ANDREA BALAN FERNANDES

**SISTEMA SUICIDA
PARA LEVEDURAS BASEADO
NA DEGRADAÇÃO
DO MATERIAL GENÉTICO
VISANDO
BIOSSEGURANÇA**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Ana Clara G. Schenberg

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas, para
Obtenção do título de
Doutor em Microbiologia

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
1998**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Fernandes, Andrea Balan.

Sistema suicida para leveduras baseado na degradação do material genético visando biossegurança / Andrea Balan Fernandes. -- São Paulo, 1999.

Tese(doutorado)—Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Microbiologia .

Área de concentração: Microbiologia.

Linha de pesquisa: Biologia molecular de leveduras.

Orientador: Schenberg, Ana Clara Guerrini.

Versão do título para o inglês: Suicide system for yeast based on the DNA degradation for biosecurity.

Descritores: 1. Nuclease 2. Leveduras, Sistema suicida 3. *Saccharomyces cerevisiae* 4. DNA, Degradação 5. Biossegurança 6. Microorganismos geneticamente modificados

ICB/SBIB/128/98

Candidato(a):

ANDREA BALAN FERNANDES .

Título da Tese:

SISTEMA SUICIDA PARA LEVEDURAS BASEADO NA DEGRADAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO VISANDO BIOSSEGURANÇA.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 09/04/1999, considerou o(a) candidato(a):

(☒) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

1) Examinador(a) Amara

2) Examinador(a) Hand

3) Examinador(a) Rau

4) Examinador(a) Paulo

5) Presidente Elisalt

***À Paola,
Minha maior e melhor
descoberta,***

Ao Marlon, meu grande amor.

AGRADECIMENTOS

Em especial, gostaria de agradecer à minha querida orientadora, Ana Clara, por sua ousadia na criação deste projeto, pela oportunidade que me deu para trabalhar ao seu lado, e pelo exemplo extremamente proveitoso durante todos estes anos.

Aos professores do laboratório Sérgio Olavo Pinto da Costa, Beatriz Fernandes, Gabriel Padilla e Crodowaldo Pavan pela agradável amizade e valiosas sugestões no decorrer deste trabalho.

Ao professor Juarez Braz de Faria por sua imensa companhia, discussões e principalmente colaboração.

Às docentes que participaram do exame de qualificação Vivian Pellizari, Tânia Zucchi e Elisabete José Vicente, pelas sugestões e correções. Em especial às profas. Tânia Zucchi, pela enorme disposição em me ajudar com o ensaio Cometa e a Elisabete, por sua incansável vontade de ajudar.

À professora Luiza Lina Villa, pela produção dos oligonucleotídeos em seu laboratório.

Ao João Renato, pela doação dos plasmídeos e ajuda na elaboração dos oligonucleotídeos.

Ao professor Dr. Michael Benedik, por ceder os plasmídeos com o gene *nuc* e o anticorpo para nuclease, sem os quais este trabalho não seria realizável.

Aos amigos do laboratório Solange, Elza, Heleninha, pela agradável convivência e participação durante todos estes anos, e Denise, por contribuir com a realização da tese.

Aos amigos Léa, Ileana, Maria, Renata L., Bete Sbrogio, Gisele, Seu Antônio, Beatriz, Rita, Luis Carlos, Tatiana, Fátima, Cleofe, Inês, Renata M., Miriam, Nádia, Alexandre, Seu Hisao, Leandro, Marcelo, Quitéria, André, Márcia, Andreinha, Jefferson, Silvia, Gabriela, Gabi, Salete, Sucu, Vanda, Pimenta, Célia, Valéria e muitos outros que passaram pelo laboratório durante estes anos, principalmente pela amizade, e por tornarem o dia-a-dia bem mais divertido e agradável.

Ao pessoal do laboratório da profa. Tânia Zucchi, Nanci e Karen

À Kazui e a Norma pela contínua boa vontade e bom humor.

Aos meus amigos no geral.

À minha mãe, por me ensinar a alegria, pela força que me deu para "experimentar", e ao meu irmão, por seu amor.

E, finalmente,
Ao CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
1.INTRODUÇÃO	1
BRASIL – PANORAMA ATUAL DE BIOSSEGURANÇA.....	2
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. OS OGMs E OS SISTEMAS DE CONTENÇÃO DESTES MICRORGANISMOS.....	5
2.1.1. Os Genes Assassinos em Bactérias.....	9
2.1.2. O DNA como Alvo de Destruição Celular – Nucleases.....	12
2.1.3. O Controle da Expressão Gênica.....	14
2.1.4. Principais Problemas Relacionados aos Sistemas Suicidas.....	15
2.2. SISTEMAS SUICIDAS EM LEVEDURAS.....	17
2.3. A NUCLEASE DE <i>Serratia marcescens</i>	21
2.3.1. Atividade da Enzima e Mecanismo de Ação.....	24
2.3.2. Mecanismos de Secreção.....	29
2.3.3. Regulação da Nuclease em <i>Serratia marcescens</i>	32
2.4. A LEVEDURA <i>S. cerevisiae</i> COMO ORGANISMO HOSPEDEIRO DE GENES HETERÓLOGOS.....	35
2.5. VETORES DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM <i>S. cerevisiae</i>	37
2.6. PROMOTORES UTILIZADOS PARA A EXPRESSÃO EM <i>S.cerevisiae</i>	39
2.7. EXPRESSÃO BASEADA NO PROMOTOR DO GENE DA ÁLCOOL DESIDROGENASE II (<i>ADH2</i>).....	42
2.7.1. Regulação da expressão do gene <i>ADH2</i>	42

2.7.2. Expressão de proteínas heterólogas UAS _{ADH2}	43
2.8. SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS A PARTIR DE FUSÃO GÊNICA.....	44
3. OBJETIVOS.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1. LINHAGENS E PLASMÍDEOS.....	50
4.1.1. Linhagens de Bactérias.....	50
4.1.2. Linhagens de leveduras.....	50
4.1.3. Plasmídeos.....	50
4.2. SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	53
4.2.1. Solução I.....	53
4.2.2. Solução II.....	53
4.2.3. Solução III.....	53
4.2.4. Solução RNAaseA.....	53
4.2.5. Solução LTE.....	53
4.2.6. Solução PLTE.....	53
4.2.7. Solução Salina.....	53
4.2.8. Solução BR.....	53
4.2.9. Solução corante para dosagem de proteínas.....	53
4.2.10. Solução A para SDS-PAGE.....	53
4.2.11. Solução B para SDS-PAGE.....	53
4.2.12. Solução C para SDS-PAGE.....	53
4.2.13. Solução de Persulfato de amônio (APS):.....	53
4.2.14. Solução corante para proteínas.....	54
4.2.15. Solução descorante forte para proteínas.....	54
4.2.16. Solução descorante média para proteínas.....	54
4.2.17. Solução descorante fraca para proteínas.....	54
4.2.18. Solução salina de fosfato (PBS) 0.1 M pH 7.2.....	54
4.2.19. Solução bloqueadora.....	54
4.2.20. Solução de lavagem para Western Blot.....	54

4.2.21. Anticorpo anti-nuclease.....	54
4.2.22. Conjugado.....	54
4.2.23. Solução cromógena para Western Blot.....	54
4.2.24. Normal Melting Agar.....	54
4.2.25. Low Melting Agar.....	54
4.2.26. Solução de Lise para ensaio do Cometa.....	54
4.2.26.1. Solução Ativa.....	54
4.2.27. Solução neutralizante para ensaio do Cometa.....	55
4.2.28. Solução estoque de Brometo de etídio.....	55
4.2.29. Solução de X-GAL.....	55
4.2.30. Solução de IPTG.....	55
4.2.31. Solução de zimolase.....	55
4.3. TAMPÕES.....	55
4.3.1. TE.....	55
4.3.2. STET.....	55
4.3.3. TBE.(10X).....	55
4.3.4. Tampão de Amostra (10X).....	55
4.3.5. Tampão de corrida para SDS-PAGE (10X).....	55
4.3.6. Tampão de amostra.....	55
4.3.7. Tampão de transferência para Western blot.....	55
4.3.8. Tampão Frio para eletroforese – Ensaio Cometa.....	55
4.4. MEIOS DE CULTURA.....	56
4.4.1. Cultivo das Leveduras.....	56
4.4.1.1. Meio completo (YPD).....	56
4.4.1.2. Meio mínimo + glicose (SD).....	56
4.4.1.3. Meio mínimo Asp+Glu (SD1%aspglu) pH 6.0.....	56
4.4.1.4. Meio mínimo (SD1%) tamponado em pH 7.0.....	56
4.4.1.5. Meio mínimo + glicerol (SG).....	56
4.4.1.6. Meio mínimo + rafinose (SR).....	56
4.4.2. Cultivo de Bactérias.....	56
4.4.2.1. Meio Completo LB.....	56
4.4.2.2. Meio YT.....	56

4.4.2.3. Meio Suplementado com antibióticos.....	57
4.4.2.4. Meio SOC.....	57
4.5. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO DE BACTÉRIAS.....	57
4.5.1. Mini-preparação.....	57
4.5.2. Maxi-preparação.....	57
4.6. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO DE LEVEDURA.....	58
4.7. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO DNA EM GEL DE AGAROSE.....	59
4.8. QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	59
4.8.1. Determinação espectrofotométrica.....	59
4.8.2. Quantificação Fluorescente com Brometo de Etídio.....	59
4.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR – “POLIMERASE CHAIN REACTION”) PARA OBTENÇÃO DO FRAGMENTO <i>nuc</i>	60
4.9.1. Preparo da mistura de reação.....	61
4.10. CLIVAGEM DOS PLASMÍDIOS E FRAGMENTOS DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	61
4.11. SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>nuc</i> OBTIDO A PARTIR DE PCR.....	62
4.11.1. Clonagem dos fragmentos dos genes <i>nuc</i> no plasmídeo pUC18.....	62
4.11.2. Detecção dos clones portadores dos fragmentos do gene <i>nuc</i>	63
4.11.3. Reação de sequenciamento.....	63
4.12. REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO FRAGMENTO <i>nuc</i> NO VETOR pBS24Ub.....	63
4.13. ELUIÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GÉIS DE AGAROSE.....	64
4.14. TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. coli</i> POR ELETROPORAÇÃO (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA-USA).....	64
4.14.1. Preparação das células.....	64
4.14.2. Eletro-transformação.....	65

4.15. ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS TRANSFORMANTES DE BACTÉRIA.....	65
4.16. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURAS PELO MÉTODO DE ACETATO DE LÍTIO	66
4.17. PREPARAÇÃO DE PRÉ-INÓCULOS DAS LINHAGENS DE <i>S. cerevisiae</i>	67
4.18. CULTIVO DOS TRANSFORMANTES PARA ANÁLISE RÁPIDA DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM MEIO LÍQUIDO.....	67
4.19. CULTIVO DOS TRANSFORMANTES PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM MEIO SÓLIDO (“DROP TEST”).....	68
4.20. DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NOS MEIOS DE CULTIVO COMPLETO E MÍNIMO.....	68
4.21. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DOS TRANSFORMANTES DE <i>S. cerevisiae</i>	69
4.22. CULTIVO DOS TRANSFORMANTES PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.....	69
4.23. OBTENÇÃO DE EXTRATOS CELULARES DE <i>S. cerevisiae</i>	70
4.23.1. Para dosagem da concentração de proteínas.....	70
4.23.2. Para SDS-PAGE e Western Blot.....	70
4.23.3. Para análise da atividade da nuclease <i>in vitro</i>	71
4.24. PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS DE <i>S. marcescens</i>	71
4.25. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS PAGE.....	72
4.25.1. Preparo do gel de separação.....	72
4.25.2. Preparo do gel de empilhamento.....	72
4.25.3. Coloração para identificação de proteínas.....	73
4.25.4. Secagem.....	73

4.26. "WESTERN BLOT".....	73
4.27. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA <i>nuc</i> EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	74
4.28. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA <i>nuc</i> EM GEL DE AGAROSE.....	75
4.29. ENSAIO DO COMETA.....	75
4.29.1. Obtenção de esferoplastos.....	76
4.29.2. Preparação de Lâminas, Corrida e Coloração.....	76
4.30. INFLUÊNCIA DO Ph NA EXPRESSÃO DA NUCLEASE DE <i>S. marcescens</i> EM <i>S. cerevisiae</i>	77
4.31. PREPARAÇÃO DE MICROCOSMOS – ENSAIO <i>in situ</i>	77
5. RESULTADOS	79
5.1. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pUbNuc VISANDO A EXPRESSÃO DO GENE DA NUCLEASE DE <i>Serratia marcescens</i> NA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
5.1.1. Estratégia de Clonagem.....	79
5.1.2. Desenho e Síntese dos Oligonucleotídeos para Amplificação do Fragmento de DNA Contendo o gene da Nuclease.....	81
5.1.3. Obtenção do Fragmento do Gene <i>nuc</i> de <i>Serratia</i> Através de "PCR".....	82
5.1.4. Ligação do Fragmento do Gene <i>nuc</i> ao Vetor pBS24Ub e Transformação de células de <i>E. coli</i> DH5 α	86
5.2. TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
5.3. INFLUÊNCIA DO Ph NO CRESCIMENTO E EXPRESSÃO DA NUCLEASE DE <i>S. marcescens</i> NA LEVEDURA <i>S. cerevisiae</i>	88
5.4. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE GLICOSE NOS MEIOS DE CULTIVO SD 1% E YPD 2%.....	92
5.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>nuc</i> SOB CONTROLE DO PROMOTOR <i>ADH2/GAPDH</i> EM CULTURAS LÍQUIDAS DE	

<i>S. cerevisiae</i>	94
5.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA NUCLEASE EM MEIO SÓLIDO - "DROP TESTS".....	96
5.7. ANÁLISE DO CRESCIMENTO DOS TRANSFORMANTES EM MEIOS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	99
5.7.1. Ensaio com a linhagem <i>S. cerevisiae</i> JSC302.....	100
5.7.2. Ensaio com a linhagem W303-1B.....	101
5.7.3. Ensaio com as linhagens <i>rad52 S. cerevisiae</i> STX507 e JRY481.....	103
5.8. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DOS TRANSFORMANTES.....	104
5.9. ENSAIO DA ATIVIDADE DA NUCLEASE <i>in vitro</i>	105
5.9.1. Em gel de agarose.....	105
5.9.2. Em espectrofotômetro.....	108
5.10. ESTUDO SOBRE A SITUAÇÃO DO DNA CROMOSSOMAL APÓS A INDUÇÃO DA NUCLEASE NAS LINHAGENS DE <i>S. cerevisiae</i> JSC302 E W303-1B.....	109
5.11. SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS PELAS LINHAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JSC302 E W303-1B.....	113
5.12. IDENTIFICAÇÃO DA NUCLEASE DE <i>Serratia marcescens</i> PELO ANTICORPO POLICLONAL ANTI-nuc POR "WESTERN BLOT".....	114
5.13. SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS DE LEVEDURAS NO AMBIENTE.....	117
5.14. ESTABILIDADE DOS PLASMÍDEOS NO AMBIENTE.....	118
6. DISCUSSÃO	120
6.1. PRIMEIRA PARTE - Construção do Sistema de Expressão da Nuclease de <i>Serratia marcescens</i> em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	121
6.2. SEGUNDA PARTE - Análise da Expressão do Gene <i>nuc</i> e Atividade da Nuclease <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	126
6.3. TERCEIRA PARTE - Expressão da Nuclease de <i>S. marcescens</i> no Ambiente Ensaio de Microcosmos.....	139

