CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À NISTATINA EM *Saccharomyces cerevisiae*

ADRIANA CRISTINA LONGO

**Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da 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
Novembro de 1991**

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À NISTATINA EM *Saccharomyces cerevisiae*

ADRIANA CRISTINA LONGO

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

**Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da 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
Novembro de 1991***

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Longo, Adriana Cristina

L856c Clonagem e caracterização do gene de resistência à Nis-
tatina em Saccharomyces cerevisiae. Piracicaba, 1991.
86p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Gene resistente ao antibiótico - Caracterização 2.
Gene resistente ao antibiótico - Clonagem 3. Levedura -
Clonagem 4. Levedura - Resistência ao antibiótico 5. Vetor
de clonagem I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei-
roz, Piracicaba

CDD 589.23

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À
NISTATINA EM *Saccharomyces cerevisiae***

ADRIANA CRISTINA LONGO

Aprovada em: 05.12.1991

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares	ESALQ/USP
Prof ^a . Dr ^a . Aline Ap. Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
Prof ^a . Dr ^a . Olívia M. Nagy Arantes	Univ. Est. de Londrina

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares
Orientador

*Aos meus pais,
por fazerem de mim
mais que uma expectativa
Aos meus irmãos,*

DEDICO

*Ao Pedro,
pelo companheirismo, carinho,
confiança e incentivo sempre constantes*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares pela constante atenção, incentivo, confiança e sobretudo pela agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Yousef Haj-Ahmad do Laboratório de Biologia Molecular, da Brock University, Canadá, por ter dividido seus conhecimentos em Biologia Molecular com dedicação e espírito crítico.

Aos amigos, Vânia A. Vicente, Cláudia B. Monteiro-Vitorello, Nirlei A. Silva, Célia R. Goes, José S. Cunha Fernandes, por entenderem a importância da realização deste trabalho.

Aos amigos Sílvia M. Guerra Molina , José Odair Pereira e Lucille S. Felipe, pela revisão dos originais.

Aos colegas Sérgio, Maria Helena, Luciana, Gonçalo, Ederson e Dirce, pelas sugestões e incentivos.

Aos funcionários do Laboratório de Genética de Leveduras: Ana Maria B. Giacomelli, Paulo Ortolan Filho, Luiz Humberto Gomes, Francisco A. Pelissari, pela amizade e colaboração.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Genética, pela amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (CNPq) e à Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas canadenses Kirsty, Mabrouk, Nezar, Barbara , por amenizarem minha saudade.

A todos os amigos próximos ou distantes que sempre incentivaram e deram forças para prosseguir.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Considerações gerais.....	3
2.2 O mecanismo da transformação genética	4
2.3 A produção de proteínas heterólogas.....	7
2.3.1 Vetores de clonagem.....	7
2.3.1.1 Vetores integrativos.....	8
2.3.1.2 Vetores replicativos	9
2.3.1.3 Vetores epissomais	10
2.3.1.4 Centrômeros e cromossomos artificiais.....	12
2.3.1.5 Vetores de expressão	13
2.3.2 A transferência de genes.....	16
2.3.2.1 Marcadores recessivos ou de complementação auxotrófica.....	17
2.3.2.2 Marcadores dominantes	18
2.3.3 A expressão e secreção de proteínas heterólogas.....	27
2.4 Processos industriais com microrganismos recombinantes	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Microrganismos utilizados.....	34
3.2 Plasmídio utilizado	35
3.3 Meios de cultura	36
3.3.1 Meio completo (YEPD)	36
3.3.2 Meio de Luria e Bertani (LB)	36
3.3.3 Meio de fermentação	36

3.4 Soluções e Tampões	37
3.4.1 Solução estoque de nistatina (100x).....	37
3.4.2 Solução estoque de ampicilina (500x)	37
3.4.3 Solução de SDS alcalino	37
3.4.4 Solução de lisozima	37
3.4.5 Solução de acetato de sódio	38
3.4.6 Soluções de EDTA	38
3.4.7 Solução de pronase (10x).....	38
3.4.8 Solução de polietilenoglicol (PEG).....	38
3.4.9 Solução de brometo de etídio	38
3.4.10 Fenol saturado	39
3.4.11 Tampão Tris-EDTA.....	39
3.4.12 Tampão Tris-Acetato (20x)	39
3.4.13 Tampão de transformação (<i>E. coli</i>)	39
3.4.14 Tampão de lise (pronase- SDS).....	39
3.4.15 Tampão da amostra.....	40
3.5 Eletroforese em gel de agarose	40
3.6 Extração de DNA genômico de leveduras.....	40
3.7 Extração e purificação de plasmídios	41
3.8 Bandeamento de DNA plasmidial por gradiente de cloreto de cério (CsCl)	42
3.9 Digestão dos DNAs genômico e plasmidial com endonucleases de restrição	42
3.10 Ligação.....	43
3.11 Transformação.....	43
3.11.1 em <i>S. cerevisiae</i> #93	43
3.11.1.1 Método de IIMURA et alii (1983)	43
3.11.1.2 Método de ITO et alii (1983).....	44
3.11.2 em <i>E. coli</i> DH alfa 5	44
3.12 Seleção direta dos transformantes	45
3.13 Digestão por enzimas de restrição	45
3.14 Determinação do grau de resistência dos clones	45
3.15 Avaliação da estabilidade mitótica dos plasmídios	46
3.16 Avaliação da capacidade fermentativa dos transformantes	46

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1 Clonagem do gene de resistência à nistatina	48
4.2 Sítios de restrição dos plasmídios	54
4.3 Influência da concentração de DNA plasmidial na transformação	63
4.4 Transformação de outras linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	66
4.5 O grau de resistência dos clones	67
4.6 A instabilidade mitótica dos plasmídios	71
4.7 A capacidade fermentativa dos transformantes	72
5. CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Eficiência de transformação da linhagem <i>S. cerevisiae</i> # 93 usando o método de CaCl_2 (IIMURA et alii, 1983) e PEG (ITO et alii, 1983)	50
Tabela 2. Recuperação dos plasmídios depois da transformação em <i>E. coli</i> e estimativa do peso molecular.....	53
Tabela 3. Transformação de <i>S. cerevisiae</i> #93 com os quatro diferentes plasmídios considerando a concentração de DNA.....	64
Tabela 4. Transformação de outras linhagens de <i>S. cerevisiae</i> usando 10 ug de DNA do plasmídio pNYS4.....	68
Tabela 5. Grau de resistência dos clones à nistatina	70
Tabela 6. Capacidade fermentativa dos transformantes (mg ETOH/l).....	74

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura molecular da nistatina.....	2
Figura 2. Eletroforese de DNA total dos clones de <i>S. cerevisiae</i> selecionados, resistentes à nistatina.....	52
Figura 3. Padrão eletroforético dos quatro diferentes plasmídios recuperados após transformação em <i>E. coli</i> com DNA total dos clones recombinantes de leveduras	55
Figura 4.A. Perfil eletroforético do pNYS2 após digestão por enzimas de restrição	
B. Mapa de alguns sítios de restrição	57
C. As enzimas utilizadas, os fragmentos obtidos e o peso molecular estimado	58
Figura 5.A. Perfil eletroforético do pNYS3 após digestão por enzimas de restrição	
B. As enzimas utilizadas, os fragmentos obtidos e o peso molecular estimado	60
Figura 6.A. Perfil eletroforético do pNYS4 após digestão por enzimas de restrição	
B. Mapa de alguns sítios de restrição	61
C. As enzimas utilizadas, os fragmentos obtidos e o peso molecular estimado	62

Figura 7. Influência da concentração de DNA plasmidial na transformação da linhagem de *S. cerevisiae* #93 65

Figura 8. Crescimento das linhagens transformantes em meio completo de YEPD contendo de 30 a 210 ug/ ml de nistatina..... 69

a. YEPD b. YEPD + 30 ug/ml c. YEPD + 60 ug/ml

d. YEPD + 90 ug/ml e. YEPD + 120 ug/ml

f. YEPD + 150 ug/ml g. YEPD + 180 ug/ml

h. YEPD + 210 ug/ml

1. Controle (*S. cerevisiae* #93) 2. pNYS1

3. pNYS2 4. pNYS3 5. pNYS4

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À NISTATINA EM *Saccharomyces cerevisiae*

Autora: ADRIANA CRISTINA LONGO

Orientador: Prof. Dr. FLAVIO CESAR ALMEIDA TAVARES

RESUMO

O presente trabalho descreve a clonagem do gene de resistência à nistatina, num plasmídio replicativo bifuncional (YRp7) e sua utilização como marcador seletivo dominante na transformação de *Saccharomyces cerevisiae*.

Vinte e um transformantes foram selecionados diretamente em meio de YEPD acrescido de 60 ug/ml de nistatina, após três dias de incubação a 30 °C. O DNA genômico dos clones foi extraído e utilizado para transformar *E. coli* a fim de amplificar e recuperar os plasmídios recombinantes.

Quatro diferentes plasmídios foram isolados e seus pesos moleculares determinados. Verificou-se que três deles não apresentavam os padrões eletroforéticos esperados. Provavelmente por alterações estruturais ocorridas durante o processo de transformação.

Uma nova transformação, com DNA purificado dos quatro plasmídios, foi realizada a fim de confirmar a clonagem. A retransformação em *E. coli* com DNA total recuperou os mesmos plasmídios.

Outras linhagens de *S. cerevisiae* foram transformadas e foi possível observar que mesmo entre linhagens há uma considerável diferença quanto as suas capacidades de receber, manter e expressar DNA exógeno, pois foi grande a variação nas suas eficiências de transformação.

A instabilidade mitótica dos clones quando crescidos em meio não seletivo mostrou que os plasmídios se replicam autonomamente nas células. E que há provavelmente uma variação nos seus números de cópias, pois ao testar

o nível de resistência dos clones à nistatina, evidenciou-se que eles variam desde 60 ug/ml ,para os plasmídios pNYS1 e pNYS3, até 210 ug/ml para pNYS2 e pNYS4.

Os resultados obtidos sugerem que o gene de resistência à nistatina constitui-se num marcador seletivo em potencial para construção de vetores plasmidiais. Estudos futuros visarão a caracterização, localização e subclonagem, além dos efeitos da resistência à nistatina nas células.

CLONING AND CHARACTERISATION OF NYSTATIN RESISTANCE GENE IN *Saccharomyces cerevisiae*

Author: ADRIANA CRISTINA LONGO

Adviser: Prof. Dr. FLAVIO CESAR ALMEIDA TAVARES

SUMMARY

The present work describes the cloning of nystatin dominant resistance gene, in a bifunctional replicating plasmid (YRp7) and its use as a selective marker in the transformation of *Saccharomyces cerevisiae*.

Twenty- one resistant transformants were directly selected in YEPD medium containing 60 ug/ml of nystatin, after 3 days of incubation at 30 °C. The genomic DNA of the clones was isolated and utilized to transform *E. coli* in order to amplify and rescue the plasmids.

Four different plasmids were isolated and their molecular weights determined. It was possible to verify that three of them had not the standard electrophoretic patterns. Possibly due to structural alterations occurred during the transformation process.

A new transformation with the purified DNA was realized to confirm the gene cloning. The retransformation in *E. coli*, with total DNA of the four plasmids, rescued the same plasmids.

Other *S. cerevisiae* strains were transformed and it was possible to observe that even among strains there is a difference in their capacities to receive, maintain and express the foreign DNA once there was a variation in their transformation efficiencies.

The mitotic instability of the clones, when grown in non- selective medium showed that the plasmids replicate autonomously into the cells. And probably, there is a difference in their copy numbers, once in order to test the resistance level of the clones, it was verified that they vary from 60

ug/ml to pNYS1 and pNYS3 plasmids, to 210 ug/ml to pNYS2 and pNYS4 plasmids.

The results obtained support that the nystatin gene resistance is a potential marker to be used in plasmid vector construction. Future studies suggest the final characterisation of the gene, subcloning, location and studies related with the effect of nystatin resistance into the cells.

1. INTRODUÇÃO

Na transformação de leveduras, o uso de marcadores dominantes, nos plasmídios usados como vetores de expressão, tanto de genes nativos quanto heterólogos, facilita a seleção dos transformantes.

Atualmente, a maioria dos plasmídios usados na transformação em eucariotos possuem marcadores auxotróficos, os quais complementam uma mutação auxotrófica na linhagem hospedeira e permitem a seleção positiva dos transformantes. Para a transformação de linhagens selvagens ou industriais, muitos destes vetores seletivos não podem ser empregados, uma vez que as linhagens não contêm marcas auxotróficas disponíveis, além de frequentemente apresentarem problemas relacionados à ploidia.

Os genes de resistência tão intensivamente utilizados como marcadores na transformação de bactérias, geralmente não são aplicáveis na transformação de leveduras, devido à ausência de antibióticos efetivos e os genes de resistência correspondentes. Por isso, houve necessidade de se testar novos marcadores de resistência que apesar de ainda trazerem alguns problemas referentes à transformação de leveduras, têm progressivamente melhorado seus resultados.

A nistatina (Figura 1) é um antibiótico bem conhecido, utilizado no enriquecimento de mutantes em leveduras e no isolamento de mutantes resistentes, empregados em estudos genéticos e fisiológicos. É um dos poucos antibióticos realmente efetivos contra fungos em geral e atua nas células através de um desbalanço no transporte de cátions e pela combinação com os esteróis da membrana celular, causando rompimento e perda do conteúdo citoplasmático.

Por estas características, o presente trabalho teve como principais objetivos, clonar o gene dominante de resistência à nistatina e utilizá-lo como marcador seletivo nos processos de transformação em *S. cerevisiae*, analisando as características genéticas e moleculares dos clones, em busca de vetores de clonagem eficientes para a expressão de genes heterólogos.

● *Figura 1. Estrutura molecular de nistatina.*

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um eucarioto predominantemente unicelular que exhibe muitas estruturas celulares semelhantes às de organismos superiores, tais como, nucléolo, complexo de Golgi e retículo endoplasmático.

Estes organismos têm sido extensivamente analisados bioquímica e fisiologicamente. Inicialmente por causa de sua importância na indústria de alimentos e bebidas. E, mais recentemente (HINNEN et alii, 1978), pela possibilidade de se aplicar a tecnologia do DNA recombinante.

O genoma haplóide de uma célula constitui-se essencialmente de 14000 kb de DNA, o qual excede em pelo menos quatro vezes o genoma de *E. coli*. Além do conteúdo de DNA cromossomal, o qual constitui aproximadamente 90% do DNA de *S. cerevisiae*, há pelo menos dois elementos independentes: DNA mitocondrial e o plasmídeo 2 micron. Algumas linhagens contêm um terceiro replicon independente, conhecido como plasmídeo killer, que são moléculas de RNA de dupla fita que codificam uma toxina, a qual mata outras linhagens sensíveis (WICKNER, 1982). Seu mapa genético compreende 16 cromossomos metacêntricos com cerca de 500 genes já mapeados. Com algumas exceções, seus genes funcionalmente relacionados não estão agrupados como os genes de procariotos (MORTIMER & SHILD, 1985).

Os cromossomos são similares aos de eucariotos superiores. O DNA é associado com proteínas para formar a cromatina. Além disso, possuem centrômeros, os quais se associam com microtúbulos no fuso mitótico durante a segregação cromossômica. Telômeros estão presentes nas extremidades cromossômicas para assegurar uma apropriada replicação.

A viabilidade em se aplicar técnicas clássicas e moleculares, fez com que *S. cerevisiae* surgisse como um organismo apto ao estudo dos problemas fundamentais da biologia de eucariotos. Isto tem levado grupos a explorarem a possibilidade de usar estas leveduras como hospedeiras para a expressão e secreção de peptídeos e proteínas comercialmente importantes.

2.2 O mecanismo da transformação genética

HINNEN et alii (1978) foram os primeiros a demonstrarem que as células de leveduras podem receber, manter e expressar DNA exógeno pela alteração do fenótipo das células receptoras.

A introdução de sequências de DNA no genoma de leveduras por transformação criou uma nova dimensão à biologia molecular deste organismo, que tem sido muito bem caracterizado geneticamente e bioquimicamente. Por apresentarem uma parede celular espessa, constituída essencialmente de polissacarídeos (quitinas, mananas e glucanas), o primeiro procedimento utilizado na transformação de *S. cerevisiae* incluiu a esferoplastização das células pela remoção enzimática da parede celular. A introdução de DNA, promovida pela adição de polietilenoglicol (PEG), na presença de cloreto de cálcio, permitiu regeneração da parede celular.

O DNA transformante utilizado foi o plasmídeo pYeLeu 10, o qual é um híbrido composto do plasmídeo de *E. coli* Col E1 e um segmento de DNA de levedura contendo o gene LEU2. Desta forma, os esferoplastos de uma linhagem auxotrófica estável leu2 foram transformados à prototróficos a uma frequência de 1×10^{-7} . Ao serem testados por hibridização, dos 42 transformantes LEU2, 35 continham sequências do DNA Col E1. A análise genética dos 7 transformantes remanescentes, mostrou que houve recombinação recíproca entre os alelos do gene LEU2 do plasmídeo com o leu2 das células. Com relação aos transformantes que continham sequências do DNA Col E1, a análise genética mostrou que em 30 deles, o alelo LEU2 foi ligado ao original leu2 e os 5 restantes estavam localizados em outro cromossomo. O plasmídeo não se replicou autonomamente nas células receptoras, uma vez que transformantes estáveis foram obtidos como resultado da recombinação entre sequências de DNA no plasmídeo e a sequência homóloga no DNA nuclear.

Várias modificações foram feitas nos métodos básicos de transformação (BEGGS, 1978 & STRUHL et alii, 1979) e algumas combinações entre vetores e linhagens receptoras foram desenvolvidas dando melhores eficiências de transformação.

A desvantagem dos métodos que envolvem esferoplastos é que geralmente a introdução de DNA fica associada à alta frequência de fusão

celular. Entretanto, de acordo com HARASHIMA et alii (1984), a obtenção de esferoplastos é essencial à introdução de DNA, embora não esteja diretamente relacionada à transformação, sendo fusão e transformação celular consideradas como eventos independentes.

No processo de transformação genética existe uma interação entre DNA plasmidial e os protoplastos. Uma vez fixado à superfície da membrana dos protoplastos pela presença de íons de cálcio, o DNA plasmidial, se torna preso entre 2 agregados e os protoplastos se fusionam (BRZOBOHATY & KOVAC, 1985). Este mecanismo tem sido utilizado para explicar a alta frequência de cotransformação e de células transformadas que apresentam poliploidias (SAKAI et alii, 1984).

Os processos de transformação foram simplificados quando descobriu-se que não só esferoplastos, mas também, células intactas podem ser transformadas por plasmídios de DNA (ITO et alii, 1983). Este método é o que tem sido mais rotineiramente utilizado, apesar da desvantagem da baixa eficiência de transformação quando comparado com os métodos que utilizam esferoplastos.

