamílico, na proporção 25:24:1. Finalmente o vetor desfosforilado foi separado em gel de agarose 0.8%, e após coloração, a banda referente ao vetor foi cortada do gel e purificada como descrito mais adiante.

3.5.3. Ligação do vetor aos fragmentos de DNA genômico.

A ligação entre o vetor desfosforilado e os fragmentos de DNA genômico foi feita com T₄ DNA Ligase (Gibco BRL) a 16°C por 18 horas. A concentração da enzima e tampão de reação foram os recomendados pelo fabricante.

3.5.4. Transformação de *E. coli* com os produtos de ligação.

Para se obter o maior número possível de transformantes de bactéria foi escolhido o método de transformação por eletroporação, de acordo com o protocolo de Dower et al., 1988, conforme descrito a seguir:

3.5.4.1. Preparo de células competentes para eletroporação.

Uma colônia isolada de células de *E. coli* DH5 α F' foi inoculada em 5ml de meio LB de baixo teor de sódio e incubada a 37°C por 18 horas sob agitação a 200rpm. Em seguida 2ml dessa cultura foram inoculados em 500 ml de meio LB de baixo teor de sódio e incubados a 37°C sob agitação. O acompanhamento da multiplicação das células foi feito por leitura da densidade óptica (DO) a 600nm em espectrofotômetro Beckman DU640. Quando a cultura atingiu DO de 0.6 esta foi transferida para garrafas de centrifugação e deixada no gelo por 15 minutos. As células foram recolhidas por centrifugação a 5000rpm por 15 minutos a 4°C em centrífuga Beckman J2-MC em rotor JA-14. Em seguida as células foram ressuspensas em 500ml de água MilliQ gelada e ficaram por 30 minutos no gelo. As células foram novamente centrifugadas na mesma condição anterior e em seguida ressuspensas em 250ml de água MilliQ gelada, e foram deixadas no gelo por mais 30 minutos. Uma terceira centrifugação foi feita, sendo as células ressuspensas em 10ml de uma solução gelada de 10% de glicerol em água MilliQ, e incubadas por 20 minutos no gelo. Finalmente o material foi centrifugado a 9000rpm em rotor JA-20, e ressuspensado em 1500 μ l da solução de glicerol recém descrita. Alíquotas de

40µl dessa suspensão de células foram distribuídas em tubos de microcentrífuga e instantaneamente congeladas em N₂ líquido. Após o congelamento o material foi estocado a -70°C até o momento do uso.

3.5.4.2 Transformação por eletroporação

Cada alíquota de 40µl foi usada em uma transformação. As alíquotas foram retiradas do freezer e descongeladas no gelo. Acrescentou-se 1µl de mistura de ligação diluída uma vez e o tubo foi incubado em gelo por 2 minutos. As células foram então introduzidas na cubeta de eletroporação de 2mm de distância entre eletrodos. O pulso elétrico foi aplicado com 200 Ohm de resistência e 25kv de capacitância. Imediatamente foram adicionados 1000µl de meio LB e o material transferido para o tubo original da alíquota de células. Seguiu-se uma incubação de 1 hora a 37°C antes que as células fossem transferidas para meio LB sólido com 100mg/ml de ampicilina. As placas de Petri foram deixadas a 37°C por 18 horas, quando foi possível a visualização das colônias de transformantes.

3.5.4. Amplificação da biblioteca genômica.

Para aumentar a quantidade de plasmídios na biblioteca as colônias foram recolhidas das placas e transferidas para 200 ml de meio LB com ampicilina. A transferência foi feita pela adição de 1ml de meio LB líquido a cada placa, seguida de raspagem das colônias com uma alça de Drigalski e adição ao frasco de 200ml. Uma vez colhidas as colônias de todas as placas, a cultura resultante foi incubada a 37°C por 3 horas, permitindo a multiplicação das células portadoras dos plasmídios da biblioteca. Ao final desse período, 10 alíquotas de 500µl da cultura foram estocadas com glicerol a -70°C, para uso futuro da biblioteca. O restante da cultura foi usado para extração dos plasmídios da biblioteca.

3.5.5. Extração de DNA plasmidial da biblioteca ("Midi-Prep")

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina. Uma amostra de 200ml da cultura de bactérias, contendo os plasmídios da biblioteca foram centrifugadas a 5000rpm em rotor JA-14 a 4°C sendo a massa celular ressuspensa em 8ml de solução I de extração de plasmídios. Em seguida foram acrescentados 8ml de solução II, homogeneizando cuidadosamente a mistura, até obter-se uma consistência pegajosa, uma confirmação indireta do rompimento das células. Adicionaram-se 8ml de solução III, repetindo-se a homogeneização cuidadosa da mistura, que incubada em gelo por 10 minutos. Após esse período observou-se a formação de um precipitado branco composto por restos celulares e DNA genômico de *E. coli*. Esse material foi centrifugado a 18000rpm a 4°C por 20 minutos em rotor JA-20, sendo o material precipitado descartado, transferindo-se o sobrenadante para um tubo limpo. Foram adicionados 48ml de etanol 100% a esse tubo e após homogeneização o material foi incubado a -20°C por 60 minutos, seguido de centrifugação a 9000rpm por 10 minutos, observando-se ao final do processo, a presença de um precipitado composto por DNA plasmidial e RNA. O precipitado foi lavado em etanol 70% e secado a temperatura ambiente antes de ser ressuspensa em 500µl de TE. Não foi feito um tratamento para remoção do RNA, uma vez que de acordo com Gietz e Woods, 1994, a presença de RNA na solução de DNA a ser utilizada em transformação de *S. cerevisiae* aumenta a eficiência de obtenção de transformantes.

3.5.6. Avaliação da qualidade da biblioteca obtida.

A solução contendo os plasmídios da biblioteca foi usada para transformar *E. coli*, com o intuito de se avaliar a percentagem de plasmídios contendo fragmentos de DNA de *S. cerevisiae* e o tamanho médio desses fragmentos. Os transformantes foram plaqueados em meio LB com ampicilina, contendo IPTG e XGAL, para avaliação da atividade de β-galactosidase nos

transformantes. As colônias que conservaram a atividade, de cor azul, foram consideradas como portadoras do vetor sem inserto, enquanto que as colônias que perderam a atividade, e que permaneceram claras, foram consideradas como clones portadores de DNA recombinante.

Para avaliação do tamanho médio de insertos, 36 colônias foram tomadas ao acaso da biblioteca, cultivadas em 2ml de LB com ampicilina e usadas para extração de plasmídios ("Mini-Prep"). Foram adicionados 1500µl de cultura de bactérias a tubos de microcentrífuga e centrifugados a 13000rpm por 1 minuto. O meio de cultura foi descartado e as células foram ressuspensas em 100µl de solução de preparação de plasmídios I. Foram adicionados 200µl de solução II e foi feita a homogeneização. Em seguida, 150µl de solução III foram adicionados e os tubos foram deixados no gelo por 5 minutos. O material foi então centrifugado a 13000rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo limpo, contendo 800µl de etanol absoluto gelado. Após 10 minutos a -70°C, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 13000rpm e o sobrenadante descartado. O precipitado, contendo DNA plasmidial e RNA, foi lavado em etanol 70%, secado a temperatura ambiente e ressuspensado em 50µl de TE. Amostras de 2µl de cada extração foram digeridas com RNase, *EcoRI* e *HindIII*, de acordo com a recomendação do fabricante. Os fragmentos da digestão foram separados em gel de agarose 0.8%. O tamanho dos insertos foi medido e a média aritmética dos tamanhos foi calculada.

3.6. Seleção de clones contendo o gene *NYS*.

3.6.1. Preparo de células para transformação de *S. cerevisiae*.

Os plasmídios da biblioteca genômica de M606.1c foram introduzidos na linhagem de HD93.15d pelo método de transformação com PEG (Polietileno Glicol) e acetato de lítio (Gietz & Woods, 1994). Uma colônia

isolada dessa levedura foi inoculada em 5 ml de meio YEPD e incubada por 18 horas a 30°C a 200rpm. A densidade celular na cultura resultante foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer. Foi calculado o volume de cultura necessário para inóculo em um frasco com 50 ml de meio YEPD, estimando-se que a densidade celular resultante fosse de 1×10^6 células por ml. Essa segunda cultura foi incubada a 30°C a 200rpm até que a densidade celular atingisse 2×10^7 células por ml. Em seguida as células foram centrifugadas a 1500g por 5 minutos, a massa celular foi lavada em 20ml de água estéril e novamente centrifugada. As células foram ressuspensas em 1ml de água estéril e transferidas para um tubo de microcentrífuga. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 500µl de uma solução 0.1M de acetato de lítio e incubadas a 30°C por 15 minutos.

3.6.2. Transformação de *S. cerevisiae*.

Nos experimentos de transformação, foram utilizados 5µl de DNA plasmidial da biblioteca misturados com 5µl de DNA carreador. Essa mistura foi transferida para um tubo de microcentrífuga estéril e em seguida foram adicionados 50µl da suspensão de células competentes. Foram adicionados 300µl de solução de 40% de PEG e 0.1M de acetato de lítio. A mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos e em seguida a 42°C por 20 minutos. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 6000rpm por 1 minuto, descartando-se a fase líquida. As células foram ressuspensas em 1ml de água estéril e plaqueadas em meio YNB suplementado com triptofano, leucina e histidina. As células foram incubadas a 30°C por 3 dias. A eficiência de transformação foi de 10^4 transformantes por µg de DNA, com o vetor YEp352 em concentração conhecida.

3.6.3. Seleção de clones contendo o gene *NYS*.

Após três dias, as colônias se tornaram visíveis e o número médio de colônias por placa foi estimado. Cada uma das placas de YNB foi replicada para uma placa de YEPD, contendo 10ppm de nistatina. As placas de réplica foram incubadas a 30°C por 5 dias, até que aparecessem colônias resistentes a nistatina. As colônias resistentes foram transferidas para placa de YNB sem uracila e selecionadas para a etapa seguinte.

3.6.4. Teste das marcas de HD 93.15d.

Para afastar a possibilidade da seleção de um contaminante ou mesmo de um mutante, os clones selecionados no meio com nistatina tiveram suas marcas auxotróficas testadas. Cada clone foi inoculado em meio YNB com todas as combinações dos nutrientes leucina, uracila, histidina e triptofano agrupados 3 a 3. Apenas os clones que tiveram o mesmo genótipo de HD 93.15d (excetuando-se *ura3*), foram consideradas como transformantes.

3.6.5. Extração de plasmídios de levedura.

As leveduras transformantes resistentes a nistatina foram multiplicadas em 5ml de YEPD líquido a 30°C por 18 horas. Foram transferidos 1.5ml da cultura para tubo de microcentrifuga e as células foram centrifugadas a 13000rpm por 1 minuto. O meio de cultura foi descartado e as células ressuspensas em 200µl de solução de lise, para extração de plasmídios. Foram adicionados 200mg de bolinhas de vidro e 200µl da mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Os tubos foram bem fechados e agitados em vortex a velocidade máxima por 3 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados a 13000rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e 2µl dessa solução foram usados para transformar *E. coli*.

3.6.6. Teste da capacidade de transformação dos plasmídios.

Os plasmídios extraídos dos transformantes resistentes foram usados para transformar novamente a levedura HD93.15d. Os plasmídios que foram capazes de retransformar a levedura e de conferir-lhe resistência a nistatina, foram selecionados para continuação dos estudos.

3.7. Avaliação do fragmento clonado.

3.7.1. Mapeamento de restrição dos plasmídios.

Inicialmente, os plasmídios foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (que flanqueiam o sítio de *BamHI* no vetor YEp352) para averiguação do tamanho dos fragmentos clonados. O plasmídio portador do menor fragmento foi selecionado para mapeamento de restrição, subclonagem e sequenciamento.