7. CONCLUSÕES.....	142
8. PERSPECTIVAS.....	143
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1. Esquema da transferência de DNA livre em ambientes aquáticos e terrestres	8
Figura 2. Estrutura da Nuclease de <i>Serratia marcescens</i> com os resíduos de aminoácidos importantes na catálise.....	22
Figura 3. Regiões conservadas das sequências de várias nucleases relacionadas entre si.....	26
Figura 4. Modelo para o mecanismo de hidrólise das ligações fosfodiéster pela nuclease de <i>Serratia marcescens</i>	28
Figura 5. Localização dos três “Open Reading Frames” relacionados à expressão do gene <i>nuc</i> e suas respectivas funções.....	35
Figura 6. Estrutura e Processamento da prépró-fator α	46
Figura 7. pBGS18-Nuc8.	51
Figura 8. pBS24Ub.....	51
Figura 9. pUbNuc.....	52
Figura 10 pUC18	52
Figura 11. Estratégia de clonagem do gene <i>nuc</i> de <i>Serratia marcescens</i> no plasmídeo pBS24Ub para expressão na levedura <i>S. cerevisiae</i>	80
Figura 12. Oligonucleotídeos sintetizados para amplificação do fragmento do gene da nuclease a partir de PCR.....	82

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 0.8% mostrando a amplificação do gene <i>nuc</i> de <i>Serratia marcescens</i> depois do PCR.....	83
Figura 14. Sequência do gene <i>nuc</i> de <i>Serratia marcescens</i> após a reação de PCR.....	84
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1.0% mostrando o fragmento do gene <i>nuc</i> amplificado por PCR após clivagem com a enzima <i>EcoRV</i>	85
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 0.7%. Análise de restrição dos plasmídeos extraídos dos 7 transformantes de <i>E. coli</i> DH5 α	86
Figura 17. A) Análise da variação do pH em diferentes meios de cultivo; B) influência do pH no crescimento da linhagem <i>S. cerevisiae</i> JSC302.....	89
Figura 18. Ensaio de western blot para análise da influência do pH na expressão da nuclease de <i>S. marcescens</i> nas culturas de <i>S. cerevisiae</i> JSC302.....	91
Figura 19. Ensaio de western blot para análise da influência do pH na expressão da nuclease de <i>S. marcescens</i> nas culturas de <i>S. cerevisiae</i> W303-1B.....	92
Figura 20. Consumo de Glicose em A) meio completo e B) meio mínimo em paralelo ao crescimento celular.....	93
Figura 21. Crescimento dos transformantes em meio completo YPD2% para análise da expressão da nuclease.....	97
Figura 22. Crescimento dos transformantes em meio mínimo SD1% para expressão da nuclease.....	98

Figura 23. Curva de crescimento das linhagens JSC302/pBS24Ub e JSC302/pBS24UbNuc em diferentes meios de cultura: A) YPD2%, B)SD1%, C) SG1% e D)SR2%.....	101
Figura 24. Curva de crescimento das linhagens W303-1B/pBS24Ub e W303-1B/pBS24UbNuc em diferentes meios de cultura: A) YPD2%, B)SD1%, C) SG1% e D)SR2%.....	102
Figura 25. Curva de crescimento das linhagens <i>rad52</i> com o plasmídeo controle e nuc+.....	104
Figura 26. Ensaio <i>in vitro</i> da atividade da nuclease nos extratos celulares da <i>S. cerevisiae</i> JSC302.	106
Figura 27. Ensaio <i>in vitro</i> da atividade da nuclease nos extratos celulares de <i>S. cerevisiae</i> W303-1B.	107
Figura 28. Análise <i>in vitro</i> da atividade da nuclease de extrato celular das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> JSC302 e W303-1B e de sobrenadante de <i>Serratia marcescens</i> sobre DNA plasmidiano.....	108
Figura 29. Teste do Cometa realizado para a linhagem de <i>S. cerevisiae</i> JSC302.....	111
Figura 30. Teste do Cometa realizado para a linhagem de <i>S. cerevisiae</i> W303-1B.....	112
Figura 31. SDS-PAGE das proteínas presentes no extrato celular da linhagem JSC302 e sobrenadante de <i>Serratia</i>	113
Figura 32. SDS-PAGE das proteínas presentes no extrato celular da linhagem W303-1B e sobrenadante de <i>Serratia</i>	114

Figura 33. Western Blot das proteínas presentes no extrato celular de JSC302 transformada com os plasmídeos pBS24Ub e pBS24UbNuc.....115

Figura 34. Western Blot das proteínas presentes no extrato celular de JSC302 transformada com os plasmídeos pBS24Ub e pUbNuc.....116

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1. Tempo de vida do DNA em vários ambientes.....	13
Tabela 2. Transformantes obtidos das diferentes linhagens da levedura <i>S. cerevisiae</i> com os plasmídeos pUbNuc2, 3, 4 e 5.....	87
Tabela 3. Taxa de sobrevivência das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> transformadas com os plasmídeos pBS24Ub e pUbNuc2, 3, 4 ou 5 em meio SD1%.....	95
Tabela 4. Análise da estabilidade dos plasmídeos pBS24Ub, pUbNuc2 e pUbNuc3.....	105
Tabela 5. Sobrevivência da linhagem <i>S. cerevisiae</i> JSC302 e estabilidade dos plasmídeos pBS24Ub e pUbNuc3, no ambiente.....	118

ABREVIATURAS

Abs :	Absorbância
<i>ade</i> :	mutante de levedura para síntese de adenina
ADH-I :	Álcool desidrogenase I
ADH-II :	Álcool desidrogenase II
ADH-III :	Álcool desidrogenase III
ADH-IV :	Álcool desidrogenase IV
<i>ADH1</i> :	Gene da Álcool desidrogenase I
<i>ADH2</i> :	Gene da Álcool desidrogenase II
<i>adr1</i> :	Mutante de levedura incapaz de produzir ADR1
<i>ADR1</i> :	Gene que codifica o fator de ativação de transcrição do gene <i>ADH2</i>
<i>ADR1^c</i> :	Mutante que produz a proteína ADR1 de forma constitutiva
<i>ADR6</i> :	Fator de ativação de transcrição do gene <i>ADH2</i>
AgHBs:	Antígeno do vírus da hepatite B
<i>Agp</i> :	promotor híbrido <i>ADH2/GAPDH</i>
Ala:	Alanina
AMP:	Adenosina mono-fosfato
<i>Ap^R</i> :	resistência à ampicilina
<i>ara-14</i> :	mutante de levedura deficiente na síntese de arabinose
Arg:	Arginina
<i>ARG3</i> :	Promotor da ornitina transcarbamoilase
<i>aro7</i> :	mutante de levedura deficiente na síntese de aminoácidos aromáticos
<i>Asp</i> :	Asparagina
ATP:	Adenosina tri-fosfato
Bisacrilamida :	N-N-metileno-bis-acrilamida
BSA:	soro-albumina bovina
<i>CEN</i> :	Centrômero

<i>cir^o</i> :	ausência do plasmídio 2-micron
<i>CYC1</i> :	Gene que codifica para deficiência no citocromo c 1
D.O. :	Densidade óptica
Da :	Dalton
DAB :	3,3'-diaminobenzidina
dATP :	Desoxi-adenosina-5'-trifosfato
dCTP :	Desoxi-citidina-5'-trifosfato
dGTP :	Desoxi-guanosina-5'-trifosfato
DNA :	Ácido desoxirribonucleico
DNAase :	Desoxirribonuclease
DRT'S:	Solução de Denhardts
dsDNA:	ácido desoxirribonucleico dupla fita
DSS:	DNA de esperma de salmão
DTT :	Ditiotreitol
dTTP :	Desoxi-timidina-5'-trifosfato
EDTA :	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA :	Teste imunoenzimático (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay)
<i>endA1</i> :	mutante de bactéria deficiente na atividade não específica de endonuclease 1
Endo H :	Endoglicosidase H
<i>ENO</i> :	Gene que codifica para enolase em leveduras
<i>G418^R</i> :	gene de resistência à gentamicina
<i>GAL1</i> :	Gene que codifica Galactoquinase
<i>GAL10</i> :	Gene que codifica para uridina-difosfoglicose-4-epimerase
<i>GAL4</i> :	Gene que codifica o fator de ativação dos genes do metabolismo da galactose em levedura
<i>GAL7</i> :	Gene que codifica Galactose-1-fosfato uridiltransferase
<i>GAPDH</i> :	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
<i>gef</i> :	gene que codifica o polipeptídeo tóxico Gef

<u>Gef</u> :	proteína tóxica que tem como alvo a membrana celular
Glu:	glutamina
GSP:	"general secretion protein"
<i>gyrA96</i> :	mutação em bactérias para girase
hEGF:	fator de crescimento epitelial humano
His:	histidina
<i>his</i> :	fenótipo de deficiência na síntese de histidina em leveduras
HIV :	Vírus da imunodeficiência humana
<i>hok</i> :	gene que codifica o polipeptídeo tóxico Hok em bactérias
<u>Hok</u> :	proteína tóxica que atua na membrana da célula
<i>hsdR17</i> :	mutação que abole a restrição do DNA mas não metilação
hSOD:	proteína superóxido dismutase humana
<u>Hsp</u> :	proteína de choque térmico ou de estresse (heat shock protein)
IFA :	Adjuvante Incompleto de Freud
IPTG :	Isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo
kb :	quilo base = 1000 pares de bases
kDa :	quilodalton
<i>KEX1</i> :	gene que codifica uma carboxipeptidase em leveduras
<i>KEX2</i> :	gene que codifica a endoproteinase que cliva a sequência Lys-Arg
Km ^R :	resistência a canamicina
<i>lacY1</i> :	mutante deficiente na atividade de permease para lactose
LB :	Meio de Luria-Bertani, para cultivo de bactérias
Leu:	leucina
<i>LEU2</i> :	Gene que codifica leucina em leveduras
<i>leu2-d</i> :	mutante deficiente para a síntese de leucina

<u>LexA</u> :	proteína repressora dos genes do sistema SOS em bactérias
LMA:	"low melting agar"
Lys:	lisina
MAP :	Metionil-amino-peptidase
<i>MAT a</i> :	<i>locus</i> de tipo de acasalamento a
<i>MAT α</i> :	<i>locus</i> de tipo de acasalamento α
<i>mcrC</i> :	mutação que afeta o sistema de restrição de metil citosina
<i>MF1 α</i> :	Gene do fator de acasalamento α v de levedura
MM :	Material e métodos
<i>mrr</i> :	mutação que afeta o sistema de restrição que requer metilação de citosina ou adenina
NLS:	sinal de localização nuclear ("nuclear localization signal")
nm:	nanômetros
NMA:	"normal melting agar"
<i>nuc(Su)</i> :	mutante que super expressa a nuclease
<i>nuc</i> :	gene estrutural da nuclease em <i>Serratia marcescens</i>
<u>Nuc</u> :	nuclease de <i>Serratia marcescens</i>
OGM:	Organismos geneticamente modificados
<i>ogr</i> :	gene do fago P2 que codifica uma proteína ligante ao Zn^{+2}
OPD :	Orto-fenileno-diamina
ORF:	"open reading frame" (quadro aberto de leitura)
pb :	pares de base
PBS :	Solução salina tamponada de fosfato
PCR :	Reação da polimerase em cadeia
PEG :	Polietilenoglicol
<i>pep4-3</i> :	mutante de levedura deficiente em protease

PGK :	gene que codifica para Fosfo-glicerato-quinase de <i>S. cerevisiae</i>
PHO5 :	Gene que codifica a monoéster-ortofosfórico-hidrolase, uma das fosfatases ácidas da levedura <i>S. cerevisiae</i>
phoA:	gene bacteriano da fosfatase alcalina
pl:	ponto isoelétrico
plac:	promotor do operon <i>lac</i> de <i>E. coli</i>
PMSF :	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
prb1-1122:	mutante em protease B
prc1-407:	mutante em protease C
proA:	mutante na síntese de prolina
rad52:	gene mutante de <i>S. cerevisiae</i> que leva à deficiência na reparação de quebras da dupla fita do DNA
recA:	gene que codifica uma proteína de recombinação em bactéria/recombinação homóloga
RelF:	proteína tóxica de ação na membrana celular
relF:	gene estruturalmente semelhante ao <i>hok</i>
RIPs:	"ribosome inactivated proteins" (proteínas inativadoras do ribossomo)
RNA :	Ácido ribonucleico
RNAase :	Ribonuclease
RTA:	cadeia A da ricina
RTB:	cadeia B da ricina
SCP:	"Single Cell protein"
SD :	Meio mínimo de cultivo de leveduras com glicose
SDS :	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE :	Gel de poliacrilamida-SDS
SG:	meio mínimo de cultivo de leveduras com glicerol
Sm:	isoforme da nuclease de <i>Serratia</i>
sok:	gene que codifica o polipeptídeo repressor do Hok
SR:	meio mínimo de cultivo de leveduras com rafinose

<i>STE13</i> :	gene da dipeptidil aminopeptidase
<i>Str^R</i> :	resistência a estreptomicina
<i>SUC2</i> :	gene que codifica a Invertase
<i>supE44</i> :	supressão de mutação nonsense
TBE:	tampão Tris, Ácido bórico, EDTA
TBS:	Tampão de baixo sal
TCA:	Ácido tricloroacético
TE:	Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8.0
TEL:	Telômero
TEMED:	N,N,N,N'-tetrametiletenodiamina
<i>thi-1</i> :	mutante para síntese de tiamina
Thr:	treonina
TRIS:	Trishidroximetilaminometano ou 2-amino-hidroxi-metil-1,3-propanediol
tRNA:	RNA transportador
<i>TRP1</i> :	Gene que complementa a auxotrofia à triptofano em levedura
<i>trp1-1</i> :	mutante deficiente na síntese de triptofano
Ty:	transposon de levedura
UAS:	Sequências ativadoras à montante dos genes (Upstream activator sequences)
<i>UAS_{ADH2}</i> :	UAS do gene <i>ADH2</i>
<i>UAS_{GAL}</i> :	UAS dos genes do metabolismo da galactose
<i>UAS_{PHO}</i> :	UAS do gene <i>PHO5</i>
<i>UBH</i> :	Ubiquitina hidrolase
<i>UBI</i> :	Ubiquitina
u.f.c.:	unidade formadora de colônia
<i>URA3</i> :	Gene que complementa a auxotrofia à uracila em levedura
<i>ura3-1</i> :	mutante na síntese de uracila
VHB:	vírus da hepatite B

X-Gal :	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactosídeo
YCp :	Plasmídio centromérico de levedura
YEp :	Plasmídio epissomal de levedura
YIp:	Plasmídio integrativo de levedura
YLp :	Plasmídio linear de levedura
YNB:	Base de nitrogênio de levedura
YPD :	Meio completo de cultivo de leveduras
YRp :	Plasmídio replicativo de leveduras

RESUMO

Microrganismos geneticamente modificados (OGMs), obtidos através das técnicas de biologia molecular são amplamente utilizados para as mais diversas finalidades, atingindo o ambiente, solo, águas, animais e até mesmo o Homem. Contudo, o comportamento e o destino destes microrganismos no ambiente, depois que sua função tenha sido completada, e onde estes não podem ser controlados, tem sido objeto de preocupação. Para diminuir os riscos potenciais associados à liberação (acidental ou intencional) dos OGMs no ambiente pesquisadores desenvolveram sistemas de contenção de microrganismos geneticamente engenheirados, baseados na clonagem de genes que codificam proteínas tóxicas, sob regulação de promotores indutíveis (para revisão ver Molin *et al.*, 1993). Estes sistemas permitem o controle da morte celular em tempo pré-determinado, com a indução do promotor que regula o gene que codifica a proteína tóxica. Contudo, embora as leveduras sejam tão importantes e úteis quanto as bactérias, não existem sistemas suicidas usados para contenção destes microrganismos.

No presente trabalho, construímos um sistema suicida para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* o qual apresenta o gene da nuclease de *Serratia marcescens* clonado sob controle do promotor *ADH2GAPDH*, que é reprimido por glicose. Desde que a nuclease é capaz de destruir DNA e RNA, tal sistema não permitirá que o material genético do OGM em questão, seja transferido para outros microrganismos, após a morte celular.

A atividade da nuclease foi detectada *in vivo*, através da diminuição da viabilidade dos transformantes de levedura, após o consumo da glicose. Quando leveduras mutantes *rad52* foram usadas como células hospedeiras, o efeito letal do plasmídeo foi dramaticamente aumentado. Por outro lado, a atividade da nuclease produzida nos transformantes de levedura foi analisada *in vitro*, através da incubação de extratos celulares com DNA plasmidiano mostrando a completa degradação deste em gel de agarose. Além disso, em ensaio de microcosmos, a viabilidade das leveduras

portadoras do plasmídeo suicida no ambiente diminuiu drasticamente quando comparada com células controles.