A transformação de células intactas é um processo multifásico que depende da aquisição de competência da célula ao nível de parede celular (BRZOBOHATY & KOVAC, 1986). Esta condição pode ser artificialmente induzida por métodos baseados no tratamento das células com polietilenoglicol e cátions monovalentes (ITO et alii, 1983), somente polietilenoglicol (KLEBE et alii, 1983) ou utilizando cloreto de cálcio (IIMURA, et alii 1983). Contudo, estes métodos, os quais residem na habilidade da complexa parede celular, absorver e permitir moléculas de DNA no citoplasma, são bastante ineficientes (5×10^{-5} a 1×10^{-6} transformantes/células viáveis). A razão para esta baixa eficiência não está ainda esclarecida. Existe um papel dominante da parede celular no processo de introdução do DNA (BRUSCHI & HOWE, 1985), pois ao ter a parede celular removida para produção de esferoplastos, a eficiência de transformação aumenta acentuadamente (BEGGS, 1978).

Muitos são os fatores que afetam a competência celular para introdução de DNA, sendo que vários deles estão presentes nos estágios iniciais do processo de transformação (BRUSCHI et alii, 1987). Algumas células são facilmente transformadas, outras moderadamente, enquanto que outras não

transformam de forma alguma. Possivelmente por este caráter ser geneticamente determinado.

Outros métodos além dos químicos também têm sido empregados com o objetivo de aumentar a eficiência de transformação, e tentar esclarecer o mecanismo envolvido. São métodos físicos, onde encontra-se principalmente a eletroporação, que foi inicialmente reportado por NEUMANN et alii (1982). A introdução de DNA plasmidial e subsequente transformação foram obtidas pela aplicação de pulsos elétricos às células de mamíferos. Desde então, pulsos elétricos têm sido frequentemente utilizados nos processos de transformação, incluindo além de células de mamíferos, protoplastos de plantas (RIGGS & BATES, 1986), bactérias (CALVIN & HANAWALT, 1988) tripanossomas (GIBSON et alii, 1987).

KARUBE et alii (1985) & HASHIMOTO et alii (1985), utilizaram o mesmo método para introduzir DNA plasmidial em esferoplastos e células intactas de leveduras. O primeiro estudo deu uma eficiência de transformação comparável aos métodos convencionais (10^3 transformantes/ug de DNA). O segundo, feito com células intactas produziu muito baixa eficiência (100 transformantes/ug de DNA), a qual é até menor que as obtidas através dos métodos químicos.

MEILHOC et alii (1990), demonstraram que este método podia ser eficiente para transformar células intactas, avaliando alguns efeitos que poderiam influenciar, como a força e duração do pulso elétrico, a concentração de DNA, o número de células e o estágio de crescimento. Consequentemente a eficiência de transformação foi cerca de 10^7 transformantes/ug de DNA, em *S. cerevisiae*. E ao utilizarem o mesmo protocolo, transformaram *Yarrowia lipolytica* (5×10^4 transformantes/ug de DNA) e *Kluyveromyces lactis*.

Apesar do frequente uso da eletrotransformação, ainda muito pouco se sabe sobre o mecanismo envolvido na transferência de DNA. Provavelmente, quando as alterações no potencial de membrana, disparado pelo campo elétrico atinge um valor crítico, ocorrem áreas de desorganização reversíveis, promovendo uma permeabilidade da membrana à micro e macromoléculas.

Existem algumas evidências de que a célula para se tornar permeável requer um menor pulso, que o necessário para a eletrotransformação. Não se faz necessária uma incubação prévia das células

com DNA antes de serem submetidos a pulsos elétricos, sugerindo que o DNA não se liga às células antes da sua entrada e que a absorção deve ser muito rápida (1 segundo ou menos). A entrada do DNA é restrita ao comprimento do pulso, uma vez que a adição de DNA após o pulso não resulta em nenhum transformante.

De qualquer forma, ainda permanece incerta a forma pela qual moléculas de DNA que possuem uma massa de milhões de daltons, driblam barreiras e transformam tanto esferoplastos quanto células inteiras. O importante é que com transformação em leveduras, está sendo possível estudar a organização e regulação gênicas destes organismos.

2.3 A produção de proteínas heterólogas em leveduras

S. cerevisiae pela sua importância industrial, ausência de metabólitos tóxicos e pelas décadas de pesquisa básica, despertou como o mais importante organismo utilizado na indústria biotecnológica.

Atualmente, os sistemas desenvolvidos são extremamente sofisticados e excedem os de todos os outros organismos. Por isso, para a otimização dos processos muitos são os elementos envolvidos.

2.3.1 Vetores de clonagem

Os plasmídios usados para transformação de leveduras são geralmente construídos para serem propagados em *E.coli* e leveduras. Isto favorece o isolamento e a caracterização dos mesmos. Portanto, além de parte do plasmídio de *E. coli*, os vetores contêm sequências que permitem a replicação em leveduras. Seja por uma origem de replicação autônoma ou por uma sequência capaz de se integrar ao replicon cromossomal por recombinação homóloga (KNOWLTON, 1986). São os chamados vetores bifuncionais, que de acordo com a sua interação com as células receptoras, são classificados em integrativos (YIp), replicativos (YRp), episomais (YE_p) e cromossomos artificiais (YAC).

2.3.1.1 .Vetores integrativos

São vetores, que por se inserirem no DNA cromossômico, se tornam parte do mesmo e portanto sua replicação e manutenção fica sob o controle do DNA cromossomal. Sua maior vantagem, entretanto, está na baixa instabilidade mitótica que apresentam e na baixa frequência de perda pela célula hospedeira. O número de cópias é geralmente um por célula, mas em alguns casos é possível aumentá-los por amplificação gênica.

A forma pela qual o evento de integração ocorre é um método de classificação dos vetores integrativos. Segundo HINNEN et alii (1978), existem três classes de eventos de integração: tipo I, tipo II e tipo III. Na integração tipo I, um único evento de permuta, entre o segmento de DNA no plasmídeo e a região homóloga correspondente no cromossomo, resulta na inserção do vetor inteiro no DNA do hospedeiro. A integração tipo II resulta da integração do vetor inteiro, em locais ao acaso, no cromossomo hospedeiro, enquanto que a integração tipo III é devido a um evento de dupla permuta onde somente a porção do vetor envolvido na permuta é inserida.

Na prática, a maior desvantagem das propriedades dos vetores integrativos é sua difícil recuperação. Quando a estrutura da forma integrada é conhecida e pode ser replicada em *E.coli*, por possuir origem de replicação e marcadores seletivos, o isolamento do DNA cromossomal seguido pela digestão com enzimas de restrição e ligação resulta, algumas vezes, em um DNA circular fácil de ser recuperado. Para que isto ocorra, o DNA cromossomal da levedura deve ser clivado com uma endonuclease, a qual não cliva dentro da sequência clonada nem das sequências do vetor procariótico. A mistura de fragmentos de DNA da levedura obtida depois da digestão é ligada a baixas concentrações de DNA, o que favorece reações intramoleculares e os plasmídios podem então serem selecionados em *E. coli* (WINNACKER, 1987).

Os plasmídios integrativos oferecem algumas aplicações interessantes, pois não só permitem a introdução de genes nas células, mas também sua integração exatamente no locus normal do cromossomo (SCHERER & DAVIS, 1979).

2.3.1.2 Vetores replicativos

A segunda classe de vetores de leveduras, chamados YRp, são mantidos na célula porque incluem um elemento conhecido como sequência de replicação autônoma (ARS), o qual provê o plasmídio de uma origem de replicação (STINCHCOMB et alii, 1979). As sequências que conferem replicação autônoma são segmentos de DNA cromossomal, os quais são presumíveis replicons. Normalmente, ARSs de cromossomos de leveduras são usados, mas há ARSs isolados de mitocôndrias (HYMAN et alii, 1982) e de outros genomas eucarióticos (STINCHCOMB et alii, 1980). As origens de replicação de DNA cromossomal foram inicialmente identificados em derivativos de vetores YIp, os quais transformaram leveduras aproximadamente 2 ou 3 vezes mais do que o esperado (STINCHCOMB et alii, 1979). Estes plasmídios ARS existem principalmente como moléculas circulares de DNA extracromossomal, presentes no núcleo, com a replicação sob o controle dos mesmos produtos gênicos necessários à duplicação do DNA cromossomal. Da mesma forma que o DNA cromossomal, plasmídios ARS são restritos a uma única replicação de DNA que ocorre durante a fase S do ciclo celular. No entanto, estes plasmídios podem ser encontrados em multiplicidade de cópias (70-100 em algumas células), quando a média do número de cópias na cultura é cerca de 10 (ZAKIAN & KUPFER, 1982).

Por haver um estrito controle celular limitando a iniciação da sua replicação, há evidências de que a super replicação não é o mecanismo da amplificação dos plasmídios ARS. Sugere-se que o alto número de cópias mantidos numa subpopulação celular é resultado de uma distribuição assimétrica na divisão celular.

MURRAY & SZOSTAK (1983) estudaram a estabilidade mitótica dos plasmídios ARS em células individuais e encontraram que uma célula filha deixa de receber o plasmídio de 30 a 60% das divisões celulares, dependendo do plasmídio em questão. A segregação do plasmídio ARS é fortemente tendenciosa sendo que uma célula filha, perde 20 vezes mais o plasmídio que uma célula mãe. Esta alta taxa de retenção do plasmídio pela célula mãe, permite que o número de cópias aumente em um pequeno número

de células, os quais levam vantagem em crescimento seletivo e também na retenção do plasmídio nas gerações subsequentes.

Apesar destes problemas, os elementos ARS são importantes no desenvolvimento de sistemas de transformação, pois são eles quem conferem altas frequências de transformação em *S. cerevisiae* (MARUNONCHI et alii, 1987).

Recentemente, elementos ARS os quais são funcionais em *S. cerevisiae* foram isolados de outras leveduras como *Candida utilis* (HSU et alii, 1983), mas estes não mostravam ter função de origens de replicação nas espécies das quais foram obtidos. No entanto, TAKAGI et alii (1986), construíram um vetor contendo um elemento ARS de *C. maltosa* que podia se replicar em *C. maltosa* e *S. cerevisiae*. E DAS et alii (1984) construíram um vetor similar que era capaz de se replicar em *K. lactis*. Segundo CANNON et alii (1990), foi possível isolar e analisar uma sequência de nucleotídeos de *C. albicans*, de origem genômica conhecida e com função de ARS para construção de plasmídios que se replicassem em *C. albicans* e *S. cerevisiae*, com o objetivo de análise da função e expressão gênicas em *C. albicans*. Por estas e outras peculiaridades, estes plasmídios têm sido sequenciados e extensivamente estudados (VOLKERT et alii, 1989).

2.3.1.3 Vetores episomais

Os plasmídios mais comumente usados na transformação genética de leveduras para expressão de genes heterólogos são aqueles que utilizam o sistema de replicação do plasmídio endógeno 2 micron. Estes plasmídios são encontrados em grande parte das linhagens de *S. cerevisiae* numa média de 50-100 cópias por célula haplóide, correspondendo à aproximadamente 2-3% do total do DNA cromossomal (FUTCHER, 1988). Acredita-se que este plasmídio se replica no núcleo, uma vez que a análise de tétrades obtida de um cruzamento de linhagens contendo os plasmídios (cir^+) com linhagens sem plasmídios (cir^0), revelou que todas as células haplóides em um asco contêm plasmídios 2 micron (LIVINGSTON, 1977).

Parece claro que os plasmídios quiméricos se replicam autonomamente em células de leveduras na forma circular e podem ser utilizados como vetores bifuncionais entre leveduras e *E. coli*.

Os transformantes obtidos com uma frequência de $10^3 - 10^4$ colônias por micrograma de DNA são instáveis e 10-30% dos transformantes perdem o plasmídio depois de 15 a 20 gerações sob crescimento em meio não seletivo (HSIAO & CARBON, 1981). Uma vez que o plasmídio nativo é muito estável, a instabilidade apresentada pelos transformantes é surpreendente. Talvez seja resultado de uma replicação competitiva com o plasmídio endógeno 2 um (FUTCHER & COX, 1984).

Extensivos estudos de estabilidade de plasmídios em sistemas bacterianos têm demonstrado que ambos os fatores, genético e fisiológico, afetam o nível de retenção do plasmídio nas culturas. Em *S. cerevisiae*, a manutenção do 2 um e 2 um quiméricos nas populações celulares, tem sido investigada durante crescimento em bateladas (FUTCHER & COX, 1984) e em culturas contínuas (MEAD et alii, 1986). O comportamento destes plasmídios variam consideravelmente e muitos são os fatores que influenciam na estabilidade, inclusive, a presença de outros plasmídios na célula, como o próprio 2 um nativo (WALMSLEY et alii, 1983), a taxa com que as células sem plasmídios são geradas, quando comparadas com as células com plasmídios (instabilidade segregacional) e a diferença no crescimento das células sem e com plasmídios (seleção).

BUJEGA et alii (1989) estudando o plasmídio quimérico pJDB248 em *S. cerevisiae*, mostraram que culturas contínuas com glicose limitada têm um papel significante na estabilidade do plasmídio. As células sob condições de crescimento em meio não seletivo sofrem uma redução no padrão de crescimento, o que leva a uma rápida perda do plasmídio. Isto pode ser resultado da seleção, da redução na segregação ou até mesmo da combinação destes eventos.

Parece claro que a estabilidade dos plasmídios é altamente complexa, envolvendo interação plasmídio/hospedeiro e dependente de condições fisiológicas específicas.

2.3.1.4 Centrômeros e cromossomos artificiais

Um outro tipo de plasmídio contém um elemento adicional que auxilia na instabilidade mitótica característica dos plasmídios ARS: o centrômero de leveduras.

Cada cromossomo possui um local que direciona sua ligação ao fuso mitótico e auxilia a segregação exata das cromátides durante a mitose e a separação dos homólogos na meiose II. Pequenos segmentos de DNA contendo os centrômeros de diferentes cromossomos tem sido clonados em plasmídios ARS e parecem funcionar extracromossomalmente (CLARKE & CARBON, 1980).

Plasmídios contendo ARS e uma sequência centromérica (CEN) oferecem uma maior estabilidade mitótica (1 a 2 % de perda por divisão) enquanto que parecem manter um número constante de 1 cópia por célula. Estes plasmídios também imitam o comportamento dos cromossomos na primeira e segunda divisões meióticas, tendendo a uma segregação 2^+ e 2^- . A sequência de DNA requerida para uma função centromérica tem sido mostrada por análises de deleções de DNA centromérico clonado. E parece residir dentro de um segmento menor que 600 pb (FITZGERALD & HAYES, 1987).

Outra porção dos centrômeros de leveduras que tem sido incorporada aos plasmídios, é o telômero. Tais estruturas, localizam-se nas extremidades dos cromossomos lineares e são essenciais à estabilidade e replicação dos cromossomos. Estes têm sido isolados de cromossomos de leveduras e de DNA de protozoários como a *Tetrahymena*. Desta forma, permitem a manutenção do DNA na levedura como moléculas lineares e de dupla fita (SZOSTAK & BLACKBURN, 1984). Embora importantes para a estabilidade dos cromossomos normais, os telômeros adicionados aos plasmídios contendo centrômeros não conferem estabilidade adicional se o tamanho da molécula for inferior a 50 Kb (HIETER et alii, 1985). Esta dependência sugere que a separação espacial dos elementos envolvidos na função do centrômero, telômeros ou origem da replicação é um pré-requisito para a segregação normal dos cromossomos.

BURKE et alii (1987) procurando resolver o problema da instabilidade dos plasmídios recombinantes, construíram um cromossomo ar-

tificial (YAC), capaz de clonar um fragmento de DNA exógeno com centenas de kilobases e mantê-lo estável em *S. cerevisiae*. Um outro procedimento possível para integrar grandes fragmentos de DNA e também deletar, inverter, translocar um segmento cromossomal a um local predeterminado no cromossomo, utilizando o sistema de recombinação sítio-específica do bacteriófago P1, foi sugerido por SAUER (1987).

Recentemente, MATSUZAKI et alii (1988) efetuaram modificações cromossomais em *S. cerevisiae*, usando o sistema de recombinação sítio-específica do plasmídio pSR1 de *Zygosaccharomyces rouxii*. Este sistema tem vantagens na modificação de cromossomos em *S. cerevisiae* porque tem uma operação eficiente e não depende do sistema de recombinação do hospedeiro.

O tamanho do DNA cromossomal que pode ser inserido num organismo sem causar instabilidade foi investigado por MATSUMOTO et alii (1990), que deletando seletivamente uma região de 100 kb, gerou cromossomos acêntricos, lineares e instáveis; assim como minicromossomos, tanto lineares quanto circulares e estáveis. Ao construir os minicromossomos, lineares ou circulares, estas extensas regiões repetitivas mostraram-se estar envolvidas na função centromérica, proporcionando uma segregação normal.

Cromossomos artificiais contendo centrômeros e telômeros são mantidos em cópia única e seu uso é pertinente no entendimento do processo de replicação e segregação dos cromossomos eucarióticos e não no desenvolvimento de vetores de alto nível de expressão gênica.

2.3.1.5 Vetores de expressão

Uma área de particular interesse no desenvolvimento de um vetor está na construção de vetores, os quais exibem altos níveis de expressão dos genes heterólogos. Este é um aspecto importante na área da biotecnologia, onde a produção de proteínas e enzimas de bom nível tem um impacto econômico no processo de produção. Desta forma, vetores especializados têm sido desenvolvidos para a produção de fármacos, químicos, etc. (ELLIOT, 1987).

Os vetores de expressão são muito similares na sua estrutura básica. Diferenciam-se de acordo com o organismo hospedeiro, mas todos contêm os elementos necessários à transformação, replicação e manutenção.

Na escolha de um vetor, algumas variáveis devem ser consideradas. O vetor deve ser capaz de manutenção estável e estar presente em um número de cópias suficiente para os níveis de expressão. Em um vetor é inserido um cassete de expressão que consiste essencialmente dos elementos de controle transcricionais, como as sequências promotoras e terminadoras, que flanqueiam a região codificadora do gene de interesse. Em alguns casos, sequências "enhancer" estão presentes para aumentar a transcrição de um promotor.

Com relação às estratégias utilizadas para expressão de produtos gênicos heterólogos, elas podem ser de expressão direta e de secreção. Na expressão direta as sequências promotoras estão ligadas diretamente ao códon de iniciação de tradução ATG, seguido pela região codificadora do gene heterólogo sendo que o produto protéico se acumula no citoplasma das células. Este método tem dois problemas pois, em muitos casos o iniciador metionina não é removido e se o autêntico amino terminal não é uma metionina, isto pode ser indesejável. Segundo, que muitas proteínas contêm pontes dissulfídicas que devem ser formadas para que a proteína exiba atividade biológica. A maior vantagem da expressão direta é o alto nível de expressão que pode ser obtido (ELLIOT, 1987).

Os vetores de secreção contêm um elemento adicional aos dos vetores de expressão direta, o peptídeo sinal. As proteínas secretoras contêm em seus amino-terminais uma parte com 15-30 aminoácidos hidrofóbicos. Este peptídeo sinal direciona a proteína na via secretora seguida por uma eventual chegada à superfície celular.

O peptídeo sinal é geralmente removido durante a secreção por um sinal peptidase gerando um novo amino terminal. E a formação das pontes dissulfídicas ocorre durante o processo secretório. Se os peptídeos sinais são adicionados ao amino terminal das proteínas heterólogas, a proteína é introduzida na via secretora onde as pontes dissulfídicas podem ser formadas. A remoção do peptídeo sinal resulta em um amino terminal autêntico. Outra vantagem dos vetores de secreção é a modificação pós traducional que ocorre.