3.7.2. Mapeamento de restrição.

O mapa de restrição foi construído pela comparação de tamanho de fragmentos de restrição gerados independentemente por diferentes endonucleases e em combinações duas a duas. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 0.8% e o tamanho de cada um foi estimado por comparação com o padrão de peso molecular λ *HindIII*, feita pelo software DNAFRAG (Shaffer & Sederoff, 1981).

3.7.3. Sequenciamento da extremidade 5' do fragmento clonado.

A extremidade 5' do clone selecionado foi sequenciada pelo método de terminação de cadeia (Sanger et al., 1975), utilizando o kit RPN2436 Amersham. O oligonucleotídeo iniciador ou "primer" utilizado foi o reverso M13 de sequência 5'CAGGAAACAGCTATGAC₃ marcado com fluoresceína na extremidade 5'. A leitura da sequência de bases foi feita no sequenciador

automático a laser ALF Pharmacia. A reação de sequenciamento foi feita de acordo com as recomendações do fornecedor do kit.

A sequência obtida foi utilizada para consulta ao banco de dados *Saccharomyces* Genome Database - SGD, Stanford University, E.U.A. (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>) que abriga a sequência completa do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. O mapeamento do gene *NYS* foi feito por busca de homologia entre a sequência obtida do clone e as sequências dos 16 cromossomos da levedura. Os dados de mapa completo de restrição da região clonada no tipo selvagem e de localização de ORF's hipotéticas dentro do clone também foram obtidos da mesma fonte.

3.8. Subclonagem.

Com objetivo de reduzir ao máximo o tamanho do fragmento contendo o gene *NYS*, o clone original selecionado foi subclonado em diferentes fragmentos. A divisão do clone original levou em conta o mapa de restrição e os dados do SGD sobre a possível posição de ORF's. Os fragmentos para subclonagem foram gerados por digestão do clone original com as enzimas de restrição apropriadas e purificação de blocos de agarose.

As bandas de gel de agarose, contendo os fragmentos a serem subclonados, foram recuperadas como descrito a seguir. Uma vez localizada a banda de interesse no gel, esta foi cortada com auxílio de estilete e subdividida em pequenos cubos de aproximadamente 2mm de lado. Esses pedaços de agarose, contendo DNA, foram inseridos em um tubo de microcentrífuga de 500µl de capacidade especialmente preparado. Os tubos tinham pequenos furos na tampa e no fundo, sendo que o furo do fundo era coberto por lã de vidro. Após a inserção da agarose no tubo, estes foram imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido. Em seguida foram colocados dentro de um segundo tubo de 1.5ml de capacidade cuja tampa foi previamente removida e então centrifugados a 13000rpm por 8 minutos. Após a centrifugação, uma

solução contendo o DNA se acumulou no tubo de 1.5ml, enquanto que a agarose permaneceu no tubo de 500 μ l. A solução de DNA foi transferida a um tubo limpo e foi feita uma extração da agarose remanescente com um volume de mistura cloroformio-álcool isoamílico. Novamente, centrifugou-se a amostra a 13000rpm por 5 minutos e a fase aquosa foi transferida a um tubo limpo. Em seguida foram adicionados 10% de volume de uma solução de acetato de sódio 3M. O DNA foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto e incubação a -70°C por 60 minutos. Após esse período, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 13000rpm, para coleta do precipitado de DNA que foi lavado em etanol 70%, secado a temperatura ambiente e ressuspendido em água MilliQ. Os fragmentos de DNA assim preparados, foram utilizados para ligação ao vetor YEp352.

O vetor foi preparado assim como foi descrito para a preparação da biblioteca, mudando apenas as enzimas responsáveis pela sua linearização. A ligação entre fragmento e vetor foi feita de acordo com a recomendação do fornecedor da T₄ DNA ligase (Gibco BRL). Os produtos de ligação foram usados para transformar *E. coli*.

Para as transformações da subclonagem foi empregado método do cloreto de cálcio (Ausubel, 1994). Uma colônia isolada de células de *E. coli* DH5 α F' foi inoculada em 5 ml de meio LB e incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação a 200 rpm. Em seguida, 100 μ l dessa cultura foram inoculados em 30ml de meio LB e incubados a 37°C sob agitação. O acompanhamento da multiplicação das células foi feito por leitura de densidade óptica (DO) a 600nm e quando a cultura atingiu DO 0.6, foi transferida para tubo de centrifugação e deixada no gelo por 15 minutos. As células foram recolhidas por centrifugação a 3000rpm por 15 minutos a 4°C em rotor JA-20. Em seguida as células foram ressuspendidas em 5ml uma solução de cloreto de cálcio 0.1M gelada e estéril, e ficaram por mais 5 minutos no gelo. As células foram novamente centrifugadas na mesma condição anterior e em seguida, ressuspendidas em

1ml da mesma solução, transferidas a um tubo de microcentrífuga e deixadas no gelo até o momento do uso. Foram adicionados 2 μ l de DNA a 20 μ l de suspensão de bactérias competentes e a mistura foi incubada no gelo por 30 minutos. Após esse tempo os tubos contendo as células foram colocados a 42°C por 60 segundos e imediatamente, colocados em banho de gelo onde foram deixados por 5 minutos. Após o choque térmico foram adicionados 1000 μ l de meio LB, seguindo-se uma incubação por 1 hora a 37°C. As células foram plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina, IPTG e XGAL. As placas de Petri foram deixadas a 37°C por 15 horas, quando já foi possível a visualização das colônias de transformantes.

As colônias brancas, que perderam a atividade de β -galactosidase, foram inoculadas em 2ml de LB com ampicilina e cultivadas a 37°C por 18 horas com agitação a 200rpm. Essas bactéria tiveram seus plasmídios extraídos e digeridos com as enzimas apropriadas para confirmação da subclonagem.

Uma vez preparados os subclones, estes foram usados para transformar a linhagem de *S. cerevisiae* HD93.15d. Os plasmídios capazes de conferir resistência a nistatina foram usados para a continuação da subclonagem. Este procedimento continuou até a obtenção do menor fragmento capaz de conferir resistência a nistatina na linhagem sensível.

3.9. Sequenciamento do gene *NYS*.

Após a obtenção do fragmento de DNA contendo o gene *NYS* em tamanho mínimo, foi feito o sequenciamento completo. Os mesmos procedimentos utilizados no sequenciamento anterior, foram aplicados a subclones específicos de regiões do gene *NYS*. Os dados obtidos foram novamente submetidos ao SGD para comparação entre a sequência de bases do gene *NYS* e a da sua região correspondente no genoma do tipo selvagem sensível.

3.10. Análise da composição de ergosterol das linhagens.

A composição de ergosterol foi avaliada pelo método descrito por Shaw e Jefferies, em 1953. As linhagens foram crescidas em meio YEPD líquido para a obtenção de 5 gramas de massa celular fresca. Este material foi ressuspendido em 10 ml de uma solução de KOH 40% peso/volume, e em seguida transferido para um balão de refluxo de 100ml. Os balões de refluxo foram conectados a condensadores retos, e a suspensão foi fervida, por duas horas, para a reação de saponificação. Concluído o período de refluxo, a suspensão foi transferida para um funil de separação de 250ml e extraída por três vezes com 50ml éter etílico. Os lipídios não saponificáveis (esteróis), com este procedimento, passaram da fase aquosa para a fase apolar do éter. Após as extrações, as três porções de éter foram reunidas e extraídas duas vezes com 25ml de água. As fases foram separadas novamente, em funil de separação. Os tubos contendo a fração lipídica não saponificável dissolvida em éter, foram transferidos para estufa e deixados a 50°C por duas horas, até que o éter evaporasse por completo. O resíduo ficou depositado na parede do tubo e foi ressuspendido em etanol absoluto, também a 50°C. Após a completa dissolução do extrato não saponificável, o volume de etanol foi acertado para 50ml. Uma alíquota de 2.5ml dessa solução foi diluída 20 vezes a um volume final de 50ml. Essa solução foi analisada, quanto à absorção de luz ultravioleta, por espectrofotometria entre os comprimentos de onda 215nm e 320nm. O cálculo do teor de ergosterol foi feito através da fórmula de correção da absorbância do ergosterol a 282nm.

$$\begin{aligned} \text{ABS } 282\text{nm (corrigida)} &= \text{ABS a } 282\text{nm} \times 2.505 + \text{ABS a } 293.5\text{nm} \times 1.395 \\ &\quad - \text{ABS a } 271.5\text{nm} \times 2.421 - \text{ABS a } 310\text{nm} \times 1.479 \end{aligned}$$

Como foi usada uma cubeta de 10mm, o valor da absorbância corrigida foi dividido por 306 para obter a percentagem peso/volume de

ergosterol na solução de etanol diluída 1:20. O cálculo do teor de ergosterol na massa fresca foi feito pela multiplicação da percentagem de ergosterol na diluição analisada por 200.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O interesse pela resistência a nistatina foi resultado de estudos sobre a contaminação de dornas de fermentação, por leveduras com propriedades indesejáveis e competidoras da cultura pura, utilizada como inóculo para a produção de etanol combustível. Uma levedura resistente a nistatina e adequada ao emprego industrial poderia combinada com a ação deste antibiótico fúngico, eliminar leveduras indesejáveis. Esta hipótese resultou no desenvolvimento de um processo de produção de etanol com o controle de leveduras contaminantes (patente outorgada INPI 8903744-8), o qual depende do gene dominante de resistência a nistatina obtido por Tavares (1992, 1995). Este gene e o mecanismo de resistência por ele conferido apresenta diferenças significativas em relação ao tema descrito na literatura. A maior parte dos genes descritos são genes recessivos que impedem a formação do ergosterol e com isto tornam sem eficácia o efeito da nistatina, que primariamente seria ligar-se ao ergosterol na membrana plasmática, causando a formação de poros e perda de material citoplasmático. Conhecer melhor este gene demandou estudos visando sua localização genômica, estrutura e função, parte do qual foi realizado neste trabalho, como descrito a seguir.

4.1. Construção da biblioteca genômica de M606.1c

A estratégia empregada para o isolamento do gene *NYS*, foi dividida em duas etapas. A primeira compreendeu a construção de uma biblioteca genômica com o DNA de uma linhagem de *S. cerevisiae* resistente a nistatina derivada de M606, o segregante M606.1c. Tal biblioteca foi construída a partir de fragmentos de DNA representativos da totalidade do genoma de M606.1c. Dessa maneira foi possível assegurar que todos os genes da linhagem resistente estivessem representados. A segunda etapa do processo foi a seleção daquele gene da linhagem M606.1c que é o responsável pela resistência. Conhecendo a herança monogênica e dominante do gene *NYS* (Tavares, 1995), foi traçada uma estratégia

de seleção positiva de clones em meio com nistatina. A seleção positiva é tipo de seleção de clones mais simples e direta, entretanto é necessário que o gene expresse sua dominância de maneira marcante, permitindo com facilidade a identificação das colônias desejadas e a eliminação de falsos positivos, mutantes e contaminantes. Uma vez introduzido na célula sensível, o gene dominante se expressaria, permitindo a essa célula adquirir o fenótipo de resistência de M606.1c. Enquanto isso as células transformadas com os outros genes, não ligados à resistência, permaneceriam na condição de sensibilidade e não seriam capazes de formar colônias. A seguir estão descritos os resultados da construção da biblioteca genômica e da seleção positiva de clones contendo o gene *NYS*.

4.1.1. Preparo dos fragmentos de DNA genômico.

Para obtenção de fragmentos de DNA genômico com tamanho entre 5 e 6 kb foi feita a digestão parcial do DNA de alto peso molecular de M606.1c com a endonuclease de restrição *Sau3AI*. O tamanho do DNA usado para digestão parcial foi superior a 70kb, estimado em gel de agarose 0.4%.