Estes resultados mostram que a nuclease de *Serratia marcescens* é expressa de forma ativa em *S. cerevisiae* sendo capaz de evitar a permanência dos transformantes de leveduras no ambiente, em laboratório, ou em condições simulando o ambiente, sem a necessidade de um indutor adicional.

ABSTRACT

Genetic Engineered Microorganisms (GEMs), obtained by molecular biology techniques, are becoming of widespread use for different purposes thus reaching the environment, including soil, water, plants, animals and Man. However, the behavior and fate of these microorganisms after their function has been completed in environments where they cannot be physically contained is a matter of concern. To minimize the potential risks associated with the release (deliberate or accidental) of GEMs in the environment, researchers have developed biological containment systems for bacteria which are based on the cloning of genes coding for toxic proteins, under the regulation of regulatable promoters (for review, see Molin *et al.*, 1993). Such suicide systems allow the predetermined control of cell death from the moment the promoter of the killer gene is switched on. However, even if yeasts are as useful and important in biotechnological processes as bacteria, there is no suicide system described so far for the containment of these microorganisms.

In the present work, we constructed a suicide system for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, consisting of the *Serratia marcescens* nuclease gene, cloned under the control of the yeast *ADH2GAPDH* promoter, which is repressed by glucose. Since this nuclease is able to destroy DNA and RNA, such suicide system does not allow the genetic material of the GEM to be transferred to other microorganisms upon cell death.

The nuclease activity in *S. cerevisiae* was detected *in vivo*, through the decrease in cell viability of the yeast transformants, upon glucose consumption. When yeast *rad52* mutants were used as the host cells, the lethal effect of the suicide plasmid was dramatically increased. On the other hand, the activity of the nuclease produced in yeast transformants was analyzed *in vitro*, by incubation of cell-free extracts with plasmid DNA,

showing complete degradation on agarose gels. Furthermore, in microcosmos assays, the viability of the yeast cells carrying the suicide plasmid decreased drastically when compared to control cells.

These results showed that the *S. marcescens* nuclease is expressed in an active form in *S. cerevisiae*, being able to avoid the maintenance of the yeast transformants, either in the laboratory, or in conditions simulating the environment, without the need of adding any inducer.

1.INTRODUÇÃO

Organismos geneticamente modificados (OGMs), obtidos através das técnicas de biologia molecular, estão sendo cada vez mais utilizados para as mais diversas finalidades, atingindo o ambiente, solo, águas, animais e até mesmo o Homem. As vantagens obtidas através do desenvolvimento desta tecnologia e do uso destes microrganismos são inquestionáveis na área da saúde, agricultura e outras. Contudo, uma questão importante tem sido levantada com relação ao comportamento destes microrganismos no ambiente, uma vez que sua função tenha sido completada. Vários são os trabalhos demonstrando que microrganismos promovem a transferência de genes em diversos habitats (Lorenz e Wackernagel, 1992, 1993, 1994), sob diferentes formas, garantindo a estabilidade destes por gerações.

Uma vez que bactérias são muito utilizadas como hospedeiras de proteínas heterólogas, pesquisadores desenvolveram sistemas de auto-contenção (ou suicidas) destes microrganismos geneticamente modificados, baseados na clonagem de genes que codificam proteínas tóxicas, sob regulação de promotores indutíveis (Molin *et al.*, 1988; Knudsen *et al.*, 1995). Estes sistemas permitem que os OGMs desempenhem as funções para as quais foram construídos, e depois, em tempo pré-determinado, iniciem a expressão do gene que os levará à morte. Apesar disto, embora as leveduras sejam tão importantes e úteis quanto as bactérias, não existem ainda sistemas suicidas descritos para estes microrganismos.

No presente trabalho, procuramos construir um sistema suicida para leveduras baseado na degradação do seu próprio material genético, através da expressão de uma enzima com atividade catalítica extremamente potente, capaz de degradar RNA e DNA. Este sistema apresenta a vantagem de ser inovador no caso de leveduras, e ao contrário do que é encontrado para bactérias, onde a maioria dos sistemas construídos baseiam-se na expressão de genes que codificam enzimas que têm como alvo a membrana celular, o sistema apresentado neste trabalho, elimina o elemento vital da célula destruindo qualquer fonte de transferência genética para o meio ambiente.

O gene *nuc* de *Serratia marcescens* foi clonado no plasmídeo pBS24Ub, sob regulação do promotor híbrido *ADH2GAPDH*, que é reprimido por glicose (Sabin *et al.*, 1989). Desta maneira, as células de *Saccharomyces cerevisiae* somente sobreviverão em condições laboratoriais, onde as concentrações de glicose podem ser controladas. Outros ambientes onde esta fonte de carbono não seja abundante, serão indutores da morte celular.

No caso dos processos industriais, que visam a obtenção de produtos obtidos através de OGMs, muitas vezes o microrganismo utilizado não é reutilizado para um novo inóculo. Nestas situações, se faz necessário preparar novos inóculos, proceder com a limpeza das dornas, para substituir o ensaio, ou mesmo, dispensá-los. Nestes casos, os microrganismos restantes da fermentação, são submetidos à adição de químicos para provocar a morte celular e, em seguida, liberados no ambiente. Este procedimento, contudo, não garante que o DNA, após a lise celular, não permaneça estável, transferido e incorporado por outros microrganismos. É exatamente nesta fase que o nosso sistema é particularmente interessante. A destruição do material genético pode ocorrer: a) no próprio laboratório, em tempo pré-determinado pela exaustão da glicose, ou b) no ambiente, onde não há glicose. Ambos os casos induzem a atividade do promotor *ADH2GAPDH* e, conseqüentemente, a expressão da nuclease.

BRASIL – PANORAMA ATUAL DE BIOSSEGURANÇA

Questões de biossegurança e bioética, tanto em nível laboratorial quanto ecológico, tem preocupado cientistas e ambientalistas diante da perspectiva de liberação no ambiente de organismos transgênicos. Foram organizados vários encontros para a determinação de normas de trabalho com OGMs, tendo sido adotadas em todo o mundo, inclusive no Brasil, normas de biossegurança elaboradas por instituições, como o

National Institute of Health – NIH, que garantiram um grau satisfatório de segurança laboratorial. Paralelamente, outras instituições, nos Estados Unidos e na Europa, estabeleceram mecanismos, já em uso em um grande número de países, que permitem avaliar e gerenciar, satisfatoriamente, o potencial de risco envolvido na liberação de organismos no ambiente. O resultado deste grande esforço mundial, permitiu que, passadas algumas décadas do advento da engenharia genética, não se tenha notícia de prejuízos de qualquer natureza causados por esta tecnologia que, ao contrário, já produziu resultados extremamente relevantes nas áreas da saúde, agricultura, microbiologia industrial e ambiental. Na Europa, mais de 19 campos de liberação de OGMs foram criados para estudos relacionados ao comportamento, interação com outros microrganismos e permanência, seis dos quais foram usados para testar métodos de detecção (European Commission, 1994). Com base nestes estudos, muitos OGMs têm sido monitorados atualmente (Jansson, 1995).

A adoção de diretrizes ou legislações específicas para a prática da engenharia genética passou a ser condição fundamental para a cooperação internacional com países industrializados, que detêm a liderança nesta área, além de constar também, como questão relevante nos textos de convenções que resultaram da Conferência da UNCED, como a da Biodiversidade, da qual o Brasil é signatário. Vários países incluindo na América Latina o Brasil, a Argentina, Chile, México e Venezuela, entre outros, estabeleceram, através de legislações específicas, normas de biossegurança para regular o uso da engenharia genética e a liberação no meio ambiente de organismos modificados por essa metodologia. No Brasil, essas normas estão reguladas pela Lei nº 8.974, que foi sancionada pelo atual Presidente da República, em 05 de janeiro de 1995.

Pela medida provisória nº 1.015, de 29 de maio de 1995, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, passou a integrar a estrutura do Ministério da Ciência e Tecnologia. A CNTBio é composta por cientistas, representantes do Executivo, do Setor Empresarial que atua em Biotecnologia, de representantes dos interesses dos consumidores e de

órgão legalmente constituído de proteção à saúde do trabalhador.

Desde que foi instaurada, a CTNBio aprovou trinta e quatro testes de campo com liberação de OGMs. Essas liberações destinam-se à avaliação de genótipos em condições de campo, em experimentos de pequena escala, sendo vetada a comercialização dos produtos até que a própria CTNBio proponha normas para essa atividade (Boletim Informativo da CTNBio – julho de 1998).

É importante ressaltar que os sistemas de auto-contenção de microrganismos através de sistemas suicidas poderão constituir uma medida de segurança eficaz na questão da contaminação por OGMs, e, conseqüentemente, a inclusão de um sistema suicida em qualquer organismo recombinante deveria passar a ser um pré-requisito para a exploração em larga-escala dos OGMs.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. OS OGMs E OS SISTEMAS DE CONTENÇÃO DESTES MICRORGANISMOS

O desenvolvimento das técnicas de engenharia genética durante os anos 70 teve grande impacto sobre várias áreas da ciência, que passaram a utilizar diversas proteínas produzidas a partir de microrganismos geneticamente modificados, ou, em linguagem comum, “engenheirados” (OGMs). Pode-se citar a expressão em hospedeiros heterólogos de um número de genes que codificam proteínas e hormônios de interesse médico e farmacêutico e biossíntese de antibióticos e outros compostos com valor adicional (Carter *et al.*, 1987; Hopwood *et al.*, 1995; Marston, 1987). O interesse nestas técnicas, bem como o desenvolvimento de produtos a partir de plantas, desenvolvimento de biopesticidas ou fatores de crescimento com uso potencial na agricultura (Dowling e O’Gara, 1994) e microrganismos em geral, vem sendo grandemente influenciado pela rapidez com que os resultados de pesquisa básica têm atingido a aplicação. A grande quantidade de informação e experiência acumulada sobre certos microrganismos de laboratório, tais como, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, possibilitou que fossem, de imediato, empregados como hospedeiros de genes heterólogos; hoje, o espectro de hospedeiros é praticamente ilimitado. Contudo, a própria rapidez com que esta ciência se desenvolve gera uma constante preocupação, por parte dos pesquisadores e da sociedade, com relação aos riscos inerentes à manipulação genética e a uma possível contaminação do meio ambiente por tais OGMs.

Os próprios descobridores das novas metodologias reconheceram desde o início os riscos potenciais que elas apresentavam, tomando a iniciativa de organizar já em 1975, a Conferência de Asilomar sobre Moléculas de DNA Recombinante, que teve como principal objetivo discutir as maneiras de se trabalhar com microrganismos geneticamente manipulados e buscar definições e estratégias para garantir a segurança dos pesquisadores e da população (Berg *et al.* 1975). Definiram-se, naquela

ocasião, regras de conduta bastante rígidas para que o trabalho científico fosse realizado com o mínimo de riscos para o pesquisador, a população e o ecossistema.

Barreiras biológicas e físicas adequadas deveriam ser criadas para conter os novos microrganismos formados a partir do DNA recombinante. Entretanto, esta regulamentação foi posteriormente abrandada, buscando não tolher em demasia a liberdade dos pesquisadores, o que poderia vir a obstruir o progresso científico. Os riscos são classificados em diferentes níveis: a) mínimo, quando ambos, organismo parental e genes introduzidos nele, não são patogênicos; b) médio, quando um deles é patogênico e c) máximo, quando os dois são patogênicos. Assim, a transferência de DNA recombinante de um organismo transgênico bem caracterizado para um não caracterizado, endógeno do ambiente, é considerado de risco altíssimo que deve ser minimizado. Conjecturas deste tipo mostram cenários mais drásticos como a transferência de um determinante virulento de uma linhagem que funciona como vacina viva para um patógeno, criando um organismo ainda mais patogênico e infeccioso. Embora ainda possam existir outras razões, a mais importante para o desenvolvimento de sistemas de contenção ainda é a prevenção (Munthali *et al.*, 1996).

Em alguns casos, os OGMs foram descritos como capazes de interferir em populações microbianas e seus processos fisiológicos no solo (Austin *et al.*, 1990; Doyle *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1989). O principal ponto levantado sobre esta questão é o fato de muito pouco se conhecer sobre o comportamento destes organismos fora do laboratório e sobre o tipo de interferências ambientais que poderiam advir da recombinação genética ou mesmo de mutações que os OGMs viessem a sofrer, em seguida à sua liberação na natureza (Tiedje *et al.*, 1989). Microrganismos têm evoluído mecanismos altamente eficientes para a transferência horizontal de genes que facilitam a adaptação às variações ambientais. Um problema adicional é a falta de controle da nossa parte sobre a transferência de material genético de um organismo para outro, fenômeno corriqueiro principalmente entre

bactérias, através de processos como conjugação, transdução e transformação (Stozky, 1989; Lorenz & Wackernagel, 1993), que poderiam ocorrer entre os OGMs e os microrganismos naturais do meio ambiente.

Embora a transformação genética de bactérias tenha sido descrita desde 1928 por F. Griffith, vindo a ser compreendida nos seus mecanismos básicos em 1944 (Avery *et al.*, 1944), somente recentemente, foi comprovada a ocorrência de transformação genética no ambiente, ou natural, entre diferentes espécies bacterianas (Stewart, 1989). Na verdade, trata-se do mesmo fenômeno, onde ocorre a entrada, na célula bacteriana, de fragmentos de DNA livre (cromossômico ou plasmidiano), que podem se incorporar no cromossomo da célula, de maneira que a informação genética acaba sendo transmitida às gerações subsequentes. Este é um dos mecanismos de transferência gênica horizontal e depende da função de vários genes localizados no cromossomo bacteriano (revisto por Lorenz & Wackernagel, 1994).

Os resultados dos estudos *in vitro* da transformação de muitas espécies, bem como a evidência da persistência de DNA livre no ambiente, aumentaram o interesse pelo estudo do crescimento, adaptação e evolução dos microrganismos no ambiente natural e, por outro lado, do estabelecimento de sistemas capazes de degradar o material genético de microrganismos geneticamente manipulados (Molin *et al.*, 1993). Na Figura 1, temos a representação esquemática do fluxo de genes por transformação, proposto para ambientes aquáticos e terrestres (Lorenz, 1992).

Fragmentos de DNA livres no ambiente são continuamente produzidos por lise celular e excreção, formando agregados de DNA. A liberação destes agregados é distribuída em superfícies de minerais, e outros sólidos, como também em partículas suspensas nos habitats aquosos (Munthali *et al.*, 1996). Este DNA extracelular pode transformar células competentes ou ser degradado pela atividade de DNAases extra e intracelulares, sendo os produtos desta degradação utilizados como nutrientes (Lorenz & Wackernagel, 1993).

Figura 1. Esquema da transferência de DNA livre em ambientes aquáticos e terrestres (extraído de Lorenz & Wackernagel, 1994).

De qualquer forma, a maioria do conhecimento que se tem sobre o comportamento de microrganismos geneticamente engenheirados no solo é baseado em estudos denominados de ensaios em microcosmos, onde um “pedaço da natureza” – solo, rio, sedimento, água poluída, lodo ativo, etc. – é removido da sua localização natural e levado para o laboratório, onde as condições ambientais são controladas. Estes estudos, na sua maioria, concluem que os benefícios e riscos associados aos OGMs são os mesmos de organismos da microbiota natural. Contudo, muitas vezes os procedimentos utilizados para a realização dos ensaios limitam a visualização da troca de DNA entre espécies correlatas, o que pode perfeitamente ser possível no ambiente (Ronchel *et al.*, 1995).