Um grande número de variáveis pode afetar o nível de expressão de um vetor. Usualmente promotores fortes, de origem homóloga são os vetores de expressão em leveduras. Por exemplo, a maioria dos vetores de expressão em leveduras utilizam elementos promotores de genes de enzimas glicolíticas, os quais são expressados em altos níveis por serem genes cromossomais de cópia única.

Em alguns casos é possível utilizar promotores heterólogos para expressão. Por exemplo, promotores de *Neurospora crassa* funcionam em *Aspergillus* (TURNER & BALANCE, 1985), mas frequentemente eles são inativos.

A expressão heteróloga pode em alguns casos realizar efeitos tóxicos, particularmente quando estão envolvidos altos níveis de expressão. As consequências são usualmente uma queda no número de cópias dos plasmídios (para os plasmídios epissomais), uma reduzida taxa no crescimento, ou em casos extremos, mutações no hospedeiro ou rearranjos nos plasmídios. Em alguns casos, a transformação inicial não ocorre ou o nível de expressão é muito baixo. Existem para isto algumas soluções e a mais simples talvez seja o uso de promotores regulados para o controle da expressão. A transformação, amplificação e crescimento das linhagens hospedeiras contendo genes regulados por estes promotores são feitas sob condições de baixa expressão. E, este caso, o crescimento e o número de cópias do plasmídio não são afetados. A indução da expressão final do crescimento resulta na morte das células se a expressão for tóxica.

Outras estratégias para diminuir os efeitos tóxicos são estabilizar plasmídios por integração, usar plasmídios com baixo número de cópias ou usar promotores fracos. Portanto, parece que a força de um promotor e o número de cópias do plasmídio devem estar balanceados para que haja otimização da expressão.

Como será discutido, muitos são os vetores que vêm sendo desenvolvidos atualmente. São vetores especializados para produção de proteínas importantes, tanto médica quanto comercialmente. O importante é perceber que apesar das aspirações de se identificar o "melhor" sistema e organismo, ou então, tentar desenvolver um simples sistema de vetores, os quais

possam ser utilizados em todos os problemas, infelizmente não existe organismo com utilidade universal.

2.3.2 A transferência de genes

Com os resultados obtidos por HINNEN et alii (1978) na complementação à mutação do gene *leu2*, em linhagens haplóides de *S. cerevisiae*, com o gene *LEU2* clonado no plasmídio quimérico Col E1, iniciou-se um importante processo de transformação genética e, atualmente é grande o número de leveduras que têm sido transformadas. Para tanto os plasmídios utilizados como vetores de expressão de genes tanto nativos quanto heterólogos, devem conter marcadores para que seja possível a seleção de tais transformantes.

Muitos dos sistemas de transferência de DNA se tornam ineficientes se não houver uma forma viável de selecionar os clones que trazem as moléculas recombinantes. Os marcadores seletivos usados para isolar transformantes e manter plasmídios nas células são de dois tipos: recessivos e dominantes. Os primeiros são genes funcionais contidos nos plasmídios que complementam mutações cromossômicas. E os segundos são baseados nos sistemas bacterianos que utilizam antibióticos inibidores do crescimento com o gene correspondente de resistência nos vetores.

No caso dos microrganismos eucarióticos existem poucas combinações de substâncias microbianas ativas com o gene de resistência correspondente. Em alguns casos, o gene de resistência bacteriana junto com sinais de expressão de eucariotos também podem ser viáveis. Entretanto, tais sistemas não parecem ser gerais como a maioria dos sistemas de seleção de procariotos.

2.3.2.1 Marcadores recessivos ou de complementação auxotrófica

A complementação de marcas auxotróficas tem sido utilizada na transformação de leveduras para selecionar células recombinantes. Para o desenvolvimento deste sistema, é necessário um mutante auxotrófico com um específico defeito enzimático e um gene biossintético para complementação. Entretanto, alguns destes sistemas podem ser facilmente obtidos, pelo uso eficiente de métodos de seleção direta (REISER et alii, 1990).

No entanto, para isolar tipos específicos de mutantes auxotróficos de leveduras, uma série de métodos para seleção positiva e enriquecimento de meios de cultura têm sido descritos (BOEKE et alii, 1984). Ácido ureído succínico tem sido usado para selecionar auxotróficos para pirimidina e o ácido alfa- aminoadípico é importante para obtenção de mutantes de Lys2 e Lys5. Mutantes de *S. cerevisiae* resistentes ao ácido 5-floro orótico são geralmente deficientes em 5-P oritidina descarboxilase e 5-P oritidina pirofosforilase; produtos do gene URA3 e URA5, respectivamente. A nistatina e o inositol, têm da mesma forma, feito parte de várias técnicas para enriquecimento de mutantes, tanto em *S. cerevisiae* quanto em *Yarrowia lipolytica*. Desta forma, vários tem sido os genes utilizados nos sistemas de transformação.

O primeiro gene a ser descrito foi da leu2, utilizado nos experimentos de HINNEN et alii (1978), mas em princípio todos os genes para os quais há uma mutação disponível podem ser usados como marcadores seletivos. No entanto, a pressão seletiva vai depender da frequência de transformação e da taxa de reversão. Isto porque, frequência de transformação abaixo de 10^{-6} requer o uso de duplos mutantes, uma vez que a taxa de reversão de muitas mutações está entre 10^{-6} e 10^{-7} . Em muitos casos, isto acaba dificultando, pois nem sempre é fácil obter os mutantes desejáveis.

ITO et alii (1983), transformaram células intactas de leveduras auxotróficas para o gene TRP1, com o plasmídio YRp7. Para tanto, utilizaram tratamento com LiAc. Além do YRp7, transformaram também linhagens auxotróficas para o gene estrutural HIS3 e como vetor utilizaram o YEp6 que possui um replicador derivado do 2 um. Este plasmídio já havia sido utilizado nos experimentos de STRUHL et alii (1979).

A grande desvantagem do uso destes sistemas é a necessidade de se ter mutantes específicos em todas as linhagens utilizadas como hospedeiro. As linhagens industriais, no entanto, são na maioria das vezes prototróficas e não apresentam mutações específicas. Alterações genotípicas poderiam causar queda na produtividade, o que não é interessante. Além disso, muitas linhagens são aneuplóides ou poliplóides, o que torna o isolamento de mutantes auxotróficos quase impossível (SCHWAB, 1986).

2.3.2.2 Marcadores dominantes

* Resistência a drogas

O sistema de marcador positivo ou dominante frequentemente envolve um antibiótico, ao qual a levedura é sensível, assim como o gene que confere resistência à droga. O problema é que leveduras geralmente não são sensíveis a antibióticos comuns, fazendo com que a maioria dos sistemas baseados na resistência em *E. coli* não possam ser explorados. Um dos primeiros marcadores dominantes a ser reportado em leveduras foi a resistência ao antibiótico aminoglicosídeo G418, uma forma da gentamicina (JIMENEZ & DAVIS, 1980). Ao contrário de outros antibióticos comumente utilizados, como a canamicina (*can*) e a neomicina (*neo*), o G418 é capaz de efetivamente inibir o crescimento de leveduras. A resistência ao G418, dos experimentos de JIMENEZ & DAVIS (1980) foi conferida pela expressão de um dos genes procarióticos do transposon Tn903, o qual foi expressado em leveduras através de um vetor multicópias. Este determinante não foi muito eficiente, mas sua eficiência de transformação foi otimizada por WEBSTER & DICKSON (1983) a 10% da eficiência de um marcador auxotrófico. Para alcançar este nível, as células precisaram de um período pós-transformacional de 18 horas, em crescimento não seletivo (YEPD), antes de se aplicar o antibiótico. Esta dependência para expressão em leveduras de um gene bacteriano e a influência positiva na eficiência de transformação em crescimento não seletivo, sugeriu que o nível de produção da enzima da resistência codificada pelo Tn 903 é um fator limitante da performance do marcador.

Os genes *neo*, mais comumente utilizados são os dos transposons Tn5 e TN903 que codificam aminoglicosídeo-3- fosfotransferase (APH) (tipo I) ou APH (tipo II), respectivamente. Ambas as enzimas inativam a canamicina e seu análogo o G418, mas as suas propriedades enzimáticas como pH ótimo e especificidade ao substrato são diferentes. Estas evidências sugeriram o trabalho de LANG- HINRICHS et alii (1989), que fizeram um estudo comparativo da expressão dos genes. Os resultados mostraram que de uma série de vetores, os que carregavam o gene *neo* do Tn 903, transformaram *S. cerevisiae* em altas taxas e conferiram um alto nível de resistência às células transformadas. Já os vetores de expressão análoga, os quais contêm o gene *neo* do Tn5 não transformaram aos níveis comparáveis. Evidenciou-se que os plasmídios que carregam o gene *neo* do Tn903 sem qualquer sequência regulatória ou promotora, induzem a baixas resistência e atividade enzimática (fosfotransferásica) e os plasmídios contendo o gene de expressão, conferem altos níveis de resistência e de atividade fosfotransferásica.

HADFIELD et alii (1990), continuaram os estudos com G418 e isolaram do Tn903, sequências codificadoras do aminoglicosídeo transferase (APT), uma enzima que dá a resistência ao G418 por catalisar a transferência de um grupo fosfato do ATP celular ao grupo 3 hidroxil do antibiótico, inativando-o. Quando esta enzima foi incorporada na construção do gene heterólogo, utilizando PGK1, como promotor e terminador, o APT heterólogo foi determinante da resistência em leveduras. As colônias transformantes foram selecionadas entre 30-48 horas e o crescimento foi normal. A fim de determinar se o marcador heterólogo funcionaria em um vetor de cópia única, ele foi inserido em um plasmídio integrativo, pCH153. E, surpreendentemente, a frequência de transformação atingida foi a mesma do vetor multicópias pBEJ16. No entanto, colônias transformantes dos vetores multicópias, foram capazes de inicialmente crescer mais rápido, indicando que o subsequente aumento no número de cópias auxiliou no estabelecimento do fenótipo.

Outros antibióticos têm sido objeto de estudo de vários pesquisadores. GRITZ & DAVIS (1983), reportaram a expressão da resistência à higromicina B, em *S. cerevisiae*. E, posteriormente KASTER et alii (1984), construíram um plasmídio bifuncional que também conferia resistência à higromicina B em leveduras. As células transformantes foram capazes de cres-

cer em meio de YEPD contendo altos níveis de higromicina B (200 ug/ml), mas o plaqueamento prévio das células transformantes, em meio contendo sorbitol 1.2 M e incubadas à 30 °C por cerca de 20 horas, facilitou na recuperação dos transformantes. O tempo requerido, parece estar relacionado ao mecanismo de ação da higromicina B, que causa erros traducionais através da perturbação da maquinaria da síntese proteica. Talvez a fosfotransferase seja acumulada, antes de atingir a resistência.

A construção de novos tipos de plasmídios levando genes de resistência como marcadores seletivos, têm tido resultado em várias linhagens de *S. cerevisiae*. Estes plasmídios contêm genes que codificam a resistência para fleomicina e cloranfenicol (GATIGNOL et alii, 1987; HADFIELD et alii, 1987).

HADFIELD et alii (1987), reportaram a caracterização em termos de estrutura primária e expressão de um marcador bifuncional de resistência ao cloranfenicol. Este marcador é um gene heterólogo, o qual contém todos os sinais necessários para expressão em leveduras e *E. coli*. Ele é composto do promotor de leveduras ADC1 modificado, do terminador CYC1(citocromo 1) e da sequência codificadora CAT (cloranfenicol acetil transferase) do Tn9. Para entender como o marcador funciona nas células, foram avaliados a forma com que o CAT é codificado, seus níveis de expressão e os efeitos no crescimento celular do hospedeiro, assim como, as concentrações de cloranfenicol que permitem o crescimento celular e a resposta da levedura à pressão seletiva. Verificaram que o nível da síntese de CAT do promotor ADC1 é substancialmente reduzida em comparação com a síntese do homólogo ADH1 (alcool desidrogenase). Esta redução na expressão do gene heterólogo corresponde à redução do nível de "estado permanente" de mRNAs heterólogos, o qual parece ser resultado de uma menor taxa da iniciação transcricional (KINGSMAN et alii, 1985). Um outro fator que poderia afetar a expressão do marcador é a estabilidade da proteína CAT na célula da levedura. Ao examinarem a quantidade da enzima produzida nas células, concluíram que esta foi suficiente para transformar eficientemente, mesmo quando presente ao nível de cópia única, apesar de não ter havido inibição da expressão, quando o marcador estava presente em múltiplas cópias. Isto é importante porque não seria conveniente que ele interferisse na síntese proteica das células

hospedeiras, deixando a expressão dos genes clonados. Um outro resultado interessante é que ao aumentar a pressão seletiva visando influenciar no número de cópias dos plasmídios baseados no 2 μ m, verificou-se que a seleção para Cm^r não influenciou no controle do número de cópias. Quanto à região promotora bifuncional ADC1, parece que as sequências promotoras de *E. coli* são independentes das de leveduras. Estes resultados sugerem que o cloranfenicol também é uma alternativa na construção de plasmídios com marcadores dominantes.

A fleomicina pertence ao grupo de antibióticos que matam as células, tanto de procariotos quanto de eucariotos, pela quebra da molécula de DNA. Sua resistência é codificada por 3 genes *ble*: um é do transposon Tn5 (MAZODIER et alii, 1985), outro do plasmídio pUB110 de *Staphylococcus* (SEMON et alii, 1987) e um terceiro (*Sh ble*) tem sido recentemente clonado de uma linhagem produtora da talisomicina de *Streptoalloteihus hindustanus* (DROCOURT et alii, 1990). Todos eles conferem resistência à bleomicina e fleomicina em *E. coli*.

A resistência codificada pelo transposon Tn5, tem sido expressada em *S. cerevisiae* através de vetores bifuncionais com promotor e terminador do gene CYC1. Deleções no promotor da glicose resultaram em níveis variáveis de resistência a fleomicina (GATIGNOL et alii, 1987). Estudos posteriores mostraram que tanto os níveis de resistência quanto a eficiência de transformação podem ser consideravelmente melhorados quando se utiliza um vetor com promotores fortes (GATIGNOL et alii, 1990).

Um vetor contendo promotores TEF1 (fator 1 alfa de elongação) e ENO1(enolase 1), ao invés do CYC1 anteriormente empregado, aumentou a eficiência de transformação, quando a seleção foi feita em meio rico em glicose, contendo 10 ug Ph/ml.

Por haver um grande número de organismos nos quais a resistência a fleomicina codificada pelo gene *ble* é funcional [leveduras (GAILLARDIN & RIBET, 1987); outros fungos (ISOGAI, T. et alii, 1987); Van ENGEBENBURG et alii, 1989); células de plantas (PEREZ et alii, 1989)], este sistema permitiria o isolamento de promotores de uma série de fontes e sua análise em um hospedeiro homólogo.

Além do gene de resistência a antibióticos, genes de resistência a herbicidas, também têm tido sucesso na transformação de leveduras. CASEY et alii (1988) reportaram a aplicação do gene de resistência ao sulfometuron metil (SM), como marcador dominante em vetores replicativos e integrativos em linhagens industriais de *Saccharomyces sp.* O sítio alvo do SM em *S. cerevisiae* é o acetolactato sintetase, uma enzima na via biossintética para leucina e valina. A transformação de linhagens prototróficas de *S. cerevisiae* e de linhagens de *S. carlsbergensis* sob condições onde SM inibe a atividade da acetolactato sintetase, resultou no não crescimento das linhagens em meio sem isoleucina e valina. Enquanto que linhagens prototróficas geralmente não crescem em meio contendo concentrações de 15 ug/ml, as células transformadas contendo tanto vetores integrativos quanto replicativos foram resistentes à até 70 ug/ml.

KUNZE et alii (1989), descreveram a construção de vetores plasmídiais que conferem resistência ao glifosato, um outro herbicida (n-fosforometil-glicina), que tem efeito inibitório não só contra crescimento de plantas, mas também, sobre o crescimento de bactérias e leveduras. Sua ação, inclui a inibição da EPSP sintetase, uma enzima que catalisa a conversão do sikimato-3-fosfato a 5-enol-sikimato-3-fosfato. O gene que codifica para EPSP sintetase, tem sido clonado em *S. cerevisiae* (como parte do polipeptídeo pentafuncional arom) e *E. coli* (aro A). A inserção do gene aroA de *E. coli* entre as sequências promotoras e terminadoras de leveduras em diferentes plasmídios de expressão aumentou a atividade da EPSP sintetase, conferindo resistência à toxicidade do glifosato.

A eficiência do glifosato como marcador seletivo na transformação foi relativamente alta quando comparada com a seleção para prototrofia a LEU2, sugerindo que o glifosato pode ser viável para sistemas de transformação genética de linhagens de laboratório marcadas, assim como, linhagens industriais e/ou selvagens.

** Resistência a metais pesados*

Entre os genes de resistência a metais pesados, o mais extensivamente utilizado é o da resistência ao cobre. O principal gene responsável por esta resistência é chamado CUP1 e tem sido clonado e caracterizado por FOGEL (1982) & FOGEL et alii (1983). Segundo estes autores, o aumento da resistência ao cobre em leveduras resulta de um aumento na produção de uma proteína chamada cobre-quelatina, que está associada ao aumento do número de cópias do gene CUP1. A síntese de mRNA é induzível pelo baixo nível de cobre, e relaciona-se às diferenças encontradas entre os genomas cobre-resistentes e cobre-sensíveis. Linhagens resistentes produzem muito mais proteína cobre-quelatina que as sensíveis e esta parece ser a base de sua habilidade de crescer em meio contendo altos níveis de cobre. Já as linhagens sensíveis parecem conter o gene em cópia única.

De acordo com HENDERSON et alii (1985), a observação acima é importante pois sugere que a resistência de uma linhagem ao cobre é afetada pelo número de cópias que a célula possui do gene CUP1. Desta forma, vetores baseados na resistência ao CUP1, poderiam ser úteis nos estudos como marcadores seletivos.

Um exemplo recente está nos vetores bifuncionais construídos por MACREEDIE (1989) & MACREEDIE et alii (1989), possuindo os cassetes de expressão do cobre, como vetores de expressão. Estes cassetes (CUP1B e CUP1E) foram clonados nos sítios de *HindIII*-*SacI* de pYEKL2, criando pYELC5 e pYELC7, o qual é idêntico ao pYELC5, mas com sítios múltiplos de clonagem reversos. Ambos os plasmídios tem quatro sítios de clonagem viáveis para que haja altos níveis de expressão de proteínas heterólogas induzíveis pelo cobre.

** Genes que codificam amilases, alfa-galactosidases, beta galactosidases e invertases*

A ausência de amilases degradativas previne a utilização do amido em muitas espécies de *Saccharomyces*. A disponibilidade de genes de

amilases clonados permite sua transferência e expressão em linhagens deficientes com o objetivo de seleção e melhoramento (REISER et alii,1990).