O ensaio de determinação da concentração de *Sau3AI* necessária para a produção de fragmentos no tamanho desejado foi executado conforme descrito no capítulo três. Os fragmentos produzidos por concentrações decrescentes

Figura 2. Digestão parcial do DNA genômico de M606.1c com *Sau3AI*. Em todas as canaletas, exceto a do marcador de peso molecular, foram aplicados 2µg de DNA. Notar a diminuição do tamanho dos fragmentos com o aumento da concentração de *Sau3AI*. M - Marcador λ -*HindIII*; A - 0U *Sau3AI*/2µg DNA M606.1c; B - 0.100U; C - 0.125U; D - 0.150U; E - 0.175U.

da enzima foram observados em gel de agarose. A figura 2 apresenta a fotografia de um desses geis.

Concentrações superiores a 0.25U de enzima digeriram completamente 2µg de DNA genômico em 15 minutos de reação a 37°C, como se pôde observar na figura 2. Concentrações inferiores a 0.10U praticamente não alteraram a integridade do DNA de alto peso molecular. A reação contendo 0.125U por 2µg de DNA genômico propiciou a formação de fragmentos contidos, em sua maioria, na faixa de tamanho desejada de 5.0 a 6.0kb. A escala dessa reação padrão foi aumentada 10 vezes em volume, mantendo as concentrações de *Sau3AI* e DNA genômico fixas. Optou-se por fazer 10 reações desse tipo ao invés de aumentar a escala da reação padrão em 100 vezes. Foi possível notar em alguns dos experimentos de digestão parcial que o volume final da reação também exerce influência sobre o tamanho dos fragmentos gerados, havendo diferenças nos resultados após aumentos de escala superiores a 10 vezes. Assim a alteração do tamanho médio dos fragmentos de restrição foi menor fazendo-se 10 reações em escala 10 vezes da reação padrão do que seria se fosse feita uma reação em escala 100 vezes. A quantidade obtida de DNA parcialmente digerido foi de 200µg ao final das reações.

Ao final da preparação dos fragmentos de digestão parcial, obteve-se uma média de tamanho de 6.0 kb exatamente como planejado. Entretanto, a população de fragmentos continha, em menor concentração, moléculas que variavam de 1.0 até 20.0kb. A presença dessas moléculas na biblioteca poderia reduzir a uniformidade de tamanho de insertos podendo prejudicar a qualidade final da mesma. Para reduzir a participação de moléculas menores que 5.0kb e maiores que 7.0kb no DNA utilizado para ligação, foi feito um fracionamento dos fragmentos em gradiente de concentração de sacarose. Dessa maneira foi possível dividir em faixas de tamanho, os fragmentos gerados por digestão parcial do DNA genômico. Os 200µg de DNA provenientes da digestão parcial foram divididos pelo fracionamento em 35 frações de 750µl cada. Amostras dessas frações foram avaliadas em gel de agarose 0.8%. Esse gel está representado na figura 3A, que mostra a maioria das canaletas sem qualquer conteúdo de DNA, enquanto que apenas as frações 18, 19, 20 e 21 continham fragmentos de DNA de tamanhos decrescentes. Na figura 3B, apenas as frações com DNA estão representadas,

Figura 3. A - Gel de agarose para seleção de frações com fragmentos de digestão parcial no tamanho adequado à ligação ao vetor. B - Gel de agarose mostrando em detalhe as frações 18, 19, 20 e 21.

podendo-se fazer uma melhor avaliação do tamanho médio dos fragmentos em cada fração. A fração 19, com fragmentos de 4.6 a 7.0kb, e a fração 20 com fragmentos de 3.0 a 6.0kb foram selecionadas para ligação ao vetor de clonagem.

O fracionamento em gradiente de concentração de sacarose teve um rendimento muito satisfatório, apesar de ser mais trabalhoso e demorado em relação aos métodos de separação e purificação de DNA de agarose. A pureza e quantidade do DNA obtido foram superiores às que se poderia obter por outros métodos mais rápidos. Certamente esse é o melhor método para fracionamento de DNA digerido, sobretudo quando se deseja construir uma biblioteca genômica.

4.1.2. Preparo do vetor de clonagem.

A preparação do vetor teve como objetivo aliar baixa frequência de vetor não digerido ou recircularizado a uma capacidade de ligação ao inserto de DNA genômico. O primeiro cuidado tomado foi na digestão do vetor com a enzima *Bam*HI. O vetor foi digerido até que se conseguiu-se uma percentagem de vetor não digerido

Tabela 1. Efeito da Fosfatase Alcalina na capacidade de religação do vetor. Em todos as transformações a quantidade de DNA utilizada foi de 10ng.

DNA utilizado na transformação de <i>E. coli</i>	colônias transformates
YEp352 (10ng)	1160*
YEp352 digerido com <i>Bam</i> HI	47**
YEp352 dig. <i>Bam</i> HI, ligado com T ₄ DNA ligase	720
YEp352 dig. <i>Bam</i> HI, ligado T ₄ , desfosforilado com 0U de CIAP	600
YEp352 dig. <i>Bam</i> HI, ligado T ₄ , desf. 0.01U de CIAP	75
YEp352 dig. <i>Bam</i> HI, ligado T ₄ , desf. 0.05U de CIAP	52
YEp352 dig. <i>Bam</i> HI, ligado T ₄ , desf. 0.10U de CIAP	40
YEp352 dig. <i>Bam</i> HI, ligado T ₄ , desf. 0.50U de CIAP	43

* Eficiência de transformação de 1.1×10^6 transformantes por mg de DNA.

** Aproximadamente 4% de vetor não digerido.

inferior a 5% do total. A razão de vetor não digerido sobre vetor digerido foi monitorada por transformação de *E. coli* com amostras da digestão de YEp352 (Tabela 1).

Uma vez obtido o DNA plasmidial altamente digerido, foi feito o tratamento desse material com fosfatase alcalina de intestino de bezerro (CIAP). A CIAP remove os grupos fosfato das extremidades 5' do DNA, fazendo com que essas extremidades só sejam capazes de se ligar a extremidades que conservam seus fosfatos 5'. Quando o vetor linearizado tem ambas as extremidades desfosforiladas, a recircularização da molécula só pode ocorrer pelo intermédio de um segundo fragmento, no caso o inserto de DNA genômico a ser clonado. Dessa maneira pôde-se reduzir muito na biblioteca genômica o número de clones que não continham insertos.

Entretanto, se a CIAP for utilizada em excesso pode haver uma diminuição da eficiência de ligação entre vetor e inserto. Para evitar os efeitos da CIAP remanescente no vetor, foi utilizada na desfosforilação a menor concentração da enzima capaz de evitar a religação do vetor digerido. Amostras do vetor foram tratadas com quantidades decrescentes de CIAP, o material resultante foi ligado

com T₄ DNA ligase e usado para transformar *E. coli*. A tabela 1 apresenta a ação de desfosforilação de diferentes concentrações de CIAP sobre 200ng de plasmídeo digerido com *Bam*HI.

A concentração escolhida para desfosforilação do vetor usado na preparação da biblioteca foi de 0.05U/μg de vetor. Após o tratamento com CIAP a reação foi aquecida por 10 minutos a 75°C, seguida por uma extração da enzima remanescente com fenol/cloroformio/álcool isoamílico. Finalmente o material foi aplicado em gel de agarose 0.8% e a banda correspondente ao plasmídeo digerido foi cortada e o DNA do vetor foi recuperado da agarose.

Esses tratamentos tiveram por objetivo a obtenção de um vetor com alta qualidade, fundamental a construção de uma biblioteca genômica com alta proporção de clones contendo inserto.

4.1.3. Avaliação da biblioteca genômica de *S. cerevisiae* M606.1c.

Para o máximo aproveitamento dos produtos de ligação entre o vetor e os fragmentos genômico da fração 19, foi utilizada a transformação de *E. coli* por eletroporação. Enquanto a eficiência média de transformação pelo método do cloreto de cálcio foi de 5×10^6 , a eficiência mínima nas transformações por eletroporação foi de 2×10^8 . Isso significa que para cada colônia de bactéria obtida por CaCl₂ pôde-se obter pelo menos 40 colônias por eletroporação.

Após a transformação com a mistura de ligação, foram obtidas 45 placas de Petri contendo cada uma aproximadamente 1500 colônias de *E. coli*, totalizando 67500 colônias. Após a amplificação da biblioteca em meio líquido, uma alíquota dos plasmídios foi utilizada para retransformar *E. coli*. Foram selecionadas ao acaso 36 colônias transformantes para extração do DNA plasmidial. Esses plasmídios foram digeridos com *Eco*RI e *Hind*III, e os produtos da digestão foram separados em gel de agarose. Os sítios de restrição dessas enzimas estão localizados em lados opostos ao sítio de clonagem *Bam*HI (mapa do vetor na figura 1.), portanto a digestão dos plasmídios da biblioteca com *Eco*RI e *Hind*III permitiu a separação entre vetor e inserto. A figura 4 apresenta o gel com a digestão *Eco*RI/*Hind*III de cada um dos 36 clones avaliados.

Dos 36 clones examinados, 18 não continham inserto. O tamanho dos insertos dos 18 clones restantes foi determinado por comparação com o marcador de peso molecular λ *Hind*III. O inserto médio foi estimado em 5.5 kb, valor coerente com o tamanho médio de fragmentos contidos na fração 19 usada

Figura 4. Gel de agarose com produtos da digestão de 36 clones aleatórios da biblioteca genômica com *EcoRI* e *Hind* III. M - Marcador λ -*Hind*III; V - Vetor YEp352 digerido com *Bam*HI.

para ligação ao vetor. Através desse experimento também foi possível estimar em 50% a percentagem de clones sem inserto na biblioteca. A participação de clones sem inserto foi posteriormente reavaliada por plaqueamento em LB contendo IPTG e XGAL de bactérias da cepa DH5 α F' transformadas com a biblioteca. As colônias que desenvolveram a cor azul possuíam o gene *LacZ* da B-galactosidase do vetor conservado, sendo capazes de converter o XGAL em seu produto cromogênico. As colônias que permaneceram brancas perderam a atividade do gene *LacZ* pela inserção de um fragmento de DNA de *S. cerevisiae* no sítio *Bam*HI. A contagem das células brancas e das células azuis revelou uma proporção de 43% de azuis e 57% de brancas, ou seja 43% de plasmídios sem inserto na biblioteca. Assim estimou-se em 38500 (57% de 67500) o número de clones com inserto da biblioteca.

Uma vez determinado o tamanho médio dos insertos e a percentagem de plasmídios sem inserto, foi possível estimar a probabilidade de seleção do gene de resistência a nistatina através dessa biblioteca genômica. O cálculo proposto por Clarke e Carbon em 1976, estima a probabilidade de clonagem de genes a partir de bibliotecas genômicas, baseado no tamanho do genoma de um organismo. No caso de *Saccharomyces cerevisiae* o genoma possui cerca de 13 megabases. A formula de Clarke e Carbon e o cálculo utilizando os dados da biblioteca de genômica de M606.1c etão apresentados a seguir:

$$P = 1 - (1 - I / G)^n \text{ onde,}$$

P é a probabilidade de clonagem;

I é o tamanho médio de insertos em pares de bases;

G é o tamanho do genoma do organismo em pares de bases;

n é o número de clones na biblioteca.

Substituindo nessa fórmula os valores da biblioteca de M606.1c obtém-se:

$$P = 1 - (1 - 5500 / 13000000)^{38500} =$$

$$P = 1 - (1 - 4.23 \times 10^{-4})^{38500} = 1 - (0.99957)^{38500} =$$

$$P = 1 - 8.4 \times 10^{-8} = 0.999999915 \text{ ou } 99.99\%$$

Devido ao tamanho reduzido do genoma de *S. cerevisiae*, com um número relativamente pequeno de clones foi possível obter uma probabilidade de praticamente 100% de sucesso na seleção do gene *NYS*. Este foi um resultado plenamente satisfatório, que cumpriu os requisitos necessários para o isolamento do gene de resistência a partir de tal biblioteca.