A meta principal do desenvolvimento de sistemas biológicos de contenção dos OGMs consiste na eliminação (ou ao menos, uma redução substancial) de tais populações microbianas introduzidas nos ecossistemas,

uma vez que sua função já tenha sido completada. Duas diferentes abordagens se apresentam para o estabelecimento destes sistemas de confinamento: a) um mecanismo passivo baseado na debilitação da linhagem, tornando-a incapaz de sobreviver muito tempo fora das condições de laboratório. Assim, por exemplo, foi construída a linhagem mutante X1776 de *Escherichia coli*, que, para a constituição da parede celular, necessita do ácido diaminopimélico, molécula raramente encontrada na natureza (Curtiss *et al.*, 1977). Esta abordagem apresenta a desvantagem de que estas linhagens perdem muito do seu vigor, mesmo em condições ótimas de laboratório, e, evidentemente, não se prestam para desenvolver algum tipo de tarefa no meio ambiente, onde não serão capazes de competir com a microbiota natural; b) um mecanismo ativo, pelo qual o tempo de vida da linhagem seja controlado através da indução proposital de uma proteína letal: o desempenho da linhagem é portanto normal, até o momento em que ela comete suicídio. Em princípio, este mecanismo poderia ser introduzido em qualquer linhagem sadia que passaria, então, a carregar o gene que desencadearia sua própria morte (Knudssen & Karlstrom, 1991).

2.1.1. Os Genes Assassinos em Bactérias

Para estudar o desenvolvimento de "sistemas suicidas", foi primeiramente necessário identificar genes que codificassem proteínas, tendo como alvo de ação estruturas essenciais da célula, tais como, membrana celular, ribossomos, etc. Durante estudos sobre a manutenção do plasmídeo R1 de *E. coli*, foi identificado um *locus* responsável pelo alto grau de estabilidade deste plasmídeo, que é relacionado à expressão de um pequeno polipeptídeo (52 aminoácidos), altamente tóxico para as células (Gerdes *et al.*, 1985, Gerdes *et al.*, 1986a). O fenótipo da estabilidade do plasmídeo está sob controle de um RNA "antisense", sintetizado constitutivamente, que regula a expressão do peptídeo tóxico. Contudo, em células nas quais o plasmídeo não segregou, o RNA "antisense" decai

rapidamente, liberando um RNA mensageiro extremamente estável, que codifica este peptídeo, o que resultará na eliminação das células livres de plasmídeo da população (Gerdes *et al.*, 1986b).

O isolamento dos dois genes, regulador e efetor, permitiu a análise molecular deste mecanismo de controle da expressão gênica (Gerdes *et al.*, 1988, Gerdes *et al.*, 1990a). O gene que codifica o polipeptídeo tóxico foi denominado de *hok*, ("host killing") e o RNA "antisense" foi denominado *sok* ("suppression of killing"). A proteína tóxica afeta a morfologia das células, tornando-as transparentes devido à perda de substâncias celulares, relacionada à desestabilização da membrana celular, resultando na parada da respiração (Gerdes *et al.*, 1986a).

A partir da identificação dos genes *hok* e *sok* do plasmídeo R1 de *E. coli*, os pesquisadores passaram a procurar, em outros plasmídeos, sequências homólogas que pudessem apresentar a mesma função (Gerdes *et al.*, 1990b). Bech e colaboradores (1985) identificaram o gene *relF*, a 37 minutos no cromossomo de *E. coli*, que é estruturalmente semelhante ao *hok*.

Um segundo homólogo do gene *hok*, o gene *gef*, foi identificado no cromossomo de *E. coli* (1 minuto no mapa) e a proteína codificada por este gene apresenta um mecanismo de ação idêntico ao dos genes *hok* e *relF* (Poulsen *et al.*, 1989). Dois aspectos desta família de genes tem sido estudados: (i) a regulação da expressão gênica e (ii) o modo de ação destas proteínas. A partir da construção de um gene de fusão, entre *gef* e *phoA*, resultando em uma fosfatase alcalina enzimaticamente ativa ligada à membrana, localizou-se a Gef como uma proteína ancorada na membrana, com a região carboxi-terminal voltada para o periplasma (Poulsen *et al.*, 1991). Esta proteína é constituída por um dímero, que pode sofrer modificações pós-traducionais. Foi proposto um modelo no qual a proteína Gef forma uma porina na membrana interna, através da qual ocorreria o transporte de várias substâncias; no caso de ser produzida em excesso, este transporte levaria à morte da célula. Uma das consequências da ligação da proteína na membrana é a saída do íon Mg^{+2} das células e o

simultâneo transporte de RNAase do periplasma para o citoplasma, com capacidade de degradação de RNA ribossomal, sendo tais danos irreversíveis (Akimoto *et al.*, 1986, Ono *et al.*, 1987, Sakikawa *et al.*, 1989).

As proteínas Gef, RelF e Hok têm sido usadas como "assassinas" ("killers") em outras bactérias com resultados satisfatórios (Contreras *et al.*, 1991; Knudsen & Karlstrom, 1991; Ronchel *et al.*, 1995; Munthali *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 1998). A grande vantagem destas proteínas é que elas são pequenas, altamente tóxicas, mesmo quando presentes em pequenas quantidades dentro da célula, causando um efeito de reação em cascata, que se segue à sua incorporação na membrana. Também apresentam a vantagem de serem ativas contra várias espécies bacterianas (Molin *et al.* 1987).

Um sistema muito interessante foi construído por Molina e colaboradores (1998), baseado na proteína Gef. Neste sistema, a regulação da expressão do gene suicida ocorre através da presença de compostos organoclorados. Assim, a célula quando adicionada em um ambiente altamente poluído com este composto, vai utilizando-o para seu crescimento e ao mesmo tempo, este mantém o promotor reprimido. A partir do momento em que o composto é exaurido, e o ambiente está despoluído, não há mais repressor e a célula começa a desencadear a expressão de sua morte.

Outro sistema interessante foi baseado na clonagem do gene *colE3* que codifica uma colicina, E3RNAase, que cliva a subunidade 16S do rRNA, regulada pelo produto do gene *immE3* (proteína E3 de imunidade) (Munthali *et al.*, 1996). Alternativamente, já é possível conter OGMs no solo ou rizosfera de plantas importantes para agricultura usando mediadores nutricionais e genes do metabolismo correspondente. Um exemplo deste enfoque é o conceito de "rizosfera tendenciosa" (Rossbach *et al.*, 1995), o qual é baseado na contenção de OGMs capazes de metabolizar o mediador nutricional "rizopina" produzido por plantas transgênicas. Depois da colheita, os organismos modificados perderiam sua vantagem seletiva e não conseguiriam competir com a microbiota endógena (Jansson, 1995).

2.1.2. O DNA como Alvo de Destruição Celular - Nucleases

Apesar do sucesso dos experimentos realizados com proteínas da família Gef, um sério problema ainda continuava sendo pertinente: a liberação do material genético para o ambiente, mesmo depois da morte da célula, uma vez que estas proteínas atuam na membrana, acabando por liberar o conteúdo celular para o meio. Uma série de pesquisas vinha evidenciando a persistência do DNA no meio ambiente por períodos de tempo suficientes para permitir a ocorrência de processos de recombinação ou conjugação (Roszak & Colwell, 1987). A Tabela I relaciona o tempo de permanência do DNA livre em diferentes ambientes. Tais resultados redirecionaram os pesquisadores, que partiram em busca de novas “proteínas assassinas”, capazes de atuar diretamente sobre o material genético.

As nucleases começaram portanto a ser consideradas para estas finalidades, já que apresentam uma vantagem muito importante sobre as Gefs: as nucleases têm a capacidade de degradar diretamente o material genético, evitando a passagem deste de uma linhagem para outra destruindo a fonte de todos os elementos celulares.

Um dos pioneiros na construção de sistemas baseados na degradação do material genético, foi Stephen Cuskey, que utilizou a expressão da endonuclease *EcoRI*, em *E. coli* (Molin *et al.* 1993), mas, os resultados não foram animadores porque havia um nível de expressão basal deletério. Posteriormente, duas enzimas foram escolhidas para construção de sistemas suicidas por apresentarem alta atividade. Bej e Molin (*In* Molin *et al.* 1993) examinaram a atividade das nucleases de *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus* em sistemas suicidas. Para ambas, a estratégia de contenção envolveu a clonagem das sequências representando as enzimas maduras, sob regulação do promotor *p_{lac}* (operon da lactose).

Tabela 1. Tempo de vida do DNA em vários ambientes (extraído de Lorenz e Wackernagel, 1994).

AMBIENTE	MEIA-VIDA (hs)	REFERÊNCIA
Aquático		
esgotos	0.017-0.17 0.23	Phillips <i>et al.</i> , 1989 Fibi <i>et al.</i> , 1991
águas limpas		
oligotrófico	4.2	Paul <i>et al.</i> , 1989
eutrófico	5.5	Paul <i>et al.</i> , 1989
água do mar		
estuário	3.4-5.2	Paul <i>et al.</i> , 1989 Paul <i>et al.</i> , 1987
	5.5	DeFlaun <i>et al.</i> , 1989
superfície oceânica		
oligotrófica	12.8	Paul <i>et al.</i> , 1989
limitação de P	4.5	Turk <i>et al.</i> , 1992
sem limitação de P	45.0-83.0	Turk <i>et al.</i> , 1992
sedimentos marinhos	235 140	Novitzky, 1986 Maeda & Taga, 1974
Terrestre		
solo		
arenosos	9.1	Romanowsky <i>et al.</i> , 1992
lodosos	15.1	Romanowsky <i>et al.</i> , 1992
barro	18.2	Romanowsky <i>et al.</i> , 1992

Ao contrário do que ocorreu com a endonuclease *EcoRI*, na ausência de indução, as células continuavam a crescer perfeitamente bem, o que mostrava que níveis basais desta nuclease não são letais. Após a indução da expressão, as células paravam de crescer e uma fração importante da população morria, ocorrendo degradação do DNA cromossômico. Contudo, os autores ressaltam que grandes quantidades de enzima devem estar presente para o sistema funcionar, por causa da competição com o sistema de reparo.

Mais recentemente, Ahrenholtz e colaboradores (1994) desenvolveram um sistema suicida baseado na degradação do material genético de *E. coli*, através da ação da nuclease de *Serratia marcescens*, cujo gene foi clonado sob regulação do promotor *pL* do fago lambda, controlado pelo repressor termo-sensível *cl857*. A quantidade de enzima

produzida após a indução foi suficiente para degradar 80% do DNA intracelular, inclusive plasmidiano, dentro de 3 horas.

A eficiência de morte do sistema suicida com nuclease é similar ou maior do que outros apresentados anteriormente. Como a lise da célula não acompanha a morte, durante a produção industrial de OGMS, a célula poderia ser preservada enquanto a massa de DNA, e possivelmente RNA, seria degradada permitindo uma redução nos esforços necessários para remoção de ácidos nucleicos dos produtos.

Outros genes são estudados como alternativas, como por exemplo, os genes *kill/kor* (Figurski *et al.*, 1982; Barth *et al.*, 1984; Schreiner *et al.*, 1985); e o gene da fosfolipase A de *Serratia marcescens* (Givskov *et al.*, 1988; Givskov e Molin, 1993). Esta enzima faz parte de um operon do qual o segundo produto gênico, PhiB, também é expresso. Esta proteína é uma antagonista da fosfolipase. Ela evita os efeitos deletérios da pequena parte de fosfolipase que fica dentro da célula em condições normais (Givskov e Molin, 1993). A deleção deste gene resulta na atuação da fosfolipase como uma proteína assassina.

A maioria dos trabalhos desenvolvidos com este objetivo, ressalta a importância da escolha do promotor, bem como do sistema de reparação celular, como fatores que podem afetar o resultado final da ação das nucleases. Para que o sistema suicida seja eficiente, a enzima deve estar presente em altas concentrações, para competir com o sistema de reparação celular do material genético. De fato, quando se usam células bacterianas portadoras da mutação *recA*, o efeito letal das nucleases fica ainda mais evidente.

2.1.3. O Controle da Expressão Gênica

O ponto chave para a construção de um sistema suicida reside na regulação da expressão do gene com função “assassina”. Primeiramente, é importante que não haja vazamento da expressão do gene, ou seja, que só ocorra expressão após a indução, para evitar o aparecimento de

resistência, como será explicado mais adiante. Em laboratório, o controle eficaz da expressão gênica pode ser facilmente obtido, existindo vários promotores disponíveis (Molin *et al.* 1993). No meio ambiente, porém, vários fatores, ainda mal conhecidos, podem alterar este controle: em um local onde as condições variam constantemente, é difícil prever quais serão os sinais externos aos quais a célula responderá. Um problema encontrado pelos pesquisadores é a identificação da expressão dos genes no ambiente, porque a maioria das células pode permanecer a maior parte do tempo em estado de dormência para depois voltar a atividade. Seria portanto ideal que os sistemas suicidas fossem dotados de promotores suficientemente fortes e que permitissem a expressão da proteína, tanto em células em crescimento ativo, como em período estacionário ou de dormência.

Vários são os mecanismos de controle da expressão de genes, como por exemplo: a) químico, onde a indução do gene suicida ocorre através de um determinado composto como o IPTG (Bej *et al.*, 1988) ou triptofano (Molin *et al.*, 1987; Molin *et al.*, 1988); b) físico, como o grupo de promotores do fago lambda, regulados pelo repressor cl (Sussman & Jacob 1962); c) estresse, causados por temperatura, pressão osmótica, pH, presença de compostos tóxicos, entre outros (Matin *et al.*, 1989; Matin, 1990; Spector, 1990; Nystrom *et al.*, 1990); d) ativação recombinacional (Gerlitz *et al.*, 1990). É preciso portanto, conhecer as condições em que se encontrará a célula, para poder dotá-la do sistema de promotor regulável mais adequado.

2.1.4. Principais Problemas Relacionados aos Sistemas Suicidas

Dentre os fatores que limitam a eficiência dos diferentes sistemas suicidas, destacam-se o aparecimento de mutações que tornam a célula insensível à proteína tóxica e, a seleção na população das células com tal fenótipo. Esta seleção será mais eficiente se houver expressão basal do gene com função "assassina", o que acarretará uma taxa de crescimento reduzida das células com o sistema intacto em relação às células com o

sistema mutado, conferindo a estas últimas uma clara vantagem seletiva. Assim, em pouco tempo, irão predominar na população as células resistentes. Com efeito, a maior dificuldade encontrada para o estabelecimento dos sistemas suicidas é a alta proporção de células sobreviventes, que permanece após a indução do gene da morte, cerca de 10^{-6} a 10^{-3} , dependendo do sistema (Knudsen *et al.* 1995).

O fenótipo sobrevivente pode resultar principalmente de mutações no próprio gene suicida, no seu promotor ou ainda em outros genes que inativem a função destes. Mutações que afetam outras partes da célula, tornando-a resistente ao gene suicida, também podem ocorrer. Mutantes resistentes às Gefs foram identificados, embora o fenótipo de resistência necessite de duas mutações, pelo menos, tornando-o de baixíssima frequência (Poulsen *et al.*, 1992). O emprego de nucleases com funções assassinas apresenta mais uma vantagem, porque, diferentemente do caso das Gefs, o alvo não pode ser modificado. Quando as mutações ocorrem no próprio gene suicida, a transferência do plasmídeo para outra célula, pode facilmente identificar o problema. Este tem sido o tipo de mutação mais frequente nos sobreviventes dos sistemas-suicidas, com taxa de aproximadamente 10^{-6} /célula/geração, no caso dos genes *gef* (Knudsen & Karlstrom, 1991). Isto pode constituir um problema sério na produção em larga escala (fermentadores industriais e aplicações de campo), onde o número de células resistentes aumentará rapidamente.

No sistema desenvolvido por Ahrenholtz e colaboradores (1994), usando a nuclease de *S. marcescens*, verificou-se que o fenótipo da resistência foi, na maioria das vezes, decorrente de mutações no gene repressor *cl857*, revertendo a sensibilidade à temperatura. Uma maneira interessante encontrada para contornar o efeito das mutações, consiste em duplicar o sistema suicida no organismo, usando dois sistemas idênticos, ou mesmo, sistemas diferentes. Esta estratégia foi recentemente desenvolvida por Knudsen e colaboradores (1995), empregando o gene com função assassina *relF* de *E. coli*. A função suicida foi duplamente inserida em um plasmídeo, de forma que a inativação por deleção, recombinação, ou

inativação insercional, fosse impedida. A taxa de inativação da função suicida foi menor do que 10^{-10} /célula/geração, mostrando que esta alternativa pode ser adequada.

