**CONSTRUÇÃO DE UM VETOR COM O GENE GFP DE *Aequorea victoria*
PARA A TRANSFORMAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae***

Luiz Humberto Gomes

Biólogo, Mestre em Agronomia

Orientador: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

Tese apresentada a Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia,
área de concentração: Microbiologia Agrícola.

Piracicaba, fevereiro de 2000.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – Campus ‘Luiz de Queiroz’/USP

Gomes, Luiz Humberto

Construção de um vetor com gene GFP de *Aequorea victoria* para a transformação de *Saccharomyces cerevisiae*/ Luiz Humberto Gomes- - Piracicaba, 2000.
73 p. : il.

Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Contaminação fúngica 2. Expressão gênica 3. Fermentação industrial 4. Gene marcador
 5. Genética microbiana 6. Levedura industrial 7. Recombinação genética 8. Vetor de clonagem
- I. Título

CDD 660.62

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares por tudo que passamos e aprendi nestes 16 anos juntos.

Ao meu grande ídolo Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna, por ser o responsável direto pela minha paixão pela pesquisa.

Ao DECANO Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho, pela amizade, ensinamentos e a convivência que tanto poliram minha carreira.(pelos churrascos, pelos cafés, pelas batatas fritas, pelos sanduíches de metro, pelos jantares e principalmente pela bicicleta).

Aos Prof. Brendan P. Cormack e Alistair J.P. Brown pelo fornecimento do gene da GFP3 neste trabalho, além do carinho e apoio demonstrado em seus E-mails durante as fases difíceis deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gonçalo A.G. Pereira por me ceder parte de seu precioso tempo na colaboração neste trabalho.

À minha esposa Keila M.R. Duarte que foi uma grande heroína por me aturar durante a escrita e realização desta tese e à minha filha Ana Carolina P. Gomes por aceitar com carinho a minha ausência durante este período.

Aos meus queridos amigos Maurício Pires Machado Barbosa e Elaine Cristina Castelhana que espero que logo se tome Castelhana Barbosa.

Ao meu grande amigo Felipe Gabriel Andrino pela amizade e colaboração na execução deste trabalho, e principalmente por sua alegria e motivação que tanto me ajudaram em dias muito difíceis.

Aos Meu Sogro, Minha Sogra e meus cunhados por me devolverem neste ano a noção exata do que é viver novamente em família.

Aos amigos de trabalho Ana M.B. Giacomelli, Sabrina, Valter Marccheroni Junior, Gildemerge Amorim Leal Junior, Jefferson W. de Gaspari, Fábio Henrique Bicudo da Silva, Jonas Rizatto Paschoal, Fernanda R. Garutti, Janaina Rodrigues.

Aos colegas Funcionários do Depto. de Genética, principalmente a Sarah, Leia, Salete, Oberdã, Valdir, Fernando, Silvana, Carlos Macedonio, Zézo, Gorga, Rodinei e Norberto.

A Escola Superior de Agrucultura "Luiz de Queiroz"/USP por todas as oportunidades que tem me oferecido e as portas que tem me aberto.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS-----	IV
LISTA DE TABELAS-----	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍBOLOS-----	VII
RESUMO-----	VIII
SUMMARY-----	IX
INTRODUÇÃO-----	1
1- REVISÃO DE LITERATURA-----	3
2- MATERIAL E MÉTODOS-----	19
3.1 - MICRORGANISMOS E VETORES UTILIZADOS-----	19
3.2 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E TAMPÕES-----	20
3.3 - ISOLAMENTO DE PLASMÍDIOS DE E. COLI- MINI PREP-----	25
3.4 - ISOLAMENTO DE PLASMÍDIOS DE E. COLI COM A UTILIZAÇÃO DO KIT CONCERT HIGH PURITY PLASMID MINIPREP SYSTEM (GIBCO-BRL- 11449-014)-----	26
3.5 - PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO DE E. COLI-----	27
3.6 - PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> -----	28
3.7 - CORTES COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO-----	30
3.8 - ISOLAMENTO DOS FRAGMENTOS DO GEL-----	30
3.9 - LIGAÇÃO FRAGMENTO/ VETOR-----	31
3.10 - CORRIDA EM GEL DE AGAROSE-----	31
3.11 - ELETROFORESE DE PROTEÍNAS TOTAIS (SDS-PAGE)-----	31
3.12 - ANÁLISE DE AÇÚCARES REDUTORES-----	31
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	32
4- CONCLUSÕES-----	57
5- BIBLIOGRAFIA CITADA-----	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Mapa de restrição do Plasmídio Bluescript SKm.....	36
Figura 2 - Mapa de restrição do Plasmídio PYEGFP3.....	37
Figura 3 - Células transformadas com plasmídio pYEGFP3 e observadas sob um transiluminador de U.V. As células que apresentavam coloração verde fluorescente são as que apresentam o plasmídio com o inserto da GFP3.....	38
Figura 4 - Gel de agarose 1% para isolamento do fragmento da GFP3 onde: P= Padrão 500pb DNA Ladder GIBCO-BRL Cod.10594-018; A = pYEGFP3 cortado com HindIII; B = pYEGFP3 cortado com HindIII/SalI para a liberação do fragmento da GFP3 e C = pYEGFP3 íntegro.....	39
Figura 5 - Mapa de restrição Vetor BSKGFP3.....	40
Figura 6 – Células de bactéria DH5 α transformadas com o plasmídio BSKGFP3 e observadas sob um transiluminador de U.V. As células apresentam coloração verde fluorescente	41
Figura 7 – Mapa de restrição do vetor pYADE4.....	42
Figura 8 – Células de bactéria DH5 α transformadas com o vetor pYGFP3, B = células brancas resistentes a ampicilina contendo o vetor com o inserto e A = células azuis, resistentes a ampicilina contendo o vetor mas sem o inserto.....	43
Figura 9 - Mapa de restrição do Vetor pYGFP3.....	45

Figura 10 - Placa de Petri com YNB onde foram estriadas a levedura normal na parte superior e as duas leveduras transformadas contendo o vetor pYGFP3, HD93-15D ao centro e X2904-3C na parte inferior da placa.....47

Figura 11 – SDS-PAGE onde da esquerda para a direita temos : P= padrão; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7= amostras retiradas com 6, 12, 15, 16, 17, 18 e 19 horas de fermentação respectivamente; GFP= foi isolada das células transformantes (na altura de 30 kDa,; 8= amostra com 24 horas fermentação49

Figura 12 - Amostras de leveduras transformantes (X2904-3C) com o plasmídeo pYGFP3, preparadas para eletroforese e observadas sob um transiluminador de U.V. Da esquerda para direita temos: amostra com a expressão da GFP e sem a expressão da GFP.....51

Figura 13- 1= células transformadas de X2904-3C em meio YEDP com 1% de glicose e 4% de etanol,; 2= células não transformadas de X2904-3C em meio YEDP com 1% de glicose e 4% de etanol.....54

Figura 14 Amostra de células transformadas e não transformadas misturadas em proporções iguais e observadas em microscópio de fluorescência com o aumento de 200 X e diluição de 10^{-4} 56

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Análise da % de açúcar nas amostras coletadas no ensaio de fermentação--52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADH2 - Enzima álcool desidrogenase -isoenzima2

GFP - Proteína de fluorescência verde

XGAL - 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -galactosidase

IPTG - Isopropylthiogalctoside

U.V - Ultravioleta

RAPD - Amplificação ao acaso de fragmentos polimórficos de DNA

°C - Graus Celsius

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

PAGE - Eletroforese de gel de poliacrilamida

LB - Meio para cultivo de *E.coli* elaborado por Luria e Bertani

RPM - Rotações por minuto

D.O - Densidade ótica

DNA - ácido desoxiribonucleico

%ART - Porcentagem de açúcares redutores totais

**CONSTRUÇÃO DE UM VETOR COM O GENE GFP DE *Aequorea victoria*
PARA A TRANSFORMAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae***

Autor: Luiz Humberto Gomes

Orientador: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

RESUMO

Diversos métodos tem sido propostos para a identificação de leveduras contaminantes em processos fermentativos que utilizam leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, mas nenhum deles oferece resultados absolutamente satisfatórios com a exatidão e precisão necessárias. Considerando que a identificação poderia ser facilitada com o uso de genes marcadores, foi construído um vetor plasmidial pYGFP3 com o gene da GFP ("green fluorescent protein") extraída da *Aequorea victoria*, sob o controle do promotor de ADH2 (álcool desidrogenase II) de *Saccharomyces cerevisiae* o qual apresenta repressão por glicose. O vetor pYGFP3 foi utilizado para transformação de leveduras *S. cerevisiae* HD 93.15D (MAT a, his 3, leu2, trp1, ura3) e X2904-3C (MATa, met1, trp1, ura3), que expressam o gene GFP3 somente em condições de baixo teor de glicose, não interferindo com outras funções metabólicas ou dispêndio de energia durante o processo fermentativo. Replicações sucessivas demonstraram a estabilidade do gene marcador nos transformantes, indicando que o método é viável para identificação simples e segura desta linhagem, podendo-se constituir em recurso adicional de identificação da levedura frente a outras contaminantes do processo fermentativo.

**CONSTRUCTION OF A VECTOR CARRYING THE GFP GENE FROM
Aequorea victoria TO TRANSFORME *Saccharomyces cerevisiae*.**

Author: Luiz Humberto Gomes

Adviser: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

SUMMARY

Several methods have been proposed for identify spoilage yeast during fermentation processes, that uses *Saccharomyces cerevisiae*, therefore none of them offers absolutely acurancy and precision needed. Considering that the identification could be facilitate with the use of gene markers, a plasmid vector was constructed carrying the GFP gene (green fluorescent protein) from *Aequorea victoria*, under the control of ADH2 (alcohol dehydrogenase II) promoter from *Saccharomyces cerevisiae*, which is repressed by glucose. The pYGFP3 vector was used to transform yeast *S. cerevisiae* HD 93.15D (MAT a, his 3, leu2, trp1, ura3) and X2904-3C (MATa, met1, trp1, ura3) and the GFP3 was expressed only under low levels of glucose, not interfering in other metabolic functions of the cell neither spending energy during the fermentative process. Successive replications shows gene stability into the transformed cells, indicating its viability for simple and secure of this strain, being considered an additional tool to identify spoilage yeast in fermentative processes.

1 – INTRODUÇÃO

A identificação de leveduras contaminantes em processos fermentativos que empregam *Saccharomyces cerevisiae* tem sido preocupação constante na indústria. Vários métodos que oferecem vantagens e desvantagens uns sobre os outros já foram descritos com esta finalidade, como testes bioquímicos, ressonância magnética da parede de levedura, sorologia, sistema de co-enzima Q, níveis de trealose na parede celular, RAPD, SDS-PAGE, separação de cromossomos, meios diferenciais, "fingerprinting", entre outros. Contudo, nenhum destes métodos é capaz de identificar as leveduras contaminantes com precisão, rapidez, baixo custo e precocemente, ou quando estão em baixa frequência, antes que causem problemas ao processo.