4.2. Seleção dos clones contendo o gene de resistência a nistatina.

A estratégia para a identificação de clones contendo o gene *NYS* foi a seleção positiva de colônias de *Saccharomyces cerevisiae*, transformadas com os plasmídios da biblioteca em meio de cultura YEPD contendo 10 ppm de nistatina. Não se sabia a princípio, se a resistência seria expressada na primeira geração de células transformantes. A resistência a nistatina está normalmente ligada a modificações na membrana plasmática. Como essa é uma estrutura celular que é herdada pelas células da geração seguinte à transformação, provavelmente as células recém transformadas teriam que rearranjar sua membrana externa antes de serem expostas à nistatina. A seleção direta em nistatina poderia ser precipitada, e prevenir a seleção dos clones. Como artifício para contornar essa dificuldade, optou-se pela seleção de transformantes prototróficos para *URA3*,

em meio mínimo sem uracila, com posterior transferência dos transformantes para meio completo com nistatina. Para tornar essa alternativa viável, a linhagem receptora dos plasmídios foi HD93.15d, uma linhagem haploide que possui além de *ura3*, as mutações *leu2*, *his3* e *trp1*. O vetor de clonagem utilizado, YEp352, possui como gene marcador para seleção de transformantes o gene *URA3*, que complementa a mutação *ura3* em linhagens auxotróficas.

Após a transformação de HD93.15d com os plasmídios da biblioteca, aproximadamente 60000 colônias de transformantes se formaram em 50 placas de Petri com meio mínimo sem uracila. Após 3 dias de incubação em meio mínimo as células se multiplicaram por várias gerações a ponto de formar colônias visíveis. Durante esse crescimento houve tempo suficiente para a expressão da resistência a nistatina, as colônias que receberam o gene de resistência puderam fazer as alterações necessárias em suas membranas, afastando-se a chance de uma seleção precipitada.

Com o auxílio de veludo, as placas de meio mínimo foram replicadas para meio completo YEPD, contendo 10 ppm de nistatina. Em duas placas separadas foram inoculadas HD93.15d transformada com YEp352, como linhagem sensível para controle, e M606.1c como linhagem resistente controle. Após 5 dias de incubação a 30°C foram identificadas quatro colônias de levedura crescendo nas placas réplica, nenhum crescimento na placa com HD93.15d e crescimento completo na placa onde foi inoculada M606.1c. As quatro colônias transformantes foram denominadas A, B, C e D e transferidas novamente para YNB sem uracila.

Para eliminar a possibilidade da seleção de um contaminante foram testados os genótipos dos quatro transformantes em YNB sem cada um dos nutrientes para os quais HD93.15d é deficiente. A tabela 2 apresenta o resultado do teste de marcas genéticas. Todos os 4 clones apresentaram o genótipo esperado *leu2*, *his3*, *trp1* e *URA3* conferido pelo vetor de clonagem YEp352.

Os plasmídios dessas leveduras foram recuperados e digeridos com *EcoRI* e *HindIII*, para liberação do fragmento clonado. Os produtos dessa digestão foram examinados em gel de agarose para determinação do tamanho do inserto presente em cada um deles. Outro fator que foi avaliado através dessa digestão, foi a sobreposição dos clones. É comum selecionar a partir de biblioteca genômicas preparadas por digestão parcial, clones que contém insertos com sobreposições.

Tabela 2. Teste de marcas genéticas dos 4 clones selecionados em meio completo contendo 10ppm de nistatina.

Linhagem	Crescimento em Meio Mínimo							
	YNB -ura	YNB -leu	YNB -trp	YNB -his	YNB +ura	+leu	+his	+trp
M606.1c	+	+	+	+				+
HD93.15d	-	-	-	-				+
HD93.15d YEp352	+	-	-	-				+
Clone A	+	-	-	-				+
Clone B	+	-	-	-				+
Clone C	+	-	-	-				+

Apesar de não conterem o mesmo fragmento clonado, esses clones comportam trechos da mesma região cromossômica, sendo muito empregados em mapeamento genômico.

Os clones A e D continham o mesmo inserto de DNA genômico enquanto B e C que continham fragmentos diferentes. Provavelmente A e D foram clones que se originaram do mesmo produto de ligação que após a amplificação dos plasmídios da biblioteca, se multiplicou em muitas cópias. Cópias diferentes do mesmo plasmídio teriam transformado duas células diferentes de HD93.15d e gerado os clones A e D. A digestão dos clones B e C não produziu fragmentos de DNA comuns aos de A e D, e tampouco comuns entre si. Os clones A e D continham um fragmento de tamanho estimado de 5kb, B continha um inserto de 4kb e C apresentou um inserto também de 4kb. Os quatro plasmídios foram usados para novamente transformar HD93.15d, afim de eliminar falsos transformantes e confirmar a suas capacidades de conferir resistência à linhagem sensível. Mais uma vez os transformantes foram selecionados para a prototrofia em relação à uracila e em seguida transferidos para meio completo com 10ppm de nistatina. Apenas os plasmídios A e D transformaram HD93.15d e conferiram-lhe resistência, sem haver diferenças perceptíveis entre eles em relação ao nível de resistência. B e C foram capazes de transformar HD93.15d, mas não lhe conferiram resistência, e por esse motivo foram descartados. O plasmídio A foi o selecionado para a subclonagem do gene *NYS* e foi designado YEpNYS1.

O isolamento de dois clones contendo o mesmo plasmídio forneceu um forte indício de que a região clonada realmente estava ligada à resistência. A chance de que um dos clones tivesse surgido por uma disseminação do outro foi afastada desde o início, uma vez que A e D foram isolados de placas de Petri distintas, sendo improvável que uma colônia tivesse conseguido "contaminar" o meio de outra placa.

4.3. Mapeamento de restrição e sequenciamento inicial de YEpNYS1.

O mapa de restrição de YEpNYS1 foi construído pela digestão desse DNA com as enzimas de restrição *HindIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *SalI*, *XhoI*, *BamHI*, *BglI* e *SmaI* em corte único, e em corte duplo com todas as combinações 2 a 2 entre elas. Os fragmentos gerados por restrição foram separados em geis de agarose e o tamanho de cada um estimado e utilizado nos cálculos da construção do mapa. O tamanho do inserto pôde ser precisamente determinado em 5900 pares de bases. Após a análise dos pesos moleculares dos fragmentos de restrição, foi possível a construção de um mapa de restrição para o inserto presente no clone YEpNYS1. Esse mapa está esquematizado na figura 5A. A figura 5B e a figura 5C, são representações de alguns dos geis de mapeamento dos sítios de restrição.

A partir da região de homologia do primer reverso M13 no vetor YEp352, foi feita a reação de sequenciamento de DNA sobre a extremidade 5' do fragmento NYS1. Foi obtida uma sequência de 380 pares de bases que foi comparada com os dados do Banco de Dados de *S. cerevisiae* (*Saccharomyces* Genome Database - SGD) que abriga a sequência completa do genoma desse organismo.

Através do software de alinhamento de sequências BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), Altschul et al. (1990), foi possível determinar a posição no mapa físico de *S. cerevisiae* da extremidade 5' do fragmento NYS1. A figura 6, ilustra o resultado da comparação entre a sequência obtida e o genoma de *S. cerevisiae*. Na sequência obtida, as bases 1 a 16 correspondem a sequências ainda do vetor. Na posição 17 observa-se a sequência GATC onde ocorreu a clivagem do DNA genômico de M606.1c pela enzima *Sau3AI*, marcando o início da sequência do fragmento clonado.

Em relação a esse sítio de restrição é interessante notar que sítio de *BamHI* existente no vetor foi perdido, uma vez que a base da posição 21 é

Figura 5. A - Esquema do mapa de restrição do plasmídeo YEpNYS1. B - Gel de agarose com produtos da digestão de YEpNYS1 com diferentes enzimas de restrição em cortes únicos. C - Gel de agarose com produtos da digestão de YEpNYS1 com diferentes enzimas de restrição em cortes únicos e combinados.

uma adenina. Como pôde-se notar no mapeamento de restrição, a enzima *Bam*HI não apresenta mais sítios de restrição no clone YEpNYS1, mesmo tendo sido usada para a linearização do vetor. O sítio de restrição original *Bam*HI no vetor era GGATCC, e após a ligação ao fragmento de *Sau*3AI, essa região passou a ter sequência GGATCA.

O alinhamento de sequência gerado pelo BLAST teve início na posição 17 do fragmento NYS1, que corresponde à posição 214.521 do cromossomo XIV de *S. cerevisiae*. Das 380 base sequenciadas, 16 correspondiam ao vetor e 364 ao fragmento NYS1. O número de identidades identificadas foi de 339 nas 364 bases do fragmento o que corresponde a 93%. Esse parâmetro considera apenas as bases de identidade perfeita nas posições correspondentes. O número de identidades positivas foi de 352 em 364, ou o equivalente a 96%. Esse parâmetro considera além dos alinhamentos perfeitos as ambiguidades positivas, normalmente encontradas nas extremidades 3' das sequências.

Apesar destes índices de similaridade de sequências serem altos (93% e 96%), poderia-se esperar uma similaridade de praticamente 100%, identificando apenas mutações ocasionais. A razão mais provável para as diferenças identificadas entre sequências foi a falta de repetições no sequenciamento dessa região.

Observando a figura 6, pode-se perceber que as diferenças começam a ser mais frequentes a partir da posição 210 do fragmento NYS1. Normalmente em torno desse ponto o sequenciamento começa a perder a fidelidade, sendo necessária a comparação entre repetições para a elaboração da sequência definitiva, sem ambiguidades. Entretanto, no caso deste primeiro sequenciamento o objetivo não foi a obtenção de uma sequência perfeita, somente a obtenção de uma sequência com um tamanho suficiente para comparação com o SGD. Uma sequência de apenas 50 bases seria suficiente para a localização do fragmento NYS1 no genoma de *S. cerevisiae*, por isso não se deu atenção às imperfeições encontradas na porção terminal da sequência.

O programa BLAST faz comparações ao longo de todo o genoma de *S. cerevisiae* e indica a probabilidade de que cada alinhamento esteja feito na posição correta do genoma. Essa probabilidade é expressa através de uma pontuação calculada a partir do número de identidades entre as sequências. A pontuação do alinhamento no cromossomo XIV foi de 1597, enquanto que a

A

```

1  GGGGKCGGTH CCCGGGGATC AMATTGGAAT TAAATGAGTT AAAGAGCGCA ATGGAAGTAC
61 ACGATGATTC GCGATGTTAC ACACATTTTT ATTAGAGCAG AAAACTGGGA GAAATGGAAA
121 TGAATCAAAT CATAACATAT CAAGACATTC TAGTTTTTAA TAAACCTAAT AATTATCGC
181 AAGAATCTTG GGTGTTATGT GTTGTATTTA GCGGCAATMA WTATHAAAAT ACCGTCTGCA
241 TTAMCCRTCT CCGTCACGTG AAGTAAAAAT TCCAAAAAAW WATTGAAAAA GAAAGAAAAT
301 AAGATCCAGA ATYMCTGAWG WTGAGCTTAT RGTACGGCAT GATTAACCTAC GCMWTTGTAT
361 ATWAAAGAAT CTTTGATTTT

```

B

>N210 Chromosome XIV Region from 210001 to 220000: [[Retrieve DNA](#)] [[Sequence Features](#)]
Length = 10000

Plus Strand HSPs:

Score = 1597 (239.6 bits), Expect = 7.8e-67, P = 7.8e-67
Identities = 339/364 (93%), Positives = 352/364 (96%), Strand = Plus / Plus

```

Query:      17  GATCAMATTGGAATTAAATGAGTTAAAGAGCGCAATGGAAGTACACGATGATTCGCGATG 76
              GATCA ATTGGAATTAAATGAGTTAAAGAGCGCAATGGAAGTACACGATGATTCGCGATG
Sbjct:    4521 GATCAAATTGGAATTAAATGAGTTAAAGAGCGCAATGGAAGTACACGATGATTCGCGATG 4580

Query:      77  TTACACACATTTTTATTAGAGCAGAAAACCTGGGAGAAATGGAAATGAATCAAATCATAAC 136
              TTACACACATTTTTATTAGAGCAGAAAACCTGGGAGAAATGGAAATGAATCAAATCATA C
Sbjct:    4581 TTACACACATTTTTATTAGAGCAGAAAACCTGGGAGAAATGGAAATGAATCAAATCATA-C 4639

Query:     137  ATATCAAGACATTCTAGTTTTTAATAAACCTAATAATTTATCGCAAGAATCTTGGGTGTT 196
              ATATCAAGACATTCTAGTTTTTA TAAACCTA TAATTTATCGCAAGAATCTTGGGTGTT
Sbjct:    4640 ATATCAAGACATTCTAGTTTTTA-TAAACCTA-TAATTTATCGCAAGAATCTTGGGTGTT 4697

Query:     197  ATGTGTTGTATTTAGCGGCAATMAWTATHAAAATACCGTCTGCATTAMCCRTCTCCGTCA 256
              ATGTGTTGTATTT GCGGCA T+A+T T AAAATACCGTCTGCATTA+CC+TCTCCGTCA
Sbjct:    4698 ATGTGTTGTATTT-GCGGCA-TCATT-TCAAAATACCGTCTGCATTACCCGTCTCCGTCA 4754

Query:     257  CGTGAAGTAAAAATTCCAAAAAAWWATTGAAAAA-GAAAGAAAA-TAAGATCCAGAATYM 314
              CGTGAAGTAAAAATT C AAAAA++ATTGAAAAA GAAAGAAAA TAAGATCCAGAAT++
Sbjct:    4755 CGTGAAGTAAAAATTTCCAAAAATATTGAAAAAAGAAAGAAAAATAAGATCCAGAATTC 4814

Query:     315  -CTGAWGWTGAGCTTATRGACGGCATGATTAACCTACGCMWTTGTATATWAAAGAATCTT 373
              CTGA+G+TGAGCTTAT+GTACGGCATGATTAACCTACGC +TTGTATAT+AAAGA TCTT
Sbjct:    4815 ACTGATGATGAGCTTATGGTACGGCATGATTAACCTACGCATTTGTATATTAAAGATTCTT 4874

Query:     374  TGATTTT 380
              TGATTTT
Sbjct:    4875 TGATTTT 4881

```

Figura 6. A - Sequência de DNA de 380pb da extremidade 5' do fragmento NYS1, determinada a partir do plasmídio YEpNYS1. B - Comparação entre a sequência da extremidade de NYS1 e o genôma de *Saccharomyces cerevisiae*. O alinhamento está apresentada da maneira que é fornecida pelo programa BLAST, por consulta via Internet. A sequência superior é a de NYS1 (Query), a sequência inferior é a do cromossomo XIV com suas coordenadas, e a sequência do meio é um consenso elaborado pelo programa. (+) corresponde a uma ambiguidade positiva e (-) a uma inserção/deleção.

pontuação do segundo alinhamento, em uma região do genoma mitocondrial, teve pontuação 207. Esse dado foi a primeira evidência de que o fragmento clonado NYS1 realmente correspondia a uma sequência do cromossomo XIV.

Como havia sido determinado no mapeamento de restrição de NYS1, o fragmento possuía aproximadamente 5900 pares de bases. Conhecendo esse tamanho e a posição genômica do início do fragmento NYS1, foram levantados no SGD dados a respeito da sequência correspondente no tipo selvagem. Foram solicitados dados referentes à região do cromossomo XIV entre as coordenadas 214.521 (início de NYS1) e 220.421 (término de NYS1, 214.521 + 5.900). Além da sequência de nucleotídeos dessa região, foram obtidos também dados sobre seu mapa de restrição e sobre as ORF's presentes nesse segmento.

O mapa de restrição fornecido pelo SGD foi idêntico ao determinado para o fragmento NYS1, excetuando-se um sítio da enzima *Xho*I na região 3' que estava presente em NYS1 e ausente na sequência do tipo selvagem. Essa correlação quase perfeita foi mais um dado a que permitiu a confirmação da localização do fragmento clonado. As informações sobre o mapa de restrição, de mais de 200 enzimas, fornecido pelo SGD foi de grande valor para a etapa seguinte de subclonagem do gene *NYS*.

A região correspondente ao fragmento NYS1 possui três "open reading frames", ORF's, potenciais genes que já foram sequenciados mas que ainda não tem a sua função conhecida. As ORF's são caracterizadas por possuírem na sua sequência um codon de iniciação de tradução (ATG) e um codon de terminação numa posição a 3' do mesmo quadro de leitura. Essas sequências foram identificadas pelo SGD por análise computacional e batizadas de acordo com um código de nomenclatura de ORF's. As ORF's presentes em NYS1 foram YNL232W, YNL231C e YNL230C. A primeira letra, "Y", se refere a "Yeast", indicando que se trata de uma ORF de *S. cerevisiae*. A segunda letra, "N", a décima quarta letra do alfabeto, indica que a ORF está localizada no cromossomo XIV. A terceira letra, "L", se refere a "Long", indicando que a ORF está no braço longo do cromossomo. A numeração foi dada de acordo com a ordem em que as ORF aparecem em cada braço cromossômico. A última letra, "W" ou "C", indica a fita de DNA em que a ORF se encontra, em homenagem a James Watson e Francis Crick, descobridores da estrutura em dupla hélice do DNA. A figura 7A apresenta uma reprodução da tabela de ORF's presentes na região onde se inclui o fragmento NYS1, da mesma

maneira que é fornecida pelo SGD. Além das três ORF's de função ainda desconhecida, também estava presente no fragmento NYS1 a ORF YNL229C que corresponde ao gene *URE2*, um regulador de transcrição e possivelmente uma glutatona transferase (Coffman et al., 1994).

A partir das coordenadas de início e término de cada ORF foi determinada a posição de cada um desses genes no mapa de restrição do fragmento NYS1. Assim, reunindo os dados do mapa de restrição aos dados obtidos do SGD foi possível redesenhar o mapa do fragmento clonado de forma mais completa e com informações importantes para a subclonagem. Esse mapa está ilustrado na figura 7B.

4.4. Subclonagem do gene *NYS*.

A estratégia usada para subclonagem do gene *NYS* foi baseada na suposição de que seria mais provável que a mutação, que deu origem à resistência, tivesse ocorrido dentro de um gene já existente. Para que uma mutação simples desse origem a uma nova ORF, teria que haver uma alteração que desse origem a um novo codon de iniciação e, ao mesmo tempo, a um codon de terminação a 3' no mesmo quadro de leitura. Como o segundo evento pareceu ser improvável, a subclonagem foi feita no sentido de isolar os quatro genes presentes em NYS1, e examinar a capacidade de cada um deles de conferir resistência a nistatina à linhagem selvagem HD93.15d.

A partir da análise do mapa de NYS1, levando em conta a conveniência dos sítios de restrição e a posição das ORF's, foram determinados quais os cortes enzimáticos a serem feitos para isolamento de cada gene.

A primeira ORF, YNL232W, foi isolada em um fragmento de 1850 pb gerado pela digestão de YEpNYS1 com *EcoRI*. Esse fragmento foi purificado de um gel de agarose e usado para ligação com o vetor YEp352, digerido também com *EcoRI* e desfosforilado com CIAP. A mistura de ligação foi usada para transformação de *E. coli* DH5 α F' (lac-) e as colônias transformantes contendo insertos nos seus plasmídios foram selecionadas em meio contendo IPTG e XGAL, figura 8.

A

Chromosomal Features Table

[Help](#)

[Search SGD](#) | [Virtual Library](#) | [Help](#) | [Gene Registry](#) | [Maps](#)
[BLAST](#) | [FASTA](#) | [Sacch3D](#) | [Design Primers](#) | [SGD Home](#)

Chromosome XIV features between coordinates 214600 to 220600 bp

Feature	Chromosomal Coordinates		Strand	Retrieve	Locus	Locus Description
	Begin	End				
YNL232W	214922	215800	w	DNA Info PhysicalMap	-	Hypothetical ORF
YNL231C	215986	217041	c	DNA Info PhysicalMap	-	Hypothetical ORF
YNL230C	217522	218661	c	DNA Info PhysicalMap	-	Hypothetical ORF
YNL229C	219136	220200	c	DNA Info PhysicalMap	URE2	transcriptional regulator, putative glutathione transferase

[Retrieve Features Left](#) <-----> [Retrieve Features Right](#)

B

Figura 7. A - Tabela do conteúdo do cromossomo XIV na região correspondente ao fragmento NYS1, ilustrada da mesma maneira como é fornecida pelo SGD. B - Mapa de restrição e posição das ORF's no fragmento NYS1 obtido a partir dos dados da figura 7A.

Figura 8. Placa de Petri com meio de cultura LB contendo IPTG e XGAL. Os transformantes que formaram colônias azuis foram descartados e os que formaram colônias claras foram selecionados para extração de plasmídios e confirmação da subclonagem

presente no vetor, tiveram seus plasmídios extraídos por “minipreps” e examinados para confirmação da presença do fragmento correto por digestão com *EcoRI*. O mesmo procedimento de seleção de subclones foi adotado em todas as subclonagens subsequentes. O subclone contendo a ORF YNL232W foi designado subclone A. Esse subclone continha além de YNL232W, a parte terminal 3’ de YNL231C. Considerou-se que essa parte de YNL231C não seria suficiente para promover a atividade do gene inteiro.

A ORF YNL230C também foi isolada em um fragmento de *EcoRI*, com 2300 pb. Esse subclone foi denominado subclone C e continha além de YNL230C a porção inicial (5’) de YNL231C. Novamente se considerou que essa região isoladamente não seria capaz de manter essa ORF ativa. O terceiro subclone, denominado D, continha o gene *URE2* (YNL229C) em um fragmento de 2600 pb gerado pela digestão de YEpNYS1 com *PstI*, ligado ao vetor YEp352 digerido com a mesma enzima.

A disponibilidade de variedade de enzimas de restrição na ocasião da subclonagem não permitiu que a ORF YNL231C fosse isolada das demais. Para contornar essa situação, adotou-se a estratégia de preparar um subclone que continha as ORF’s YNL232W e YNL231C. Esse subclone, designado B, foi preparado a partir de um fragmento de DNA de 3050 pb gerado pela digestão de

YEpNYS1 com *Sma*I e *Pst*II. O vetor YEp352 foi preparado pela digestão com ambas as enzimas. Uma particularidade dessa subclonagem, foi a ligação de terminações não coesivas, “blunt ends”, na extremidade *Sma*I e de terminações coesivas, “sticky ends”, na extremidade *Pst*II. Ainda estava presente nesse subclone a porção terminal de YNL230C, que foi considerada inativa.

Os quatro subclones, esquematizados na figura 9, foram usados para transformar a linhagem sensível HD93.15d para a prototrofia em relação à produção de uracila. Em seguida os transformantes foram transferidos para meio completo YEPD contendo nistatina e o crescimento das linhagens foi observado. A tabela 3 apresenta o resultado desse experimento.

Como controles foram inoculados no meio com nistatina a linhagem resistente, M606.1c, a linhagem sensível, HD93.15d, a linhagem sensível transformada com o vetor YEp352 sem nenhum fragmento clonado, e finalmente a linhagem sensível transformada com o plasmídeo YEpNYS1. A linhagem M606.1c apresentou colônias visíveis em 48 horas de incubação, mostrando resistência padrão. As linhagens sensíveis HD93.15d e HD93.15d YEp352 não se multiplicaram em 10 dias de incubação. A linhagem HD93.15d YEpNYS1 apresentou as primeiras colônias com 96 horas, e com 122 horas o crescimento completo. A diferença na velocidade de crescimento entre M606.1c e HD93.15d YEpNYS1 já havia sido notada nas primeiras linhagens selecionadas, indicando uma diferença entre a resistência expressa a partir de cópia única inserida no genoma (M606.1c) e a partir de cópias múltiplas no vetor episomal YEp352.