2.2. SISTEMAS SUICIDAS EM LEVEDURAS

O uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como um modelo para células eucarióticas é extremamente importante na identificação das vias envolvidas nos processos celulares básicos. Além disto, linhagens recombinantes são preferencialmente utilizadas para a produção de proteínas heterólogas com aplicações terapêuticas em humanos. Diferentemente dos microrganismos procariotos, como *E. coli*, as leveduras são capazes de expressar proteínas de origem animal com a conformação correta, além de realizarem modificações pós-traducionais, muitas vezes indispensáveis à atividade biológica (Valenzuela, 1987). Entretanto, embora esta levedura venha sendo extensivamente manipulada para a produção de proteínas de importância médica, industrial e científica (Romanos *et al.*, 1992), ainda não foram desenvolvidos sistemas suicidas para este microrganismo.

Alguns estudos sobre a expressão de genes heterólogos por leveduras foram desenvolvidos com o intuito de se determinar a capacidade de organismos geneticamente manipulados, desenhados para produzir compostos de relevância industrial, conseguirem expressá-los no solo (Tebbe *et al.* 1995), trazendo riscos à população, devido à introdução de fenótipos alterados no ambiente. Apesar dos resultados evidenciarem queda na taxa de sobrevivência destas leveduras em duas semanas, também foi verificada a ocorrência de plasmídeos segregantes, evidenciando a importância do desenvolvimento de sistemas suicidas para estes microrganismos.

Estudos procurando compreender como as leveduras se comportam no meio ambiente, demonstraram que, quando geneticamente

manipulados, estes microrganismos não apresentam desvantagem alguma quanto à sobrevivência em relação às linhagens selvagens (Broker, 1990). Fujimura e colaboradores (1994) analisaram a sobrevivência de leveduras geneticamente manipuladas: a) expressando o fator XIIIa de coagulação em humanos, e b) células sem o plasmídeo, e não encontraram diferenças significativas, demonstrando que a ausência do plasmídeo não confere vantagem seletiva para estas células no ambiente.

Recentemente, foi descrito que duas linhagens recombinantes das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula polymorpha*, quando inoculadas no solo, continuam viáveis e capazes de produzir a proteína heteróloga de mamífero durante 10 dias. É interessante notar que nenhuma destas 2 espécies de levedura pertencem a microflora normal dos solos; o seu habitat natural é em flores ou superfície de frutos, onde há altas concentrações de carboidratos. De fato, estas linhagens recombinantes não persistiram nas amostras de solo analisadas. Não se pode entretanto excluir a possibilidade de que as leveduras encontrem no solo micronichos com melhores condições de sobrevivência (Tebbe *et al.*, 1995).

Um outro fator agravante para a promiscuidade genética que poderia ocorrer na natureza entre OGMs, reside na possibilidade de conjugação direta entre organismos filogeneticamente distantes como bactérias e leveduras, descrita há alguns anos por Heinemann & Sprague (1989). Estes autores demonstraram que células de *E. coli* portadoras de um plasmídeo conjugativo são capazes de transferir, em alta frequência, este plasmídeo para células de *S. cerevisiae*. O processo é tão eficiente que foi proposto como um método alternativo para a transformação genética da levedura em laboratório (Heinemann & Sprague, 1991).

Muitas proteínas tóxicas para células eucarióticas, com ação específica para determinadas estruturas ou organelas celulares foram descritas. Uma proposta interessante, seria o desenvolvimento de um sistema suicida para leveduras, baseado na interferência e debilitação da síntese proteica, levando à morte celular. Uma família de toxinas de plantas, extensivamente estudada e usada como suicida para células do sistema

nervoso (Contestabile & Stirpe, 1993; Pangalos *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1993), consiste nas proteínas conhecidas como RIPs ("ribosome inactivating proteins"), capazes de danificar ribossomos de eucariotos (Frankel *et al.*, 1990; Stirpe *et al.*, 1992). A maioria delas é apresentada sob a forma de cadeia simples (RIPs do tipo I) ou cadeias duplas ligadas covalentemente (RIPs do tipo II).

As RIPs do tipo II estão entre as mais potentes toxinas conhecidas. Através de estimativas realizadas, acredita-se que apenas uma molécula presente no citoplasma, seja suficiente para levar a célula à morte (Eiklid *et al.*, 1980). Destas proteínas, somente seis são conhecidas, sendo a mais estudada a ricina. Esta é uma proteína heterodimérica encontrada em sementes de mamona (*Ricinus communis*), que apresenta a cadeia A (RTA), ligada à cadeia B (RTB) através de uma ponte dissulfeto (Olsnes & Pihl, 1982). A ligação da cadeia B a resíduos de galactose expostos nas superfícies das células de mamíferos, permite a internalização da ricina, liberando a cadeia A no citoplasma, onde ocorre a inibição da síntese proteica (Olsnes & Sandvig, 1988), através da remoção de um resíduo de adenina localizado em sequências altamente conservadas, próximas ao final 3' das subunidades 28S e 26S do rRNA (Endo *et al.*, 1987). A maioria dos ribossomos de eucariotos são susceptíveis à atividade de N-glicosidase da RTA, embora ribossomos de diferentes espécies, apresentem graus de sensibilidade variável (Stirpe & Hughes, 1989).

Gould e colaboradores (1991) demonstraram que transformantes de leveduras, induzidos a expressar a RTA, podem produzir toxinas altamente efetivas contra os seus próprios ribossomos, levando à parada imediata do crescimento celular, e subsequentemente à morte. Entretanto, encontram-se com certa frequência, mutantes que são resistentes à ação de toxinas que agem sobre a síntese proteica. Outra estratégia bastante interessante foi adotada por Saxena e colaboradores (1991) usando RNAses como citotoxinas e comparando a atividade destas com as RIPs α -sarcina e ricina. Os resultados demonstraram que a α -sarcina e a ricina são mais efetivas em abolir a síntese proteica do que as

RNAases A e B, o que poderia ser explicado pela presença de inibidores espécie-específicos, além das RNAases poderem sofrer mais rapidamente efeitos de degradação da maquinaria celular, do que a ricina e a α -sarcina. A estratégia emergente destes estudos, seria a clonagem da cadeia A da ricina ou de outra RIP do tipo II, sob o controle de um promotor regulável de levedura.

A proposta do nosso trabalho vem ao encontro de um segundo caminho para a construção de sistemas suicidas para leveduras, totalmente inexistente, consistindo na degradação do material genético por nucleases, como já demonstrado para bactérias (Ahrenholtz *et al.*, 1994). No caso das células eucarióticas, em que o material genético encontra-se compartimentalizado no núcleo, estratégias de sistemas suicidas que envolvam a destruição do DNA, devem garantir que o produto tóxico seja transportado para o interior do núcleo.

O transporte nuclear é um processo ativo, que opera através dos poros nucleares, e é dependente do reconhecimento de sinais específicos pela maquinaria de importação. Sequências de aminoácidos, denominadas sinais de localização nuclear (NLS), foram encontradas em vários sistemas eucarióticos, e se mostraram capazes de direcionar proteínas heterólogas para dentro do núcleo de eucariotos superiores (Dingwall & Laskey, 1986; Newport & Forbes, 1987; Silver & Hall, 1988) e em *Saccharomyces cerevisiae* (Silver *et al.*, 1984; Silver *et al.*, 1988).

O NLS mais bem estudado é um oligopeptídeo de sete aminoácidos, que, *in vivo*, clonado como proteína de fusão, é capaz de dirigir várias proteínas citoplasmáticas para o núcleo (Kalderon *et al.*, 1984a e 1984b). Benton e colaboradores (1989) utilizaram com absoluto sucesso este NLS para dirigir a RNA polimerase do bacterifago T7 ao núcleo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Entretanto, Barnes e Rine (1984) estudando o transporte de proteínas para o núcleo baseados na expressão da endonuclease *EcoRI* na levedura, demonstraram que esta enzima é capaz de entrar no núcleo de *Saccharomyces cerevisiae* sem necessidade de uma sequência NLS,

quando esta proteína é sintetizada *in vivo*, a partir do gene bacteriano clonado na levedura. Para este experimento, a sequência de DNA codificadora da endonuclease foi clonada sob o controle do promotor de levedura *GAL1*. Este promotor foi ideal porque a transcrição só ocorre após indução com galactose, além de ser reprimida por glicose. Após a adição de galactose, a célula de levedura produziu a endonuclease, que foi capaz de entrar no núcleo e matar a célula. Empregando-se como hospedeira uma linhagem portadora da mutação *rad52*, que é deficiente na reparação de quebras da dupla fita do DNA, observou-se um efeito letal ainda mais pronunciado após a expressão da *EcoRI*. Uma das possíveis explicações para a entrada da *EcoRI* no núcleo da levedura hospedeira sem o NLS, seria o seu reduzido tamanho (62 kDa), que possibilitaria a sua difusão através dos poros da carioteca, permissíveis para proteínas de até 50-60 kDa.

Para a construção de um sistema suicida para levedura baseado na degradação do material genético, propomos neste trabalho, a clonagem da nuclease de *Serratia marcescens* no plasmídeo de *Saccharomyces cerevisiae*, pBS24Ub, sob a regulação do promotor indutível *ADH2GAPDH*. Como a *Nuc* de *S. marcescens* tem apenas 28,9 kDa (Ball *et al.*, 1987), a entrada no núcleo, segundo os experimentos de Barnes e Rine (1989), seria ainda mais facilitada. Por outro lado, mesmo que ela não atinja o material genético nuclear, esta nuclease pode ser capaz de degradar também RNA, de maneira inespecífica, afeta de forma geral a síntese proteica, culminando na morte da célula.

2.3. A NUCLEASE DE *Serratia marcescens*

A bactéria *Serratia marcescens* vive em diversos habitats incluindo solo, água, plantas, insetos, fungos e como patógeno oportunista do homem. Produz proteínas extracelulares para ajudar na exploração destes ambientes por nutrientes que são importantes para a colonização e invasão (Suh *et al.*, 1995; Benedik e Strych, 1998). Uma destas proteínas é

a nuclease extracelular, cuja função especula-se estar relacionada a utilização do DNA como fonte de carbono. Apesar de ácidos nucleicos não serem fonte de carbono ideais, foi demonstrado em laboratório, *que Serratia marcescens* é capaz de crescer usando DNA (Beliaeva *et al.*, 1976). Alguns trabalhos sugerem que as nucleases podem funcionar como fatores de virulência, com papel durante a invasão ou estabelecimento da infecção (Focareta e Maming, 1991). A nuclease é constituída de 264 aminoácidos, dos quais 21 correspondem à sequência sinal. O quadro aberto de leitura identifica uma pré-proteína de 28,9 kDa e uma potente enzima nucleolítica de 26 KDa (Ball *et al.* 1987, Chen *et al.*; 1996; Biedermann *et al.*, 1989). Através da análise cristalográfica da enzima, identificou-se um dímero de subunidades idênticas (Friedhoff *et al.*, 1996a) (Figura 2).

Figura 2. Estrutura da Nuclease de *Serratia marcescens* com os resíduos de aminoácidos importantes na catálise iluminados (retirado de Lunin *et al.*, 1997)

O promotor que regula a expressão da nuclease em *Serratia* está a 120 pares de bases do gene estrutural *nucA* e a presença da sequência de Shine-Dalgarno a cerca de 8 nucleotídeos do início deste. A nuclease apresenta múltiplas possibilidades de leitura de codon, sendo similar ao de genes altamente expressos em *E. coli*, embora em *Serratia marcescens* esta enzima não seja uma das proteínas mais abundantes (Ball *et al.*, 1987).

A enzima pertence a uma classe de nucleases não específicas produzidas por diferentes organismos como *Saccharomyces cerevisiae* (Vincent *et al.*, 1988), *Anabaena* sp (Muro-Pastor *et al.*, 1997), *Syncephalastrum racemosum* (Chen *et al.*, 1993), *Bos taurus* (Coté e Ruiz-Carrillo, 1993) e *Streptococcus pneumoniae* (Puyet *et al.*, 1990), as quais apresentam semelhanças no tamanho, clivagem de 5'-3', requerimento para Mg^{+2} e pH ótimo ao redor de 8 (Miller *et al.*, 1991).

Embora haja homologia entre estas enzimas, a função biológica difere entre nutricional (*Serratia* e *Anabaena*) ou reparo e recombinação para geração de "primers" para replicação do DNA mitocondrial (*S. cerevisiae*). A presença de uma nuclease relacionada em diversos organismos, como bactérias entéricas, cianobactérias fotossintéticas e leveduras, sugere que o gene *nuc* tenha um ancestral comum e pode ter sido disseminado por um fago depois da separação destes organismos na escala evolutiva (Friedhoff *et al.*, 1996).

Com sua alta atividade e larga tolerância a substratos, a nuclease apresenta muitas utilidades e aplicações em biotecnologia. A nuclease purificada, comercialmente conhecida como BENZONASE (A. Benzon Pharma), é utilizada para eliminar ácidos nucleicos presentes em amostras de proteínas purificadas ou reduzir a viscosidade durante os processos de obtenção destas (Benedik e Strych, 1998). Ainda apresenta a vantagem adicional de destruir qualquer molécula de DNA recombinante que poderia contaminar a proteína de interesse. A capacidade de degradar DNA permitiu a realização de um sistema suicida para contenção de bactérias (Ahrenholtz *et al.*, 1994), além de ser usada como agente antiviral capaz de

inibir a replicação de vírus de DNA e RNA (Panfilova e Salganik, 1983; Schumann *et al.*, 1997). Outros trabalhos têm demonstrado importantes propriedades anti-tumorais, presumivelmente impedindo a divisão celular (Kurinenko *et al.*, 1977a e Kurinenko *et al.*, 1977b). Além disto, esta enzima vem sendo extensivamente estudada pela sua importância nos estudos sobre secreção de proteínas em bactérias Gram negativas (Ball *et al.*, 1987 e 1990); ferramenta para análise de "footprinting" de dsDNA, como mostrado recentemente (Meiss *et al.*, 1995) e recomendado pelo fabricante da enzima (Merck, 1995) e, para estudar subunidades da cromatina, uma vez que consegue cortar este DNA em fragmentos de 200pb, agindo nas fitas de DNA que envolvem intra-nucleossomos (Pospelov *et al.*, 1977).

2.3.1. Atividade da Enzima e Mecanismo de Ação

A nuclease é uma fosfodiesterase não específica que cliva os finais 3'hidroxil de DNA simples e dupla fita e RNA, em mononucleotídeos 5', numa mesma velocidade, não havendo preferência por bases. Quando adicionados juntos, DNA como substrato é cerca de 1.5-2.5 vezes preferível do que RNA (Nestle e Roberts, 1969; Filimonova *et al.*, 1994).

A presença de 4 resíduos de cisteína encontrados entre os carbonos C9/C13 e C201/C243 (Biedermann *et al.*, 1989) é fundamental para a formação de duas pontes dissulfeto, sem as quais a atividade da enzima pode ser alterada. A perda destas ligações desestabiliza a proteína tornando-a mais suscetível à ação de proteases. Estudos realizados com diferentes mutantes duplos demonstraram que estes somente são capazes de expressar a nuclease em pequena quantidade com atividade reduzida e que grupos sulfidril livres não afetam a atividade da enzima (Ball *et al.* 1992).

Outros fatores influenciam a atividade da nuclease, como o pH (ótimo está entre 7.4 e 8.2), aeração e a composição do meio de cultura (Jepsen *et al.*, 1987; Biedermann *et al.*, 1990). Alguns mononucleotídeos como ATP (em concentrações de 0.1 e 0.2 mM), timidina 3'-5'bifosfato e concentrações de substrato acima de 100 µg/ml, podem ser inibitórias

através da formação de complexos abortivos. A enzima ainda requer a presença do íon Mg^{+2} em concentrações que podem variar entre 5 e 10mM (Eaves e Jefries, 1962), mas este pode ser substituído por Mn^{+2} , Ni^{+2} ou Co^{+2} (Filimonova *et al.*, 1994). Por outro lado, a temperatura não é um fator crítico, sendo que a síntese ocorre tanto a 30°C como a 37°C (a inativação ocorre a 50°C/15 min.).