Genes de glucoamilases de *S. diastaticus* têm previamente sido clonados (YAMASHITA et alii, 1985). A glucoamilase, uma enzima extracelular que converte glicose pela hidrólise sequencial de ligações alfa-1-4, tem sua atividade facilmente monitorada pela formação de um halo claro em meio de bromocresol. Os transformantes foram selecionados, em linhagens haplóides de *S. cerevisiae*, pela expressão de um marcador prototrófico. A formação de halos foi utilizada para identificar clones levando dois genes diferentes da glucoamilase (STA1 e STA3).

Para a hidrólise e utilização da melibiose em *S.cerevisiae*, é necessário a indução de cinco genes estruturais, MEL1, GAL2, GAL1, GAL7 e GAL10, os quais codificam alfa- galactosidase, galactose permease, galactocinase, alfa-d- galactose-1-fosfato uridiltransferase e uridina difosfoglicose-4-epimirase, respectivamente. A expressão destes genes está sob a regulação da fonte de carbono, sendo induzível pela galactose ou pela melibiose e repressível pela glicose (OSHIMA, 1982).

RUOHOLA et alii (1986), clonaram o gene MEL1 que confere a produção de alfa-galactosidase de *S. cerevisiae* var *uvarum* para estudar sua expressão num plasmídios multicópias. Nas células transformadas, o fragmento de DNA contendo o gene MEL1, deu informações suficientes para simular a expressão regulatória do gene cromossomal. Em meio mínimo, a produção de galactose e a correspondente atividade enzimática, foi similar à indução na linhagem selvagem. **Parece que o alto número de cópias do gene MEL1 não leva à alta produção de alfa-galactosidase. Isto ocorre, provavelmente, devido à quantidade limitada da proteína regulatória GAL4, necessária para transcrição do gene MEL1 e dos genes da via da galactose.**

Em 1986, GENDRE & GUERINEAU, construíram um vetor contendo os genes MEL1 e G418 como marcadores seletivos. Inicialmente, os transformantes foram selecionados em melibiose e em seguida em G418. Com isso, houve um aumento na eficiência de transformação de 25 vezes. Da mesma forma, XIAO & RANK (1989) utilizaram o gene SMR1 (sulfometuron metil) como marcador dominante na construção de linhagens recombinantes de *S.*

cerevisiae levando o gene MEL1 ao invés de parte de um plasmídio bacteriano. O gene MEL1 foi inserido em uma região não essencial do SMR1 *in vitro*.

S. cerevisiae é incapaz de utilizar lactose como fonte de carbono, porque não tem um gene estrutural da beta-galactosidase e portanto, não pode hidrolisar lactose a glicose e galactose. Também não tem um mecanismo para transporte da lactose através da membrana celular. Este problema foi evidenciado pelos testes diretos de transporte de lactose e por leveduras geneticamente construídas que produzem a beta-galactosidase intracelular, mas não crescem em lactose. Apesar de ter sido testada, a introdução do gene da lactose permease, tais como gene LAC4 de *E. coli* em *S. cerevisiae*, o problema do transporte não foi resolvido. Uma solução seria usar a lactose permease de outras leveduras e por isso tem sido utilizado *Kluyveromyces lactis*, que podem crescer em lactose e tem um sistema lactose- permease induzível (STINCHCOMB et alii, 1980).

Em 1985, SREEKRISHNA & DICKSON transferiram para *S. cerevisiae* um plasmídio carregando uma região de 13 kb de genoma de *K. lactis*, incluindo o gene LAC4, que codifica para beta- galactosidase. Os transformantes foram selecionados primeiramente para resistência a G418 e então para crescimento em lactose. O aparecimento de fenótipos LAC⁺ é explicável pela presença do gene lactose-permease de *K. lactis* no plasmídio, confirmando uma hipótese de que o sistema de transporte em ambas as espécies são idênticos.

A levedura *Picchia pastoris* não utiliza sacarose como fonte de carbono, mas sim o metanol, e para isso contém uma via de utilização altamente regulada. Seu interesse comercial, no entanto, é baseado no uso como parte da alimentação, além do alto nível de expressão de proteínas heterólogas, utilizando os promotores regulados pelo metanol (CREGG et alii, 1985). Para explorar este potencial, foi desenvolvido um mutante de transformação para histidina (HIS4). No entanto, como já fora discutido, a maior parte das linhagens industriais são prototróficas resultando em mutantes que não podem ser selecionados. Baseados no insucesso dos resultados anteriores, SREEKRISHNA & DICKSON (1985), desenvolveram um método para seleção dominante de transformantes, a partir da incapacidade dos mesmos de utilizarem sacarose (Suc⁻) como fonte de carbono. *P. pastoris* foi transformada com um plasmídio, o qual contém o gene SUC2 de *S. cerevisiae* e uma sequência de replicação

autônoma (PARS1) de *P. pastoris*. Com isto, observou-se integração espontânea do plasmídio de DNA, resultando em fenótipos Suc⁻ estáveis.

Existe a possibilidade de se utilizar o gene SUC2 para clonar sequências de secreção de proteínas. Isto porque transformantes de *P. pastoris* contendo o gene SUC2 sem sinais de secreção não crescem em sacarose. Selecionando as células crescidas em sacarose, os sinais de secreção poderiam ser selecionados e clonados.

Em muitos casos vetores não contêm marcadores seletivos. É possível introduzi-los nas células usando um plasmídio cotransformante. As células são transformadas com um vetor episomal contendo um marcador seletivo e, com um vetor, o qual vai ser introduzido na célula. Tem sido reportado que uma significativa parcela dos transformantes selecionados, também são identificados por métodos apropriados e podem ser então curados do primeiro plasmídio (RUDOLPH & HINNEN, 1985).

Por todos estes exemplos, verifica-se a importância do crescente interesse em se utilizar marcadores dominantes nos processos de transformação genética, ao invés dos marcadores de complementação auxotrófica.

2.3.3 A expressão e secreção de proteínas heterólogas

Um objetivo da engenharia genética é se obter um produto, geralmente uma proteína, que normalmente não seria obtida se fossem empregados métodos convencionais, ou então, se esta proteína sempre estivesse presente em concentrações muito baixas. O problema é obter o gene que codifica este produto e então, colocá-lo num vetor apropriado. Assumindo estar o gene clonado, é necessário saber como ele está sendo expressado no vetor. A expressão de qualquer gene é dependente de uma eficiente transcrição e tradução. No entanto, há muitos problemas relacionados quando a expressão é importante. Por exemplo, as proteínas eucarióticas produzidas em grande quantidade podem afetar o crescimento do hospedeiro e a replicação do vetor, causando a perda dos transformantes. Sequências promotoras e terminadoras também são necessárias para que o gene seja reconhecido pela RNA polimerase para uma eficiente transcrição e tradução. Em seguida serão discutidos alguns destes problemas e o que se tem conseguido na expressão e secreção de proteínas heterólogas em leveduras.

Um vetor de expressão e secreção para *S. cerevisiae* utilizando o promotor e o peptídeo sinal da invertase codificada pelo gene SUC2, foi desenvolvido por NISHIZAWA et alii (1987). O promotor e o terminador utilizados permitiram a expressão do gene da amilase de ratos em *S. cerevisiae*. Quando a amilase foi ligada a um vetor de secreção, após remoção de suas sequências sinais, a atividade da amilase foi secretada em *S. cerevisiae*, sob condições de desrepressão, uma vez que o promotor do gene SUC2 é regulado pela concentração de glicose no meio. Cerca de 70% da atividade total (meio mais células associadas) foi secretada, indicando eficiência no processo. Ao calcularem o valor de atividade específica para amilase comercialmente disponível (350 unidades/mg proteína) encontrou-se cerca de 600 ug/litro de cultura.

TEZUKA et alii (1988) relataram a construção de um plasmídeo no qual o gene estrutural de *E. coli*, gama-gentamicina sintetase (GSH-1), foi fusionado a um fragmento de DNA cromossomal. A introdução deste plasmídeo nas células de leveduras resultou na expressão de alta atividade de GSH-1, seguido por uma maior quantidade de glutatona (GSH). O fragmen-

to estrutural do gene GSH-1 foi útil para clonagem de sinais transcrpcionais e traducionais do DNA de leveduras.

O uso de vetores de expressão, com o promotor do gene da galactose, em particular o GAL7, tem sido estudado por ABE et alii (1988), que observaram que a inclusão da sequência terminadora do GAL7, resultou num aumento de três vezes a produção da proteína codificada pelo cDNA da região anterior a 1a (Ela) do adenovirus humano, sem afetar o nível de mRNA. A produção desta proteína foi mais uma vez aumentada, através da inserção do gene regulatório positivo GAL4. Este resultado é esperado justamente pelo fato de que a concentração intracelular da proteína GAL4 é normalmente limitada para um maior nível de expressão induzida pelos genes da galactose. Poder-se-ia esperar no entanto, que a produção de proteínas fosse consideravelmente aumentada, pelo aumento da quantidade de GAL4, utilizando um vetor de expressão constitutiva, tal como o promotor ADH (alcool desidrogenase). Mas no entanto, as células cresceram muito devagar, talvez pela superprodução de enzimas metabolizadas pela galactose.

O caráter regulatório do gene SUC2 da invertase foi estudado por JANG et alii (1990) utilizando um plasmídio multicópias. Empregou-se um sistema de cultura contínua, sob condições definidas e os resultados evidenciaram que sob condições anaeróbicas houve maior produção de invertase e etanol mas, uma menor geração de biomassa que em condições aeróbicas. A diferença na dependência da biomassa e do etanol ao oxigênio poderia ser explicada pelas diferentes vias metabólicas envolvidas na quebra da glicose.

VARONI & LOTTI (1989), reportaram que altos níveis de expressão de proteínas heterólogas têm sido obtidos em leveduras, utilizando vetores episomais, baseados no 2 um que levavam uma sequência UAS-GAL fusionado com diferentes promotores TATA box. Altos níveis de expressão (de 5 a 15% do total de proteínas) têm sido obtidos com diferentes proteínas tanto intra como extracelular, tais como beta-galactosidase de *K. lactis* e alfa-glucoamilase de *S. diastaticus*. Os mais altos níveis de produtividade foram obtidos durante uma fase fisiológica transitória correspondendo à fase estacionária inicial do crescimento (PORRO et alii, 1991). A fim de elucidar o mecanismo responsável para tal dependência, os autores estudaram alguns fatores que devem influenciar, em *S. cerevisiae*, a expressão de beta-galac-

tosidase de *E. coli*, clonado sob promotor GAL1-10/CYC1 em culturas contínuas. O problema da queda de expressão de proteínas acarretado pela instabilidade genética dos plasmídios recombinantes também foi considerado construindo um vetor contendo dois marcadores seletivos (URA3 e LEU2) e multiplicidade de cópias. Com relação aos plasmídios observou-se que uma queda na produtividade enzimática, após 70-80 horas de fermentação, coincidiu com a perda dos plasmídios pelas células transformadas. Sendo que apenas 10% das células continham o plasmídio depois de 100 horas de crescimento.

Outras substâncias de interesse comercial tem sido produzidas. Uma delas é a equistatina, um polipeptídeo de 49 aminoácidos isolado do veneno de *Echis carinatus*, que inibe a agregação de plaquetas por bloquear um receptor de fibrinogênio. Grandes quantidades de equistatina têm sido requeridas para avaliar seu potencial como agente terapêutico. *E. coli* produziu equistatina recombinante como uma proteína de fusão intracelular e *S. cerevisiae* como uma proteína secretada (CARTY et alii, 1990). Uma vez que a purificação da equistatina recombinante é mais simples com leveduras, esforços têm sido feitos para aumentar a produtividade da fermentação.

Outras espécies de leveduras que não *S. cerevisiae* vêm sendo utilizadas atualmente na produção de proteínas heterólogas. Entre elas, *K. lactis* que há vários anos vem sendo utilizada comercialmente para produção de lactase (beta-galactosidase). O crescimento destes organismos em fermentação de larga escala tem sido extensivamente estudado e métodos eficientes para extração e recuperação de lactase têm sido desenvolvidos. Com estas informações tornou-se possível utilizar *K. lactis* em processos de produção de proteínas heterólogas (RIETVELD et alii, 1988).

Nos experimentos de DAS et alii (1984), foi possível pela primeira vez introduzir DNA heterólogo via um plasmídio de replicação autônoma. Os plasmídios killer de *K. lactis* também têm sido utilizados. Recentemente, um plasmídio circular, análogo a um de *S. cerevisiae*, foi isolado de *K. drosophilarum* e mostrou-se hábil a se replicar em *K. lactis*. Contudo, o plasmídio, chamado de pKD1 é o que vem sendo mais utilizado na construção de vetores de expressão heteróloga (BIANCHI et alii, 1987).

RIETVELD et alii (1988), construíram um vetor utilizando elementos regulatórios do gene da lactase e verificaram que *K. lactis* tem

propriedades superiores a *S. cerevisiae* para produção intra e extracelular de proteínas heterólogas. Internamente, as proteínas produzidas são completamente solúveis e ativas. A secreção pode ser obtida aos níveis de gramas por litro de meio de cultura.

Um sistema de expressão heteróloga baseado em sequências integrativas a fim de minimizar os problemas acarretados pelo uso de sistemas baseados em plasmídios foi desenvolvido por Van den BERG et alii (1990). Para isso, incluíram no vetor elementos regulatórios transcricionais do gene da lactase de *K. lactis* para produção de proquimosina bovina. Esta enzima, uma aspartil protease, é responsável pela coagulação do leite, constituindo-se num produto de importância comercial. A produção intracelular de quimosina em *E. coli* e *S. cerevisiae*, tem resultado em um produto insolúvel que pode ser isolado somente com o uso de uma proteína desnaturante. Ao compararem a secreção de proquimosina em *K. lactis* e *S. cerevisiae* através de um vetor contendo a região codificadora da proquimosina fusionada ao fator alfa, verificou-se que houve uma maior eficiência de secreção por parte de *K. lactis*, enquanto que a maior parte da enzima produzida por *S. cerevisiae* manteve-se intracelularmente.

O problema da baixa concentração de proteínas exportadas pode ser resultado da rigidez da parede celular de *S. cerevisiae*. Com isso, muitos dos peptídeos heterólogos, principalmente os de alto peso molecular, que seriam secretados, ficam no espaço periplasmático, exigindo processos especiais para recuperação dos mesmos.

Hansenula polymorpha tem desenvolvido um sistema de expressão heteróloga muito importante, pois ao lado de *Picchia* e outras espécies são capazes de utilizar metanol como fonte de energia e sua adição no meio de cultura induz as enzimas envolvidas no metabolismo do metanol e, paralelamente, o aparecimento de peroxissomos. Por isso, a construção de uma série de vetores de expressão/integração utilizando duas enzimas do metabolismo clonadas [metanol oxidase (MOX) e formato desidrogenase (FMD)] e um promotor metanol-induzível foi necessária para a produção do antígeno de superfície da hepatite B (GELLIINSEN et alii, 1990).

SIERKSTRA et alii (1991), compararam vetores com diferentes origens de replicação a fim de analisar sua influência na eficiência de

transformação e integração de *H. polymorpha*. Estes plasmídios continham parte do 2 um e uma sequência replicativa isolada de *H. polymorpha* (HARS2), sendo que um plasmídio sem origem de replicação foi usado como controle. As frequências de transformação considerando os tipos de vetores utilizados foram de 2.50 e 15 transformantes/ug de DNA, respectivamente. A sequência do 2 um teve um efeito negativo na eficiência de transformação. Ocorreu integração plasmidial no locus de metiloxidase em 50% dos integrantes analisados e a integração em tandem foi favorecida. O nível de mRNA e a expressão da alfa-galactosidase pelos integrantes, foi proporcional ao número de cópias integradas do plasmídio de expressão no genoma de *H. polymorpha*.

2.4 Processos industriais com microrganismos recombinantes

De acordo com SCHWAB (1986), apesar da vasta literatura envolvendo engenharia genética nos últimos 10 anos, somente poucas publicações referem-se aos impactos da biologia molecular na pesquisa e desenvolvimento de processos. Uma possível explicação para isto está no fato de que muitas das aplicações da tecnologia do DNA recombinante estão ligadas à produção de polipeptídeos de interesse farmacológico e estes são produtos geralmente de alto custo e de baixo volume, o que muitas vezes leva à produção sob condições comparáveis aos experimentos em escala de laboratório.

Em geral, os problemas associados à "scale-up" de bioprocessos empregando microrganismos recombinantes, deveriam ser similares aos encontrados em processos usando linhagens desenvolvidas por métodos clássicos. No entanto, dependendo do sistema hospedeiro-vetor utilizado, alguns problemas específicos aparecem, causando um substancial impacto no desenvolvimento de estratégias. Talvez o problema mais importante seja referente à instabilidade genética que estes organismos apresentam. Apesar do genoma ser geralmente estável, existem alguns componentes que instabilizam certos organismos, genomas ou até mesmo genes. Os efeitos da instabilidade incluem perda ou destruição de grupos de ligação (cromossomos, plasmídios ou genomas de organelas), rearranjos no DNA e transposições.

Outro fato também evidenciado é que linhagens altamente produtivas, obtidas por melhoramento genético, degeneram rapidamente quando mantidas em sub-culturas, resultando assim num sério decréscimo da produção.

A manutenção da estabilidade é um problema central nos processos em larga escala que utilizam tais microrganismos. A instabilidade pode ser, tanto de ordem segregacional quanto estrutural.

A *instabilidade segregacional* muitas vezes ocorre porque a maioria dos vetores são baseados em plasmídios de replicação autônoma. O problema de quando se utiliza estes plasmídios já fora discutido e sabe-se que a propagação eficiente é uma exata distribuição das moléculas entre as células filhas durante a divisão celular (CAULCOTT, 1984). No entanto ocorre que as células acabam perdendo seus plasmídios no decorrer das gerações. E além disso, as células sem plasmídio têm uma taxa de crescimento maior que as células que contêm plasmídios, resultando numa queda da produtividade.

Um método para tentar resolver o efeito da perda de plasmídio é utilizar um mecanismo seletivo.

Em leveduras, entretanto, a seleção pode apenas reduzir, mas não eliminar a instabilidade. Por outro lado o custo da produção é aumentado devido ao custo dos componentes dos meios definidos, que geralmente incluem os antibióticos e aminoácidos, entre outros.

STEPHENS & LYBERATOS (1989), utilizaram alterações nos níveis do substrato a fim de estabilizar os organismos. Para tanto, as células sofreram alterações cíclicas entre condições de substrato limitado e não limitado. Por causa do seu conteúdo metabólico, propôs-se que as células contendo plasmídios demoram mais a se adaptarem a alterações na concentração de substrato que as células sem plasmídios. Durante os períodos de substrato limitado, as células sem plasmídios crescem a uma taxa quase máxima. Manipulando tempo e amplitude dos ciclos pode-se resolver as discrepâncias observadas entre os tipos de células. Outros pesquisadores (CAUNT et alii, 1990), desenvolveram um método para estabilização dos plasmídios em meio não seletivo, baseado na ciclagem de oxigênio, em culturas contínuas.

Leveduras recombinantes têm se mostrado eficientes na expressão de genes que codificam proteínas (GOPAL et alii, 1989). No entanto, linhagens contendo plasmídios produzem em cultura contínua uma menor taxa de etanol que as células sem plasmídios. Estas linhagens recombinantes, segundo COPPELLA & DHURJATI (1989) têm uma capacidade respiratória reduzida, devido à competição entre o metabolismo do plasmídio e do hospedeiro para energia disponível.