Para a eficiente detecção de leveduras contaminantes, o emprego de leveduras portadoras de genes marcadores poderia contribuir para facilitar a identificação, desde que esta marca obtida por mutação ou transformação, não interferisse com as funções metabólicas e prejudicando o processo fermentativo.

Recentemente em estudos de expressão gênica e do desenvolvimento celular tem-se utilizado o gene *GFP* ("Green Fluorescent Protein") isolado do celenterado *Aequoria victoria*, que expressa uma proteína de fluorescência espontânea quando exposta à luz ultravioleta. Devido a fácil identificação visual de células e componentes celulares, pela emissão de fluorescência, o gene GFP tem sido

empregado na transformação de vários organismos, inclusive de leveduras para a fácil e segura identificação de células e colônias isoladas.

A utilização do gene *GFP* depende do emprego de genes promotores específicos, em construções apropriadas para o problema em estudo. Na identificação de leveduras industriais em ambiente contaminado com leveduras selvagens, com características morfológicas e fisiológicas parecidas, o uso de genes marcadores não poderia afetar a multiplicação celular e a eficiência metabólica, prejudicando o rendimento e a produtividade.

Com o objetivo de estudo da expressão do gene *GFP* como marcador de leveduras industriais, procurou-se construir um plasmídeo vetor portador do gene *GFP* controlado por um promotor reprimido, ativo somente em baixos teores de glicose e avaliar sua capacidade de emitir fluorescência, visando a identificação de leveduras melhoradas, frente a outras linhagens, ou leveduras contaminantes selvagens. Este vetor poderia ser utilizado na transformação de outras leveduras, o que permitiria sua fácil identificação visual.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

Ao longo dos anos desenvolveram-se vários métodos para a identificação de leveduras, com a finalidade de caracterizá-las de forma inequívoca e as distinguir, mesmo quando misturadas com células de diferentes linhagens da mesma espécie. Esses métodos tem destacada aplicação na indústria de fermentações, onde aliás tiveram a sua origem (Hansen, 1987). As leveduras e outros microrganismos, após isolamento do ambiente natural ou de cultivo artificial, comumente são identificados e classificados empregando-se meios de cultivo de composição definida. Sempre comparando com organismos padrão, determinam-se características morfológicas e fisiológicas e ocasionalmente, procede-se à avaliação de propriedades tecnológicas, conforme métodos descritos por Barnett et al. (1986) e Kreger-Van Rij (1987).

O emprego de meios especiais e o trabalho dos ensaios de identificação são demorados, exigindo pelo menos uma semana para produzir resultados, sendo ainda necessário a interpretação dos resultados por pessoal especializado. Além disto, os ensaios são sujeitos a variações ambientais, onde mesmo com rígida observação das condições e protocolos para avaliação das propriedades das leveduras, pode-se obter resultados duvidosos. Por este motivo, deve-se considerar que qualquer variação dos resultados devido à técnica usada, ou pela variação de linhagens, podem resultar em identificação totalmente errada (Eguchi et al., 1991).

Visando contornar as limitações dos testes morfológicos e fisiológicos propostos por Barnett (1960), diversos testes estão disponíveis comercialmente como "kits" de diagnóstico "easy-to-use" (Lin & Fung, 1987; Deak & Beuchat, 1987). Estes "kits" cobrem uma margem limitada de testes de assimilação de carbono e nitrogênio e são disponíveis comercialmente utilizadas para algumas espécies de leveduras de importância médica, não sendo indicadas para identificação de leveduras de um modo geral.

Na tentativa de se contornar as limitações dos métodos de identificação baseados em propriedades morfológicas e testes bioquímicos, foram propostos métodos como a sorologia (Tsuchiya et al., 1965), análise da parede celular de leveduras por ressonância nuclear magnética (Gorin & Spencer, 1970), análise do sistema de co-enzima Q (Yamada et al., 1976), conteúdo de bases nitrogenadas (Kurtzman & Phaff, 1987), bioluminescência (Miller & Galston, 1989), conteúdo de trealose (Gutierrez, 1990), propriedades dos ácidos graxos (Bendová et al., 1991), movimento de prótons e transporte de açúcares (Kilian et al., 1991), efeito inibitório de diferentes compostos (Simpson et al., 1992), DNA fingerprinting (Tavares et al., 1992) e a combinação de meios diferenciais, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), "Contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis" (CHEF) e "Random amplified polymorphism DNA" (RAPD), como feito por Gomes (1995).

Também para fins de identificação, Hall (1971); Lin (1975) e Oliveira & Pagnocca (1988) utilizaram corantes no meio para diferenciação das linhagens de

leveduras. Com estes meios foi possível distinguir cinco espécies do gênero *Saccharomyces* e outras quinze espécies de leveduras.

Atualmente, métodos de separação de cromossomos tem sido utilizados para a identificação de linhagens de leveduras, como feito por Carle & Olson (1984 e 1985), que utilizaram o método "Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis" (OFAGE), estabelecendo um padrão de bandas para *Saccharomyces cerevisiae*. Com o método, foram detectadas doze bandas, onde nove bandas correspondem a cromossomos individualizados e três bandas reúnem dois cromossomos em cada uma, o que totalizaria a separação de quinze cromossomos da levedura.

Sheehan & Weiss (1991) utilizaram o método CHEF para identificar a presença de leveduras poliplóides na indústria cervejeira, pois, a presença das mesmas causam alteração no sabor e aroma da cerveja. Com a utilização do método, foi possível encontrar padrões de 16 bandas para *Saccharomyces cerevisiae*, detectando ploidia da linhagem quando comparada com a original do estoque. Relataram ainda problemas com o método, o qual não apresentou uma repetibilidade satisfatória.

Meaden (1989) fez uma comparação entre seis métodos utilizados para a avaliação da diversidade de leveduras em cervejarias, sendo eles: "DNA fingerprinting" , CHEF, "field inversion gel electrophoresis" (FIGE), OFAGE, "pulsed field gel electrophoresis" (PFGE) e "transverse alternating field electrophoresis" (TAFE). Neste trabalho pode demonstrar a ineficiência dos cinco métodos baseados na separação de cromossomos, em relação à alta eficiência do método de "DNA fingerprinting", salientando ainda que o TAFE não é confiável para

distinguir a diversidade existente entre linhagens de cervejaria, fato observado anteriormente por Casey et al. (1988).

Van Vurren & Van Der Meer (1988) analisaram através de SDS-PAGE linhagens de *Saccharomyces* utilizadas comercialmente para a produção de vinho e duas linhagens usadas na fermentação de cerveja. O padrão de bandas protéicas foi usado como um "fingerprinting" das linhagens, com o que foram distinguidos diferentes grupos genéticos de *Saccharomyces cerevisiae*. O padrão de bandas de proteínas das linhagens, dentro de cada grupo, apresentou uma alta correlação, confirmando que *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces uvarum* e *Saccharomyces carlsbergensis* na realidade pertencem à espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Lehmann et al. (1992) utilizaram RAPD para melhor caracterizar diferenças genotípicas entre leveduras do genero *Candida*, de importância médica. Foram utilizados "primers" pequenos (com até 10 pb), com seqüências arbitrárias que resultaram em reações capazes de distinguir isolados de *Candida albicans*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* e *Torulopsis glabrata*. A análise de RAPD permitiu construir dendrograma com linhagens de *Candida parapsilosis*, classificando as linhagens em três grupos distintos, evidenciando a diversidade genética dentro de isolados de *C. haemulonii*. De acordo com Gomes et al., (2000), o método de RAPD permite distinguir a linhagem de levedura padrão dentre outras que possam, por exemplo, contaminar a fermentação na indústria alcooleira.

Apesar desta enorme gama de métodos disponíveis, nenhum deles é capaz de demonstrar com total exatidão se a levedura utilizada como inóculo no início do processo fermentativo, ainda permanece a mesma depois de vários ciclos ou ao longo

da safra na produção de etanol, razão pela qual Gomes (1995), utilizou uma combinação de métodos com o que se obteve uma melhor resposta.

Devido a este problema tem sido procurados marcadores moleculares que possam identificar com precisão as leveduras industriais e o mais importante, utilizar marcadores que não causem interferência no processo. Vários são os tipos de marcadores que podem ser utilizados, alguns dos quais se descrevem a seguir.

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

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

ou vitamina que está sendo empregado para seleção. As células que receberam o vetor com o alelo selvagem durante a transformação, conseguem crescer neste meio e formam colônias isoladas, enquanto as células que não receberam o vetor não se multiplicam.

Para uso de marcadores dominantes, as mutações auxotróficas são dispensáveis nas células a serem transformadas. Quando se deseja transformar linhagens industriais, mutações auxotróficas são indesejáveis, visto que as linhagens industriais são normalmente prototróficas e a sua mutagenização, para obter mutantes auxotróficos, comprometeria sua performance. Ainda, para utilização de linhagens com marcadores auxotróficos é necessária a utilização de meio de cultura mínimo, livre de aminoácidos, vitaminas ou bases nitrogenadas, a serem suplementados com fatores de crescimento (Sambrock et al., 1989).

Desde o início da década de 80 vem se tentando introduzir genes de seleção em vetores de clonagem bifuncionais de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. Atualmente já se conhece um grande número deles e novos genes continuam a ser identificados para esta finalidade (Sambrock et al., 1989).

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

quinze cópias do gene *CUP1* por célula. O mesmo efeito de resistência devida ao efeito de dosagem gênica foi obtido por Henderson et al., 1985, com a clonagem de *CUP1* em vetor multicópia.

A levedura *S. cerevisiae* é sensível a alguns antibióticos, entre eles o aminoglicosídeo G418, que inibe a tradução nos ribossomos 80S de eucariotos. Jimenez & Davies (1980) demonstraram que *S. cerevisiae* era capaz de expressar o gene de resistência a canamicina de *E. coli*, tendo como resultado a insensibilidade ao G418 (Hadfield et al., 1993).

Em 1983, Webster & Dickson desenvolveram um novo sistema para seleção de transformantes de levedura, sem a necessidade de complementação de marcadores auxotróficos. Nesse, efetuaram a construção de vetores de clonagem bifuncionais, contendo como marcador seletivo para *S. cerevisiae*, o gene Km^r do Tn903 de *E. coli*. Entretanto, além de não se conseguir uma seleção de transformantes eficiente em meio mínimo, havia a necessidade de uma longa incubação (12 a 18h) em meio sem G418, para haver tempo para a expressão da resistência e com isto, melhorar a eficiência de transformação.

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

forma, o vetor se mostrou versátil por permitir o uso da marca de resistência para seleção de transformantes, tanto de *E. coli* como de *S. cerevisiae*.