As linhagens transformadas com os quatro subclones apresentaram

Tabela 3. Teste de resistência a nistatina em células transformadas com cada um dos quatro subclones do plasmídeo YEpNYS1.

Linhagem	Crescimento em YEPD + 10 ppm de nistatina
M606.1c	+
HD93.15d	-
HD93.15d YEp352	-
HD93.15d YEpNYS1	+
HD93.15d YEpNYS1 subclone A	-
HD93.15d YEpNYS1 subclone B	+
HD93.15d YEpNYS1 subclone C	-
HD93.15d YEpNYS1 subclone D	-

um variado padrão de crescimento. A linhagem transformada com o subclone A não apresentou crescimento, descartando a possibilidade de que YNL232W fosse o gene de resistência. Os subclones C e D também não foram capazes de conferir resistência a nistatina a HD93.15d, afastando a possibilidade de que YNL230C e *URE2* estivessem ligadas à resistência. Assim a única ORF restante que poderia ser o gene *NYS* era YNL231C.

O subclone B conferiu a HD93.15d a mesma resistência apresentada

Figura 9. Esquema da subclonagem de YEpNYS1. Os subclones estão dispostos abaixo da sua região correspondente no fragmento NYS1.

pela linhagem transformada com YEpNYS1. Como esse subclone continha as ORF's YNL232W e YNL231C, e YNL232W isoladamente não foi capaz de promover resistência, pôde-se formular a hipótese de que YNL231C fosse o gene responsável pela resistência. O subclone B foi então denominado como YEpNYS2. No entanto, essa hipótese ainda teve de ser confirmada pela etapa seguinte de subclonagem do gene *NYS*.

Para isolar a ORF YNL231C no menor fragmento de DNA capaz de conferir resistência a nistatina, foi feita uma análise cuidadosa da sequência dessa região obtida do SGD. A ORF YNL231C possui 1055pb. Buscou-se a combinação sítios de restrição ideal para a obtenção de um fragmento que contivesse esse 1055pb e apenas a região periférica necessária à expressão do gene. Foram identificados dois sítios apropriados para corte e preparação do fragmento para subclonagem. O primeiro sítio, da enzima *Xba*I, estava localizado 127pb antes do codon de iniciação ATG e o segundo sítio, da enzima *Mlu*I, localizado 190pb após o codon de terminação. No total, a distância entre os sítios *Xba*I e *Mlu*I foi de 1365pb. Essas enzimas foram adquiridas e o fragmento preparado a partir de digestão de YEpNYS2 primeiro com *Xba*I e depois com *Mlu*I, uma vez que elas apresentam tampões de reação incompatíveis. Foi necessária a conversão das extremidades 5' protuberantes geradas por *Mlu*I e *Xba*I para extremidades não coesivas para que a ligação ao vetor fosse possível. A conversão de extremidades foi pela extensão da extremidade 3' sobre o molde 5' protuberante, feita pelo fragmento Klenow da DNA Polimerase na presença de dNTP's. Para evitar esse tratamento no vetor YEp352, este foi digerido com *Sma*I que já gerou extremidades abruptas sendo necessária apenas a desfosforilação com CIAP para completar a preparação do vetor. Vetor e fragmento foram ligados e usados transformar *E. coli*. As colônias transformantes brancas foram examinadas quanto à presença do fragmento clonado, que foi batizado YEpNYS3.

É interessante destacar que quando se faz ligação entre fragmentos de extremidades não coesivas, podem-se obter clones com o fragmento inserido em dois sentidos. As colônias que apresentaram plasmídios contendo o fragmento NYS3 foram digeridas com *Eco*RI e *Hind*III para a determinação da orientação de inserção do DNA no vetor. A figura 10A mostra um gel de agarose onde o plasmídios YEpNYS3, com o fragmento clonado nos dois sentidos, está digerido com essas enzimas. O plasmídio em cujo o fragmento foi inserido na mesma

orientação do fragmento NYS1 foi denominado YEpNYS3+, enquanto que o plasmídeo em que o fragmento foi clonado na orientação contrária foi denominado YEpNYS3-. A figura 10B ilustra os mapas desses dois subclones.

Ambos plasmídios foram utilizados para transformar HD93.15d para

Figura 10. A - Gel de agarose com produtos de digestão de YEpNYS3+ e YEpNYS3-, para determinação da orientação desses subclones. B - Mapa de restrição dos subclones NYS3. A área cinzenta corresponde ao inserto e a área negra corresponde a regiões do vetor YEp352.

Tabela 4. Teste de resistência a nistatina em células transformadas com os subclones YEpNYS3+ e YEpNYS3-.

Linhagem	Crescimento em YEPD + 10 ppm de nistatina
M606.1c	+
HD93.15d	-
HD93.15d YEp352	-
HD93.15d YEpNYS1	+
HD93.15d YEpNYS2	+
HD93.15d YEpNYS3+	+
HD93.15d YEpNYS3-	+

a confirmação da expectativa de que YNL231C fosse o gene de resistência a nistatina. O resultado dessa transformação aparece na tabela 4. O procedimento de seleção de transformantes foi o mesmo adotado nas transformações anteriores, seleção em meio mínimo sem uracila seguida de transferência de colônias transformantes para meio completo com 10ppm de nistatina.

Os dois subclones NYS3 apresentaram o mesmo padrão de resistência de NYS1 e NYS2, formando colônias após cinco dias de crescimento. Novamente os controles HD93.15d não transformada e transformada com YEp352 não formaram colônias até uma incubação de 10 dias quando o experimento foi encerrado. M606.1c apresentou crescimento pleno com 48 horas de incubação a 30°C.

A partir dos dados da subclonagem foi possível concluir que a ORF YNL231C, foi o capaz de quando inserido na linhagem sensível conferir-lhe resistência a nistatina. Apesar da resistência não ser semelhante à apresentada por M606.1c, ficou claro que essa ORF do cromossomo XIV estava ligada a resistência. A subclonagem foi considerada concluída uma vez que a redução do número de bases periféricas à região codificadora do gene poderia afetar a sua expressão. A ORF YNL231C passou a ser denominada NYS, gene de resistência a nistatina de *Saccharomyces cerevisiae*. O subclone NYS3 foi considerado de tamanho apropriado para o sequenciamento completo que teve início imediato.

4.5. Sequenciamento do gene NYS.

O sequenciamento do gene NYS foi iniciado no Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP, onde foram sequenciadas aproximadamente 80% das 1365 bases do fragmento NYS3. A conclusão do trabalho foi feita no Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP. Em ambos os casos foram utilizados sequenciadores automáticos a laser (A.L.F. Pharmacia Biotech). Três diferentes plasmídios foram utilizados no sequenciamento: YEpNYS3+, pSKNYS4 e pSKNYS5. Os plasmídios NYS4 e NYS5 foram construídos especialmente para o sequenciamento a partir de fragmentos internos de NYS3+, ligados ao vetor pBluescript SK. NYS4 é um fragmento de NYS3 que corresponde à região reguladora da transcrição e às primeiras 354 bases do gene NYS. Foi gerado pela digestão com *HindIII* e *EcoRI*, possuindo no total 550pb. NYS5 corresponde à região central de NYS, da base 355 a 961. Também

foi gerado por digestão com *EcoRI* e *HindIII*. A subclonagem desses fragmentos no vetor pBluescript SK permitiu que ambas as fitas de NYS4 e NYS5 fossem sequenciadas, pois esse vetor apresenta regiões de homologia dos primers Universal M13 e Reverso M13 colocadas um de cada lado dos sítios de clonagem, sendo um primer em cada fita.

Esses dois primers (ou sequências iniciadoras), foram marcados com fluoresceína durante a síntese e usados na reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia de Sanger. A sequência do primer Universal M13 é ⁵fluoresceína-dCGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT₃, e a do primer Reverso M13 é ⁵fluoresceína-dCAGGAAACAGCTATGAC₃. O primer Reverso M13 também foi usado no sequenciamento das últimas 241 bases da porção terminal de NYS, a partir da região de homologia desse primer no vetor YEp352, e usando como molde o subclone YEpNYS3+. Nesse caso apenas uma das fitas foi sequenciada, mas como a região era relativamente pequena a fidelidade do sequenciamento pôde ser assegurada. Todos os sequenciamentos foram repetidos três vezes, e depois as sequências foram comparadas entre si para a elaboração de uma sequência definitiva. Nos casos onde ambas as fitas foram sequenciadas também foi feita a comparação entre as duas sequências para que se aumentasse a fidelidade do sequenciamento.

A figura 11 apresenta um exemplo de cromatograma gerado pelo sequenciador automático. A figura 12 apresenta a sequência completa do fragmento NYS3, onde está inserido o gene NYS. A figura 13 esquematiza os subclones NYS4 e NYS5 e a região do gene NYS sequenciada com cada combinação primer - molde.

O sequenciamento dos 1337 nucleotídeos que compõe o fragmento

Figura 11. Exemplo de cromatograma gerado pelo sequenciador automático ALF Pharmacia Biotech. A cada pico nas curvas de fluorescência registradas em cada canaleta do gel o sequenciador acrescenta uma nova base à sequência de DNA. A curva verde corresponde a A, a curva azul a C, a curva amarela a G e a curva vermelha a T. O cromatograma apresentado é do sequenciamento do fragmento NYS5 com o primer Reverso M13. Notar o final da sequência do vetor e o início da sequência de NYS5 no sítio de restrição *EcoRI* (GAATTC) na posição 60.


```

-126                                TAGACT AATACCACTT CTTCGTTAGA
-100 AAAATATTTT AATCCTTATT TTGTTTCTAA CTGTTCCCTT CTCTCCATCC
-50 AACAAATAAT ACAAACCAC TTTATATAA AAAAATTACA AAAGCAAAAA
1   ATGTTCAAGA GATTTAGCAA AAAGAAGGAG GCTCCAGAAG ACCCAAAAAA
51  TTTGATTAAT ATTGATAAGC CTATCAAAGA ACTTCCTGCT TCGATAGCTA
101 TTCCAAAAGA AAAACCACTT ACAGGTGAGC AACAAAAAAT GTATGACGAA
151 GTGCTAAAC ATTTAGTAA CCCTGACTTG AAGGTTTATA CAAGTGAAAA
201 AAATAAGTCG GAGGATGATC TTAAACCCTT AGAGGAAGAA GAAAAGGCAT
251 GGTTGACAAG AGAATGTTTT TTACGTTACC TAAGGGCTAC TAAATGGGTG
301 CTAAAAGACT GTATCGATAG AATCACCATG ACTCTAGCGT GGAGAAGAGA
351 ATTCGGTATT AGTCATTTAG GTGAAGAGCA TGGTGATAAA ATAACTGCTG
401 ACTTGGTGGC CGTCGAGAAC GAATCAGGTA AGCAGGTGAT TTTGGGTTAC
451 GAAAACGAHD CHAGACCTAT CTTATATTTG AAACCGGGCA GACAAAATAC
501 AAAGACTTCT CACAGACAGG TACAGCACTT GGTCTTCATG TTGGAAAGAG
551 TTATCGATTT TATGCCAGCT GGTCAAGACT CTCBAGCTTT GCTAATAGAC
601 TTTWAAGATT ACCCTGATGT TCSBAAAGTA CCTGGCAATA GTAAAATCCH
651 CCTATTKGTG TAGGGAAGAG TGCTGCSTAT CTTCHAAMYC ATTATCCHGA
701 AAGACTAGKA AARMACTTTT GACGAATATT CCTTGGTTAG CATGGACTTT
751 CTTGAAGTTA ATTCACCCTT TTATTGACCC ACTGACCCGT GAAAAGCTAG
801 TTTTTGATGA ACCATTTGTT AAATATGTCC CTAAGAACGA ACTAGATTCG
851 TTGTATGGTG GTGATCTGAA ATTCAAGTAC AATCATGATG TTTATTGGCC
901 AGCTCTGGTG GAAACCGCGC GTGAAAAAAG AGATCATTAT TTTAAGAGGT
951 TTCAAAGCTT CGGTGGTATT GTAGGTTTAA GTGAGGTTGA TTTAAGAGGT
1001 ACTCATGAAA AACTTCTTTA CCCAGTAAAA TCGGAAAGCA GTACCGTGTA
1051 AAGGCAAATT TAGATAGATA ATGATAATGC ACTATAATAT ATAATAAATA
1101 AAAGAGAATA AAAAGTTTAA TCACGTTCCC GCTTCTTTTT CCTAACCATC
1151 AAAGAATGCA ATCTAAAGAA GAAGAAGCGA ATACCCTCTT TTAAATATAT
1201 A

```

Figura 12. Sequência completa do gene de resistência *NYS* (YNL231C). As letras em negrito representam os nucleotídeos do gene, enquanto que o restante das letras representa as regiões periféricas ao gene. Em vermelho, o codon de iniciação ATG (+1) e o codon de terminação. Em azul o sítio de restrição *EcoRI*, e em verde o sítio de restrição *HindIII*. Em amarelo a região de consenso do “TATA box”, na posição -27.