A *instabilidade estrutural* está ligada a problemas menos comuns, que incluem deleções, inserções, rearranjos, mutações de ponto, etc, as quais eliminam ou reduzem a expressão dos genes envolvidos (MIZUKAM et alii, 1986). Até o momento não há estratégias bem fundamentadas capazes de resolver tais problemas, justamente porque muito pouco se sabe sobre os fatores que causam tal fenômeno.

Até o presente momento não existe suficiente informação para permitir uma discussão mais detalhada sobre a utilização de microrganismos recombinantes em processo industriais. Entretanto, parece óbvio que a estabilidade e a expressão gênica requerem condições ambientais definidas para uma melhor produtividade. De qualquer forma, as técnicas de DNA recombinante não substituem completamente os métodos clássicos de melhoramento de linhagens e sim, oferecem um recurso adicional de significância crescente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos utilizados

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sensíveis à nistatina são provenientes do estoque mantido no laboratório de Genética de Leveduras da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- USP e do laboratório de Biologia Molecular da Brock University - St. Catharines- Canadá.

As linhagens resistentes são resultado de estudos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Genética de Leveduras da ESALQ/USP (TAVARES, 1989).

Tabela 1 - Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas e sua procedência.

Linhagem	Procedência	Resistência
<i>S.cerevisiae</i> M 606	ESALQ- USP	NYS ^r
<i>S. cerevisiae</i> # 93	Brock University	NYS ^s
<i>S. cerevisiae</i> # 1	Brock University	NYS ^s
<i>S. cerevisiae</i> # 33	Brock University	NYS ^s
ATCC 26603	ESALQ-USP	NYS ^s
M300-1A	ESALQ-USP	NYS ^s
STX 145-15 D	ESALQ-USP	NYS ^s
MXV	ESALQ-USP	NYS ^s
Fleischmann	ESALQ-USP	NYS ^s

Foram também utilizadas linhagens de *Escherichia coli* DH alfa 5 nos experimentos de transformação bacteriana.

3.2 Plasmídio utilizado

YRp7 - plasmídio bifuncional com 5.7 kb que pode ser usado como vetor de clonagem para *S. cerevisiae* e *E. coli*. Este plasmídio tem a habilidade de se replicar em ambos os organismos devido à presença de uma sequência de replicação autônoma (ARS) de origem cromossomal de *S. cerevisiae* e por possuir parte do plasmídio bacteriano pBR322. Como marcadores seletivos estão *TRP1* para *S. cerevisiae* e *Amp*, *Tet* e *TRPC* para *E. coli*. O plasmídio YRp7 compreende um fragmento de *EcoRI* de aproximadamente 1.5 kb de *S. cerevisiae* contendo o gene do *TRP1* e elemento *ARS1* inserido no sítio para *EcoRI* do pBR322 (STRUHL et alii, 1979). O plasmídio foi usado nos processos de clonagem do gene da nistatina.

3.3 Meios de Cultura

3.3.1. Meio completo (YEPD)

Extrato de levedura.....	1.0 %
Peptona.....	2.0 %
Dextrose	2.0 %
Ágar (opcional)	2.5 %
Água destilada	

Este meio foi utilizado para a manutenção de cultura, multiplicação das células, preparo de inóculo nos ensaios de fermentação, crescimento e seleção dos transformantes, assim como na análise do grau de resistência, estabilidade, etc.

O pH não precisa ser ajustado, ficando em torno de 6.8.

3.3.2. Meio de Luria e Bertani (LB) (MANIATIS et alii, 1982)

Triptona.....	1.0 %
NaCl	0.5 %
Extrato de levedura.....	1.0 %
Ágar (opcional)	2.5 %
Água destilada	

O pH foi ajustado para 6.8 com NaOH 1N. Este meio foi utilizado para crescimento e seleção dos transformantes em *E. coli*. E para crescimento das linhagens bacterianas, das quais extraiu-se plasmídios.

3.3.3. Meio de fermentação

Extrato de levedura.....	1.0 %
Peptona.....	1.0 %
Dextrose	15.0 %
Água destilada	

O pH do meio foi ajustado para 4.5 com HCl 1N e utilizado nos ensaios de fermentação, envolvendo os clones transformantes e as respectivas linhagens originais.

3.4. Soluções e Tampões

3.4.1 Solução estoque de nistatina (100 x)

Nistatina.....	600 mg
Álcool etílico.....	10 ml

A solução foi estocada a -20°C e utilizada em meio de YEPD para seleção direta dos transformantes numa concentração de 60 ug/ml . Além dos testes do grau de resistência dos clones, onde utilizou-se concentrações que variaram de 30 a 210 ug/ml .

3.4.2 Solução estoque de ampicilina (500 x)

Ampicilina.....	250 mg
Água destilada	10 ml

A solução foi esterilizada por filtração. Mantida a -20°C e utilizada na concentração final de 50 ug/ml .

3.4.3 Solução de SDS alcalino

NaOH	0.2 N
SDS	1.0 %
Água destilada	9.0 ml

A solução foi preparada no momento do uso e utilizada para extração de plasmídios bacterianos.

3.4.4 Solução de lisozima

EDTA (ácido etileno diamino tetracético)	10 mM
Glucose	50 mM
Tris HCl.....	25 mM

O pH foi ajustado para 8.0 pela adição de HCl 37% e a esterilização foi feita por filtração.

A lisozima numa concentração de 2 mg/ml foi adicionada no momento do uso.

A solução foi utilizada para lise das células bacterianas durante a extração de DNA plasmidial.

3.4.5 Solução de acetato de sódio

NaAc 3 M

Ajustado o pH para 4.8 com ácido acético glacial.

A solução foi utilizada na extração de DNA plasmidial.

3.4.6 Soluções de EDTA

Solução de EDTA 50 mM

Solução de EDTA 100 mM

Ambas as soluções têm pH 7.5 e foram utilizadas na extração de DNA de leveduras.

3.4.7 Solução de pronase (10x)

50 mg de pronase (Sigma P6911) dissolvidos em 10 ml de Tris 10 mM, com pH 7.5

Incubada por 15 min a 56 °C

Incubada por 1 hora a 37 °C

Filtrada

Estocada a -20 °C

Solução utilizada na extração de DNA genômico de leveduras na concentração de 5 mg/ml.

3.4.8 Solução de polietilenoglicol (PEG)

PEG 400040.0 g

Água destilada 100.0 ml

A solução foi autoclavada a 120 °C por 20 minutos.

3.4.9 Solução de brometo de etídio (MANIATIS et alii, 1982)

Brometo de etídio1.0 g

Água destilada 100.0 ml

A solução foi agitada por várias horas para dissolução e estocada à temperatura ambiente. Sendo utilizada nos tampões de eletroforese de DNA. Como agente intercalante, o DNA pode ser evidenciado sob transiluminador U.V.

3.4.10 Fenol saturado

Para cada 100 ml adicionou-se aproximadamente 500 mg de hidroxiquinolina. E para que houvesse saturação, adicionou-se TE, sob agitação até obter-se duas fases.

Utilizado para precipitação de proteínas nas extrações de DNA.

3.4.11 Tampão Tris-EDTA (MANLATIS *et alii*, 1982)

Tris base..... 10 mM

EDTA 1 mM

Utilizado na ressuspensão de células e de DNA.

3.4.12 Tampão Tris-acetato (20x)

Tris base..... 800 mM

Acetato de sódio..... 100 mM

EDTA 20 mM

Ajustado o pH para 7.9 com ácido acético glacial.

O tampão foi utilizado nos géis de agarose e nas cubas eletroforéticas.

3.4.13 Tampão de transformação (*E. coli*)

Tris-HCl..... 5 mM

CaCl₂ (dihidratado) 75 mM

O tampão foi autoclavado e estocado em refrigerador.

3.4.14 Tampão de lise (pronase-SDS)

Tris base..... 10 mM

EDTA 10 mM

SDS..... 0.4 %

O tampão foi utilizado para extração de DNA genômico de leveduras, acrescido de 5 mg/ml de pronase no momento do uso.

3.4.15 Tampão da amostra

Glicerol ou ficol.....	20.0 %
SDS.....	2.0 %
Azul de bromofenol.....	0.05 %
Agua destilada	

A solução foi aquecida, sem atingir o ponto de ebulição e utilizada num volume mínimo de 10% nas amostras de DNA a serem corridas em gel de agarose.

3.5 Eletroforese em gel de agarose

Esta técnica foi utilizada em várias etapas deste trabalho. Na observação dos DNAs genômicos e plasmidial, monitoração dos processos de digestão e ligação de DNA e estimativa de número e peso molecular dos fragmentos do DNA plasmidial.

A eletroforese foi realizada em tampão tris-acetato(1.0 x) (ítem 3.4.12). A concentração de agarose (tipo I-Sigma) variou de 0.8 a 1.0%. O volume dos géis variou de 150 ml para os géis maiores a 50 ml para as preparações de mini-géis.

A corrente elétrica para migração variou desde 15 V, para os géis que foram corridos durante à noite até 70 V. Maiores voltagens foram evitadas por causarem distorções nas corridas.

Ao tampão tris-acetato, adicionou-se aproximadamente 15 ug de brometo de etídio (ítem 3.4.10) por aproximadamente 30 minutos para que os géis pudessem ser analisados e fotografados em transiluminador de U.V. e fotografados por um aparelho Polaroid.

Para o preparo do gel, a agarose foi misturada ao tampão TA 1.0 x, sendo fundida por ebulição. Na aplicação do gel, adicionou-se o tampão às amostras numa proporção mínima de 10% dos seus volumes e as mesmas foram distribuídas nos poços do gel.

3.6 Extração de DNA genômico de leveduras

A extração de DNA tanto das linhagens resistentes quanto das sensíveis utilizadas neste trabalho, foi necessária para as etapas de transformação genética e posterior caracterização dos transformantes.

As células foram cultivadas em 100 ml de YEPD (item 3.4.1) a 30 °C até atingirem a fase exponencial tardia (aproximadamente 15 horas). Foram centrifugadas a 4000 rpm por 30 segundos e lavadas em 5 ml de EDTA 50 mM (item 3.4.6). Seguiu-se outra centrifugação, também a 4000 rpm durante 10 segundos. As células foram ressuspensas em 4 ml de EDTA 100 mM (item 3.4.6), 800 µl de 2-beta-mercaptoetanol e 100 µl de zymolase (1 mg/ml). Células foram incubadas a 37 °C por 20-30 minutos e em seguida centrifugadas. Adicionou-se 5 ml da solução pronase-SDS (item 3.4.14) e incubou-se por 45-60 minutos a 37 °C. A extração das proteínas foi feita pela adição de fenol, clorofórmio, álcool isoamílico na proporção 25:24:1, respectivamente. Centrifugou-se a 6000 rpm e o sobrenadante foi coletado cuidadosamente. Esta etapa foi repetida de 2-4 vezes, até se ter um sobrenadante límpido, onde se fez a precipitação com etanol gelado a 95%. A ressuspensão do DNA foi feita, tanto pela utilização de TE (item 3.4.11) quanto por água destilada esterilizada.

3.7 Extração e purificação de plasmídios (MANIATIS et alii, 1982)

Esta metodologia foi utilizada, tanto para extrações de grandes quanto de pequenas quantidades de DNA. As alterações sofridas estão somente nos volumes das soluções utilizadas; para pequenas extrações, em tubos Eppendorf, os volumes corresponderam em média a 1% dos volumes usados em extrações de grande escala.

A partir de um pré-inóculo em 3 ml de LB (item 3.4.2) incubado por 3 horas a 37 °C, as células foram inoculadas em 500 ml de meio LB acrescido de ampicilina numa concentração de 50 µg/ml e incubados a 37 °C por 18 horas. A partir de então, as células foram centrifugadas e adicionou-se 5 ml da solução de lisozima (2 mg/ml) e as células foram incubadas em gelo por 50 minutos, quando então apresentaram um aspecto viscoso.

Adicionou-se, em seguida, 10 ml da solução de SDS- alcalino (item 3.4.3) e a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 5-10 minutos. Quando tornou-se transparente, adicionou-se 15 ml de NaAc 3 M (item 3.4.5) e incubou-se no gelo por aproximadamente 60 minutos.

Desta forma, proteínas e moléculas de alto peso molecular são quebradas e precipitam-se. No preparo do DNA em larga escala, utilizou-se uma filtragem com lã de vidro para facilitar a centrifugação, que foi executada

a 5000 rpm por 20 minutos, sob refrigeração. O sobrenadante foi coletado e prosseguiu-se à precipitação com 2 volumes de etanol gelado a 95%. O DNA em suspensão foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 4 °C e ressuspensado em 2 ml de TE.

A precipitação com etanol foi feita de 2 a 3 vezes. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O DNA precipitado foi seco a 37°C, para eliminar resíduos de etanol, que poderiam alterar o DNA causando desintegração rápida do mesmo e então, ressuspensado em média de 2 ml de TE e estocados a -20 °C.

3.8 Bandeamento de DNA plasmidial por gradiente de cloreto de céσιο (CsCl)

A metodologia foi utilizada para purificação dos DNA plasmidiais utilizados. Estes incluem o vetor YRp7 e os clones de *S. cerevisiae* recuperados em *E. coli*.

Após dissolução do DNA em tampão TE (ítem 3.4.11) para um volume total de 6 ml, adicionou-se 6.6 g de CsCl, misturando-se muito bem para que não houvesse interferência na densidade e 0.6 ml de uma solução de brometo de etídio na concentração de 6 mg/ml.

A densidade ótima para centrifugação encontrava-se entre 1.55 e 1.59. Se esta densidade não fosse atingida inicialmente, acrescentava-se CsCl ou TE.

Após exato balanceamento entre os tubos, os mesmos foram colocados para centrifugação durante 22 horas a 65000 rpm.

3.9 Digestão dos DNAs genômico e plasmidial com endonucleases de restrição

Para que fossem prosseguidas as etapas de ligação, clonagem e transformação, o DNA genômico da linhagem M606 (resistente à nistatina) e o plasmídeo YRp7, foram clivados com a endonuclease de restrição *Bam*HI. Com a linhagem M606, para um total de 100 ul, foram utilizadas 50 ul de DNA genômico, 10 ul de tampão de digestão (10x), 1 ul de *Bam*HI e 39 ul de água destilada estéril. Por se tratar de uma digestão parcial, a solução foi mantida a 37 °C por 30-40 minutos. Após a digestão foi feita extração com fenol e

precipitação com etanol para evitar interferência de nucleases nos processos seguintes.

Com o plasmídio, procedeu-se da mesma forma mas, para 20 ul de YRP7, adicionou-se 1 ul de *Bam*HI, 5 ul de tampão (10x), 24 ul de água. Por ser necessário uma digestão total, a solução foi incubada a 37 °C por 3-4 horas. Em seguida, procedeu-se à extração com fenol e precipitação com etanol.

3.10 Ligação

Na etapa de ligação, 20 ul de DNA plasmidial e 40 ul de DNA genômico foram incubados por 3-4 horas em temperatura ambiente numa solução contendo 1 ul da enzima T4 DNA ligase, 10 ul de tampão da enzima, 29 ul de água bidestilada estéril.

O processo foi monitorado em eletroforese de gel de agarose 0.9%.

3.11 Transformação

3.11.1 em *S. cerevisiae* #93

3.11.1.1 Método de IIMURA et alii (1983)

As células de leveduras foram crescidas em meio YEPD (ítem 3.3.1) durante 18 horas a 30 °C, posteriormente centrifugadas a 3000 rpm e lavadas com água destilada. Utilizando-se 5 ml de CaCl₂ 200 mM (pH 6.0), as mesmas foram ressuspensas e incubadas a 0 °C por 15 minutos. Procedeu-se então, uma centrifugação a 3000 rpm e ressuspendeu-se em 600 ul de uma solução de CaCl₂ 200 mM e MgCl₂ 100 mM e 400 ul de Tris 10 mM. Adicionou-se de 1 a 10 ug da mistura de ligação (dependendo do experimento) em 200 ul da solução. Incubou-se a 37 °C por 5 minutos.

O plaqueamento de 100 ul/placa, deu-se em YEPD acrescido de 60 ug/ml de nistatina.

Os transformantes foram selecionados após 2-3 dias de crescimento a 30 °C.

3.11.1.2 Método de ITO et alii (1983)

As células foram crescidas por 18 horas a 30 °C em 5 ml de YEPD (item 3.3.1). Retirou-se 500 ul, os quais foram inoculados em 50 ml de YEPD e postos para crescer até o final da fase exponencial (5×10^7 células/ml). As células foram centrifugadas a 3000 rpm e lavadas em tampão TE (item 3.4.11). Uma vez centrifugadas, ressuspendeu-se em 5 ml de LiAc 250 mM e deixou-se sob intensa agitação por 4 horas a 30 °C. Em seguida, alíquotas de 300 ul foram distribuídas em tubos Eppendorf e 10 ug da mistura de ligação foram adicionadas, junto com PEG 4000 a 10%. Após misturar-se cuidadosamente as células, estas foram incubadas por 2 horas a 30 °C, aplicando-se a seguir um choque térmico de 5 minutos a 42 °C.

Cerca de 100 ul de células foram plaqueadas em meio YEPD + nistatina (60 ug/ml) e selecionados após 2 ou 3 dias de crescimento a 30 °C.

Em ambos os métodos para transformação de *S. cerevisiae* o controle negativo foi feito com as células competentes e água.

3.11.2 em E. coli DH alfa 5

A transformação de *E. coli* foi necessária para amplificar o número de cópias dos plasmídios recombinantes. Foi possível assim avaliar e caracterizar os mesmos.

Preparo de células competentes

Células da linhagem de *E. coli* DH alfa 5 foram crescidas sob agitação em 5 ml de LB (item 3.3.2) durante 18 horas a 37 °C, servindo de pré-inóculo. Para o preparo do inóculo, 500 ul da cultura foram cultivados em 50 ml de LB, sob agitação, durante 2.5 horas a 37 °C.

Após a centrifugação a 6000 rpm, durante 25 minutos a 4 °C, as células foram colocadas em gelo e ressuspendidas em 25 ml de tampão de transformação gelado (item 3.4.13). Durante 1 hora, as células foram mantidas no gelo e então, centrifugadas novamente. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado ressuspendido em média de 3 ml de tampão de transformação gelado.

Transformação das células competentes

100 μ l de células competentes foram distribuídas em tubos Eppendorf e mantidas no gelo.

Adicionou-se então 10 μ l de DNA e incubou-se no gelo de 45-60 minutos, tomando-se o cuidado de agitar os tubos periodicamente.

Procedeu-se a um choque térmico de 2 minutos a 42 °C e em seguida, os tubos foram colocados no gelo. Adicionou-se 900 μ l de meio LB e incubou-se por 30-45 minutos a 37 °C. As células foram plaqueadas em LB contendo 50 μ g/ml de ampicilina para que fosse feita a seleção.

Como controle negativo utilizou-se somente as células competentes e como controle positivo o plasmídeo YRp7.