O cloranfenicol é outro antibiótico que inibe a tradução nos ribossomos 70S, presentes nas mitocôndrias de células eucariotas. O crescimento de *S. cerevisiae* pode ser interrompido pelo cloranfenicol, se as células estiverem sendo cultivadas sob condições aeróbias, como quando se utilizam fontes de carbono não fermentescíveis, como o glicerol e o etanol. A resistência ao cloranfenicol pode ser obtida pela expressão da acetiltransferase do cloranfenicol (CAT) bacteriana no citoplasma de leveduras. Hadfield et al.(1986), construíram um vetor bifuncional contendo o gene Cm^r de resistência ao cloranfenicol de *E. coli* como marcador seletivo dominante, tanto para *S. cerevisiae*, como para *E. coli*. Esse vetor obteve tanto na sua versão epissomal, como na versão integrativa, eficiência de transformação comparáveis às obtidas em seleção por marcadores como *HIS3*, *LEU2* e *TRP1*. Nessa publicação os autores descrevem a seleção de transformantes de leveduras industriais, selecionados em meio completo mais cloranfenicol.

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

A resistência a herbicidas em leveduras também foi estudada, ao se verificar que o metil sulfometuron inibe o crescimento de *S. cerevisiae*, o que acontece pela

sua ação sobre a enzima acetolactato sintase, codificada pelo gene *ILV2*, da via de biossíntese de valina e isoleucina,. Mutantes resistentes dominantes, possuem uma mutação pontual no gene *ILV2*, que resulta numa substituição de um único aminoácido, tornando a enzima insensível ao metil sulfometuron. Quando o alelo dominante é introduzido por transformação, confere à célula hospedeira resistência ao herbicida, tanto em cópia única, como em multi-cópia (Casey et al., 1988). Um outro marcador dominante de resistência a herbicidas foi recentemente clonado e mapeado no cromossomo XV de *S. cerevisiae*, o gene *MTC1* de resistência ao metolachlor (Echeverrigaray et al., 1999).

A transformação de leveduras utilizando diferentes vetores, para os mais diversos fins, tem sido realizados (Hinnen et al., 1979) com esferoplastização de leveduras. A eficiência de transformação foi aumentando devido a modificações na metodologia (Struhl et al., 1979), podendo-se obter de 3.000 a 50.000 transformantes por µg de plasmídeo. Contudo, a metodologia era considerada trabalhosa até que se passou a utilizar o método empregado por Ito et al. (1983), como uso do acetato de lítio, que fragiliza a parede celular e que foi utilizado para transformação de *E. coli*. Este método foi testado em leveduras por Gietz & Schiestl (1991) e por Gietz et al.(1992), onde obtiveram alta eficiência de transformação. Graças a essa metodologia, foi possível clonar genes em levedura e assim facilitar a retirada dos transformantes das placas com meio de cultura, utilizando uma marca de seleção.

O desenvolvimento de vetores bifuncionais para *S. cerevisiae-E. coli* tem sido o objetivo de diversos trabalhos (Parent et al., 1985; Baldari & Cesareni, 1985; Hill et al., 1986). Com isto, passaram-se a utilizar os plasmídios pUC que contém o sistema

lacZ para levedura-*E. coli* para seleção de insertos (Yanisch-Perron et al., 1985) e em especial o plasmídeo pUC19, por sua diversidade de sítios de restrição. Com estes plasmídios foi possível obter mutações sítio-dirigidos por Gietz & Sugino (1988), para em genes para a leucina, uracila e triptofano em *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando que a eficiência de transformação era aumentada com os vetores originários do pUC19.

A obtenção de mutantes de leveduras com marcadores para seleção ou monitoramento foram realizados utilizando diversas substâncias. Tavares (1995) obteve um mutante de *S. cerevisiae* resistente a nistatina, um fungicida de amplo espectro, que pode ser usado como controle de contaminantes no processo de produção de álcool. Na fase de multiplicação do fermento, basta utilizar nistatina na proporção de 5 ppm e eventualmente, durante a safra caso seja constatada a eventual contaminação.

Um dos marcadores mais utilizados recentemente aproveita a propriedade do gene *GFP* ("Green Fluorescent Protein"), que expressa uma proteína de fluorescência espontânea isolada do celenterado *Aequoria victoria* (Morin & Hastings, 1971), cujo metabolismo da bioluminescência foi estudado por Ward (1979). Trata-se de proteína com 238 aminoácidos, cujo tipo selvagem apresenta um pico de excitação a 395 nm e um pico menor a 475 nm (Kahana & Silver, 1996). Não existem co-fatores conhecidos ou compostos enzimáticos que sejam requeridos para a formação da fluorescência, contudo sabe-se que a expressão do gene *GFP* diminui quando as temperaturas passam de 30°C. Entretanto, uma vez que a proteína *GFP* é produzida, revela-se bastante termoestável (Lim et al., 1995).

A clonagem do cDNA do *GFP* e demonstração de sua expressão como um transgene funcional, proporcionou diversos estudos a respeito da célula, seu desenvolvimento e sua biologia molecular (Yang et al., 1996). O gene *GFP* tem sido utilizado como marcador que auxiliar o estudo da expressão gênica em vários organismos, como em bactérias (Chalfie et al., 1994), leveduras (Kahana et al., 1995), plantas (Casper & Holt, 1996); Epel et al., 1996), *Drosophila* spp. (Wang & Hazelrigg, 1994) e "zebrafish" (Amsterdam et al., 1996).

Em estudo de interação hospedeiro-patógeno, com os enteropatógenos *Salmonella* e *Mycobacterium* transformados com o gene *GFP*, possibilitou-se a visualização direta e medir quantitativamente a presença destes patógenos em células de mamíferos (Valdivia et al., 1996).

Foi descrito por Bloemberg et al. (1997), que o uso de diferentes plasmídios portadores do *GFP* como marcadores para *Pseudomonas* spp., um grupo importante de patógenos de raízes, apresentaram expressão da fluorescência de forma estável e constitutiva, permitindo avaliar a forma e velocidade de contaminação por estes patógenos *in vivo*.

A utilização do *GFP* como marcador em leveduras foi feita por diversos autores como Cormack et al. (1997), que otimizaram o aumento da expressão da fluorescência em levedura ao obter o gene *GFP3*, que apresenta um número maior de códons de glicina (GGT), passando de sete no gene tipo selvagem, para vinte e três no mutante, enquanto que os códons da alanina (GCT) passaram de três, para sete em relação ao tipo selvagem. As linhagens de leveduras transformadas com o vetor

originário de pUC19, contendo o novo gene *GFP3* sob o controle do promotor de *ADH1*, proporcionaram um aumento de 40 vezes na expressão da fluorescência, em relação ao vetor com o gene selvagem. Este vetor, chamado de yEGFP3 foi inserido em células da levedura patogênica *Candida albicans* e estudada a velocidade de infecção em rins de camundongo.

Em *Saccharomyces cerevisiae* existem mais de 100 genes relacionados com reparo de lesões no DNA, dentre os quais o RAD51, RAD52 e o RAD54, que possuem também importante função na recombinação de *Saccharomyces cerevisiae*. No estudo da expressão do RAD54, o *GFP* foi utilizado como marcador para evidenciar a presença da proteína RAD54, em condições de indução de dano e posterior reparo do DNA de *S. cerevisiae* (Walmsley et al., 1997).

A calmodulina é proteína essencial à divisão de *Saccharomyces cerevisiae*, mas em *Schizosaccharomyces pombe* sua função ainda não era bem entendida, até que Moser et al. (1997) conjugaram o gene da calmodulina ao *GFP* e, com isso, conseguiram demonstrar que a calmodulina tem papel importante na segregação dos cromossomos na divisão celular desta levedura.

No estudo dos mecanismos de formação e polaridade dos microtúbulos na divisão celular de *Schizosaccharomyces pombe*, a *GFP* foi ligada ao gene *ral3*, que expressa uma das proteínas envolvidas na polarização dos microtúbulos. A visualização da formação dos microtúbulos através da fluorescência expressada, mostrou que a proteína *ral3* aparece do meio para as extremidades dos microtúbulos, sendo portanto a proteína que especifica a orientação espacial dos fusos (Sawin e

Nurse, 1998). Em outro estudo, o *GFP* foi ligado ao gene *Kar9p*, envolvido na migração do núcleo. Através de imunofluorescência com a proteína *GFP*, foi possível constatar que o gene *Kar9p* é também responsável pela orientação da formação dos microtúbulos no citoplasma de leveduras (Miller & Rose, 1998; Miller et al., 1999).

Knight et al. (1999) utilizaram o *GFP* ligado ao gene *RAD54* em *Saccharomyces cerevisiae*, como marcador para monitorar a presença de compostos genotóxicos durante o processo de fabricação de pães.

Em *Cryptococcus neoformans*, o *GFP* ligado ao promotor de actina (*GAL7*), auxiliou na demonstração da expressão deste gene durante o crescimento vegetativo em meio de cultura. A sua expressão foi avaliada também *in vivo* em coelhos infectados com a levedura *C. neoformans* transformada com o plasmídio *pACT* carregando a *GFP*, verificando-se que a fluorescência apareceu em tecidos do sistema nervoso central dos animais. Neste trabalho de Poeta et al. (1999), foi observado que a expressão do promotor do gene da actina é regulado durante a fase de infecção do patógeno.

No estudo de organelas celulares, o *GFP* tem contribuído para o estudo do complexo de Golgi, na marcação de promotores responsáveis por proteínas da membrana plasmática e identificação de proteínas, em mamíferos e leveduras (Kjer-Nielsen et al., 1999). Outros trabalhos estudaram proteínas responsáveis pelo empacotamento das membranas do complexo de Golgi, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo (Barr et al., 1998).

No estudo da estabilidade das células de *Saccharomyces cerevisiae* durante o brotamento, o uso de um plasmídeo marcado com *GFP*, monitorado por análise citométrica, mostrou que perdas de plasmídios, ou de pedaços de plasmídeo, puderam ser monitorados e medidos em 266 linhagens de *S. cerevisiae* (Hegemann et al., 1999).

A expressão da proteínas de choque térmico tem sido estudadas com diferentes metodologias. Enekel et al. (1999) conseguiu fazer-se expressar a proteína *GFP* ligada à uma sub-unidade alfa da proteína 26S de *Saccharomyces* e verificou-se que esta proteína está relacionada à proteólise de membranas do retículo endoplasmático rugoso.

A enzima Álcool Desidrogenase II (E.C. 1.1.1.1) é codificada pelo gene *ADH2* de *Saccharomyces cerevisiae*, localizado no cromossomo XIII. A enzima é regulado por níveis catabólicos da fonte de carbono, verificando-se que na presença de fontes de carbono fermentescíveis, a enzima é fortemente reprimida e que em meios contendo apenas etanol como fonte de carbono, a atividade enzimática é marcadamente aumentada (Beier & Young, 1985).