Embora a enzima de *Serratia marcescens* seja considerada uma das mais promíscuas endonucleases, ela mostra sequências e/ou preferências estruturais dentro do genoma, diferentemente de outras nucleases (Drew e Travers, 1984; Herrera e Chaires, 1994; Doherty *et al.*, 1995). A clivagem de uma fita na ligação fosfodiéster poderia facilitar a ação sobre a outra. Neste sentido, DNA dupla fita d(G)d(C) é clivado mais rapidamente do que d(A)d(T) (Meiss *et al.*, 1995). De qualquer forma, deve-se enfatizar que a nuclease de *Serratia* utiliza moléculas diferentes como substrato (DNA ou RNA), demonstrando que estes devem ser forçados a assumir uma conformação similar aceitável pela enzima (Friedhoff *et al.*, 1996b).

A análise cinética da clivagem de vários substratos naturais ou sintéticos pela nuclease de *Serratia* provou que: a) DNA e RNA são clivados em velocidades semelhantes; b) ao menos para oligodesoxinucleotídeos, a formação do complexo enzima/substrato é um passo limitante da velocidade; c) a taxa de reação diminui conforme o substrato se torna menor, zerando com tetrâmeros; d) o fosfato 3' é essencial para a clivagem, que segue a cinética de Michaelis-Menten, sugerindo que dois sítios ativos operam independentemente e que não existe outro sítio de ligação ao ácido nucleico na enzima, com um efeito na atividade de clivagem (Friedhoff *et al.*, 1996).

A detecção da atividade da nuclease pode ser realizada por métodos tais como: i) diminuição da viscosidade do substrato ou aumento da absorbância a 260 nm (Burke e Slinker, 1980), e ii) diminuição da fluorescência associada à clivagem do DNA, uma vez que quando há hidrólise do ácido nucleico, ocorre também a hidrólise da substância

intercalada no DNA (brometo de etídio, verde de metila ou azul de toluidina) (Friedhoff *et al.*, 1996).

Comparações entre as sequências da nuclease de *Serratia marcescens*, da endo-exonuclease mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* (Vincent *et al.*, 1988), da endonuclease mitocondrial de *Bos taurus* (Coté e Luiz-Carrillo, 1993) e da endonuclease extracelular de *Anabaena spp.* (Muro-Pastor *et al.*, 1992), revelaram 23 resíduos altamente conservados nas 4 proteínas, seis dos quais se encontram na região mais conservada da própria nuclease de *Serratia marcescens* (Asp86-Ala94) (figura 3). Seis destes 23 resíduos (Asp86, Arg87, His89, Glu127, Arg152, Glu211) normalmente são encontrados nos sítios catalíticos de nucleases dependentes de Mg^{+2} com estruturas tri-dimensionais conhecidas (Saenger, 1991; Suck, 1992; Gerlt, 1993; Lunin *et al.*, 1997).

<i>Sm</i>	VRnaYtLnnNstTkfANWVAyHITkdtpAsgkt
<i>As</i>	VknqYaLsYNnsQtANWVAwqlwsswLgnaer-
<i>Sc</i>	nReefl sCYNrqTQnp yWVIEHITPEsLAarna
<i>Bt</i>	sRa sYvLCYdprTrgAlWVvEqlrPEgLrgdgn
<i>Sm</i>	DRGHQAPIA slaqv s d wesl n-YLSN it PQksD
<i>As</i>	DRGH i APsA Drt k t t e dnaaTFI mt NMmPQP-D
<i>Sc</i>	DRGHQAPAADakfSQqAMDDTFYiSNMcPQVge
<i>Bt</i>	DRGH I AaAA nhrwSQkAMDDTFYLSN v aPQVPh
<i>Sm</i>	gAWArLEDq eRkLi d Rad i s SVYtVTGPLY
<i>As</i>	Nt WgNLEDYCRELv - - sqgKe l YIVaGPnq
<i>Sc</i>	dy WAhLE yf CRgLT - - kkYKSVrIVTGPLY
<i>Bt</i>	NAWnNLEkYs RsLT- R- tYq nVYvcTGPLf
<i>Sm</i>	T i P sayWKVl f i n nSPA
<i>As</i>	TVPk stWKi vVv l dSPg
<i>Sc</i>	AVPTHFF KI l VaEApt A
<i>Bt</i>	AVPTHFF KVl i l EAag g
<i>Sm</i>	DfcqFrVtVDEIE k rTGLi i wag l PddvQaSLk
<i>As</i>	DwraykV sVDEIE sITGydFLsNV sPni Qt Sie
<i>Sc</i>	KLtdFeVPI DaLERsTGLEl Lqk VPPsk k kaLc
<i>Bt</i>	pLehFIVPie sLERas GLIFv pNi l a raQs l ka

Figura 3. Regiões conservadas das sequências de várias nucleases relacionadas. (Lunin *et al.*, 1997)

Com o objetivo de se estudar o mecanismo de ação destas enzimas e identificar sítios catalíticos, foram criadas mutações, as quais mostraram que estes resíduos são necessários para a catálise eficiente, por apresentarem importante papel estrutural e funcional (Friedhoff *et al.*, 1994).

A análise cristalográfica da enzima (Miller e Krause, 1996) associada à mutagênese sítio dirigida (Friedhoff *et al.*, 1994, 1996a e 1996b) e a estrutura tri-dimensional (Lunin *et al.*, 1997) permitiram encontrar a localização de ao menos três resíduos os quais foram associados como fundamentais no sítio ativo da enzima, nomeados His89, Asn119 e Glu127. Estes resíduos não somente estão localizados próximos entre si, mas a mutagênese em qualquer um deles resulta na diminuição drástica da atividade (Friedhoff *et al.*, 1996b).

Três diferentes mecanismos para a ativação das moléculas envolvidas na catálise são propostos para nucleases dependentes de Mg^{+2} : a) ativação pela histidina como na DNAase I (Weston *et al.*, 1992), b) ativação por íons metais como na DNA polimerase I de *E. coli* (Beese e Steitz, 1991), RNAase HI de *E. coli* (Yang *et al.*, 1990; Katayanagi *et al.*, 1993) e RNAase H de HIV (Davies *et al.*, 1991) ou, c) ativação pelo grupo fosfato adjacente à ligação fosfodiéster como no caso das endonucleases *EcoRI* e *EcoRV* (Jeltsch *et al.*, 1993a; Jeltsch *et al.*, 1993b)(Friedhoff *et al.*, 1994).

Este último mecanismo seria o mais aceito, onde a proteína de *Serratia* usaria o resíduo His89 para ativar uma molécula de água protonando-a no ataque nucleofílico ao átomo de fósforo, e que, como em todas as outras hidrolases dependentes de Mg^{+2} , este íon ligado aos resíduos Asp e/ou Glu, serviria para estabilizar o fósforo covalente no estado de transição. Na *Serratia*, possivelmente Asp86, Glu127 e Glu211 podem servir como ligantes para Mg^{+2} (Friedhoff *et al.*, 1994; Lunin *et al.*, 1997).

A interpretação mais consistente com os dados é que ele deve funcionar como ácido geral, protonando o grupo O3' (Lunin *et al.*, 1997). Comparando-se a atividade de nuclease selvagem com uma mutada em His89, em diferentes valores de pH, foi demonstrado que este resíduo está

envolvido com um equilíbrio entre protonação/desprotonação ao redor de 5.5-6.5 e, que a protonação interfere com atividade da enzima (Friedhoff *et al.*, 1996b). A ligação de uma nuclease em um DNA dupla fita dodecâmero causa uma mudança na carga da proteína de aproximadamente 3 unidades de carga por monômero, resultando em uma proteína carregada positivamente em pH fisiológico e His89 estaria envolvido no desligamento mais dramático envolvendo o pH para hidrólise da ligação fosfodiéster (Friedhoff *et al.*, 1996; Antosiewicz *et al.*, 1997). O mecanismo de ação proposto para a ação da nuclease está demonstrado na figura 4.

Figura 4. Modelo para o mecanismo de hidrólise das ligações fosfodiéster pela nuclease de *Serratia marcescens*, tirado de Lunin *et al.* (1997).

A comparação com outras hidrolases de estrutura definida oferece possíveis funções para o resíduo Glu127. Este resíduo agiria como base geral tirando um próton da molécula de água. O ataque subsequente ao fósforo com inversão de sua configuração origina um estado de transição penta-covalente. A carga negativa deste fósforo em transição é neutralizada por grupos de guanidina dos resíduos Arg87 e/ou Arg131. O estado de transição poderia ser estabilizado pelos íons Mg^{+2} , os quais estão coordenados ao grupo fosfato e o resíduo Asp86, corrigindo a posição do grupo fosfato relativa à enzima.

2.3.2. Mecanismos de Secreção

A secreção de proteínas em bactérias Gram negativas frequentemente ocorre pela rota de secreção geral (GSP), envolvendo um intermediário periplasmático onde ATP ou GTP são requeridos para a translocação através da membrana. Alguns aspectos deste processo são: manutenção das proteínas competentes para translocação; ligação ao receptor de membrana da maquinaria de translocação e força para o movimento da proteína e translocação unidirecional (Suh e Benedick, 1997). Proteínas não cruzam a membrana interna na conformação quaternária e o periplasma providencia um ambiente oxidante, o qual favorece a formação de pontes dissulfeto, além de conter moléculas que facilitam a formação da estrutura da proteína nascente.

A saída de proteínas por difusão via poros da membrana é dependente de características como tamanho, carga e conformação da proteína (Jepsen *et al.*, 1987). A sequência sinal, reconhecimento e processamento, podem ser comuns a movimentações de proteínas do envelope e extracelulares (Hines *et al.*, 1988).

As proteínas secretadas por *Serratia marcescens* incluem 1 nuclease, 2 proteases, 2 quitinases e 1 lipase, as quais são consideradas de classe dois ou auto-secretórias (Ball *et al.*, 1989). O mecanismo usado para secretar a nuclease permanece obscuro e há indícios de que ele pode ser

único. A capacidade da *S. marcescens* secretar a nuclease parece ser regulado pela fisiologia do hospedeiro, meio de cultivo, condições de crescimento e mutações nas células hospedeiras (Suh *et al.*, 1996). A secreção da nuclease ocorre em dois passos: primeiro para o periplasma, tornando-se ativa, e então, para o meio de cultura, liberada através da membrana externa, sem a lise da célula, num processo lento de aproximadamente 1-2 horas. Este último passo é dependente do pH externo, o que confirma que a secreção da Nuc de *Serratia* pode ser diferenciada das descritas para as proteínas do GSP (Suh e Benedick, 1997). O mecanismo eficiente só ocorre em *Serratia marcescens*, sugerindo que a nuclease requer produtos de genes específicos dos hospedeiros, embora algumas informações necessárias para a liberação da proteína localizam-se na própria sequência do gene (Suh *et al.*, 1996). Além destes fatores, o transporte da nuclease através da membrana está relacionado à hidrofobicidade, carga e conformação da enzima, características que sofrem influência direta do meio de cultura (Miller *et al.*, 1991).

Estudos sobre a nuclease mostraram a presença de três isoformas identificados e nomeados de acordo com a ordem de eluição: Sm1 (pl 7.4), Sm2 (pl 6.8), os quais apresentam atividades catalíticas semelhantes, e Sm3 (pl 7.3). A sequência de aminoácidos e a linearização destes mostram diferenças somente na região amino-terminal: Sm3 perde o primeiro resíduo Asp, enquanto Sm1 e Sm2 perdem os três primeiros resíduos Asp-Thr-Leu. A explicação para a formação de estruturas diferenciadas estaria no fato da molécula nativa ser degradada no espaço periplasmático ou durante o transporte através da membrana citoplasmática (Pedersen *et al.*, 1993).

Sm2 é a nuclease secretada mais eficientemente e no início da fase estacionária (10 horas de cultivo). Por outro lado, Sm1 fica horas no periplasma, e usa da lise celular para atingir o meio (em culturas tardias de mais de 24 horas), permanecendo então, única no sobrenadante. Este fato sugere a presença de algum mecanismo de reconhecimento da maquinaria secretória, ou mesmo competição entre os dois isoformes, privilegiando a

proteína na forma reduzida (Suh *et al.*, 1995). A diferença entre a secreção de Sm2 e a não secreção de Sm1 está no processamento do sinal da proteína, e não na região amino-terminal. Acredita-se que Sm1 seria produzida para reduzir a viscosidade causada pela liberação do DNA cromossomal após a lise das células ajudando a dispersão de outras intactas ou, mais importante, ela poderia providenciar nutrientes através da degradação e reciclagem de DNA, permitindo que a bactéria se torne mais adaptável em ambientes diversos (Suh *et al.*, 1995).

Mutações Δnuc bloqueiam a secreção na membrana citoplasmática, evitando a translocação e o processamento do peptídeo sinal, o que é consistente com o acúmulo de nuclease na fração celular quando a ΔNuc é produzida. Introduzindo uma cópia defectiva do gene *nucA* em um plasmídeo houve a inibição da produção da proteína *Nuc* a partir do locus cromossomal. Este fato poderia ser explicado por alguns mecanismos como, por exemplo, a titulação de fatores regulatórios para a transcrição ou regulação da proteína, a presença de um RNA "anti-sense" providenciando um "feed-back" responsável pela inibição de outras cópias do gene, ou ainda, a competição por sítios ou fatores essenciais para secreção (Chen *et al.*, 1996).

A produção da nuclease com o plasmídeo intacto foi afetada pela variação nas condições de cultura como presença de casaminoácidos, extrato de levedura, etc. Há indução dos níveis de nuclease com o consumo da glicose, formação de acetato e diminuição do pH. Em condições reduzidas de oxigênio na cultura, há um aumento de 10 vezes na produção da nuclease durante a fase estacionária, porém ela fica presa no periplasma.

Ainda não está definido se esta indução está relacionada à fase de crescimento ou por um mecanismo como repressão catabólica da glicose. Altos níveis de casaminoácidos causam a liberação da nuclease do periplasma para o meio, durante a fase estacionária tardia de crescimento. A secreção extracelular da nuclease é dependente do promotor. Esta observação leva a crer que existe uma coordenação temporal da síntese da *Nuc* com os componentes necessários para o seu aparato secretório. A

recente descoberta do gene *nucE*, essencial para a secreção da nuclease, e, cuja expressão é coordenadamente regulada com *nucA*, apoia esta hipótese (Jin, 1994 e Jin *et al*, 1996). A nuclease interage com este fator ou com a porta de secreção modificada por este. Este mesmo poderia ser bloqueado pela Δ *Nuc* para evitar a exportação.

Experimentos realizados com estes mutantes mostram que a maioria da atividade da nuclease intracelular está representada no periplasma. O primeiro passo de translocação para o periplasma requer um Δ P e a eficiência da secreção diminui quando o pH diminui, embora a atividade da enzima não seja alterada. A ativação da membrana depende do pH do meio, que poderia atuar nos componentes da maquinaria como fosfolipídios ou polissacarídios alterando as propriedades físicas da membrana externa, mas sem a necessidade de protonação. Diferentemente das proteínas do GSP, a nuclease acumulada no periplasma antes da secreção é muito grande para atravessar a membrana através de uma porina qualquer. Com base nestes dados, duas linhas de evidência sugerem que a nuclease não é uma proteína auto-secretória: a) quando a nuclease é produzida em *E. coli* ela é inicialmente periplasmática; e b) em *Serratia marcescens*, a expressão da nuclease não garante sua secreção para o meio de cultura (Suh e Benedick, 1997).

2.3.3. Regulação da Nuclease em *Serratia marcescens*

É sabido que a expressão da nuclease não é regulada pelo substrato, uma vez que a adição de ácidos nucleicos não interfere nos resultados de expressão. A transcrição de *nucA* é regulada pela fase de crescimento (Chen *et al.*, 1992). A transição das células bacterianas da fase exponencial para a estacionária é acompanhada por mudanças na expressão de genes que são responsáveis por respostas adaptativas, afetando a fisiologia e morfologia celular. A síntese de proteínas extracelulares envolvidas na degradação, em geral, também é regulada pela fase de crescimento (Jin *et al.*, 1996).