3.12 Seleção direta dos transformantes

Os transformantes resistentes à nistatina foram selecionados após 2-3 dias de incubação a 30 °C em meio YEPD (ítem 3.3.1) acrescido de 60 μ g/ml de nistatina.

3.13 Digestão por enzimas de restrição

A metodologia descrita foi utilizada para construir o mapa de restrição dos plasmídios recombinantes.

Foram feitas hidrólises simples a fim de se identificar os diferentes sítios de restrição para caracterização do gene de resistência à nistatina.

Os plasmídios foram então, digeridos com as seguintes enzimas: *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *ClaI*, *PvuI*, *PvuII*, *PstI*, *KpnI*, *XbaI*, *SalI*. A incubação foi feita a 37 °C por 2-3 horas.

Os marcadores de peso molecular utilizados foram o fago lambda e o adenovírus AD5. Ambos digeridos com *HindIII*.

3.14 Determinação do grau de resistência dos clones

Os clones obtidos foram testados quanto as suas capacidades de crescerem em meio de YEPD com concentrações crescentes de nistatina.

Para isso, foram utilizadas como controle a linhagem sensível à nistatina e os clones obtidos.

As concentrações de nistatina variaram de 30 a 210 ug/ml.

3.15 Avaliação da estabilidade mitótica dos plasmídios

Para observar como os plasmídios se comportavam durante crescimento em meio sem pressão seletiva, as colônias dos clones transformados com os quatro diferentes plasmídios, foram isoladas e crescidas em 5 ml de meio seletivo (YEPD + 15 u/ml nistatina), até atingirem uma concentração de 5×10^3 células/ml (contadas em câmara de Neubauer).

Uma amostra de 200 ul foi inoculada em meio YEPD (item 3.2.1) e em YEPD + 15 ug/ml nistatina, incubando-se por 24 horas a 30 °C. Plaqueou-se em média 3 placas para cada plasmídio, uma vez que as amostras produziram aproximadamente 500 colônias por placa. Foram feitas réplicas e depois de 2 dias as colônias NYS^S e NYS^R foram contadas.

3.16 Avaliação da capacidade fermentativa dos transformantes

Avaliou-se a capacidade fermentativa das linhagens transformadas, tendo como controle as linhagens originais. Os ensaios de fermentação foram controlados com inóculos padronizados, conforme discriminados a seguir:

Preparo do inóculo

Um pré-inóculo foi preparado em tubos de ensaio contendo 5 ml do meio de multiplicação (item 3.3.1). A inoculação deu-se a partir de colônias isoladas e os tubos foram incubados sob agitação a 30 °C por 24 horas. Destes tubos, 1 ml da cultura foi inoculado em 10 ml do mesmo meio e incubados a 35 °C por 24 horas.

Fermentação

As fermentações realizaram-se em tubos de centrífuga de 15 ml, com tampas de papel alumínio autoclavadas contendo 10 ml do meio de YEPD de fermentação (controle) e tubos com meio de fermentação com concentrações de 5ug/ml e 10ug/ml de nistatina. O inóculo constituiu-se do total de células, conforme descrito anteriormente.

Os tubos foram então, incubados em estufa a 35 °C por 15 horas.

Análise por cromatografia gasosa

Com uma diluição de 1:100 do vinho analisou-se o teor alcóolico em cromatógrafo CG, modelo 37-D, com sistema de ionização de chamas e coluna PAC-2694. O cálculo do teor alcóolico foi realizado em integrador CG-100, com um padrão 10% de etanol (vol/vol).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento do gene de resistência dominante à nistatina, em *S. cerevisiae*, é resultado de experimentos anteriores desenvolvidos no laboratório de Genética de Leveduras, da ESALQ/USP. Até então, não havia sido isolado genes de resistência dominante à nistatina. O trabalho anterior incluiu o isolamento de mutantes usando ácido nitroso como mutagênico.

A resistência monogênica dominante foi confirmada pela análise de tétrades, o que despertou o interesse na utilização deste gene como marcador seletivo, pela crescente necessidade em se encontrar genes dominantes eficientes para uma seleção rápida e direta dos transformantes. O sucesso dos processos de transformação dependem principalmente do desenvolvimento de métodos seletivos eficientes e para isto concentrações adequadas do agente seletivo precisam estar bem estabelecidas. Os resultados experimentais mostraram que a maioria das linhagens é resistente a concentração de 60 ug/ml, enquanto que para a linhagem sensível #93, utilizada como receptora do DNA exógeno, uma concentração de 20 ug/ml foi suficiente para inibir completamente o crescimento em meio sólido.

Diferença de comportamento foi observada quando as linhagens foram crescidas em meio líquido, onde uma concentração de 15 ug/ml de nistatina foi necessária para inibir o crescimento. Os resultados se justificam porque em meio líquido e sob agitação, há uma maior dispersão do antibiótico, que apresenta problemas de solubilidade e, a superfície de contacto, entre os componentes do meio e a membrana celular é maior, aumentando assim a toxidez da nistatina.

4.1 Clonagem do gene de resistência à nistatina

A clonagem do gene não requereu a construção de banco genômico em *E. coli*, partindo-se para a clonagem tipo "Shotgun", onde está envolvida a clonagem de fragmentos ao acaso. Por ser um gene de resistência dominante, a nistatina possibilita a seleção direta dos clones, sem a necessidade

de uma seleção para marcas auxotróficas, o que torna o processo de transformação lento e dispendioso.

A transformação de *S. cerevisiae* # 93 (item 3.11.1.1) resultou em 21 clones, selecionados diretamente em placas de YEPD acrescido de 60 ug/ml de nistatina. A baixa eficiência de transformação obtida (1.5 transformantes / ug DNA), não foi considerada de relevante importância, uma vez que em se tratando de um marcador dominante, a obtenção de um único clone seria suficiente para a continuação dos experimentos. Enquanto alguns autores, (DAS et alii, 1984; KUNZE et alii, 1989), acreditam que a baixa eficiência de transformação é devida ao marcador seletivo utilizado, existem outros que defendem a possibilidade de que o método empregado no processo de transformação tem um papel fundamental (CONSTANZO & FOX 1988). Por isso, como forma comparativa, a transformação foi também realizada pelo método descrito no item 3.11.1.2. Como mostra a Tabela 1, o número de transformantes aumentou cerca de duas vezes. Estes resultados que incluem a utilização de métodos com incubação das células com PEG, reforçam as hipóteses de BRZOBOHATY & KOVAC (1986), de que o PEG é essencial para a transformação com DNA plasmidial, apesar dos mecanismos envolvidos não serem ainda entendidos. Mesmo assim, a eficiência de transformação continua baixa e isto pode ser devido ao emprego de processos de transformação, onde estão envolvidas células intactas ao invés de protoplastos. Segundo BRUSCHI & HOWE (1985), a parede celular tem uma influência muito grande na competência da célula para introdução de DNA, sendo que a eficiência de transformação com células esferoplastizadas é muito maior (BEGGS, 1978). Outros métodos de transformação (HINNEN et alii, 1978 & BEGGS, 1979) foram evitados, porque de acordo com alguns autores (IIMURA et alii, 1983, BRZOBOHATY & KOVAC, 1985) são métodos dispendiosos, que facilitam o aparecimento de poliploidias e fusões celulares, o que não é interessante quando se trabalha com linhagens de interesse comercial.

De qualquer forma, parece que tanto o marcador seletivo quanto as condições da cultura de células a serem transformadas e os métodos empregados, auxiliam na eficiência de transformação. Mas os marcadores dominantes, segundo KUNZE et alii (1989) ainda estão longe de alcançarem a eficiência dos marcadores auxotróficos.

Tabela 1. Eficiência de transformação da linhagem **S. cerevisiae**#93, usando o método de CaCl_2 (IIMURA et alii, 1983) e PEG(ITO et alii, 1983).

Linhagem	Método	Transformantes/15 ug de DNA
S. cerevisiae #93	CaCl_2	21
	PEG	48

Com esses resultados, em todas as transformações seguintes, utilizou-se o método descrito por ITO et alii (1983).

Na extração de DNA, os clones não foram postos inicialmente para crescer em meio contendo somente YEPD, apesar de alguns autores considerarem importante para a revitalização dos mesmos, evitando assim um estresse por parte das células (WEBSTER & DICKSON, 1983). Isto porque, transformação e seleção constituem-se num processo fisiológico e bioquímico extremamente desgastante para as células, capaz de reduzir principalmente a taxa de crescimento. Mesmo assim, os clones apresentaram um bom crescimento o que possibilitou a extração de DNA.

Como mostra a Figura 2, não foi possível visualizar os plasmídios inseridos no genoma da levedura através da transformação. Isto porque, plasmídios como o YRp7, contêm um pequeno número de cópias/célula. De acordo com ZAKIAN & KUPFER (1982), este número situa-se em torno de 10 cópias/células, devido ser sua sequência de replicação autônoma, um ARS de origem cromossomal que tem sua replicação sob controle do DNA cromossomal. Uma alternativa, para isolar e caracterizar tais plasmídios, foi uma transformação em *E. coli* com DNA total de leveduras, que por possuir um ciclo celular curto (aproximadamente 20 minutos), obtém-se um maior número de divisões celulares durante a fase exponencial de crescimento, possibilitando a amplificação do número de cópias. Deste modo, o DNA isolado dos 21 clones obtidos, foi utilizado na transformação (item 3.11.2) e os resultados mostraram que nem todos os DNAs foram capazes de transformar *E. coli*. Os 28 clones obtidos com a transformação foram provenientes de cerca de 10 clones de leveduras. Isto pode ser devido a uma possível integração do gene ao DNA cromossomal, passando a se replicar como parte do mesmo, ou então, por uma eventual perda da origem de replicação do pBR322, impossibilitando assim a sua replicação em *E. coli* (ORR- WEAVER et alii, 1983). A ocorrência de mutações espontâneas não foi considerada como uma possibilidade, porque a taxa seria muito alta.

Com a extração de DNA dos transformantes obtidos em *E. coli* DH alfa 5, evidenciou-se a presença de quatro diferentes plasmídios (Tabela 2). Estes plasmídios ao serem analisados em eletroforese de gel de agarose, mostraram que dois dentre os quatro apresentavam um peso molecular inferior

- *Figura 2. Eletroforese de DNA total dos clones de S. cerevisiae selecionados, resistentes à nistatina. 1 - 21 clones recombinantes, 22- S. cerevisiae #93, 23 - linhagem resistente M606, 24-lambda / HindIII.*

Tabela 2. Recuperação dos plasmídios depois de transformação em *E. coli* e estimativa do peso molecular.

Plasmídio	Número de transformantes	Peso molecular estimado (pb)
pNYS1	2	3000
pNYS2	16	6200
pNYS3	12	4500
pNYS4	1	17000

ao vetor YRp7, que possui 5.7 kb. Um deles era ligeiramente maior, enquanto que, um outro era muito maior (Figura 3).

O presente resultado, levou a uma nova transformação em *S. cerevisiae* #93 e uma subsequente transformação em *E. coli*, para certificar-se de uma transformação verdadeira. A transformação com o DNA plasmidial purificado, resultou em clones resistentes à nistatina e na transformação em *E. coli* foi possível, então, recuperar os mesmos plasmídios. Consequentemente, procedeu-se a uma análise mais detalhada dos DNAs referente aos seus sítios de restrição, padrões de bandas, etc em eletroforese em gel de agarose (item 3.5)

Ao contrário de alguns autores (LANG-HINRICHS et alii 1989, 1990), a integridade do vetor plasmidial não foi verificada. Ocorreram alterações na molécula e a hipótese para se explicar tais resultados seria a ocorrência de deleções e/ou rearranjos no vetor durante o processo de transformação. Resultados semelhantes foram obtidos por CLANCY et alii (1984), que ao transformarem *S. cerevisiae* pelo método de acetato de lítio (ITO et alii, 1983), observaram que os plasmídios YRp7 e YRp19 sofreram alterações de 1 a 5 kilobases, geralmente em sítios não selecionáveis e as frequências observadas foram bem maiores do que seriam se fossem relacionadas à ocorrência de mutações espontâneas.

Os mecanismos envolvidos são desconhecidos, mas sugere-se que a linearização dos plasmídios estimula a frequência com que eles sofrem deleções ou outras alterações (ORR- WEAVER et alii, 1983).

O mesmo fenômeno tem sido observado com frequência em processos de transfecção em células de mamíferos (CALOS et alii, 1983), onde além de deleções, evidenciou-se mutações de ponto e menos frequentemente duplicações e inversões. Apesar de ainda não terem sido evidenciados em leveduras, provavelmente tais alterações ocorram.

Com estes resultados, viu-se a necessidade de tentar caracterizar tais alterações e por isso os DNAs dos plasmídios foram submetidos a uma análise detalhada de seus sítios de restrição.

4.2 Sítios de restrição dos plasmídios

- *Figura 3. A. Padrão eletroforético dos quatro diferentes plasmídios recuperados após transformação em E.coli com DNA total dos clones recombinantes de leveduras .*

Os sítios de restrição dos plasmídios, embora obtidos com várias enzimas, não permitiram fazer uma localização do gene *NIS^r* e, nem tão pouco, construir seus mapas de restrição. Para isto, serão necessárias digestões duplas e /ou triplas visando uma melhor caracterização dos clones, principalmente pela dificuldade em analisar os resultados devido à ocorrência de alterações na molécula do DNA plasmidial.

Com a análise dos sítios constatou-se que houve, realmente, alterações nos padrões de restrição dos plasmídios e, que dentre os quatro, três foram alterados, inclusive aquele que apresentava um peso molecular ligeiramente maior que o vetor. Em seguida serão discutidos os resultados concernentes às análises dos plasmídios individualmente pois, apesar de três terem sofrido alterações, estas foram de intensidade diferentes, acarretando a cada um problemas únicos.

O plasmídio pNYS2 (Figura 4), apresenta um peso molecular de aproximadamente 6.2 kb. Mas apesar de se verificar uma diferença de 500 bp com relação ao YRp7, que tem 5.7 kb, este plasmídio sofreu alterações nos seus sítios. Não se sabe ao certo onde estas deleções ocorreram, mas provavelmente os sítios que possuem marcas selecionáveis não foram alterados. Sejam eles: a região *ori* de *E. coli*, o gene *Amp* e o *ARS* de levedura. Um possível sítio a ter sido alterado é aquele onde se localiza o do gene para *TRP1*, um gene de complementação auxotrófica, que não foi essencial no processo de seleção dos transformantes. Ao comparar os sítios de restrição do pNYS2 com os do YRp7, observou-se alterações no tamanho dos fragmentos de *HindIII* e *PstI*. Sítios estes presentes no gene do *TRP1*.

A complementação auxotrófica para o gene do *TRP1* foi avaliada. Inicialmente, por se tratar de linhagens prototróficas, não foi possível verificar, realmente, se houveram mudanças na linhagem transformada. E, quando a linhagem STX 145-15D, uma linhagem auxotrófica para o gene *TRP1*, foi utilizada nos processos de transformação, não houve transformantes. Este resultado pode ser devido, tanto à hipótese da deleção do gene do *TRP1* não complementando a mutação na linhagem, quanto pelas características genéticas da própria linhagem, que dificultam a entrada de DNA exógeno (BRUSCHI et alii, 1987).

• *Figura 4. A. Perfil eletroforético do pNYS2 após digestão por enzimas de restrição B. Mapa de alguns sítios de restrição .*

C. As enzimas utilizadas, os fragmentos obtidos e o peso molecular estimado

Enzimas de restrição	Fragmentos obtidos	Peso molecular estimado (bp)
<i>EcoRI</i>	3600 + 2550	6150
<i>HindIII</i>	6200	6200
<i>BamHI</i>	4150 + 1950	6200
<i>XbaI</i>	6200	6200
<i>PvuI</i>	5800 + 600	6200
<i>PvuII</i>	3950 + 2200	6150
<i>Sal I</i>	6200	6200
<i>PstI</i>	3400 + 2800	6200
<i>ClaI</i>	6200	6200
<i>KpnI</i>	6200	6200
Tamanho médio		6185

O sítio de *Bam*HI, utilizado para linearizar o plasmídeo também foi alterado, originando agora dois fragmentos, ao invés de apenas um com 5.7 kb. Os fragmentos originados contêm cerca de 4.2 e 1.8 Kb, provavelmente devido à possibilidade da ocorrência de deleções durante o processo de linearização, uma vez que a linearização, segundo alguns autores, discutidos anteriormente, favorece a ocorrência de tais fenômenos.

O plasmídeo pNYS3 (Figura 5) e pNYS1 mostraram alterações em todos os sítios de restrição. O plasmídeo pNYS3 apresentou três enzimas (*Eco*RI, *Cla*I e *Pvu*I), nas quais a soma dos seus fragmentos não coincidem com a soma dos fragmentos das demais enzimas, que aparentam não ter os sítios de restrição ou então, que as enzimas não clivaram o plasmídeo. Haveria a possibilidade de terem ocorrido metilações, mas a hipótese foi descartada por ser a linhagem DH alfa 5, metilação negativa. Quanto ao plasmídeo pNYS1 (dados não mostrados), este não apresentou sítios de restrição para nenhuma das enzimas utilizadas. Desta forma não houve como explicar os resultados. Se o plasmídeo houve sido isolado em *Saccharomyces*, o isolamento de um fragmento contendo somente o ARS e o gene *NYS^r* existiria, mas por terem sido isolados após amplificação em *E. coli*, esta hipótese foi descartada.

O plasmídeo pNYS4 (Figura 6), foi o único que não sofreu alterações nos seus sítios de restrição. Apresenta todos os sítios intactos e possui um peso molecular de aproximadamente 17 kb.

Apesar de não ter nenhum de seus sítios deletados, por digestões simples não foi possível determinar a posição do gene no plasmídeo. Apenas um sítio de restrição, o da enzima *Pvu*I, foi localizado; uma vez que além de apresentar fragmentos com digestão total, apresentou digestão parcial, possibilitando deste modo, pela soma de fragmentos, encontrar a sequência de seus fragmentos no vetor. Entretanto, pode se dizer que o gene de resistência à nistatina encontra-se no fragmento de aproximadamente 11 kb.