A regulação da expressão do gene *ADH2* é mediada pelo menos em parte, pelo produto do gene *ADR1* (Beier & Young, 1985). Segundo Denis (1983) o gene *ADR1* codifica um ativador transcricional que se liga a um sítio palindrômico da sequência do promotor de *ADH2*. Outro gene envolvido na expressão de *ADH2* é o gene *ADR6* (Taguchi & Young, 1987a; Taguchi & Young, 1987b) que parece codificar um segundo fator de transcrição, cujo sítio de ação ainda não é bem conhecido. Ainda outros genes possuem atividade regulatória sobre a *ADH2*, como o

gene *CCR4* juntamente com os efetores negativos *CRE1* e *CRE2*. Como identificado por Denis (1984), mutações nestes alelos *CRE1* e *CRE2* permitiram que a *ADH2* fosse expressada, mesmo sob condições de repressão. Estudos posteriores, mostraram que o gene *CCR4* causa aumento nos níveis de mRNA *ADH2* (Denis & Malvar, 1990). Posteriormente, Karnitz et al., (1992), identificaram e caracterizaram outros três genes afetando a expressão de *ADH2*, os genes *adr7*, *adr8* e *adr9*.

O gene *ADH2* tem sequência conhecida e vários mutantes possibilitaram estudar as regiões adjacentes a este gene. Chan & Smith (1984), utilizaram o vetor M13 para clonagem de mutantes obtidos para identificar e isolar proteínas que interagem, especificamente, com o sítio da região regulatória de *ADH2*.

A ativação e/ou repressão de *ADH2*, pode ser consequência de diversos fatores. Em *Saccharomyces cerevisiae*, os elementos *Ty*, que representam uma família multigênica de transposons, com aproximadamente 35 sequências dispersas pelo genoma, pode influenciar a atividade de *ADH2* e *ADH4*, uma vez que o *Ty* situa-se adjacente aos loci de *ADH2* e de *ADH4*. Mutações em leveduras, que ocorram na região do *Ty*, diminui a expressão dos genes vizinhos, tornando assim, as atividades de *ADH2* e *ADH4* constitutiva na célula (Bradshaw & McEntee, 1989). Sob condições normais, o gene *ADH2* é reprimido por glicose e é expresso somente em condições de crescimento não fermentativo, o que não ocorre quando a célula é portadora de um *Ty* mutante, fazendo com que o gene *ADH2* se expresse mesmo em condições de elevado teor de glicose. Desta forma, ao se causar a mutação na região do *Ty* é possível estudar melhor a expressão dos genes *ADH2*, *ADH4* e *ADH1*.

Estudos na clonagem de gene *GAM2*, requerido para transcrição do gene *STAI*, que é responsável pela síntese de glicoamilase extracelular de *S. cerevisiae* var.

diastaticus, revelaram após o sequenciamento do DNA, que se trata do gene *SIN3*, conhecido como um regulador negativo em leveduras. Análises de RNA concluíram que o *GAM2* ou *SIN3*, atua como regulador positivo dos genes *GAM3 /ADR6*, que por sua vez, são responsáveis pela transcrição de *STAI* e de *ADH2* (Yoshimoto et al., 1992).

Os exemplos citados demonstram o quanto pode ser ampla a utilização do gene *GFP* e que a escolha de promotores específicos, permitem estudar a expressão de vários genes sob condições controladas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MICRORGANISMOS E VETORES UTILIZADOS

Os microrganismos e vetores utilizados foram:

Escherichia coli (DH5 α F') cedida pelo Dr. Walter Maccheroni (Depto. Genética - ESALQ USP).

Saccharomyces cerevisiae - HD 93.15D (MAT a, his 3, leu2, trp1, ura3) cedida pelo Dr. Gonçalo A. G. Pereira Depto Genética UNICAMP.

Saccharomyces cerevisiae - X2904-3C (MATa, met1, trp1, ura3), pertencente ao Laboratório de Genética de Leveduras ESALQ-USP.

Bluescript-SKm (Stratagene),

pYADE4 (Brunelli & Pall, 1993)

pYEGFP3 (Cormack et al., 1997).

Todo monitoramento de crescimento celular tanto das bactérias como das leveduras foi feito em espectrofotômetro Beckman DU640.

3.2 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E TAMPÕES

MEIO COMPLETO PARA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (YEPD).

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Dextrose 2% (p/v)

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

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos.

MEIO YEPD COM ETANOL

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Dextrose 1% (p/v)

Etanol 4% (p/v)

* Etanol foi adicionado após a autoclavação

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

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos

MEIO DE FERMENTAÇÃO PARA *Saccharomyces cerevisiae*

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Sacarose 20% (p/v)

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos.

MEIO PARA CRESCIMENTO EM FONTE DE CARBONO NÃO FERMENTECÍVEL (YPGE)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	1% (p/v)
Glicerol	3% (p/v)
Etanol	3% (p/v)*

* Etanol foi adicionado após a autoclavação.

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

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos.

MEIO MÍNIMO PARA *Saccharomyces cerevisiae* (YNB).

YNB sem aminoácidos	0,67% (p/v)
Dextrose	2% (p/v)

O pH foi ajustado para 6.8.

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

Esterilizado por autoclavagem a 0,5 atm por 30 minutos.

MEIO LB LÍQUIDO

Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
Triptona	1% (p/v)
Cloreto de Sódio	1% (p/v)

pH foi ajustado para 6,8.

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

Esterilizado por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos.

MEIO SELETIVO 1

Meio LB acrescido de solução de IPTG (200µl/ 100ml) , Solução de XGAL (100µl/ 100ml) e solução de ampicilina (100µl/ 100ml)

MEIO SELETIVO 2

Meio LB acrescido de solução de XGAL (100µl/ 100ml) e ampicilina (100µl/ 100ml)

MEIO SELETIVO 3

Meio LB acrescido de ampicilina (100µl/ 100ml)

SOLUÇÃO ESTOQUE DE IPTG (500X).

IPTG 100mg/ml

Estocada a -20°C.

Preparada em água dd

SOLUÇÃO ESTOQUE DE BROMETO DE ETÍDIO.

Brometo de etídio 10 mg/ml

Preparada em água dd

SOLUÇÃO DE GLICEROL 30%

Glicerol 30% (p/V)

Em água destilada

Esterilizada por autoclavagem a 1 atm por 20 minutos

SOLUÇÃO ESTOQUE DE XGAL (500X).

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

Preparada em dimetilformamida e estocada a -20°C.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE AMPICILINA (1000X).

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

Preparada em água dd

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm Estocada a -20°C

SOLUÇÕES ESTOQUE DE AMINOÁCIDOS PARA MEIO YNB

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

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

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

Uracila 200x	4 mg/ml	estocada a -20°C
--------------	---------	------------------

Adicionar 1 ml a cada 200 ml de meio YNB antes de verter com a temperatura próxima de 50°C. Preparada em água dd.

Esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm

SOLUÇÃO I - MINI PREP

Tris-HCl	25mM
----------	------

EDTA	10mM
------	------

O pH foi ajustado para 8,0.

SOLUÇÃO II - MINI PREP

Hidróxido de sódio	0,2N
SDS	1%

SOLUÇÃO III - MINI PREP

Acetato de potássio	3M
Ácido acético	10%

SOLUÇÃO I TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS (lavagem e congelamento)

1 M Sorbitol

10 mM Bicine-NaOH, pH 8,35

3% Etileno glicol

5% DMSO

SOLUÇÃO II TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS (Incubação)

40% PEG 1000

0,2 M Bicine-NaOH, pH 8,35

SOLUÇÃO III TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS (lavagem e espalhamento)

0,15 M NaCl

10 mM Bicine-NaOH, pH 8,35

SOLUÇÃO DE DNA CARREADOR.

DNA de espermatozoides de salmão 10 μg/μl

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

TAMPÃO DE ELETROFORESE TBE (5X).

Tris 500mM

EDTA 25mM

Ácido Bórico 500mM

Preparada em água dd

TE

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM

Preparada em água dd

O pH foi ajustado para 8,0.

3.3 - ISOLAMENTO DE PLASMÍDIOS DE *E. coli* - MINI PREP

(Adaptado de Sambrook et al., 1989)

1. Cultivar as bactérias em 2 ml de meio de cultura seletivo 1 "overnight";

2. Transferir 1,5 ml da cultura para tubo tipo eppendorf;
3. Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto e descartar o meio de cultura;
4. Ressuspender as células em 100 µl de solução I
5. Adicionar 200 µl de solução II misturando lentamente;
6. Adicionar 150 µl de solução III, misturar devagar e deixar no gelo por 5 minutos, observar a formação do precipitado.
7. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos;
8. Remover 400 µl de sobrenadante transferindo para um novo tubo limpo;
9. Precipitar o DNA plasmidial com 800 µl de etanol 100% e deixar a -20 °C por 10 minutos;
10. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos;
11. Adicionar 500 µl de etanol 70% e soltar o pellet do fundo do tubo com ajuda da ponteira;
12. Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto;
13. Descartar o etanol 70% e deixar que seque o pellet;
14. Ressuspender em 50 µl de tampão TE ou de água;

3.4 - ISOLAMENTO DE PLASMÍDIOS DE *E. coli* COM A UTILIZAÇÃO DO KIT CONCERT HIGH PURITY PLASMID MINIPREP SYSTEM (GIBCO-BRL- 11449-014)

1. Cultivar as bactérias em 2 ml de meio de cultura seletivo
- 2- Após o crescimento os plasmídios foram isolados, utilizado-se o Concert High Purity Plasmid Miniprep System (GIBCO-BRL- 11449-014), de acordo com a recomendação do fabricante .

3.5 - PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli*

Para o preparo e estoque de células competentes seguimos os seguintes passos de acordo com Mandel & Higa (1970) modificando-se apenas o tempo de incubação em CaCl_2 , passando de 40 minutos para 2 horas e com isso aumentando o número de células competentes em 50 %:

1. Crescer as células de bactéria em 5 ml de LB overnight à 37° C;
2. Retirar 1 ml e transferir para 100 ml de LB a colocar à 37°C até uma D.O de aproximadamente 0,6 a 600 nm;
3. Coloque a cultura em gelo por 5 minutos;
4. Centrifugar à 10.000g por 1 minuto;
5. Descartar o sobrenadante e adicionar 10 ml da solução de transformação gelada;
6. Deixar em banho de gelo por 2 horas;
7. Centrifugar à 10.000g por 1 minuto;
8. Descartar o sobrenadante e ressuspender em 2 ml do tampão de transformação gelado
9. Adicionar 2 ml de solução de glicerol 30%
10. Aliquotar em tubos de 1,5 ml estéril com 100 µl em cada e armazenar em freezer -80°C

Para a transformação das células competentes seguimos os passos abaixo:

1. Retirar um aliquota de células competentes do freezer -80°C e adicionar $5\mu\text{l}$ de DNA plasmidial ou produto de ligação;
2. Conservar em banho de gelo por 40 minutos;
3. Aquecer a 42°C por 40 segundos;
4. Adicionar $700\mu\text{l}$ de LB;
5. Espalhar em meio seletivo;
6. Aguardar 24 horas.