Figura 13. Esquema dos sequenciamentos do gene *NYS*. A região cinzenta corresponde ao fragmento clonado e a região negra corresponde a sequências do vetor de clonagem. As setas vermelhas indicam as regiões sequenciadas com o primer Universal M13, e as setas azuis indicam as regiões sequenciadas a partir do primer Reverso M13.

NYS3 revelou um dado inesperado. Nenhuma diferença de sequência foi encontrada entre o gene de resistência clonado de M606.1c e a sequência existente no cromossomo XIV do tipo selvagem. Como a resistência a nistatina foi originalmente conseguida por mutagenese, a expectativa era de identificar na sequência do gene clonado, a mutação que teria transformado YNL231C no gene NYS. A completa similaridade entre as sequências indica que provavelmente o gene clonado de M606.1c não foi o mesmo que é responsável pela sua resistência. A explicação mais coerente para esse resultado pode ser a seleção de um gene que levaria à resistência, quando inserido em muitas cópias numa célula de levedura sensível. O experimento seguinte de avaliação da produção de ergosterol nas leveduras usadas no trabalho forneceu mais indícios que suportam essa hipótese. A similaridade de sequência será discutida novamente no item 4.7. (Discussão geral).

4.6. Análise da produção de ergosterol nas linhagens de levedura.

Os esteróis das linhagens de *S. cerevisiae* estudadas foram extraídos por saponificação e analisados quanto ao seu padrão de absorção de luz ultravioleta por espectrofotometria. O ergosterol apresenta picos de absorção em três comprimentos de onda específicos: 271.5nm, 282nm e 293.5nm. As linhagens analisadas foram o mutante M606.1c, a linhagem tipo selvagem sensível a nistatina HD93.15d transformada com o vetor YEp352 e a mesma linhagem transformada para resistência com o plasmídeo YEpNYS3+. As curvas de absorção de luz U.V. estão representadas no gráfico da figura 14. Os teores de ergosterol nas células de cada linhagem, demonstrados na tabela 5, foram calculados a partir da fórmula de Shaw e Jefferies, 1953, que compensa as absorbâncias não ligadas ao ergosterol.

Uma característica interessante desse método é o fato de que a varredura das absorbâncias de U.V. permite, além de analisar o teor de ergosterol, verificar a presença de outras moléculas no extrato não saponificável. Os resultados desse experimento foram muito importantes para o entendimento do mecanismo de resistência a nistatina exibido pelo híbrido M606 e pelas linhagens dele derivadas. O primeiro resultado foi o aparecimento, na linhagem M606.1c, dos três picos característicos do ergosterol, sendo possível estimar o teor desse esterol nas células desse mutante, resistente a nistatina, em 0.28% na massa

Tabela 5. Teores de ergosterol nas linhagens de levedura, determinados por espectrofotometria e correção da absorbância a 282nm.

Linhagem	Ergosterol na massa fresca (% p/p)
M606.1c	0.28
HD93.15d YEp352	0.21
HD93.15d YEpNYS3+	0.13

Figura 14. Gráfico do espectro de absorvâncias em luz ultravioleta entre 215nm e 320 nm do extrato não saponificável das linhagens de *S. cerevisiae*.

úmida. Esse dado afastou a hipótese de que a resistência de M606.1c pudesse ser gerada por um defeito genético na via metabólica de biosíntese de ergosterol, como está amplamente descrito na literatura. Os picos característicos do ergosterol aparecem bastante pronunciados, não deixando dúvidas de que o complexo enzimático necessário à síntese desse composto está íntegro nessas células. A linhagem sensível HD93.15d também apresentou os mesmos três picos de ergosterol, assim como a linhagem HD93.15d transformada com o gene *NYS*.

Além da capacidade de produção de ergosterol de M606.1c, chamou a atenção a presença de um pico de absorção no comprimento de onda de 235nm. Esse pico que se destaca na curva de absorbâncias não está presente no tipo selvagem e nem no selvagem transformado com YEpNYS3+. A busca de dados na literatura a respeito do composto responsável por esse composto levou à comparação entre o espectro de absorção de M606.1c e o de um mutante resistente a nistatina descrito por Grunwald-Raij & Margalith em 1990.

Entre os mutantes descritos nesse trabalho, está o mutante que foi nomeado *nys3*. Esse mutante apresenta um espectro praticamente idêntico ao de M606.1c, apresentando os picos de ergosterol e um quarto pico no comprimento de onda de 235nm. Observando a figura 15, pode-se notar a grande semelhança entre o espectro de *nys3* e o de M606.1c. Esse fato induziu a suposição de que essas duas linhagens seriam portadoras da mesma mutação.

Segundo Grunwald-Raij e Margalith, o mutante *nys3* acumula um esterol denominado cholesta-5,7,22,24-tetraenol. Esse composto não é um intermediário da síntese do ergosterol e pelo que sugere sua estrutura, provavelmente é um produto da modificação do ergosterol. Na figura 16, estão as estruturas das cadeias do ergosterol e do cholesta-5,7,22,24-tetraenol lado a lado para comparação. Pode-se perceber que a única diferença entre essas duas moléculas, é a presença de um radical metil no ergosterol, que quando é removido, deixa uma valência livre que acaba formando uma dupla ligação, como aparece na estrutura do cholesta-5,7,22,24-tetraenol. É possível portanto supor que tanto o mutante *nys3* como M606, possuem uma enzima capaz de converter parte do ergosterol formado em cholesta-5,7,22,24-tetraenol, pela simples remoção de um grupo metil. Essa enzima por sua vez, seria codificada pelo gene de resistência a nistatina de M606.1c.

Figura 15. Comparação entre os espectro de absorção em luz ultravioleta no extrato não saponificável de M606.1c (A) e do mutante *nys3* (B) descrito por Grunwald-Raij & Margalith, 1990. S188C é a linhagem selvagem que deu origem ao mutante *nys3*.

Figura 16. Comparação entre as estruturas moleculares do ergosterol e do cholesta-5,7,22,24-tetraenol, fonte: Grunwald-Raij & Margalith, 1990.

esperava obter, típico do tipo selvagem, tendo como esterol predominante o ergosterol. Entretanto, o espectro da linhagem transformada com o gene *NYS* foi distinto daquele da linhagem resistente, sendo muito semelhante ao do tipo selvagem. Esse dado, assim como a completa homologia de sequências, indicou que o gene *NYS* não parece ser o mesmo gene que torna M606 resistente a nistatina.

4.7. Discussão geral.

Reunindo os dados levantados durante o trabalho foi possível perceber incompatibilidades entre o gene clonado e as características que se conhecem do gene de resistência de M606.

O primeiro resultado que sugeriu diferenças entre esses genes foi o fenótipo de resistência conferido. Enquanto o gene de M606.1c lhe permitiu crescer normalmente em meio com nistatina, o gene que foi clonado permitia o crescimento dos transformantes muito lento chegando a cinco dias de incubação. No entanto, esse fato não causou surpresa pois inicialmente, supôs-se que a lentidão do crescimento era resultado dos efeitos negativos das modificações da membrana sobre o vigor celular. Os mutantes originais, que deram origem a M606, também exibiam o mesmo tipo de crescimento em meio com nistatina. Devido a aquelas características de baixa taxa de crescimento e baixa capacidade de produção de etanol, os mutantes originais tiveram de passar por um longo processo de melhoramento genético, até que o vigor de crescimento fosse recuperado. Nesse processo muitos outros genes foram incorporados aos mutantes que adquiriram um “background” genético que lhes permitiu remediar os problemas decorrentes da resistência. Era de se esperar que ao selecionar transformantes com o gene de resistência, estes apresentassem o mesmo fenótipo de baixo vigor exibido pelos mutantes originais, uma vez que a linhagem HD93.15d não possui os genes que dão em M606 o respaldo à resistência.

Os dados de sequenciamento entretanto, foram mais conclusivos em relação à clonagem do gene desejado. O gene que foi selecionado da biblioteca apresentou completa similaridade em relação à sequência do tipo selvagem depositada no SGD. Se o fragmento clonado contivesse uma mutação, a identidade das sequências não seria possível. Mesmo considerando que a mutação estivesse localizada numa sequência a 5' da que foi sequenciada, esse fato não justificaria o dado seguinte de completa falta do *cholesta-5,7,22,24-tetraenol* no transformante.

Os 126 pares de bases conservados na região promotora de YNL231C deveriam ser suficientes para pelo menos uma expressão basal desse gene. Se considerarmos que o gene estava presente nos transformantes em várias cópias por célula, a hipótese de baixa expressão não tem sustentação.

A análise de esteróis forneceu evidências ainda mais concretas de que o gene de resistência de M606 e o gene de resistência isolado da biblioteca não eram iguais. A diferença entre os espectros de absorção é conclusiva em relação à falta de produção de cholesta-5,7,22,24-tetraenol nas leveduras transformadas. Na curva do transformante HD93.15d YEpNYS3+, o ponto de maior depressão é exatamente na faixa de 235nm, na qual M606.1c atinge sua maior absorbância. Isso demonstrou que não houve problemas de baixa expressão no transformante, e sim inabilidade de produção do composto originado pela demetilação do ergosterol.

Esses três dados levaram à conclusão de que o gene selecionado foi responsável por um mecanismo alternativo de resistência a nistatina, diferente daquele existente em M606. Entretanto, deve-se frisar que se YNL231C conferiu um fenótipo distinto do de M606, ela também conferiu um fenótipo muito distinto daquele exibido pela levedura não transformada. O controle HD93.15d YEp352, não foi capaz de crescer em meio com 10ppm de nistatina nem mesmo após períodos de longa incubação, por vezes superiores a 15 dias.

Surge com explicação cabível para o fenômeno observado o efeito de multi-cópia. A transformação em multi-cópia, assim como a super-expressão, poderiam levar a um efeito completamente distinto do produto gênico de YNL231C. De acordo com dados do SGD, o produto de tradução dessa ORF possui homologia significativa com uma proteína bem conhecida de *S. cerevisiae*, Sec14, proteína transportadora de fosfolipídios. Essa proteína é responsável pela correta distribuição de fosfolipídios para as diversas organelas. Essa proteína atua sobre fosfatidilcolina e fosfatidilinositol, levando esses fosfolipídios desde o seu sítio de síntese até a organela onde terá sua função de componente da membrana (Van der Rest, 1995). A composição de fosfolipídios na membrana fundamental para o funcionamento das organelas, e é dependente da atuação de proteínas distribuidoras como Sec14.