Para localizar os outros sítios de restrição, serão necessárias digestões parciais e/ou duplas e triplas, o que também propiciará localizar a posição do gene no plasmídeo. Este plasmídeo apesar do seu elevado peso molecular, deverá ser melhor caracterizado, pois a ausência de alterações estruturais facilita o seu emprego em processos de transformação. Isto porque, provavelmente, problemas como a alta instabilidade segregacional poderão ser

B

Enzimas de restrição	Fragmentos obtidos	Peso molecular estimado(bp)
<i>EcoRI</i>	3500 + 1900	5400
<i>BamHI</i>	3300	3300
<i>XbaI</i>	3300	3300
<i>PvuI</i>	3300	3300
<i>PvuII</i>	2200 + 1800 + 1300	5300
<i>Sal I</i>	3300	3300
<i>PstI</i>	3300	3300
<i>ClaI</i>	3900 + 1900 + 700	5500
<i>KpnI</i>	3300	3300
<i>HindIII</i>	3300	3300
Tamanho médio		3950

• Figura 5. A. Perfil eletroforético do pNYS3 B. As enzimas utilizadas, os fragmentos obtidos e o peso molecular estimado

B

• Figura 6. A. Perfil eletroforético do *pNYS4* após digestão por enzimas de restrição B. Mapa de alguns sítios de restrição

C. As enzimas utilizadas, os fragmentos obtidos e o peso molecular estimado

Enzimas de restrição	Fragmentos obtidos	Peso molecular estimado(bp)
<i>EcoRI</i>	4900 + 4500 + 2800 + 200 + 1100 + 1000 + + 600	16900
<i>BamIII</i>	5800 + 10500	16400
<i>XbaI</i>	16900	16900
<i>PvuI</i>	11300 + 3300 + 1800 + 758	17158
<i>PvuII</i>	3300 + 2900 + 1700 + 1000 + 700 + 600 + 500 + 440 + 350	15850
<i>Sal I</i>	10000 + 6800	16800
<i>PstI</i>	15900 + 900	16800
<i>ClaI</i>	16900	16900
<i>KpnI</i>	14000 1700	16700
<i>HindIII</i>	7900 + 5800 + 3400 + 600	16900
Tamanho médio		16720

minimizados. Com relação ao elevado peso molecular, uma vez localizado o gene poderão ser efetuadas deleções de partes não essenciais. Além do que a sua subclonagem num vetor que favoreça a eficiência de transformação e expressão gênica deverão melhorar o seu comportamento.

4.3 Influência da concentração de DNA plasmidial na transformação

Existem vários fatores que podem alterar a eficiência de transformação dos plasmídios recombinantes. Um deles, é a concentração de DNA, bastante estudada e que sempre apresenta resultados contrastantes.

Para verificar os seus efeitos na eficiência de transformação, os quatro plasmídios foram ensaiados e mostraram que a eficiência de transformação é alterada conforme se aumenta a concentração de DNA. Não sendo, portanto, um fator comum para todos os plasmídios.

De acordo com a Tabela 3 e a Figura 7, para os plasmídios pNYS 1 e pNYS3, a concentração de DNA não interferiu nas suas eficiências de transformação. Enquanto que para os plasmídios pNYS2 e pNYS4 o número de colônias aumentou linearmente com a concentração de DNA, mas somente até a concentração de 10 ug. Com a concentração de 15 ug, não houve qualquer aumento. Inclusive verificou-se uma queda no número de transformantes.

Estes resultados, não coincidem com os obtidos por ITO et alii (1983) & IIMURA et alii (1983), que verificaram que a eficiência de transformação aumentou com a concentração de DNA. Mas estão de acordo com os resultados de KLEBE et alii (1983), que reportaram um aumento no número de transformantes até uma determinada concentração de DNA, mas quando concentrações muito altas foram aplicadas estes números diminuídos drasticamente.

O problema da eficiência de transformação envolve diversos fatores, tanto de ordem fisiológica quanto genética e bioquímica. Para explicar tais resultados, a idade da população, a fase do ciclo celular e a rigidez da parede celular, não seriam os determinantes das diferenças encontradas entre os plasmídios, por se tratar de uma única linhagem que foi transformada e que se submeteu às mesmas condições de tratamento. De acordo com MEILHOC et

Tabela 3. Transformação de *S. cerevisiae* #93 com os quatro diferentes plasmídios considerando a concentração de DNA.

Concentração (DNA/ug)	Nº de colônias transformadas			
	Plasmídios			
	pNYS1	pNYS2	pNYS3	pNYS4
0	0	0	0	0
1	2	5	1	4
5	3	10	2	17
10	3	15	2	22
15	2	8	2	14
Total	10	38	7	56

• *Figura 7. Influência da concentração de DNA plasmidial na transformação da linhagem de S. cerevisiae #93*
• a. pNYS4 b. pNYS2 c. pNYS3 d. pNYS1

alii (1990), existe dentro de uma população celular, uma sub-população a qual é capaz de se tornar competente para a transformação. Por isso é que, nem sempre, aumentando-se a concentração de DNA tem-se um maior número de colônias.

Paralelamente aos estudos da influência da concentração de DNA na transformação, foi possível observar, que os plasmídios diferem acen-tuadamente nas suas capacidades de transformarem *S. cerevisiae* #93. A menor transformabilidade foi exibida pelos plasmídios pNYS1, seguida pelo pNYS3, pNYS2 e pNYS4, respectivamente. Estas diferenças podem estar relacionadas à integridade estrutural dos mesmos, uma vez que são coincidente com os resultados referentes às possíveis alterações estruturais que eles sofreram durante o processo de transformação.

Uma outra hipótese seria que apesar das células terem sido transformadas, as modificações sofridas pelos plasmídios, dificultaram a expressão do gene pois nem sempre uma célula transformada é capaz de expressar o gene correspondente.

4.4 Transformação de outras linhagens de *S. cerevisiae*

Com a finalidade de avaliar a transformabilidade do plasmídio pNYS4, o único que não apresentou alterações nos seus sítios de restrição, linhagens sensíveis à nistatina e de importância industrial foram transformadas, considerando a hipótese de JOHNSTON et alii (1981), de que existe uma singularidade entre linhagens, na capacidade que têm de receber e expressar um DNA exógeno.

Apesar de algumas linhagens apresentarem marcadores auxotróficos, os transformantes foram selecionados usando somente nistatina como marcador seletivo.

Como já fora discutido, fatores fisiológicos e ambientais inter-ferem na eficiência que certas linhagens têm de receberem DNA exógeno e serem geneticamente transformadas. Segundo NAVAS et alii (1991), a habilidade que uma linhagem possui de ser transformada depende, prin-cipalmente de seu genótipo que é capaz, inclusive, de interferir no sucesso de

um marcador seletivo, pois a resposta de uma linhagem a um determinado marcador é linhagem-específica e deve, portanto, ser resolvido de maneira singular.

Como mostra a Tabela 4, evidenciou-se uma acentuada diferença na transformação das linhagens. O menor nível de transformabilidade foi obtido com a linhagem Fleischmann. Embora houvera linhagens que não transformaram, como a STX 145 - 15D e a MXV, houve aquelas que apresentaram níveis intermediários, como a M300 A, a #1, #33 e a própria #93. Mas nenhum deles alcançou o nível de transformabilidade da linhagem ATCC 26603. Este resultados coincidem com os discutidos por BRUSCHI et alii (1987), que encontraram tanto linhagens que alcançam alto número de transformantes quanto aquelas que não transformam.

4.5 O grau de resistência dos clones

Devido a importância da otimização dos processos de seleção direta dos clones e a fim de verificar a forma com que o gene de resistência à nistatina, presente nos plasmídios isolados é expressado, avaliou-se o nível de resistência dos clones, sendo que, segundo LANG-HINRICHS et alii (1989), os níveis de resistência podem estar relacionados ao número de cópias do vetor, presente na célula e/ou a forma pela qual este gene vem sendo expressado.

Como mostra a Figura 8 e Tabela 5, a linhagem #93, não transformada e utilizada como controle nos experimentos, teve seu crescimento interrompido numa concentração de 30 ug/ml. No que se refere aos plasmídios, estes, novamente, apresentaram resultados particulares. O menor plasmídio (pNYS1) e, provavelmente, o que sofreu alterações mais acentuadas, foi capaz de crescer satisfatoriamente até uma concentração de 60 ug/ml, havendo uma redução acentuada do crescimento nas concentrações de 90 e 120 ug/ml. Os transformantes do plasmídio pNYS3 foram resistentes a até 120 ug/ml. Enquanto que os plasmídios pNYS2 e pNYS4 foram capazes de resistir a uma concentração de 210 ug/ml.

A diferença observada nos níveis de resistência, apresentado pelos plasmídios, provavelmente é decorrente das alterações por eles sofridas.

Tabela 4. Transformação de outras linhagens de *S. cerevisiae* usando 10 ug de DNA do plasmídio pNYS4

Linhagem	Número de clones
<i>S. cerevisiae</i> #93	12
<i>S. cerevisiae</i> #1	14
<i>S. cerevisiae</i> #33	49
<i>S. cerevisiae</i> ATCC26603	92
<i>S. cerevisiae</i> MXV	0
<i>S. cerevisiae</i> STX145-15D	0
<i>S. cerevisiae</i> Fleischmann	8
<i>S. cerevisiae</i> M 300 A	6

- *Figura 8. Crescimento das linhagens transformadas em meio completo YEPD contendo de 30 a 210 µg/ml de nistatina.*
- *a.YEPD b.YEPD + 30µg/ml c.YEPD + 60µg/ml*
- *d. YEPD + 90 µg/ml e. YEPD + 120 µg/ml*
- *f. YEPD + 150 µg/ml g. YEPD + 180µg/ml*
- *h. YEPD + 210 µg/ml*
- *1. Controle S. cerevisiae #93 2. pNYS1 3. pNYS2*
- *4. pNYS3 5. pNYS4*

Tabela 5. Grau de resistência dos clones à nistatina

Plasmídio	Nistatina (ug/ml)							
	0	30	60	90	120	150	180	210
pNYS1	+	+	+	+	+	-	-	-
pNYS2	+	+	+	+	+	+	+	+
pNYS3	+	+	+	+	+	-	-	-
pNYS4	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle	+	+	-	-	-	-	-	-

Os menores plasmídios, (pNYS1 e pNYS3), que provavelmente apresentam alterações mais drásticas, têm a expressão do gene dificultada, ou então, as suas instabilidades estruturais influenciam até na replicação sincronizada dos mesmos. Já os plasmídios pNYS2 e pNYS4, conseguem crescer até concentrações mais altas. O pNYS2, apesar de ter sofrido alterações na sua estrutura, estas provavelmente foram menos acentuadas e não interferiram na expressão do gene. Enquanto que o pNYS4, sem quaisquer alterações, tem uma replicação sincronizada, permitindo assim que os plasmídios estejam presentes em seus números de cópias correspondentes, facilitando a expressão dos genes.

4.6 A instabilidade mitótica dos plasmídios

Quando se trabalha com linhagens industriais, avaliar a capacidade que os plasmídios têm de crescer em meio sem pressão seletiva, é um fator importante a ser considerado. Segundo SAKAI & YAMAMOTO (1986), encontrar plasmídios com alta estabilidade na ausência de pressão seletiva e com alto número de cópias é muito importante pois, em processos industriais, a utilização de mecanismos seletivos aumentam o custo. Por isso, os clones ao serem crescidos em meio sem pressão seletiva, mostraram que alguns fatores fisiológicos, provavelmente, interferiram na estabilidade dos plasmídios.

Para os plasmídios pNYS é esperado que repliquem de forma autônoma nas células, devido a presença de seus ARS e, conseqüentemente, apresentem problemas referentes à sua estabilidade, uma vez que eles são facilmente perdidos durante a replicação celular. De acordo com SREEKRISHNA et alii (1987), é pela estabilidade dos plasmídios que se avalia a utilidade de uma levedura recombinante.

Os resultados mostraram que para alguns dos plasmídios (pNYS1 e pNYS3), o crescimento em meio não seletivo influenciou, acentuadamente na estabilidade, fazendo com que perdessem 100% dos plasmídios após 20 gerações.

O plasmídio pNYS2, teve um melhor comportamento e apresenta após uma média de 100 gerações, uma estabilidade de 67%. Se os plasmídios em questão fossem originários do plasmídio 2 um, a instabilidade

verificada, provavelmente, seria resultado de fatores genéticos e fisiológicos, que segundo WALMSLEY et alii (1983), até a presença do plasmídio 2 um nativo é capaz de interferir na estabilidade por competir com os plasmídios quiméricos. Apesar da alta instabilidade poder ter origem nas alterações sofridas pelos plasmídios, elas são perfeitamente compatíveis com a estabilidade verificada em experimentos com plasmídios contendo elementos ARS (MURRAY & SZOSTAK, 1983).

O plasmídio pNYS4, tem o maior peso molecular e apresentou os melhores resultados quando avaliou-se a estabilidade mitótica, embora esperava-se que o tamanho dos plasmídios fosse um dos fatores que interfeririam na estabilidade. Plasmídios menores, geralmente, são os mais estáveis, mas acredita-se que estes resultados sejam decorrentes das já discutidas alterações ocorridas, pois apesar de serem pequenos tiveram sítios deletados, fazendo com que houvesse uma interferência, inclusive, na replicação.

A estabilidade do pNYS4 (96%) é comparada à estabilidade de plasmídios que foram integrados aos cromossomos. Mas esta hipótese foi descartada por terem sido isolados através da transformação em *E.coli*, confirmando assim sua replicação autônoma. Esta estabilidade talvez seja resultado de um maior número de cópias do vetor, que de acordo com ZAKIAN & KUPFER (1982), apesar de geralmente estarem presentes em cerca de 10 cópias/célula podem ser encontrados em multiplicidade de cópias (70 a 100 cópias/célula). A amplificação dos plasmídios pode ser uma possibilidade da ocorrência do fenômeno, mas sugere-se que o possível maior número de cópias é resultado de uma distribuição assimétrica entre células mãe e filha, nas divisões celulares. Desta forma, haveria uma compensação da perda progressiva dos plasmídios durante as divisões mitóticas.

4.7 A capacidade fermentativa dos transformantes

A hipótese de que a nistatina atua nas células por alterar a composição da membrana celular e, principalmente, os lipídios, levou a uma análise da capacidade que os clones transformantes têm de produzir etanol através da fermentação.

Foi possível observar, como mostra a Tabela 6, que ao contrário das linhagens-controle não transformadas, os clones não foram capazes de apresentar percentagens de etanol equivalentes. A diferença nas suas capacidades fermentativas foi bastante acentuada, mesmo quando a fermentação ocorreu na ausência do agente seletivo.

A hipótese de KUNZE et alii (1989) de que transferência de genes através da transformação é importante por serem capazes de transferir genes individuais, sem alterar o restante do fenótipo, não foi observada com relação ao gene NYS^r , onde a capacidade fermentativa das linhagens foi totalmente alterada.

Com relação ao gene de resistência clonado num vetor bifuncional, será imprescindível entender quais, realmente, são os efeitos que se desencadeiam numa célula quando transformada. Isto porque, se o interesse neste gene for a seleção direta, por exemplo, de transformantes para expressão de genes heterólogos, não será interessante que as linhagens hospedeiras sofressem alterações fisiológicas ou morfológicas, pois muitas vezes são os caracteres próprios das linhagens que têm importância para o sucesso do programa. Apesar de ainda não estar inteiramente confirmado parece que a nistatina, realmente, desorganiza a composição lipídica da membrana, atuando principalmente sobre os fosfolipídios e esteróis. No entanto, os resultados obtidos referentes especificamente à produção de etanol, estão de acordo com COPPELLA & DHAURJATI (1989), que observaram que as linhagens recombinantes tiveram uma capacidade respiratória reduzida devido à competição entre o metabolismo do plasmídeo e o do hospedeiro para a energia disponível, acarretando a produção de uma menor taxa de etanol que nas células sem plasmídeo. Provavelmente, estes resultados sejam também decorrentes dos efeitos da transformação nas células e não, unicamente, do efeito da nistatina. Isto porque a linhagem M606, utilizada como doadora do gene NYS^r , não sofreu decréscimo na sua capacidade fermentativa, quando a nistatina está presente no meio. Embora estas linhagens, originadas de processos mutagênicos, tenham passado por vários retrocruzamentos até que se restaurasse sua capacidade fermentativa; sugerindo a existência de vários genes envolvidos, os quais não foram transferidos ao mesmo tempo que o gene NYS^r , durante a transformação.

Tabela 6. Capacidade fermentativa dos transformantes (mg EtOH/l)

Linhagem	Nistatina (ug/ ml)		
	0	5	10
S. cerevisiae M300A	7.19	0.587	0.498
S. cerevisiae M300A t	0.344	0.310	0.266
S. cerevisiae Fleischmann	7.96	0.522	0.490
S. cerevisiae Fleischmann t	0.344	0.285	0.260
S. cerevisiae ATCC	6.77	0.604	0.558
S. cerevisiae ATCC t	0.478	0.300	0.293

5. CONCLUSÕES

O estudo da utilização do gene de resistência à nistatina (*NYS^r*) como marcador seletivo, permitiu extrair as seguintes conclusões:

1. Leveduras recombinantes contendo plasmídios *pNYS* podem ser selecionadas diretamente em meio contendo nistatina, sem a necessidade de se utilizar marcadores auxotróficos.

A eficiência de transformação é influenciada pela concentração de DNA plasmidial e por fatores genéticos e fisiológicos pois, existem diferenças, inclusive, entre linhagens de *S. cerevisiae*.

2. A estabilidade, o grau de resistência dos clones e a eficiência de transformação, influenciadas pelas características de cada plasmídio, são decorrentes das alterações estruturais sofridas, durante o processo de transformação. Estas alterações, provavelmente, se tratam de deleções e/ ou rearranjos.

O maior grau de resistência dos clones quando comparados à linhagem doadora do gene *NYS^r* é decorrente, provavelmente, de um maior número de cópias do vetor ou da sua melhor expressão.

3. A ocorrência de uma alta instabilidade mitótica observada nos plasmídios é devido à assincronia segregacional, característica dos vetores que contêm seqüências *ARS*, que possibilitam a replicação autônoma dos mesmos. Além disso, pode-se dizer que nos plasmídios menores (*pNYS1* e *pNYS3*), a assincronia foi mais acentuada devido terem tido seus sítios de restrição alterados, durante o processo de transformação. Os plasmídios maiores, *pNYS2* e *pNYS4*, melhor se comportaram e por isso, deverão ser realizados outros estudos para que, ao se isolar o gene *NYS^r*, este possa ser sequenciado, subclonado e, então, possam ser construídos vetores que incluam

este gene como um marcador seletivo de relevante importância. Por conseguinte, a ação e os efeitos do gene *NYS^r* nas células de leveduras devem ser melhor compreendidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A.; WADA, T.; HANDA, H.; NOGI, Y. ; FUKASAWA, T. Efficient usage of a galactose-inducible expression vector for the production of heterologous protein in yeast. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 2035-41, 1988.
- BEGGS, J.D. Transformation of yeast by a replicant hybrid plasmid. *Nature* **275**: 104-9, 1978.
- BIANCHI, M.M.; FALCONE, C.; CHEN, X.J.; FUKUHARA, A.H. Transformation of the yeast *K. lactis* by new vectors derived from the 1.6 um circular plasmid pKD1. *Curr. Genet.* **12**: 185-92, 1987.
- BOEKE, J.D.; LACROUTE, F. ; FINK, G.R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5-phosphate decarboxylate activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 345-7, 1984.
- BRUSCHI, C.H. & HOWE, G.A. Involvement of the wall-membrane complex in DNA transformation. *J. Cell Bioch.* **1519**: 150, 1985.
- BRUSCHI, C.V.; COMER, A.R.; HOWE, G.A. Specificity of DNA uptake during whole cell transformation of *S. cerevisiae*. *Yeast* **3**: 131-7, 1987.
- BRZOBOHATY, B. & KOVAC, L. Interaction of plasmid DNA with yeast protoplasts and a mechanism of genetic transformation. *FEBS* **83** : 211-4, 1985.
- BRZOBOHATY, B. & KOVAC, L. Factors enhancing genetic transformation of intact yeast cells modify cell wall porosity. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3089-93; 1986.
- BUJEGA, V.C.; KLEINMAN, J; STAMBURY, P.F. ; GINGOLD, E.B. The segregation of the 2u-based yeast plasmid pJDB248 breaks down under conditions of slow glucose-limited growth. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2891-7, 1989.
- BURKE, D.J.; CARLE, G.F.; OLSON, M.V. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**: 806-12, 1987.