3.6 - PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*

O preparo e estoque de células competentes de leveduras foram feitos de acordo com Dohmen, et al. (1991) seguindo os passos abaixo :

1. Inocular a célula em 10 ml YEPD "overnight" à 30°C ;
2. Transferir 5 ml desta cultura para fresco de 100ml com 50 ml de YEPD e colocar no shaker à 200 rpm e 30°C ;
3. Medir a D.O até atingir 0,6 a 600nm ;
4. Centrifugar a cultura a 3000g por 5 minutos e descartar o sobrenadante;
5. Adicionar 10ml da solução I e ressuspender com a ajuda do vortex;
6. Centrifugar a cultura a 3000g por 5 minutos e descartar o sobrenadante;
7. Adicionar 1ml da solução I e ressuspender;

8. Adicionar um volume igual de solução de glicerol 30%;
9. Aliquotar em tubos de 1,5 ml estéril com 100 µl em cada e armazenar em freezer - 80°C

Após o preparo das células competentes a transformação das células foi realizada seguindo os passos abaixo:

1. Adicionar à alíquota de 100µl congelada 15 µl DNA plasmidial, mais 5 µl de DNA carreador (ssDNA). Nas transformações com produtos de ligação são utilizados 5µl da ligação e não adicionar o DNA carreador;
2. Manter sob agitação rápida a 37 °C por 5 a 10 minutos alternando entre banho maria e vortex;
3. Adicionar 1.2 ml de solução II e misturar bem;
4. Incubar a 30 °C por 60 minutos;
5. Centrifugar a 3000g por 1 minuto;
6. Ressuspender em 1 ml de solução III e centrifugar a 3000g por 1 minuto
7. Ressuspender novamente em 1 ml de solução III e centrifugar a 3000g por 1 minuto, após a centrifugação ressuspender com a mesma solução num volume apropriado para plaqueamento;
8. Espalhar em meio YNB e incubar a 30°C por 3 a 5 dias.

Os transformantes de leveduras foram selecionados em Meio mínimo para *Saccharomyces cerevisiae* (YNB sem aminoácidos 0,67%, Dextrose 2%) acrescidos dos devidos aminoácidos: linhagem HD93-15D acrescida de his 3, leu2, ura3; menos

trp1 e a linhagem X2904-3C, acrescida de met1, ura3 menos trp1, sendo que trp1 é a marca de seleção plasmidial.

3.7 - CORTES COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Os cortes com enzimas de restrição foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante (GIBCO-BRL).

Enzima	Código
SaII	15217-029
HindIII	15207-020
EcoRV	15425-036
SmaI	15228-034

3.8 - ISOLAMENTO DOS FRAGMENTOS DO GEL

Os fragmentos foram isolados utilizando-se o GFX Gel Band Purification Kit (Amersham-Pharmacia Biotech - 27-9602-01).

3.9 - LIGAÇÃO FRAGMENTO/ VETOR

As ligações dos fragmentos aos vetores de clonagem foram feitas com T4 DNA ligase (15224-017 - GIBCO-BRL) seguindo as instruções do fabricante. As quantidades do vetor e fragmento (1:5) utilizadas nas ligações foram padronizadas em todo trabalho respeitando as quantidades equimolares de acordo com Sambrook et al., 1989.

3.10 - CORRIDA EM GEL DE AGAROSE

Todos os cortes e ligações foram avaliados utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v). Todos os geis de agarose feitos durante o trabalho utilizaram tampão de corrida TBE, e submetidos a 3 V/cm e em seguida corados com brometo de etídio e fotografados.

3.11 - ELETROFORESE DE PROTEÍNAS TOTAIS (SDS-PAGE)

Preparo das amostras, eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) vertical e coloração com prata, foram realizados de acordo com Gomes et al.(2000). Padrão de peso molecular utilizado (Pharmacia-LMW - COD. 17-0446-01)

3.12 - ANÁLISE DE AÇUCARES REDUTORES

A análise de açúcares redutores foi realizada pela metodologia de Somogii e Nelson descrita em Laguna (1986).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Linhagens de microrganismos industriais, geralmente apresentam propriedades morfológicas e fisiológicas muito parecidas, o que dificulta sua identificação. Variações morfológicas obtidas por mutação, que pudessem contribuir para a identificação de linhagens, geralmente estão associadas a alterações fisiológicas, o que dificilmente resulta em propriedades favoráveis ao desempenho industrial.

Dentre os fungos industriais, linhagens da levedura *S. cerevisiae* são praticamente indistinguíveis morfolologicamente e apresentam também morfologia similar a outras espécies, assim tornando muito difícil sua identificação visual. Os teste bioquímicos padrão para estudos de classificação sistemática, não distinguem linhagens e nem sempre permitem distinguir espécies com facilidade. A identificação de espécies é trabalhosa, exigindo especialistas experientes (Van Vuuren & Van Der Meer, 1988; Hall, 1971; Lin, 1975 e Oliveira & Pagnocca, 1988), principalmente devido a baixa repetibilidade de resultados, causada por variações ambientais nos testes bioquímicos, o que demanda tempo muito longo para a análise, além de custos elevados (Eguchi et al., 1991). Por esta razão, necessita-se de métodos rápidos e de preferência que permitam uma fácil identificação visual, sendo importante que possibilitem detectar variantes, ou leveduras contaminantes na indústria, quando

ainda estão presentes em baixa frequência, ou seja, antes que possam interferir negativamente no processo, com prejuízos para o desempenho industrial.

O uso de marcadores genéticos apresenta-se como o recurso mais eficiente para distinguir leveduras industriais, com vantagens em relação a outros métodos sujeitos a variação ambiental. No caso de genes de resistência a inibidores do crescimento, contaminantes podem ser eliminados simplesmente adicionando-se o inibidor ao meio de fermentação, como no processo de fermentação alcoólica desenvolvido por Tavares (1995), que utiliza a nistatina, um antimicótico de amplo espectro. O gene de resistência ao herbicida metolachlor utilizado por Echeverrigaray et al. (1999), apresenta também potencial de uso aplicado.

Dentre os marcadores que conferem propriedades de fácil visualização, estão aqueles que mudam a coloração de colônias, propriedades que tem sido aproveitadas em experimentos de clonagem e estudo de expressão gênica, como o gene *GFP* que se expressa na proteína fluorescente verde de *Aequoria victoria*. Este gene tem sido utilizado nos mais diversos organismos, desde bactérias à mamíferos, com resultados excelentes no estudo de expressão de genes e promotores (Yang et al., 1996). Entretanto, a sua utilização em leveduras industriais ainda não foi testada, mas como se pode inferir, o seu uso industrial somente poderia ser viabilizado desde que a síntese da proteína fluorescente não interferisse no processo fermentativo.

Para a realização deste trabalho, o gene *GFP3* obtido por Cormack et al. (1997) e otimizado para a expressão em leveduras, foi-nos cedido clonado no plasmídio pYEGFP3. Esta colaboração permitiu obter progressos, visto que trabalhando com outros genes para a síntese da proteína *GFP*, não se obtinha

intensidade de fluorescência que permitisse segurança na identificação de leveduras transformadas.

O promotor adequado ao objetivo de evitar que a expressão da proteína fluorescente prejudicasse ao processo fermentativo, deveria regular a expressão da proteína *GFP3* de modo que não fosse constitutiva, para evitar gastos de energia relacionados a sua síntese, mas que possibilitasse a alta expressão do gene *GFP3* sob condições controladas.

Dentre os vários promotores de levedura, selecionou-se o promotor do gene *ADH2*, que apresenta alta expressão sob condições de baixas concentrações de glicose no meio, conforme demonstraram Beier & Young (1985).

Outro requisito importante seria empregar um vetor de clonagem com as características de bi-funcionalidade, ou seja, a capacidade de replicação tanto em *E.coli* como em *Sacharomyces cerevisiae*, conter genes marcadores para a seleção nestas duas espécies e o promotor de *ADH2*. Para isso, utilizamos o plasmídio pYADE4 construído por Brunelli & Pall (1993), derivado de pUC19 e que apresentava as características exigidas para a futura construção do vetor adequado.

Durante a fase de construção do vetor de clonagem, foi também utilizado o plasmídio Bluescript SKm, o que possibilitou solucionar o problema que impedia a ligação direta do gene *GFP3* a ser transferido do plasmídio pYEGFP3 para o plasmídio pYADE4, devido à inversão no quadro de leitura do gene *GFP3* em relação ao promotor de *ADH2*. Com esta finalidade, células competentes da linhagem da bactéria *E. coli* DH5 α foram transformadas com o plasmídio Bluescript SKm (2964 bps) (Figura 1) e espalhadas sobre placas de Petri contendo o meio seletivo 3,

adaptado de Sambrook et al. (1989), durante 15 horas depois de incubadas a 37°C, isolando-se as células que cresceram na presença de ampicilina. Este procedimento foi utilizado para amplificar a quantidade de plasmídeo e foi repetido em todo o trabalho na amplificação dos os plasmídios (Sambrook et al., 1989).

No caso específico do plasmídeo pYEGFP3 (3404 bps), cujo mapa se apresenta na Figura 2, as células transformadas foram espalhadas em meio seletivo 1 e após 15 horas incubadas a 37°C, quando então as colônias crescidas foram observadas em transiluminador de U.V. (Figura 3). As colônias que apresentavam coloração verde fluorescente foram isoladas e estriadas em meio seletivo 1, descartando-se as colônias não fluorescentes, que apareceram na proporção de 4:1 (normais:verde fluorescentes).

As células transformadas com os plasmídios Bluescript SKm e pYEGFP3, foram inoculadas separadamente em 30 ml de meio seletivo 3 líquido e colocadas em agitador a 150 rpm e 37°C por 15 horas, após o que, 15ml da cultura foi utilizado para o isolamento de plasmídeo e os 15 ml restantes foram misturados com o mesmo volume de solução de glicerol 30%, dividido em alíquotas de 1 ml em microtubos de 1,5 ml e estocadas em freezer -80°C.

Figura 1 - Mapa de restrição do vetor Bluescript SKm

Figura 2 - Mapa de restrição do vetor PYEGFP3

Figura 3 - Células transformadas com o plasmídeo pYEGFP3 e observadas sob um transiluminador de U.V. As células que apresentavam coloração verde fluorescente são as que apresentam o plasmídeo com o inserto da *GFP3*.

Os plasmídios isolados anteriormente pelo método adaptado de Sambrook et al. (1989) foram utilizados para a construção de um vetor que expressasse o gene *GFP3* (736 bps) em levedura. Primeiramente, retirou-se o fragmento contendo o gene *GFP3* do plasmídeo pYEGFP3, com as enzimas Sall e HindIII (Figura 4). Após o corte, o fragmento foi separado em gel de agarose do restante do plasmídeo e em seguida, foi extraído do gel com o GFX Gel Band Purification Kit. Este mesmo procedimento foi utilizado em todos os casos de isolamento de fragmento do gel.