Em *E. coli*, nem sempre a alta produção da nuclease está relacionada a um grande número de células, demonstrando que há uma relação entre a expressão da *Nuc* e a fase de crescimento celular (Jepsen *et al.*, 1987). A maior quantidade de proteína é encontrada depois de 16 a 20 horas de cultivo, mas a maior parte fica presa no periplasma devido à saturação da maquinaria de secreção celular (Ball *et al.*, 1987). A super produção da nuclease em *E. coli* não causa nenhum efeito deletério aparente, embora haja indício de alguma atividade da nuclease no citoplasma, medida através da expressão do gene *recA*. Esta fraca atividade no citoplasma poderia ser explicada pela baixa atividade específica da enzima no citoplasma ou mesmo pela presença de um inibidor (Pedersen *et al.*, 1993).

A identificação de uma classe de mutantes pleiotrópicos que super expressam as proteínas quitinase, lipase, marcesina e nuclease (denominados *Nuc(Su)*, no caso desta última) mostraram que estas enzimas apresentam algumas rotas de regulação, ou mesmo reguladores em comum, provavelmente um repressor ou regulador negativo. Através da construção de uma série de mutantes, foi identificada a região regulatória a 120 pares de base antes do início do gene (Ball *et al.*, 1990).

A evidência de que agentes que bloqueiam a replicação do DNA, como mitomicina e ácido nalidíxico, induzem a nuclease através da resposta SOS nas células, bloqueiam as divisões celulares, e ativam a síntese e excreção de uma série de proteínas extracelulares, levou alguns pesquisadores à suspeita de que a nuclease poderia ser regulada pelo sistema SOS. De uma maneira geral, a atividade específica das enzimas depois da adição de mitomicina aumentou cerca de 20 vezes; com relação à atividade da nuclease extracelular e ligada à célula, este aumento foi de 16 e 120 vezes, respectivamente (Yusupova *et al.*, 1995). Posteriormente, foi demonstrado que mutações no gene *recA* abolem a expressão da nuclease.

Comparações entre *E. coli* e *Serratia* revelaram a existência de uma região anterior ao gene *nuc* (50 pares de base para *E. coli* e 70 pares de base para *Serratia marcescens*) que mostra total homologia e

representa o promotor e o repressor LexA. Por outro lado, a sequência da proteína RecA de *Serratia marcescens* quando comparada com a de *E. coli* apresenta 80% de homologia, sendo a diferença apenas na região carboxi-terminal. Consistente com o controle SOS, um sítio de ligação para LexA está presente na região promotora do gene *nucA* (Chen *et al.*, 1992). Quantas unidades de enzima são necessárias para se induzir a resposta SOS ainda não foi determinado (Ball *et al.*, 1989).

Vários genes coordenadamente regulados pelo sistema SOS são reprimidos pela proteína LexA. Em resposta aos danos no DNA, a proteína RecA é convertida em uma forma ativa levando à clivagem autocatalítica da proteína LexA e outros repressores. Isto permite que diferentes sistemas de repressão coordenem a expressão de suas proteínas, dependendo do estado da RecA na célula (Ball *et al.*, 1989).

A síntese de nuclease é induzida na fase tardia de crescimento exponencial tanto em *Serratia marcescens*, como em *E. coli*. Mutações pleiotrópicas causando super expressão da nuclease também aumentam a eficiência do passo de secreção extracelular, como se componentes do sistema secretório fossem regulados coordenadamente (Suh *et al.*, resultados não publicados).

Foi identificado um operon *nuc* em *Serratia marcescens*, cuja sequência é ORF1 (*nucE*), ORF2 (*nucD*) e ORF3 (*nucC*) (figura 5). Sua transcrição ocorre a partir de um mesmo promotor, que também é regulado pelo sistema SOS, porque apresenta sítios de ligação do repressor LexA. O gene *nucE* codifica uma proteína de membrana com 2 domínios transmembrana e uma região carboxi-terminal carregada positivamente, que está relacionada à expressão e secreção da nuclease. Sua superexpressão aumenta a permeabilidade e causa a morte celular (Jin *et al.*, 1994 e 1996). O gene *nucD*, que se sobrepõe ao *nucE*, codifica uma proteína, NucD, que apresenta alta similaridade com a proteína S do fago lambda, envolvida na lise de proteínas. Este gene apresenta dois sítios de iniciação de transcrição com as respectivas sequências Shine-Dalgarno e originam sequências que diferem entre si por 9 nucleotídeos (Chen *et al.*, 1992).

Por outro lado, o ORF *nucC* mostrou uma alta similaridade com uma família de ativadores transcricionais codificadas por bacteriófagos temperados relacionados ao fago P2 (*nucC* tem 66% de homologia com o *ogr* de P2) (Ball *et al.*, 1989) e igualmente interage com a subunidade alfa da RNA polimerase. *NucC* foi identificada como a proteína ativadora da transcrição do operon inteiro, mas em posição antisense não é capaz de fazê-lo. Altos níveis de expressão da *NucC* tornam-se letais inclusive em *E. coli*. Componentes do sistema secretório podem ser regulados conjuntamente com *nucA* (Winkler, 68 e Winkler e Timmis, 73). O regulador negativo da nuclease é o produto do gene *nucA*.

Figura 5. Localização dos três "Open Reading Frames" relacionados à expressão do gene *nuc* e suas respectivas funções (Suh e Benedik, 1996).

2.4. A LEVEDURA *S. cerevisiae* COMO ORGANISMO HOSPEDEIRO DE GENES HETERÓLOGOS

A levedura *S. cerevisiae* é extensivamente utilizada para o estudo e compreensão da célula eucariótica. Este microrganismo contribui significativamente para o conhecimento sobre estrutura do cromossomo, segregação, replicação, recombinação, maquinarias de transcrição e tradução, transporte intracelular e rotas metabólicas básicas. A maior

vantagem que esta levedura apresenta como modelo biológico é a facilidade de manipulação, análise genética e crescimento (Castilho-Valavicius *et al.*, 1992).

Além da sua contribuição para estudos básicos, este microrganismo, como citado anteriormente, é usado para expressão e estudo de uma variedade de produtos de genes eucarióticos, utilizados em pesquisa básica, como também, na indústria em geral. Como são microrganismos unicelulares, muitas das técnicas usadas em bactérias podem ser extrapoladas para leveduras. *Saccharomyces cerevisiae* ainda apresenta crescimento rápido atingindo altas densidades celulares, podendo ser propagada em meios simples e transformada com uma variedade de vetores de plasmídeos integrativos ou replicativos (Buckholz e Gleeson, 1991).

Diferentemente de bactérias, as leveduras por serem organismos eucariotos, tem funcionamento semelhante ao de muitos organismos pluricelulares, dotados de uma organização intracelular altamente compartimentalisada e elaboradas rotas de transporte, as quais intermediam a secreção e modificação de muitas proteínas.

As células de *S. cerevisiae* podem propagar-se vegetativamente como diplóides ou haplóides, sendo que este último estado comporta dois tipos de acasalamento a e α . Em linhagens selvagens, estes tipos podem alternar, através do fenômeno denominado de interconversão gênica. No estado haplóide, a levedura secreta pequenas moléculas denominadas feromônios, que agem promovendo vários processos celulares, como: agregação de células de tipo de acasalamento oposto e bloqueio na fase G1 do ciclo celular, sincronizando os dois núcleos para a fusão. Estes eventos facilitam a conjugação e a formação de diplóides (Thorner, 1981).

Por outro lado, as células diplóides, quando em meios contendo baixas quantidades de nitrogênio, iniciam o processo da meiose e formam tétrades contendo quatro esporos haplóides. O tempo de geração desta espécie é de aproximadamente 90 minutos, sendo que as novas

células são formadas por brotamento a partir das células mães. O genoma da levedura é pequeno, cerca de 15000 kb, compreendendo 16 cromossomos e não apresenta muitos introns ou sequências repetidas (Castilho-Valavicius *et al.*, 1992).

A levedura representa um excelente sistema de expressão de proteínas heterólogas, e de fato tem sido amplamente usada, principalmente nos casos onde a proteína de interesse é incompatível com a expressão em *E. coli*, ou deve ser secretada e modificada após a tradução. O grande número de estudos em relação à genética de *S. cerevisiae* permitiu a construção de linhagens que são especialmente aptas para a expressão de genes heterólogos em altos níveis.

2.5. VETORES DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM *Saccharomyces cerevisiae*

A partir de meados da década de 70, quando ocorreu a padronização da metodologia de transformação de células protoplastizadas com plasmídeos exógenos, descrita por Hinnen *et al.* em 1978, a levedura *S. cerevisiae* pôde ser utilizada como organismo hospedeiro de vetores de expressão de proteínas heterólogas. Posteriormente, Ito *et al.* (1984) desenvolveram uma metodologia mais simples de transformação de *S. cerevisiae* através de tratamento com acetato de lítio, que pode ser utilizada na maioria dos casos, e que dispensa a necessidade de produção de esferoplastos e sua posterior regeneração.

Outro fator muito importante para a manipulação genética em *S. cerevisiae* foi a descoberta nesta levedura, de plasmídeos capazes de replicação autônoma em relação ao material genético cromossômico, dentre os quais o mais importante é o plasmídeo 2-micron, que funciona como base para a maioria dos vetores atualmente utilizados (Schenberg & Bonatelli, 1987). Paralelamente, a partir de bibliotecas genômicas de *S. cerevisiae*, foram sendo isolados os genes envolvidos com a biossíntese de vários

aminoácidos, permitindo a caracterização dos alelos selvagens responsáveis pelas auxotrofias destas linhagens, anteriormente caracterizadas por métodos de genética clássica. Tais genes são utilizados como marcadores de seleção, sendo os mais frequentes *LEU2* (Ratzkin & Carbon, 1977), *URA3* (Rose *et al.*, 1984) e *TRP1* (Tschumper & Carbon, 1980).

Finalmente, com o isolamento de uma série de genes responsáveis pela produção de proteínas em grande quantidade em *S. cerevisiae*, e os promotores destes genes passaram a ser empregados para controlar a expressão de proteínas recombinantes, dado que promotores de outros microrganismos são inativos em *S. cerevisiae*. A maior parte destes promotores provêm de genes que codificam enzimas envolvidas na via glicolítica, cuja produção em altas concentrações dentro da célula atividade já era conhecida há anos. Outros promotores, de genes envolvidos no metabolismo da galactose, fosfato e citocromo *c1*, também são muito utilizados (Shuster, 1989).

A maioria dos vetores de expressão que foram construídos apresentam origens de replicação tanto para *S. cerevisiae*, como para *E. coli*, de modo a permitir que vários passos da manipulação genética sejam realizados em bactéria, na qual o rendimento na produção de plasmídeos é maior. Além disso, é necessária a presença no vetor de marcadores de seleção para estes dois microrganismos e um cassete de expressão com um promotor forte de *S. cerevisiae* (muitas vezes também com o seu terminador de transcrição específico) (Schenberg & Bonatelli, 1987).

Atualmente, muitos grupos dão preferência a vetores que contenham como marcador de seleção o gene *leu2d* (*LEU2* defectivo), visando a amplificação do número de cópias do plasmídeo por célula, o que propicia maior rendimento na expressão da proteína exógena (Shuster, 1989). Estes plasmídeos derivados do plasmídeo 2-micron, foram desenvolvidos por J. D. Beggs (1981) e contêm o gene *LEU2* deletado 29 bp antes do codon de iniciação. Mesmo assim, o gene é transcrito, embora com uma taxa de expressão menor do que 5% daquela encontrada para o gene selvagem. Consequentemente, para que a célula possa crescer em meio

sem leucina, é necessária a presença deste gene em alto número de cópias (cerca de 400 por célula) (Erhart & Hollenberg, 1983).

A maioria dos plasmídeos de levedura utilizados para a expressão de proteínas heterólogas pertencem ao grupo dos epissomais (Yep - yeast epissomal plasmids), que, além da origem de replicação, apresentam características importantes como: alta eficiência de transformação, grande número de cópias por célula e segregação correta durante a divisão celular (Broach, 1983).

Sequências de replicação autônoma, *ARS*, presentes em plasmídeos replicativos (YRp), são consideradas opções para o uso de plasmídeos que não os baseados no 2-micron, apesar dos YRps serem menos estáveis (Williamson, 1985). Outros vetores de leveduras são os denominados plasmídeos centroméricos (YCp), que contém as regiões centroméricas *CEN*, plasmídeos lineares (YLp) que apresentam *CEN* e dois telômeros (*TEL*) e plasmídeos integrativos (YIp), que são mais estáveis, embora com número de cópias menor (Schenberg e Bonatelli, 1987).

2.6. PROMOTORES UTILIZADOS PARA A EXPRESSÃO EM *Saccharomyces cerevisiae*

As primeiras proteínas recombinantes foram obtidas na levedura a partir de promotores de genes envolvidos na via glicolítica, como é o caso do alfa interferon humano produzido por Hitzeman e colaboradores (1981) utilizando o promotor da álcool desidrogenase I (*ADHI*). Foi também com o mesmo promotor que Valenzuela e colaboradores (1982), produziram pela primeira vez o AgHBs em levedura.

O promotor *PGK*, do gene da fosfoglicerato quinase, também foi utilizado para obtenção de proteínas heterólogas, (Tuite *et al.*, 1982; Chang *et al.*, 1986), com níveis de expressão semelhantes aos obtidos com o promotor *ADH1*. Outros sistemas, baseados no promotor da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) (Bitter e Egan, 1984), permitiram a

expressão da timidina-quinase do Herpes vírus (Zhu *et al.*, 1984), taumatina (Edens *et al.*, 1984) e transcriptase reversa do HIV (Barr *et al.*, 1987b).

Altos níveis de expressão são obtidos quando apenas regiões menores derivadas deste promotor são utilizadas (Rosenberg *et al.*, 1990; Hinnen *et al.*, 1989). Aproveitando-se desta característica, foram construídos promotores híbridos contendo regiões do promotor *GAPDH* e regiões reguladoras de promotores indutíveis como *GAL1* (Bitter e Egan, 1988), *GAL7* (Wagenbach *et al.*, 1991) e *ADH2* (Cousens *et al.*, 1989).

Os sistemas de expressão utilizando promotores da via glicolítica, apesar de garantirem níveis consideráveis de expressão nos experimentos iniciais, apresentam a grande desvantagem de serem ativos na presença de glicose, e serem reprimidos numa taxa média de 10 vezes na ausência desta. Esta característica leva a uma dinâmica de produção de proteínas exatamente contrária à desejável: a atividade do promotor é maior na fase inicial do cultivo celular em meio com glicose e diminui com a exaustão da fonte de carbono, propiciando a manifestação de possíveis efeitos deletérios que as proteínas heterólogas possam exercer sobre as células. O crescimento celular em meio pobre e posterior adição de glicose levaria a um crescimento vagaroso, bem como a uma indução de apenas cerca de 10 vezes. Por este motivo, os promotores dos genes da via glicolítica não constituem a melhor escolha para a produção de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae* (Shuster, 1989).

A produção de proteínas recombinantes numa fase precoce durante o cultivo celular pode prejudicar o rendimento final (Fieschko *et al.*, 1987). Em virtude dos efeitos deletérios da proteína exógena sobre as células, tem se dado preferência à utilização de sistemas de expressão com taxas de indução mais elevadas e menor produção constitutiva, nos quais a indução possa ser aplicada em fases tardias do crescimento celular, quando a densidade celular já for elevada. Um bom nível de expressão pode ser obtido pela presença de um promotor indutível de alta eficiência, que possibilite o ciclo de crescimento celular na ausência do indutor, evitando que efeitos nocivos da proteína estrangeira sejam causados à célula

hospedeira. Quando o indutor é adicionado (ou o repressor é exaurido), há a expressão da proteína de interesse, possibilitando um alto rendimento na produção.