Se a proteína codificada por YNL231C possuisse função semelhante a Sec14, o desequilíbrio na sua expressão poderia então afetar a composição de

fosfolipídios na membrana externa e em organelas. Os estudos de Rao et al., 1985, suportam a hipótese de que não apenas o conteúdo de esteróis, mas também a composição de fosfolipídios da membrana poderia levar à resistência a nistatina. Nesse trabalho foi demonstrado que mesmo linhagens sensíveis ao antibiótico poderiam desenvolver resistência quando cultivadas em meio suplementado com diferentes classes de fosfolipídios.

Portanto parece plausível supor que esse gene selvagem, ao ser introduzido em multicópia tenha sido capaz de alterar de tal maneira a distribuição de lipídios na membrana que levou células sensíveis à resistência, ainda que esta não tenha sido tão marcante como a de M606.

Dois experimentos seriam cruciais para comprovar a hipótese levantada. Em primeiro lugar a transformação de HD93.15d com YNL231C clonada em um vetor centromérico, que se mantém em cópia única nas células de levedura. Assim poderia-se verificar se esse gene seria capaz de promover resistência em cópia única assim como faz em multi-cópia. Apesar de ser um experimento necessário, é preciso lembrar que o controle cópia única é a própria linhagem selvagem que já possui esse gene no seu cromossomo XIV, e que no entanto é sensível a nistatina.

Em segundo lugar seria necessária a disrupção de YNL231C no genoma de M606.1c. Se essa deleção não afetasse a resistência haveria a comprovação de que YNL231C não estaria ligada no mutante à resistência. Sendo capaz apenas de atuar em condição de várias cópias por célula.

Apesar dos cuidados tomados durante a preparação da biblioteca genômica, que resultaram numa biblioteca de boa qualidade, não foi possível selecionar o gene desejado. A seleção de clones foi executada com máximo cuidado, buscando dar as condições necessárias ao crescimento das colônias resistentes. Tal fato pode ter ocorrido por algum fator ligado à expressividade do gene de resistência de M606 que passou despercebido durante a seleção dos clones. Provavelmente existe alguma peculiaridade em relação a esse gene que deve ser melhor investigada, para que as próximas seleções a partir da biblioteca de M606 possam ter sucesso.

5. CONCLUSÕES:

A ORF YNL231C localizada na porção mediana do braço longo do cromossomo XIV, entre *URE2* e *SKI4*, foi capaz de conferir resistência a nistatina em leveduras sensíveis quando inserida em um vetor multicópia.

A região conhecida como YNL231C passa a ser conhecida como *NYS*, o gene de resistência a nistatina de *Saccharomyces cerevisiae*.

A resistência conferida por *NYS* foi menor que aquela observada no segregante M606.1c. Entretanto, o fenótipo de resistência conferido por *NYS* às leveduras transformadas se distingue claramente da sensibilidade exibida pelo tipo selvagem.

O cholesta-5,7,22,24-tetraenol está presente no extrato não saponificável de M606.1c, e está ausente nos extratos do tipo selvagem e do tipo selvagem transformado com o gene *NYS*. Se este composto estiver realmente ligado à resistência, então M606 não depende de *NYS* para tolerar os efeitos da nistatina. A resistência de M606 dependeria portanto de um segundo gene, provavelmente a mutação que foi selecionada originalmente.

NYS é um gene de sequência selvagem. Portanto, ele não corresponde à mutação que deu origem à resistência a nistatina do híbrido M606.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.) **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, 1994, 3000p.
- CASEY, G. P.; XIAO, W.; RANK, G. H. A convenient dominant selection marker for gene transfer in industrial strains of *Saccharomyces* yeast: *SMR1* encoded resistance to the herbicide sulfometuron metil. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 94, p. 93-97, 1988.
- COFFMAN, J. A.; EL BERRY, H. M.; COOPER, T. G. The URE2 protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATAA-containing UASNTR element in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 7476-7483, 1994.
- DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 6127-6146, 1988.
- ECHEVERRIGARAY, S.; TAVARES, F. C. A.; GOMES, L. H.; BOSCARIOL, F. C. Inhibition of yeast growth by herbicides. **Ciência e Cultura**, v. 43, p. 457-459, 1991.
- FOGEL, S. & WELSH, J. W. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.**, v. 79, p. 5342-5346, 1982.
- FRYBERG, L. M.; OEHLSCHAGER, C.; URAU, M. Sterol and fatty acid composition of polyene macrolide antibiotic resistant *Torulopsis glabrata*. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 53, p. 1309-1315, 1975.

- GACHOTTE, D.; HUSSELSTEIN, T.; BARD, M.; BENVENISTE, P. Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a delta 7-sterol-C-5-desaturase by functional complementation of a defective yeast mutant. **Plant Journal**, v. 9, p. 391-398, 1996.
- GATIGNOL, A.; BARON, M.; TIRABY, G. Phleomycin resistance encoded by the *ble* gene from transposon Tn5 as a dominant selectable marker in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics**, v. 207, p. 342-348, 1987.
- GIETZ, R. D. & WOODS, R. A. High efficiency transformation with lithium acetate. In: JOHNSTON, J. R. (Ed.) **Molecular Genetics of Yeast**. New York: Oxford University Press, 1994. cap. 3, p. 49-64.
- GRINDLE, M. & FARROW, R. Sterol content and enzyme defects of nystatin-resistant mutants of *Neurospora crassa*. **Molecular and General Genetics**, v. 165, p. 305-308, 1978.
- GRITZ, L. & DAVIES, J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 25, p. 179-188, 1983.
- GRUNWALD-RAIJ, H. & MARGALITH, P. Ethanol fermentation by nystatin-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 247-252, 1990.
- HADFIELD, C.; CASHMORE, A. M.; MEACOCK, P. A. An efficient chloranphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. **Gene**, v. 45, p. 149-158, 1986.

- HADFIELD, C.; RAINA, K. K.; SHASHI-MENON, K.; MOUNT, R. C. The expression and performance of cloned genes in yeasts. **Mycological Research**, v. 97, p. 897-944, 1993.
- HAMILTON-MILLER, J. M. T. Fungal sterols and the mode of action of the polyene antibiotics. **Advances in Applied Microbiology**, v. 37, p. 109-134, 1974.
- HENDERSON, R. C. A.; COX, B. S.; TUBB, R. The transformation of brewing yeast with a plasmid containing the gene for copper resistance. **Current Genetics**, v. 8, p. 133-138, 1985.
- HILL, J. E.; MYERS, A. M.; KOERNER, T. J.; TZAGOLOFF, A. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with unique restriction sites. **Yeast**, v. 2, p. 163-167, 1986.
- HÖFER, M.; THIELE, W.; HUH, H.; HUNNEMAN, D. H.; MRACEK, M. A nystatin-resistant mutant of *Rhodotorula gracilis*. Transport properties and sterol content. **Archives of Microbiology**, v. 132, p. 313-316, 1982.
- HOTTIGER, T.; KUHLA, J.; POHLIG, G.; FÜRST, P.; SPIELMANN, A.; GARN, M.; HAEMMERLI, S.; HEIN, J. 2- μ m vectors containing the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene as selectable marker: excellent stability in complex media, and high-level expression of a recombinant protein from a CUP1-promoter-controlled expression cassette in *cis*. **Yeast**, v. 11, p. 1-14, 1995.
- HSUCHEN, C. C. & FEINGOLD, D. S. Two types of resistance to polyene antibiotics in *Candida albicans*. **Nature**, v. 251, p. 656-659, 1974.
- JIMENEZ, A. & DAVIES, J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. **Nature**, v. 287, p. 869-871, 1980.

- JOSEPH-HORNE, T.; MANNING, N.; KELLY, S. Nonsterol related resistance in *Ustilago maydis* to the polyene antifungals, amphotericin B and nystatin. **Phytochemistry**, v. 42, p. 637-639, 1996.
- LEES, N. D.; SKAGGS, B.; KIRSCH, D. R.; BARD, M. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* - a review. **Lipids**, v. 30, p. 221-226, 1995.
- LORENZ, R. T. & PARKS, L. W. Cloning, sequencing and disruption of the gene encoding sterol C-14 reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA and Cell Biology**, v. 11, p. 685-692, 1992.
- MAZUMDER, C.; KUNDU, M.; BASU, J.; CHAKRABARTI, P. Lipid composition and amino acid transport in a nystatin-resistant mutant of *Aspergillus niger*. **Lipids**, v. 22, p. 609-612, 1987.
- MAZUMDER, C.; BASU, J.; KUNDU, M.; CHAKRABARTI, P. Changes in membrane lipids and amino acid transport in a nystatin resistant *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 435-437, 1990.
- MIYAJIMA, A.; MIYAJIMA, I.; ARAI, K.; ARAI, N. Expression of plasmid R388-encoded type II dihydropholate reductase as a dominant selective marker in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4, p. 407-414, 1984.
- NAGAI, J.; YOKOE, M.; TANAKA, H.; HIBASAMI, H.; IKEDA, T. Increased proportion of chain fatty acids in nystatin-resistant yeast mutants. **Lipids**, v. 16, p. 411-417, 1981.
- PARKS, L. W.; SMITH, S. J.; CROWLEY, J. H. Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast - a review. **Lipids**, v. 30, p. 227-230, 1995.

- PATEL, P. V. & JOHNSTON, J. R. Dominant mutation for nystatin resistance in yeast. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 164-165, 1968.
- PIERCE, A. M.; PIERCE, H. D.; UNRAU, A. M.; OEHLISCHLAGER, A. C. Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 56, p. 135-142, 1978.
- RAO, T. V. G.; TRIVEDI, A.; PRASAD, R. Phospholipid enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on polyene sensitivity. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 322-326, 1985.
- SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, p. 441, 1975.
- SCHAFFER, H. E. & SEDEROFF, R. R. Least squares fit of fragment size to gel mobility, **Analytical Biochemistry**, v. 115, p. 113-122, 1981.
- SILVA, N. A. Clonagem e mapeamento molecular do gene de resistência ao metolachlor em *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, 1995. 94p. Dissertação (Mestre) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- SHAW, W. H. C. & JEFFERIES, J. P. The Determination of ergosterol in yeast. **The Analyst**, v. 78, p. 509-528, 1953.
- STUCKA, R. & FELDMANN, H. Cosmid cloning of yeast DNA. In: JOHNSTON, J. R. (Ed.) **Molecular Genetics of Yeast**. New York: Oxford University Press, 1994. cap. 3, p. 49-64.
- TAVARES, F. C. A. Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes. **STAB**, v. 10, p. 45-49, 1992.

- TAVARES, F. C. A. Control of spoilage yeasts in fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 1121-1126, 1995.
- VAN DER REST, M. E.; KAMMINGA, H.; NAKANO, B.; ANRAKU, Y.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. **Microbial Reviews**, v. 59, p. 304-322, 1995.
- ZHU, J.; CONTRERAS, R.; FIERS, W. Construction of stable laboratory and industrial yeast strains expressing a foreign gene by integrative transformation using a dominant selection system. **Gene**, v. 50, p. 225-237, 1986.
- WEBSTER, T. D. & DICKSON, R. C. Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903. **Gene**, v. 26, p. 243-252, 1983.
- WEHNER, E. P. & BRENDDEL, M. Vector YFRp1 allows transformant selection in *Saccharomyces cerevisiae* via resistance to formaldehyde. **Yeast**, v. 9, p. 783-785, 1993.
- WENZEL, T. J.; MIGLIAZZA, A.; YDE STEENSMA, H.; VAN DEN BERG, J. A. Efficient selection of phleomycin-resistant *Saccharomyces cerevisiae* transformants. **Yeast**, v. 8, p. 667-668, 1992.