Figura 4 - Gel de agarose 1% para isolamento do fragmento da *GFP3* onde:
P= Padrão 500pb DNA Ladder GIBCO-BRL Cod.10594-018; A = pYEGFP3 cortado com HindIII; B = pYEGFP3 cortado com HindIII/SalI para a liberação do fragmento da *GFP3* e C = pYEGFP3 íntegro.

O fragmento purificado foi ligado ao plasmídio Bluescript SKm, que havia sido cortado para sua linearização com as mesmas enzimas utilizadas na retirada do fragmento com *GFP3* (Sall e HindIII). Esta construção deu origem a um novo vetor, que denominamos BSK*GFP3* (3685 bps) (figura 5).

Figura 5 - Mapa de restrição do Vetor BSK*GFP3*.

O vetor *BSKGFP3* foi utilizado para transformar novamente as células competentes da linhagem de bactéria *E. coli* DH5 α e em seguida, espalhado em placas de Petri contendo meio seletivo 1. Após 15 horas, as células crescidas foram observadas sob um transiluminador de U.V e as colônias verdes fluorescentes isoladas e transferidas, na forma de estrias, para novas placas de Petri contendo o meio seletivo1 (Figura 6), neste caso tivemos uma proporção de colônias verdes fluorescentes e colônias brancas de 1:3.

Figura 6 – Células de bactéria DH5 α transformadas com o plasmídeo *BSKGFP3* e observadas sob um transiluminador de U.V. As células apresentam coloração verde fluorescente .

De células transformantes com o vetor BSKGFP3, isolou-se o plasmídio que foi cortado com as enzimas Sall e EcoRV., para a liberação do fragmento de GFP3. O fragmento foi separado em gel de agarose como descrito anteriormente, para ser ligado ao vetor pYADE4 (Figura 7), linearizado previamente com as enzimas Sall e SmaI. Esta ligação somente foi possível porque as enzimas SmaI e EcoRV apresentam terminais coesivos, de acordo com Sambrook et al. (1989).

Figura 7 – Mapa de restrição do vetor pYADE4

Após a ligação do plasmídio pYADE4 (6037 bps) com o fragmento do gene *GFP3*, novamente este produto da ligação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . As células transformadas foram espalhadas em meio seletivo 1 e após 15 horas incubadas a 37⁰C, isoladas as células brancas na forma de estria e as células azuis descartadas. Do total de 5 placas, nas quais foram espalhadas as células transformantes, 40 colônias que apresentaram coloração branca foram isoladas (Figura 8).

Figura 8 – Células de bactéria DH5 α transformadas com o vetor pYGFP3, **B**= células brancas resistentes a ampicilina contendo o vetor com o inserto e **A**= células azuis, resistentes a ampicilina contendo o vetor mas sem o inserto.

Como o promotor *ADH2* do vetor pYADE4 é um promotor de levedura e portanto não se expressa em bactérias, não se podia avaliar se o gene *GFP3* estava funcional. O recurso empregado para isso foi separar as células brancas das células azuis, pois as células azuis com certeza indicavam que não houve a inserção do fragmento. Isto foi inferido pelo fato de que estando o "polylinker" dentro do gene para a enzima β -galactosidase, e mesmo na presença do reagente cromogênico XGAL, ficou azulada, demonstrando assim que o gene não estava rompido. Já no caso das células brancas, havia indícios de que houve ligação, pois estando rompido o gene da enzima β -galactosidase, não se produzia a cor azul. Este novo vetor foi nomeado pYGFP3 (6740bps) (Figura 9).

Figura 9 - Mapa de restrição do Vetor pYGFP3

Para confirmar se o fragmento de *GFP3* estava corretamente ligado ao vetor foi realizado o isolamento do plasmídio de 40 colônias brancas e o mesmo cortado com as enzimas *SalI* e *SmaI*, para verificar se ocorria a liberação do fragmento de *GFP3*.

Após a corrida em gel de agarose 1%, observou-se que 26 colônias apresentavam corretamente a liberação do fragmento e que as demais 14 colônias isoladas apresentavam uma dupla inserção do fragmento de *GFP3*, ou inserção de pedaços menores, tanto do fragmento, como do próprio plasmídio.

Dentre as 26 colônias que apresentavam o vetor com o gene *GFP3* inserido corretamente, a colônia 3 foi escolhida aleatoriamente, seu plasmídio isolado e utilizado para a transformação de leveduras, para fins de verificação de funcionalidade do gene *GFP3* sob o controle do promotor de *ADH2*.

O vetor isolado da bactéria foi utilizado na transformação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* HD 93-15D, de acordo com o método proposto por Dohmen et al. (1991), sendo os transformantes isolados do meio YNB sem *trp1*, após 72 horas de incubação a 30°C. O mesmo procedimento foi feito para linhagem de *Saccharomyces. Cerevisiae* X2904-3C. Esta linhagem também foi escolhida por apresentar boa capacidade fermentativa e alta velocidade de crescimento, quando comparada a linhagem HD93-15D.

Os transformantes selecionados, foram estriados sobre uma placa de Petri contendo meio mínimo para *Saccharomyces cerevisiae* YNB, juntamente com a levedura normal não transformada (Figura 10).

Figura 10 - Placa de Petri com YNB onde foram estriadas a levedura normal na parte superior e as duas leveduras transformadas contendo o vetor pYGF3, HD93-15D ao centro e X2904-3C na parte inferior da placa.

Uma vez que o gene está ligado ao promotor de *ADH2*, a expressão de *GFP3* somente ocorre em condições de baixa concentração de açúcar, não havendo expressão do gene durante o processo fermentativo, por ser este reprimido por glicose (Beier & Young, 1985).

Como se observa na figura 10, as células transformadas só apresentaram expressão de *GFP3*, depois de 72 horas em que foram estriadas no meio sólido com 2% de glicose, provavelmente porque após este período, foi consumida quase que totalmente, a glicose do meio devido ao crescimento celular.

Todos os procedimentos anteriores, para a construção do vetor pY*GFP3*, foram repetidos com uma única alteração no método de isolamento de plasmídios, no qual foi utilizado o KIT Concert High Purity Plasmid Miniprep System (GIBCO-BRL- 11449-014), ao invés do método adaptado de Sambrock et al. (1989). Com esta alteração, todos os procedimentos como: cortes com enzimas de restrição, corrida em gel de agarose, ligação fragmento/vetor e transformação, foram muito mais eficientes, devido a grande pureza apresentada pelos plasmídios isolados com o Kit, ao ser comparado em relação ao método adaptado de Sambrock et al. (1989), provavelmente devido ao preparo das soluções com reagentes de menor pureza.

Para testar se realmente o controle do promotor de *ADH2* permitiria expressar o gene *GFP* somente durante a fase de baixa concentração de glicose em processos fermentativos, células da linhagem transformante X2904-3C foram multiplicadas em meio YEDP com 3% de sacarose, sob alimentação constante para que o teor de sacarose fosse mantido acima de 1%, evitando assim que houvesse a expressão do gene antes do início dos teste de fermentação.

Esta multiplicação foi feita até se conseguir uma massa fresca de 20g de células, para que os testes de fermentação pudessem ser feitos com 20g para 180 ml de meio de fermentação, simulando uma situação de 10% de células como ocorre na indústria.

Realizaram-se três fermentações consecutivas, com reutilização das mesmas células e cada ciclo de fermentação durou 18 horas, sob temperatura controlada de 30°C. A terceira fermentação foi escolhida para a realização dos testes, pois necessitava-se de um período de adaptação das células às condições de fermentação.

As amostras retiradas a cada 2 horas foram centrifugadas e tanto o meio quanto as células, foram congelados em freezer - 80°C.

As células coletadas foram preparadas para eletroforese SDS-PAGE, seguindo ao protocolo utilizado anteriormente por Gomes et al.(1995). Como os testes de fermentação foram iniciados com 20% de sacarose, as amostras das duas primeiras horas foram descartadas devido ao elevado teor de sacarose e os resultados obtidos para as sete amostras restantes podem ser visualizados na Figura 11.

Figura 11 – SDS-PAGE onde da esquerda para a direita temos : P= padrão; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7= amostras retiradas com 6, 12, 15, 16, 17, 18 e 19 horas de fermentação respectivamente; *GFP*= foi isolada das células transformantes (na altura de 30 kDa) e 8= amostra com 24 horas fermentação.

Como se observa na Figura 11, nas amostras de 1 a 6 isoladas para a eletroforese, não houve a expressão da proteína *GFP3* e mesmo na amostra 8, com 24 horas após o início da fermentação, não se observa a presença da proteína no extrato celular. Uma amostra de 100µL de cada tempo foi retirada do ensaio de fermentação, sendo espalhada em meio YEDP com 2% de glicose e após 48 horas de incubação a 30°C, verificando-se que as células expressaram normalmente a proteína *GFP3*. Isso indica que o promotor somente se expressa em baixo teor de glicose, indicando que o uso do gene *GFP3* poderia ser excelente recurso para identificar leveduras melhoradas na presença de leveduras contaminantes em processos fermentativos. Comprovando-se que a sua expressão não ocorre durante o processo, não seria esperado que fossem causados prejuízos ao processo.

A amostra denominada "GFP" no gel de agarose, foi preparada crescendo-se as células da linhagem X2904-3C transformada com o plasmídeo pYGFP3 em YEPD líquido por 48 horas. Após este período, foi preparada para eletroforese e nesta amostra, foi verificado o aparecimento de uma banda com 30 kDA, com resultados semelhantes àqueles descritos por Dopf & Horiagon (1996). Devido a alta expressão e solubilidade da proteína *GFP3*, as bandas relativas às proteínas estruturais ou funcionais da levedura, expressadas nas outras canaletas da Figura 11, não aparecem nesta amostra. Isto ocorreu supostamente devido a impossibilidade de serem solubilizadas no meio já saturado pela proteína *GFP3*, consequentemente sendo carregadas durante a centrifugação junto com o debris de células, fato que ocorre quando há uma proteína em excesso em relação às demais (Alfenas, 1998).

Durante o processo de extração das proteínas celulares, pelo método de preparo das amostras para eletroforese que utiliza N_2 líquido, descrito por Gomes et al. (1995), as diferenças entre as células que expressam *GFP3* e a que não expressam são visíveis desde que as células são maceradas e quando são observadas em transiluminador de U.V., a diferença entre elas se torna indiscutível, conforme se pode verificar na Figura 12.

Figura 12 - Amostras de leveduras transformantes (X2904-3C) com o plasmídeo *pYGFP3*, preparadas para eletroforese e observadas sob um transiluminador de U.V. Da esquerda para direita temos: amostra com a expressão da *GFP* e sem a expressão da *GFP*.