- CALOS, M.P. Mutation of autonomously replicating plasmids. *In*: KUCHELAPATI, R. *Gene transfer*. New York/ Plenum Press, 1986, cap 9 p. 243-61.
- CALVIN, M.N. & HANAWALT, P.C. High efficiency transformation of bacteria by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**: 2796-801, 1988.
- CANNON, R.D.; JENKINSON, H.F. ; SHEPHERD, M.G. Isolation and nucleotide sequence of an autonomously replicating sequence (ARS) element functional in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 210-8, 1990.
- CARTY, C.E; HOFMANN, K.J.; KELLER, P.M.; POLOKOFF, M.A.; LYNCH, R.J.; KEECH, B.J. ; SCHULTZ, L.D. Regulated production of recombinant echistatin by yeast. *Biotechnol. Letts.* **12** : 79-84, 1990.
- CASEY, G.P.; XUAO, 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 methyl. *J. Inst. Brew.* **94**: 93-7, 1988.
- CAULCOTT, C.A. Competition between plasmid-positive and plasmid-negative cells. *Biochem. Soc. Trans.* **12**: 1140-2, 1984.
- CAUNT, P.; IMPOOLSUP, A. ; GREENFIELD, P.F. A method for the stabilisation of recombinant plasmids in yeast. *J. Biotechnol.* **14**: 311-20, 1990.
- CLANCY, S.; MANN, C.; DAVIS, R.W ; CALOS, M.P. Deletion of plasmid sequences during *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *J. Bacteriol.* **159**: 1065-7, 1984.
- CLARKE, L. & CARBON, J. Isolation of a yeast centromere and construction of a functional small circular chromosome. *Nature* **287**: 504-9, 1980.
- CONSTANZO, M.C. & FOX, T.D. Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics* **120**: 667-70, 1988.
- COPPELLA, S.J. & DHURJATI, P. A mathematical description of recombinant yeast. *Biotechnol Bioeng.* **35**: 357-74, 1989.
- CREGG, J.M.; BARRINGER, K.J.; HESSLER, A.Y.; MADDEN, R.J. *Picchia pastoris* as a host system for transformation. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3376-85, 1985.

- DAS, S.; KELLERMANN, E. ; HOLLENBERG, C.P. Transformation of *Kluyveromyces fragilis*. *J. Bacteriol.* 158: 1165-7, 1984.
- DROCOURT, D.; CALMELS, T.; REYNES, J.P.; BARON, M. ; TIRABY, G.; Cassetts of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* 18: 17926, 1990.
- ELLIOT, S. Eukaryotic expression vectors. *In*: RODRIGUES, R.L. & DENHARDT, D.T. (eds.) *Vectors : A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Butterworth, London, 1988, cap.1, p.66-88.
- FOGEL, S. & WELCH, J.W. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 5342- 6, 1982.
- FOGEL, S.; WELCH, J.W.; CATHALA, G. ; KARIN, M. Gene amplification in yeast: CUP1 copy number regulates copper resistance. *Curr. Genet.* 7: 347-55, 1983.
- FUTCHER, A.B. The 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 4: 27-40, 1988.
- FUTCHER, A.B. & COX, B.J. Copy number and the stability of 2-um circle-based artificial plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 157: 283-90, 1984.
- GAILLARDIN, C. & RIBET, A.M. LEU2 directed expression of beta-galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genet.* 11: 369-75, 1987.
- GATIGNOL, A.; BAROM, M.; TIRABY, G. Phleomycin resistance encoded by the *ble* gene from transposon Tn5 as a dominant selectable marker in *S. cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 207: 342-8, 1987.
- GATIGNOL, A.; DASSAN, M. ; TIRABY, G. Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* promoters using a probe vector based on phleomycin resistance. *Gene* 91: 35-41, 1990.
- GELLINSEN, G.; STRASSER, A.W.; MELBER, K.; KEUP, P. Die methlotrophe hefe *H. polymorpha* als expression system für heterologe proteine. *BioEng.* 5: 20-6, 1990.
- GENDRE, F. & GUERINEAU, M. Construction of an *E. coli*- yeast shuttle vector with a double positive selection in order to transform insdustrial strains of *S. cerevisiae*. *Yeast* 2: S127, 1986.

- GIBSON, W.C.; WHITE, T.C.; LAIRD, P.W. ; BORST, P. Stable introduction of exogenous DNA into *Trypanosoma brucei*. *EMBO. J.* 6: 2457-61, 1987.
- GOPAL, C.V.; BROAD, D.; LLOYD, D. Bioenergetic consequences of protein overexpression in *S. cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 2293-317, 1989.
- 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.* 25: 179-88, 1983.
- HADFIELD, C.; CASHMORE, A.M. ; MEACOCK, P.A. Sequence and expression characteristics of a shuttle chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Gene* 52: 59-70, 1987.
- HADFIELD, C.; JORDAN, B.E.; MOUNT, R.C.; PRETORIUS, G.H.J. ; BURAK, E. G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 18: 303-13, 1990.
- HARASHIMA, S.; TAKAGI, A. ; OSHIMA, Y. Transformation of protoplasted yeast cells is directly associated with cell fusion. *Mol. Cell. Biol.* 4: 771-8, 1984.
- HASHIMOTO, H.; MORIJAWA, H.; YAMATA, Y.; KIMURA, A. A novel method for transformation of intact cells by electroinjection of plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2: 336-9, 1985.
- HENDERSON, R.C.A.; COX, B.S. ; TUBB, R. The transformation of brewing yeasts with a plasmid containing the gene for copper resistance. *Curr. Genet.* 9: 133-8, 1985.
- HIETER, P.; PRIDMORE, D.; HEGEMANN, J.H.; THOMAS, M.; DAVIS, R.W.; PHILIPPSEN, P. Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA. *Cell* 42: 913-21, 1983.
- HINNEN, A.; HICKS, J.B. ; FINK, G.R. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 1929-33, 1978.
- HSIAO, C. L. & CARBON, J. Characterisation of a yeast replication origin (ars2) and construction of stable minichromosomes containing cloned yeast centromeres DNA (CEN 3). *Gene* 15: 157-66, 1981.
- HSU, W.H.; MAGEE, P.T.; MAGGE, B.B.; REDDY, C.A. Construction of a new yeast cloning vector containing autonomous replicating sequence from *Candida utilis*. *J. Bacteriol.* 154: 1033-3, 1983.

- HYMAN, B.C.; CRAMER, J.H. ; ROWND, R.H. Properties of *S. cerevisiae* mtDNA segment conferring high-frequency of yeast transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 1578-82, 1982.
- IIMURA, Y.; GOTOH, K.; OUCHI, K.; NISHIYA, T. Yeast transformation without spheroplasting process. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 897-901, 1983.
- IMPOOLSUP, A.; CAUNT, P.; GREENFIELD, P.F. Effect of growth rate on stability of a recombinant plasmid during continuous culture of *S. cerevisiae* in non-selective medium. *J. Biotechnol.* **10**: 171-80, 1989.
- ISOGAIT, T.; YOSHIDA, M. ; AOKI, H. Transformation of *Acremonium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* using an antibiotic resistance marker. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2321-9, 1987.
- ITO, H.; FUKUDA, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A. Transformation of intact cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-8, 1983.
- JANG, J.K.; PYUM, Y.R.; SHIN, P.K.; SEO, J. Analysis of cloned SUC2 gene expression in continuous culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 960-4, 1990.
- JIMENEZ, A. & DAVIS, J. Expression of a transposable antibiotic resistant element in *Saccharomyces*. *Nature*. **287**: 869-71, 1980.
- JOHNSTON, J.; HILGER, F.; MORTIMER, R. Variation in frequency of transformation by plasmid YRp7 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **16**: 325-9, 1981.
- KARUBE, I.; TAMIYA, E. MATSUOKA, H. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse. *FEBS Letts.* **18**: 290-1, 1985.
- KASTER, K.R.; BURGETT, S.G.; INGOLIA, T.D. Hygromycin B resistance as dominant selectable marker in yeast. *Curr. Genet.* **8**: 353-8, 1984.
- KINGSMAN, S.; KINGSMAN, A.J.; DOBSON, M.J. & ROBERTS, N.A. Heterologous gene expression in *S. cerevisiae*. In: RUSSEL, G.E. *Biotechnolgy and Genetic Engineering Reviews*. Intercept Press, Newcastle upon Tyne, 1985, vol 3, p. 377-416.
- KLEBE, R.J.; HARRISS, J.V.; SHARP, Z.D.; DOUGLAS, M.G. A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **29**: 335-41, 1983.

- KNOWLTON, R.G. Copy number and stability of yeast plasmids. *In*: REZNIKOFF, W. & GOLD, L. *Maximizing gene expression*. Butterworths, Boston, 1986, cap. 4, p. 171-95.
- KUNZE, G.; BODE, R.; RINTALA, H.; HOFEMEISTER, J. Heterologous gene expression of the glyphosate resistance marker and its application in yeast transformation. *Curr. Genet.* 15: 91-8, 1989.
- LANG-HINRICHS, C.; BERNDORFF, D.; SEEFELDT, C.; STAHL, U. G418 resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of the neomycin resistance genes from Tn5 and Tn903. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 388-94, 1989.
- LANG-HINRICHS, C.; DOSSERCK, C.; FATH, I.; STAHL, U. Use of the Tn903 neomycin-resistance gene for promoter analysis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* 18: 511-6, 1990.
- LIVINGSTON, D.M. Inheritance of 2 um DNA plasmid from *Saccharomyces*. *Genetics* 86: 73-84, 1977.
- MACREADIE, I.G. Yeast vectors for cloning and copper-inducible expression of foreign genes. *Nucleic Acid. Res.* 18: 1078, 1989.
- MACREADIE, I.G.; JAGADISH, M.N.; AZAD, A.A.; UANGHAN, P.R. Versatile cassetts designed for the copper inducible expression of protein in yeast. *Plasmid* 21: 147-50, 1989.
- MANIATIS, T.; FRITISCH, E.F. & SAMBROOK, J. (Eds). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Cold Spring Harbor, 1982, 545p.
- MARUNOUCHI, T.; MATSUMOTO, Y.; HOSOYA; OKABAYASHI, K. In addition to the ARS cone, the ARS box is necessary for autonomously replicating sequences. *Mol. Gen. Genet.* 206: 60-5, 1987.
- MATSUMOTO, T.; MURAKAMI, S.; NIWA, O. & YANAGIDA, M. Construction and characterization of centric circular and acentric linear chromosomes in fission yeast. *Curr. Genet.* 18: 323-30, 1990.
- MATSUZAKI, H.; ARAKI, H.; OSHIMA, Y. Gene conversion associated with site-specific recombination in yeast plasmid pSR1. *Mol. Cell. Biol.* 8: 955-62, 1988.
- MAZODIER, P.; COSSART, P.; GIRAUD, E.; GASSER, F. Completion of the nucleotide sequence of the central region of the TN5 confirms the presence of three resistance genes. *Nucleic Acid. Res.* 13 : 195-200, 1985.

- MEAD, D.J.; GARDNER, D.C.J.; OLIVER, S.G. The yeast 2 micron plasmid: strategies for the survival of a selfish DNA. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 417-21, 1986.
- MEILHOC, E; MASSON, J.M.; TEISSIE, J. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Bio/Tech* **8**: 223-7: 1990.
- MIZUKAMI, T.; YAGISAWA, M.; FURUYA, A. Improvement of the stability of recombinant plasmids carrying the threonine operon in an L-threonine hyperproducing strain of *E. coli* W. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1019-27, 1986.
- MORTIMER, R.K. & SCHILD, D. Genetic map of *S. cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **49**: 181-212, 1985.
- MURRAY, A.W. & SZOSTAK, J.W. Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell* **4**: 961-70, 1983.
- NAVAS, L.; ESTEBAN, M.; DELGADO, M.A. KAR-1 mediated transformation of brewing yeast. *J. Inst. Brew.* **97**: 115- 8, 1991.
- NEUMANN, E.; WANG, Y. & HOFSCHEIDER, P.H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**: 841-5, 1982.
- NISHIZAWA, M.; OZAWA, F.; HISHINUMA, F. Construction of yeast secretion vectors designed for production of mature proteins using the signal sequence of yeast invertase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 317-22, 1989.
- ORR- WEAVER, T.L.; SZOSTAK, J.W.; ROTHSTEIN, R.J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**: 6354- 8, 1981.
- OSHIMA, Y. Regulatory circuits for gene expression: The metabolism of galactose and phosphate. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and gene expression*, 1982, p. 1242-307.
- PEREZ, P.; TIRABY, G.; KALLERHOFF, J.; PERRET, J. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant. Mol. Biol.* **13**: 365-73, 1989.
- PORRO, D.; MARTEGANI, E.; RANZI, B.M.; ALBERGHINA, L. Heterologous gene expression in continuous cultures of budding yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 632-6, 1991.

- REISER, J.; GLUMOFF, U.; KALIN, M. & OCHSNER, U. Transfer and expression of heterologous genes in yeasts other than *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Bioch. Engin. Biotechnol.*, 1990, vol 43, p. 76-102.
- RIETVELD, K.; BAKHUIS, J.G.; JANSEN, N.J.; Van LEEN, R.W.; NOORDERMEER, A.C.M.; Van DOYEN, A.J.J.; SCHAAP, A.; Van den BERG, J.A. Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression. *14th Int. Conf. on Yeast Genet. and Molec. Biol.*, p.163, 1988.
- RIGGS, C.D. & BATES, G.W. Stable transformation of tobacco by electroporation: evidence for plasmid concatenation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 5602-6, 1986.
- RUDOLPH, H. & HINNEN, A. One step replacement in yeast by cotransformation. *Gene* **36**: 87-95, 1985.
- RUOHOLA, H.; LILJESTROM, P.L.; TORKKELI, T.; KOPU, H.; LEHTINEN, P.; KORHOLA, M. Expression and regulation of the yeast MEL1 gene. *FEMS Microbiol. Letts.* **34**: 179-85, 1986.
- SAKAI, K.; SAKAGUCHI, J.; YAMAMOTO, M. High-frequency cotransformation by copolymerization of plasmids in the fission yeast *Shizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 651-6, 1984.
- SAKAI, K. & YAMAMOTO, M. Transformation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using an antibiotic resistance marker. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1177-82, 1986.
- SAUER, B. Functional expression of the cre-lox site- specific recombination system in the *S. cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2087-96, 1987.
- SCHERER, S. & DAVIS, R.W. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4951-55, 1979.
- SCHWAB, H. Strain improvement in industrial microorganisms by recombinant DNA techniques. *Adv. in Bioch. Engin./Biotechnol.*, 1986, vol 37, p. 129-68.
- SEMON, D.; MOUUS, N.R.; SMITH, T.F.; EL ALAMA, M.; DAVIES, J. Plasmid-determined bleomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **17**: 46-53, 1987.
- SIERKSTRA, L.N.; VERBAKEL, J.M.A.; THEOVERRIPS, C. Optimization of a host/vector system for heterologous gene expression by *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* **19**: 81-7, 1991.

- SREEKRISHNA, K. & DICKSON, R.C. Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 7909-13, 1985.
- STEPHENS, M.L. & LYBERATOS, G. Effect of cycling on the stability of plasmid-bearing microorganisms in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 464-9, 1989.
- STINCHCOMB, D.T.; STRUHL, K.; DAVIS, R.W. Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replication. *Nature* **272**: 39-43, 1979.
- STINCHCOMB, D.T.; THOMAS, M.; KELLY, J.; SELKER, E.; DAVIS, R.W. Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**: 4559-63, 1980.
- STRUHL, K.; STINCHCOMB, D.T.; SCHERER, S.; DAVIS, R.W. High frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 1035-9, 1979.
- SZOSTAK, J.W. & BLACKBURN, E.H. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 163-94, 1984.
- TAKAGI, M.; KAWAI, S.; CHANG, M.C.; SHIBUYA, I.; YANO, K. Construction of a host-vector system in *Candida maltosa* by using an ARS site isolated from its genome. *J. Bacteriol.* **167**: 551-5, 1986.
- TAVARES, F.C.A. Processo de produção de etanol com o controle de leveduras contaminantes. *INPI Patente nº 8.903.744*, 1989.
- TEZUKA, H.; OHTAKE, Y.; YABUUCHI, S.; MURATA, K.; KIMURA, A. Construction of the transcriptional and translation signals-cloning vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1597-8, 1988.
- TURNER, G. & BALLANCE, D.J. Transformation in fungi. In: BENETT, J.W. & LASURE, L.L. (eds.). *Gene manipulations in fungi*. Academic Press, New York, 1985, p. 352-75.
- Van den BERG, J.A.; Van Den LAKEN, K.J.; Van COYEN, A.J.J.; RENNIERS, C.H.M.; RIETVELD, K.; SHAAP, A.; BLAKE, A.J.; BISHOP, R.J. & SHULTZ, K. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression and secretion of prochymosin. *Bio/Tech.* **8**: 135-9, 1990.
- Van ENGELBURG, E.; SMIR, R.; GOOSEN, T.; Van den BROEK, H.; Transformation of *Claviceps purpurea* using a bleomycin resistance gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 364-70, 1989.

- VARONI, M.; LOTTI, M.A. Expression of cloned glucoamylase from *S. diastaticus* under natural and inducible promoters. *Biochem. Biophys. Acta.* **1008**: 168-76, 1989.
- VOLKERT, F.C.; WILSON, D.W. ; BROACH, J.R. Deoxyribonucleic acid plasmids in yeast. *Microbiol. Rev.* **53**: 299-317, 1989.
- WALMSLEY, R.M.; GARDNER, D.C.; OLIVER, S.G. Stability of a cloned gene in yeast grown in chemostat culture. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 361-365, 1983.
- WEBSTER, T.D. & DICKSON, R.C. Direct selection of *S. cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903. *Gene.* **26**: 243-52, 1983.
- WICKNER, R.B. Killer systems in *S. cerevisiae* . In: STRATHERM, J.M., JONES, E.W.; BROACH, J.R. (eds). *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 415-44.
- WINNACKER, E.L. *From gene to clones - Introduction to gene technology*. Publish, New York, 1987, cap.5, p. 179- 207.
- XIAO, W. & RANK, G.H. The construction of recombinant industrial yeasts free of bacterial sequences by directed gene replacement into a nonessential region of the genome. *Gene* **76**: 99-107, 1989.
- YAMAKAWA, M.; HISHINUMA, F.; GUNGE, N. Intact cell transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by polyethyleneglycol. *Agric. Biol. Chem.*, **49**: 869-71, 1985.
- YAMASHITA, I.; MAEMURA, T.; HATANO, T.; FUKUI, S. Polymorphic extracellular glucoamylase genes and their evolutionary origin in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bacteriol.* **161**: 374-82, 1985.
- ZAKIAN, V.A. & KUPFER, D.M. Replication and segregation of an unstable plasmid in yeast. *Plasmid.* **8**: 15-18, 1982.