Observa-se ainda na Figura 11, que falta de expressão da proteína *GFP3* nas amostras 6, 7 e 8, correspondentes ao final de fermentação, são indicadoras de que o açúcar deixou de ser totalmente consumido, restando um teor de açúcar maior que 0,1% , onde o promotor de *ADH2* deixa de ser reprimido e/ou também porque, de

acordo com Beier & Young, (1985), quando a célula de levedura é obrigada a utilizar o etanol como fonte de carbono, ocorre uma super expressão da enzima *ADH2*.

Estas observações e inferências foram posteriormente objeto de confirmação, ao se realizar a análise de açúcar das amostras de fermentação coletadas em vários períodos para o ensaio de eletroforese, cujos dados são apresentados na Tabela 1. Verifica-se que a levedura realmente não foi capaz de consumir totalmente o açúcar presente no meio (inicial 20%), deixando um açúcar residual de 1,67%, suficiente para produzir a inibição da expressão do promotor *ADH2* e consequentemente, a síntese da proteína *GFP3*.

Tabela 1 - Análise da % de açúcar nas amostras coletadas no ensaio de fermentação

Tempo em Horas	%ART (Açúcares Redutores ToTais)
0	19,40
2	18,60
4	15,22
6	13,45
8	10,82
10	8,28
11	6,93
12	3,47
13	1,90
14	1,88
15	1,67
16	1,67
17	1,67
18	1,67
19	1,67
24	1,67

Com o intuito de reconfirmar os dados obtidos, foi realizado um ensaio de crescimento das células de X2904-3C transformadas, em meio YEDP com 1% de

glicose e 4% de etanol, sob temperatura de 30⁰C e com agitação constante de 150 rpm. Após 24 horas de crescimento, não observamos manifestação de fluorescência. Contudo, após 48 horas o meio evidenciava a cor amarela característica da expressão de *GFP3*, com fluorescência confirmada após exposição à luz UV. O aspecto das células transformadas, quando comparado ao crescimento das células normais pode ser observado na Figura 13. Comprovou-se também neste ensaio que realmente o etanol é um indutor de expressão da *ADH2* e não um inibidor.

Thatcher et al.(1998) também utilizaram a *GFP* ligada a um promotor com repressão catabólica, ligado ao desenvolvimento larval de *Caenorbditis elegans* e conseguiram monitorar a expressão dos genes no momento da expressão através de visualização da fluorescência da *GFP*., como pôde ser realizado neste trabalho.

Figura 13- 1= células transformadas de X2904-3C em meio YEDP com 1% de glicose e 4% de etanol; 2= células não transformadas de X2904-3C em meio YEDP com 1% de glicose e 4% de etanol.

Quando os transformantes foram testados em placas de Petri contendo YPGE , devido a lentidão de crescimento das células neste meio e obtenção de pequena massa celular, também a expressão de *GFP3* foi pouco pronunciada, possivelmente indicando que houve baixa síntese da proteína causada por fatores ignorados.

As duas amostras que aparecem na Figura 13, foram misturadas em proporções iguais e observadas em microscópio de fluorescência, com o objetivo de avaliar com precisão quanto a possibilidade de distinguir as células transformadas das não transformadas. Com o aumento de 200 X e diluindo a mostra 10^{-4} foi possível distinguir com clareza as células transformadas das não transformadas, como se

verifica na Figura 14. Esta análise demonstra que o gene *GFP3* pode ser utilizado com segurança para fins de identificação de leveduras industriais e o controle de leveduras contaminantes em processos fermentativos.

Para a avaliação da estabilidade dos transformantes, ao longo duas semanas as linhagens transformadas foram repicadas diariamente, na forma de estrias, em placa de Petri contendo meio YEPD com 1% de glicose e observadas quanto ao eventual aparecimento de células não fluorescentes. Neste período, não houve o aparecimento de colônias sem o vetor, pois todas apresentavam fluorescência verde sob a luz ultravioleta, indicando a boa estabilidade do vetor na levedura transformada, um resultado que foi também obtido por Wehner & Brendel (1993).

Figura 14-Amostra de células transformadas e não transformadas misturadas em proporções iguais e observadas em microscópio de fluorescência com o aumento de 200 X e diluição de 10^{-4} .

5 - CONCLUSÕES

A levedura transformada com o plasmídeo pY*GFP3* apresenta expressão do gene *GFP* somente em condições de baixo teor de glicose, não sendo detectada a expressão basal, o que demonstra que a construção do vetor utilizando o promotor do gene *ADK2*, atendeu às premissas deste trabalho.

Leveduras transformadas com o vetor pY*GFP3* torna viável monitorar fermentações, ou o cultivo aeróbio de leveduras, já que a fluorescência é indicadora do teor de açúcar, pois a *GFP3* somente se expressa quando os teores de açúcar estão abaixo de 0,1 %, eventualmente podendo também, substituir os métodos químicos de análise de açúcar de menor precisão.

Leveduras transformadas com o vetor pY*GFP3* permitem que seja monitorada a presença de leveduras contaminantes, bem como de outras linhagens de leveduras da mesma espécie, mesmo em misturas de células, através de simples observação microscópica de amostras sob luz UV, ou em meio sólido com baixa concentração de açúcar.

Esta construção e outras utilizando o gene *GFP* poderão cotribuir para outros estudos aplicados à leveduras industriais, de cervejarias, panificação, produção de vinhos, de etanol e biomassa, visto que é desnecessária qualquer modificação do seu patrimônio genético.

6 - BIBLIOGRAFIA CITADA

ALFENAS, A. C. (Ed.) **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: Editore UFV, 1998. 574p.

AMSTERDAM, A.; LIN, S.; MOSS, L.; HOPKINS, N. Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos. **Gene**, v.173, p. 99-103, 1996.

BALDARI, C.; CESARENI, G. Plasmids pEMBL Y: new single-stranded vectors for the recovery and analysis of yeast DNA sequences. **Gene**, v.35, p.27-32, 1985.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification.** Cambridge, C.U.Press, 1986.

BARR, F.A.; NAKAMURA, N.; WARREN, G. mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. **EMBO Journal**, v. 17, n.12, p.3258-3268, 1998.

BEIER, D.R. & YOUNG, E.T. **Molecular and Cellular Biology**, v.5, p.1743-1749, 1985.

BENDO VÁ, O.; RICHTER, V.; JANDERO VÁ, B.; HAÜSLER, J. Identification of industrial yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, **35**:810-2, 1991.

BLOEMBERG, G.V.; O'TOOLE, G.A.; LUGTENBERG, B.J.J.; KOLTER, R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.11, p.4543-4551, 1997.

BRADSHAW, V.A. & McENTEE, K. DNA damage activates transcription and transposition of yeast Ty retrotransposons. **Molecular and General Genetics**, v.218, p.465-474, 1989.

BRUNELLI, J.P.; PALL, M.L. A series of yeast/ *Escherichia coli* λ expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and *cre/lox*-mediated plasmid excision. **Yeast**, v.9, p.1309-1318, 1993.

CARLE, G.F.; OLSON, M.V. An electrophoretic karyotype for yeast. **Proceedures of the National Academy of Science - USA**, v. 82, p. 3756-60, 1985.

CASEY, G. P.; XIAO, W.; RANK, G. H. A convenient dominant selection marker for gene transfer in industrial strains of *Saccharomyces* yeast: *SMR1* encoded resistance to the herbicide sulfometuron metil. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 94, p. 93-97, 1988.

CASEY, G.P.; XIAO, W.; RANK, G.H. Application of pulsed field chromosome electrophoresis in the study of chromosome XIII and the electrophoretic karyotype of industrial strains of *Saccharomyces* yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 94, p. 239-43, 1988.

CASPER, S. & HOLT, C. Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from tobacco mosaic virus-based vector. **Gene**, v. 173, p.69-73, 1996

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v.293, p. 802-805, 1994.

CHAN, V.& SMITH, M. In vitro generation of specific deletions in DNA cloned in M13 vectors using synthetic oligodeoxyribonucleotides: mutants in the 5'-flanking region of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. **Nucleic Acids Research**, v/12, n.5, p.2407-2419.

CORMACK, B.P.; BERTRAM, G.; EGETON, M.; GOW, N.A.R.; FALKOW, S.; BROWN, A.J.P. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a

reporter of gene expression in *Candida albicans*. **Microbiology** , v.143, p.303-311, 1997.

DEAK, T.; BEUCHAT, L.R. Identification of food-borne yeasts. **Journal of Food Protection**, v.50, p. 243-64, 1987.

DENIS, C.L. The effects of ADR1 and CCR1 gene dosage on the regulation of the glucose-repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics**, v. 208, p.101-6, 1987.

DENIS, C.L. Identification of new genes involved in the regulation of alcohol deshydrogenase II. **Genetics**, v. 108, p. 833-844, 1984.

DENIS, C.L. & MALVAR, T. The CCR4 gene from *Saccharomyces cerevisiae* is required for both nonfermentative and spt-mediated gene expression. **Genetics**, v. 124, p. 283-291, 1990.

DOHMEN, R. J., STRASSER, A. W. M.; HONER , C.B.; HOLLENBERG, C.P. An efficient transformatio procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. **Yeast**, v.7, p. 691-692, 1991.

DOPF, J.; HORIAGON, T.M. Deletion mapping of the *Aquorea victoria* green fluorescent protein. **Gene**, v. 173, p. 39-44, 1996.

ECHEVERRIGARAY, S.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Isolation and characterization of Metolachlor-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p.679-681, 1999.

EGUCHI,S.Y.; CASTRO,M.M.S.; MECATE, G.M. 1991. **Manual de identificação de leveduras**. 32pp. Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello", Campinas, SP.

ENENKEL, C.; LEHMANN, A.; KLOETZEL, P.M. *GFP*-labeling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. **Molecular Biology Reports**, v. 26, n.1-2, p. 131-135, 1999.

EPEL, B.; PADGETT, H.; HEINLEIN, M.; BEACHY, R. Plant virus movement protein dynamics probed with a *GFP*-protein fusion. **Gene**, v. 173, p. 75-79, 1996

FOGEL, S. & WELSH, J. W. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.** v. 79, p. 5342-5346, 1982.

GIETZ, D.; JEAN, A. St.; WOODS, R.A.; SCHIESTL, R.H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.6, p.1425-1429, 1992.

GIETZ, D.; SCHIESTL, R.H. Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. **Yeast**, v.7, p.253-263, 1991.

GIETZ, D.; SUGINO, A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. **Gene**, v.74, p.527-534, 1988.

GOMES, L.H. Avaliação de quatro métodos para caracterização de leveduras. Piracicaba, 1995. (Mestrado – ESALQ/USP) 89 p.

GOMES, L.H.; DUARTE, K.M.R.; ARGUESO, J.L.; ECHEVERRIGARAY, S.; TAVARES, F.C.A. Methods for yeast characterization from industrial products. **Food Microbiology**, 2000/ No prelo/.

GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. Proton magnetic resonance spectroscopy, an aid in identification and chemotaxonomy of yeasts. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, 13:25-89, 1970.

- GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em leveduras de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, **47**:597-608, 1990.
- GRITZ, L. & DAVIES, J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 25, p. 179-188, 1983
- HADFIELD, C.; CASHMORE, A. M.; MEACOCK, P. A. An efficient chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. **Gene**, v. 45, p. 149-158, 1986.
- HADFIELD, C.; RAINA, K. K.; SHASHI-MENON, K.; MOUNT, R. C. The expression and performance of cloned genes in yeasts. **Mycological Research**, v. 97, p. 897-944, 1993.
- HALL, J.F. Detection of wild yeasts in the brewery. **Journal of the Institute of Brewing**, v.77, p. 513-6, 1971.
- HENDERSON, R. C. A.; COX, B. S.; TUBB, R. The transformation of brewing yeast with a plasmid containing the gene for copper resistance. **Current Genetics**, v. 8, p. 133-138, 1985.
- HANSEN, E.C. Undersøgelser over alkoholgærsvam penes fysiologi og morfologi VII Om Alkoholgærsvam penes Forhold til Sukkerterm

Meddeleser fra Calsberg Laboratoriet 2:220-56 IN: Rose A.H and Harrison J.S.(eds) **The Yeasts** (1987) vol I: 5-61, Acad. Press Inc. Ltd., London.

HEGEMANN, J.H.; KLEIN, S.; HECK, S.; GULDENER, U.; NIEDENTHAL, R.K.; FLEIG, U. A fast method to diagnose chromosome and plasmid loss in *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Yeast**, v.15, p.1009-1019, 1999.

HILL, J.E.; MYERS, A.M.; KOERNER, T.J.; TZAGOLOFF, A. A yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. **Yeast**, v.2, p.163-168, 1986.

HINNEN, A.; HICKS, J.B.; FINK, G.R.; Transformation of yeast. **Proceedures of the National Academy of Science (USA)**,v. 75, p.1929-1933, 1978.

JIMENEZ, A. & DAVIES, J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. **Nature**, v. 287, p. 869-871, 1980.

KAHANA, J.; SCHAPP, B.; SILVER, P. Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.9707-9711, 1995.

KAHANA, J. & Silver ,P. **Current Protocols in Molecular Biology**, p.9.7.22 – 9.7.28, 1996.

- KARNITZ, L.; MORRISON, M.; YOUNG, E.T. Identification and characterization of three genes that affects expression of *ADH2* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 132, p. 351-359, 1992.
- KILIAN, S.G.; DEEMTER, A.; KOCK, J.L.F.; PREEZ, J.C. Occurrence and taxonomic aspect of proton movements coupled to sugar transport in the yeast genus *Kluyveromyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, **59**:199-206, 1991.
- KJE-NIELSEN, L.; TEASDALE, R.D.; VLIET, C. van; GLEESON, P.A.; VAN VLIET, C. A novel Golgi-localisation domain shared by a class of coiled-coil peripheral membrane proteins. **Current Biology**, v.9, n.7, p.385-388, 1999.
- KNIGHT, A.W.; GODDARD, N.J.; FIELDEN, P.R.; BARKER, M.G.; BILLINTON, N.; WALMSLEY, R.M. Development of a flow-through detector for monitoring genotoxic compounds by quantifying the expression of green fluorescent protein in genetically modified yeast cells. **Measurements in Science and Technology**, v. 10, p. 211-217, 1999.
- KREGER-VANRIJ, N.J.W. 1987, Classification of yeasts. In: ROSE A.H AND HARRISON J.S.(eds) **The Yeasts** (1987) vol I:5-61, Acad. Press Inc. Ltd., London.

KURSTMAN, C.P. & PHAFF, H.J. Molecular taxonomy. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S., ed. **The yeasts**. London, Academic Press, 1987. v.1, p.63-94.

LAGUNA, S.E. Genética e melhoramento de leveduras para a bioconversão de extratos de *Helianthus tuberosus* L.. Piracicaba, 1986. 173p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

LEHMANN, P.F.; LIN, D.; LASKER, B.A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, **30**(12): 3249-54, 1992.

LIM, C.; KIMATA, K.; OKA, M.; NOMAGUCHI, K.; KOHNO, K. Thermosensitivity of a green fluorescent protein utilized to reveal novel nuclear-like compartments. **Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 13-17, 1995.

LIN, Y. Detection of wild yeast in the brewer efficiency of differential measured. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 81, p. 410-7, 1975.

LIN, C.C.S.; FUNG, O.Y.C. Conventional and rapid methods for yeast identification. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 14, p. 273-89, 1987.

MANDEL M.& HIGA, A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection.
Journal of Molecular Biology, v.53, p.154, 1970.

MEADEN, P. DNA fingerprinting of brewer yeast: current perspectives. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, p. 195-200, 1989.

MILLER, J.H. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1972.

MILLER, R. & GALSTON, G. Rapid methods for the detection of yeast and Lactobacillus by ATP bioluminescence. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **95**:317-9, 1989.

MILLER, R.K.; MATHEOS, D.; ROSE, M.D. The cortical localization of the microtubule orientation protein, Kar9p, is dependent upon actin and proteins required for polarization. **Journal of Cell Biology**, v. 144, n.5, p. 963-975, 1999.

MILLER, R.K.; ROSE, M.D. Kar9p is a novel cortical protein required of cytoplasmatic microtubule orientation in yeast. **Journal of Cell Biology**, v.140, n.2, p.377-390, 1998.

MORIN, J. & HASTINGS, J. Energy transfer in a bioluminescent system. **Journal of Cell Physiology**, v.77, p.313-318, 1971.

MOSER, M.J.; FLORY, M.R.; DAVIS, T.N. Calmodulin localizes to the spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* and performs an essential function in chromosome segregation. **Journal of Cell Biology**, v. 110, p.1805-1812, 1997.

OLIVEIRA, M.C.F.; PAGNOCCA, F.C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira a detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcooleiras. In: Simpósio Nacional de Fermentações, **Anais**, SBM, 8:78-81, São Lourenço, MG., 1988.

PARENT, S.A.; FENIMORE, C.M.; BOSTIAN, K.A. Vectors systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequences in *S. cerevisiae*. **Yeast**, v.1, p.83-138, 1985.

POETA, M. del; TOFFALETTI, D.L.; RUDE, T.H.; SPARKS, S.D.; HEITAM, J.; PERFECT, J.R.; DEL POETA, M. *Cryptococcus neoformans* differential gene expression detected in vitro and in vivo with green fluorescent protein. **Infection and Immunity**, v. 67, n.4, p.1812-1820, 1999.

SAWIN, K.E.; NURSE, P. Regulation of cell polarity by microtubules in fission yeast. **Journal of Cell Biology**, v.142, n.2, p.457-471, 1998.

SHEEHAN, C.A.; WEISS, A. Brewing yeast identification and chromosome analysis using high resolution CHEF gel electrophoresis. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 97, p.163-7, 1991.

SIMPSON, W.J.; FERNANDEZ, J.L.; HAMMOND, J.R.M. Differentiation of brewery yeasts using a disc-difusion test. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **98**:33-6, 1992.

STRUHL, K.; STINCHCOMB, D.T.; SCHERER, S.; DAVIS, R.W. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. **Proceedures of the National Academy of Science (USA)**, v. 76, p. 1035-1039, 1979.

TAGUCHI , A. K. W.& YOUNG, E.T. The identification and characterization of ADR6, a gene required for sporulation and for expression of the alcohol dehydrogenase II isozyme from *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 116, p.523-530, 1987a.

TAGUCHI , A. K. W.& YOUNG, E.T. The cloning and mapping of ADR6, a gene required for sporulation and for expression of the alcohol dehydrogenase II isozyme from *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 116, p.531-5340, 1987b.

TAVARES, F.C.A Control of spoilage yeasts in fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, v.17, p.11 21-1126, 1995.

- TAVARES, F.C.A; ECHEVERRIGARAY, S.; GOMES, L.H.; SOUBIHE, M.
Identificação molecular de leveduras da fermentação alcoólica. **STAB**,
Piracicaba, **10** (4): 34-9, 1992.
- THATCHER, J.D.; HAUN, C.; OKKEMA, P.G. The DAF-3 smad binds DNA
and represses gene expression in the *Caenorbditis elegans* pharynx.
Development, v.126, n.1, p. 97-107, 1999.
- TSUCHIYA,T.; FUKAZAWA.Y.; KAWARITA, S. Significance of serological
studies on yeasts. **Mycologia Applicata**, New York, **26**:1-5, 1965.
- VALDIVIA, R.H.; HROMOCKYJ, A. E.; MONACK, D.; RAMAKRISNAN, L;
FALKOW, S. Applications for green fluorescent protein (*GFP*) in the study
of host-pathogen interactions. **Gene**, v. 173, p.47-52, 1996.
- VAN VUUREN, H.J.J. AND VAN DER MEER, L. Characterization of brewing
yeast strains by numerical analysis of total soluble cell proteins patterns.
Journal of the Institute of Brewing, v. 94, p. 245-8, 1988.
- WALMSLEY, R.M.; BILLINTON, N.; HEYER, W.D. Green fluorescent protein
as a reporter for the DNA damage-induced gene RAD54 in *Saccharomyces*
cerevisiae. **Yeast**, v.13, p. 1535-1545, 1997.

- WANG, S. & HAZELRIGG, T. Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila oogenesis*. **Nature**, v.369, p.400-403, 1994.
- WARD, W. **Photochemical and Photobiological Reviews** (K. Smith, ed.) 1979. Plenum Ny, p.1-57.
- WEBSTER, T. D. & DICKSON, R. C. Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903. **Gene**, v. 26, p. 243-252, 1983.
- WEHNER, E. P. & BRENDDEL, M. Vector YFRp1 allows transformant selection in *Saccharomyces cerevisiae* via resistance to formaldehyde. **Yeast**, v. 9, p. 783-785, 1993.
- YAMADA, Y.; NOJIRI, M.; MATSUYAMA, M.; KONDO, K. Co-enzyme Q system in the classification of the ascoporogenous yeast Genera *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and *Endomycopsis*. **Journal General Applied Microbiology**, Tokyo, **23**:325-39, 1976.
- YANG, F.; MOSS, L.G.; PHILLIPS Jr., G.N. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein <http://www-bioc.rice.edu/Bioch/Phillips/Papers/GFPbio.html> (10 Nov.1999).

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene**, v.33, p.103-119, 1985.

YOSHIMOTO, H.; OHAMAE, M.; YAMASHITA, I. The *Saccharomyces cerevisiae* GAM2/SIN3 protein plays a role in both activation and repression of transcription. **Molecular and General Genetics**, v.233, p.327-330, 1992.