Os principais sistemas de expressão de proteínas heterólogas com estas características são os sistemas da álcool desidrogenase II, da galactose, do citocromo *CYC1* e da fosfatase ácida (Shuster, 1989). O gene *PHO5* codifica uma das fosfatases ácidas da levedura (monoester-ortofosfórico hidrolase) e tem sua atividade regulada pela quantidade de fosfato inorgânico no meio. O promotor deste gene tem sido muito utilizado para a produção de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae*, pois, permanece reprimido em meio com fosfato inorgânico, sendo a sua atividade induzida na ausência desta substância. Desta forma, a fase inicial do cultivo é realizada em meio rico em fosfato até o aumento da massa celular, quando então as células são centrifugadas e o meio substituído por outro, pobre em fosfato inorgânico (Miyanojara *et al.*, 1983). A construção de promotores híbridos, com as *UAS* ("upstream activator sequences") de *PHO5* unidas a elementos reguladores do promotor *GAPDH*, permitiu a obtenção de níveis de expressão mais elevados do que com os dois promotores isolados, pois confere regulação a um promotor forte (Hinnen *et al.*, 1989).

O gene do citocromo *c1* (*CYC1*) é regulado pelo sistema de repressão via glicose e foi também utilizado para a produção de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae* (Shuster, 1989). Os sistemas de expressão indutíveis baseados nos promotores do gene da álcool desidrogenase II e de genes envolvidos com o metabolismo da galactose serão analisados detalhadamente nos próximos itens. Além dos sistemas citados acima, foram também utilizados em menor escala os promotores do fator alfa (*MF α 1*) (Astolfi Filho *et al.*, 1986), da ornitina transcarbamoylase (*ARG3*) (de Wilde *et al.*, 1985), da invertase (*SUC2*), do gene *URA3* (Smith *et al.*, 1985), do gene *TRP1* (Dobson *et al.*, 1983), etc.

2.7. EXPRESSÃO BASEADA NO PROMOTOR DO GENE DA ÁLCOOL DESIDROGENASE II (*ADH2*)

2.7.1. Regulação da expressão do gene *ADH2*

A levedura *S. cerevisiae* possui quatro isoenzimas da álcool desidrogenase: *ADHI*, *ADHII* (Ciriacy, 1975, 1976 e 1979), *ADHIII* (Young e Pilgrim, 1985) e *ADHIV* (Paquin e Williamson, 1986), sendo que os genes das três primeiras já foram identificados. A grande vantagem da utilização do promotor *ADH2* é que ele é reprimido na presença de glicose, sendo a sua atividade induzida cerca de 100 vezes com a exaustão das fontes de carbono fermentáveis (Lutsdorf e Megnet, 1968; Schimpfessel, 1968). Através de experimentos envolvendo mutações decorrentes da inserção do elemento transponível *Ty* na região 5' não codificadora do gene *ADH2*, foi possível delimitar a região reguladora deste gene. Nesta região, foi encontrada uma sequência de 22pb, repetida 2 vezes (Russel *et al.*, 1983b), a qual foi posteriormente identificada como *UAS* responsável pela indução do gene *ADH2* em células crescidas na ausência de glicose (Beier e Young, 1982).

Os genes necessários para a indução completa de *ADH2* foram identificados e pertencem a dois tipos diferentes: alguns, específicos para a expressão de *ADH2*, e outros, necessários para a expressão de outros genes reprimidos pela glicose (que fazem parte do sistema de controle da repressão catabólica generalizada pela glicose) (Shuster, 1989).

Os genes *ADR1* e *ADR6* são responsáveis pela ação específica no promotor do gene *ADH2*. Para o gene *ADR1*, são encontrados dois tipos de mutantes: a forma recessiva *adr1*, incapaz de induzir *ADH2* e a forma dominante *ADR1^c*, com níveis basais elevados de produção de *ADH2* na presença de glicose. Mutantes *ADR1^c* também produzem mais *ADH2* em meios com fontes de carbono não fermentescíveis em comparação com linhagens selvagens (Shuster, 1989).

O gene *ADR1* é constitutivo (Denis e Gallo, 1986) e a sua atividade é regulada pela proteína quinase dependente de AMP cíclico (Cherry *et al.*, 1989). Mutantes *ADR1* apresentam, em geral, alterações no modo de fosforilação da proteína *ADR1*. A interação desta proteína com as sequências de 22 pb correspondentes às *UAS_{ADH2}* já foi demonstrada (Eisen *et al.*, 1988).

Outro ativador de transcrição de *ADH2* é o gene *ADR6*, embora seu mecanismo de ação não tenha sido totalmente esclarecido (Tagushi e Young, 1987a e 1987b). O gene *ADR4* participa da ativação de *ADH2* dependente de *ADR1* (Ciriacy, 1979).

2.7.2. Expressão de proteínas heterólogas usando *UAS_{ADH2}*

A identificação das regiões reguladoras *UAS* do promotor *ADH2* permitiu a utilização de segmentos deste promotor para a regulação da expressão de proteínas heterólogas cujos genes contenham estes *UAS_{ADH2}*. A primeira utilização deste promotor na produção de uma proteína heteróloga envolveu a síntese e secreção do fator de crescimento epitelial humano (hEGF), utilizando a sequência codificadora do líder do fator alfa (Shuster, 1987).

Visando aumentar o rendimento da produção de proteínas heterólogas, foram construídos promotores híbridos contendo os *UAS_{ADH2}* e as regiões localizadas entre os *UAS* e o codon de iniciação de outros promotores transcritos com alta eficiência.

Destaca-se em particular, o promotor híbrido *ADH2/GAPDH*, descrito por Cousens e colaboradores (1987), para a síntese de insulina, que vem sendo amplamente utilizado na síntese de diversas proteínas recombinantes, além do próprio AgHBs e outros antígenos do VHB (vírus hepatite B) (Valenzuela *et al.*, 1985). O promotor híbrido *ADH2/GAPDH* confere regulação devido à sequência *UAS_{ADH2}*. Este controle regulatório apresenta vantagens sobre outros sistemas de expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, como por exemplo, *GAL1,10* (Guarente *et al.*,

1982), *PHO5* (Bostian *et al.*, 1983), uma vez que: a) não é necessária a adição de um indutor externo para que a indução do promotor ocorra, tornando o processo mais barato; b) mudar a temperatura da cultura, o que poderia ser mais difícil em larga escala e c) a desrepressão do *ADH2* não requer linhagens hospedeiras específicas ou mutações (Cousens *et al.*, 1987).

Como os sistemas de expressão em geral utilizam plasmídeos mantidos em alto número de cópias por célula, é importante manter um equilíbrio entre os *UAS* e suas respectivas proteínas ativadoras, evitando um provável efeito limitante decorrente da insuficiência de ativador (Irani *et al.*, 1987). No caso da expressão utilizando-se *UAS_{ADH2}* é necessária portanto, a super-expressão de *ADR1*, o que pode ser obtido pela adição de uma cópia de *ADR1* ao vetor de expressão ou pela integração de múltiplas cópias deste gene no genoma do hospedeiro, ou ainda, pela integração de uma ou poucas cópias deste gene no genoma, submetida à regulação de um promotor forte (Shuster, 1989).

Seguindo esta última linha, foram construídas linhagens contendo uma cópia do gene *ADR1* submetido ao controle do promotor *GAPDH* integrada no seu genoma. A expressão da proteína híbrida foi consideravelmente maior neste tipo de linhagem em relação a outras, selvagens para o gene *ADRI* (Shuster, 1989).

2.8. SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS A PARTIR DE FUSÃO GÊNICA

Estes sistemas permitem a obtenção de altos níveis de proteínas heterólogas, que podem ser secretadas para o meio ou mantidas dentro da célula. Os sistemas de expressão intracelular de proteínas em levedura são mais variados, sendo o mais simples e mais difundido a clonagem direta do gene desejado, incluindo o seu codon de iniciação logo após um promotor (constitutível ou indutível), que irá controlar sua

expressão. Muitas proteínas foram obtidas com sucesso a partir deste sistema. Além do elevado rendimento, a presença das modificações pós-traducionais na levedura (como por exemplo, agrupamento em partículas, acetilação e miristilação) garante muitas vezes a manutenção das funções das proteínas expressas e secretadas. Entretanto, geralmente, encontra-se o problema do resíduo de metionina derivado do codon de iniciação, que não é removido pela ação da metionil aminopeptidase (MAP) endógena, o que pode alterar a função ou imunogenicidade da proteína (Barr *et al.*, 1990).

Além deste fato, certas proteínas são obtidas em níveis muito baixos em *S. cerevisiae* quando os genes são clonados da forma direta descrita acima. Em alguns casos, estes índices podem aumentar consideravelmente quando se constroem proteínas quiméricas baseadas em fusões gênicas. Esta estratégia foi utilizada para a expressão da pró-insulina humana fusionada à superóxido dismutase humana (hSOD), a qual é altamente estável na levedura (Cousens *et al.*, 1987) e, posteriormente, para várias outras proteínas (Barr *et al.*, 1990).

O principal sistema para secreção de proteínas heterólogas produzidas por *S. cerevisiae* utiliza a sequência sinal do feromônio ou fator alfa. Este é um peptídeo de 13 resíduos de aminoácidos, ativa e constitutivamente secretado pela célula. O feromônio α é inicialmente sintetizado sob a forma de um precursor de 165 resíduos (prépro-fator alfa), que contém um líder de 83 resíduos, seguido de quatro repetições consecutivas do feromônio maduro, precedidos por um pequeno peptídeo espaçador de sequência Lys-Arg-(Glu/Asp-Ala) (Brake, 1989; Kurjan & Herkowitz, 1982).

O processamento deste precursor se faz pela ação de 4 enzimas: a) uma sinal peptidase que cliva entre os resíduos 19 e 20, liberando o peptídeo sinal; b) uma endoproteinase codificada pelo gene *KEX2*, que cliva o lado carboxi-terminal da sequência Lys-Arg que precede o espaçador de cada repetição (Julius *et al.*, 1983b); c) uma dipeptidil aminopeptidase, codificada pelo gene *STE13*, que remove os resíduos do espaçador no lado amino-terminal de cada repetição; e d) uma

carboxipeptidase codificada pelo gene *KEX1*, que remove os resíduos arginil e lisil na extremidade carboxi-terminal de cada repetição (Achstetter e Wolf, 1985) (Figura 6).

Figura 6. Estrutura e Processamento da prépro-fator alfa (reproduzida de Barr *et al.*, 1990). A. Esquema da estrutura do principal gene estrutural do fator alfa (MF α 1), com os sítios de processamento endoproteolítico e três sítios de N-glicosilação ($\square$). B. Sequência de aminoácidos de uma única repetição do fator alfa resultante da clivagem pela KEX2. Os sítios de maturação do fator alfa ativo clivado pelas exopeptidases STE13 (Δ) e KEX1 (O) estão assinalados.

Neste sistema, o gene desejado é clonado sob a forma de fusão gênica com a sequência codificadora do peptídeo-sinal do fator alfa, logo após o sítio de clivagem da KEX2 (Brake *et al.*, 1984). A proteína então será conduzida às vias de secreção da levedura, após translocação do peptídeo sinal através da membrana do retículo endoplasmático, e o produto final secretado terá a forma da proteína natural (Brake, 1989).

Foi ainda desenvolvido um outro sistema, que aproveita as vantagens das altas taxas obtidas pela expressão das proteínas de fusão e,

além disto, origina produtos autênticos, inclusive sem a metionina na extremidade amino (Sabin *et al.*, 1989). Este sistema baseia-se no processamento *in vivo* de proteínas quiméricas entre a ubiquitina da levedura (amino-terminal) e a proteína heteróloga (carboxi-terminal), através da enzima ubiquitina-hidrolase, UBH, altamente específica para a sequência Arg-Gly-Gly da extremidade carboxi-terminal da própria ubiquitina (Varshavsky *et al.*, 1989).

A ubiquitina da levedura é uma proteína de 76 resíduos de aminoácidos, sintetizada a partir de 4 genes. O gene *UBI4* sintetiza um precursor pentamérico, a poliubiquitina (Ozkayanak *et al.*, 1984), que é uma proteína de estresse térmico, essencial para a levedura nestas condições (Finley *et al.*, 1987). A maioria da ubiquitina encontrada normalmente na levedura, é derivada dos genes *UBI1*, *UBI2* e *UBI3*, que codificam proteínas híbridas com a ubiquitina situada a montante e caudas de sequências de proteínas não relacionadas envolvidas com a biogênese dos ribossomos, o que sugere um papel de chaperone à ubiquitina neste processo (Finley *et al.*, 1989). A enzima responsável pelo processamento destes precursores, a ubiquitina-hidrolase, foi caracterizada e promove uma clivagem muito rápida, eficiente e específica para a ligação peptídica subsequente à última glicina da ubiquitina (Barr *et al.*, 1990).

Este sistema foi inicialmente utilizado por Varshavsky *et al.* (1989), para a produção de proteínas recombinantes com cada um dos diferentes resíduos de aminoácidos em suas extremidades amino. A partir destes experimentos, foi possível estabelecer a "regra da extremidade amino", que define e classifica os aminoácidos presentes nesta região quanto ao seu papel na determinação da estabilidade das proteínas (Pínho, 1995).

Posteriormente, descobriu-se que este sistema pode levar a níveis muito elevados de expressão de proteínas heterólogas processadas (Sabin *et al.*, 1989). Inicialmente, obteve-se a expressão em altos níveis, de gama interferon humano e o inibidor da alfa 1-proteinase, que possuíam extremidades amino iguais às proteínas autênticas. Foram também

expressas através deste sistema diversas regiões das proteínas de envelope e da integrase do HIVI (Barr *et al.*, 1991).

3. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi construir um sistema suicida para *Saccharomyces cerevisiae* baseado na degradação do material genético, através da expressão e atividade da nuclease de *Serratia marcescens*.

Para tal, as seguintes etapas foram cumpridas:

3.1. Clonar o gene *nuc* de *Serratia marcescens* no plasmídeo episomal de *Saccharomyces cerevisiae* pBS24Ub;

3.2. Analisar a expressão deste gene em diferentes linhagens de *S. cerevisiae*;

3.3. Analisar a atividade da enzima produzida pela levedura *in vitro* e *in vivo*;

3.4. Verificar o comportamento da(s) levedura(s) portadoras do gene suicida no meio ambiente;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LINHAGENS E PLASMÍDEOS

4.1.1. Linhagens de Bactérias:

<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> ; Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> DM15); <i>hsdR17</i> ; <i>recA1</i> ; <i>endA1</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>relA1</i> (Maniatis et al., 1982)
<i>S. marcescens</i> SM(6)	1ab selvagem (Ball et al., 1987)

4.1.2. Linhagens de leveduras:

<i>S. cerevisiae</i> W303-1B:	<i>MATα</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-1</i> , <i>his3-15</i> ; <i>leu2-3</i> , <i>leu111</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> (Dr. Rodney Rothstein - Department of Human Genetics - Columbia University)
<i>S. cerevisiae</i> JSC302	<i>MATα</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>prb1-1122</i> ; <i>pep4-3</i> ; <i>prc1407 :: DM15</i> (<i>pGAPDH/ADR1</i> , <i>G418^R</i>); <i>cir⁰</i> (esta linhagem é derivada da linhagem AB110 na qual foi introduzido o cassete de expressão constitutiva de <i>ADR1</i> no centro do gene <i>prc1-407</i>) (Caumont et al., 1996).
<i>S. cerevisiae</i> STX507-5D:	<i>MATα</i> , <i>rad52-1</i> , <i>ura3</i> , <i>arg4</i> , <i>lys7</i> , <i>trp1</i> , <i>lys2</i> , <i>ade5</i> , <i>his7</i> (Yeast Genetic Stock Center).
<i>S. cerevisiae</i> JRY481	<i>MATα</i> , <i>rad52-1</i> ; <i>arg4</i> ; <i>aro7</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1</i> ; <i>ade1</i> ; <i>leu2</i> ; <i>his4</i> (Jasper e Rine, 1984).

4.1.3. Plasmídeos:

Os plasmídeos usados neste trabalho estão representados abaixo:

Figura 7. pBGS18-Nuc8. Este plasmídeo é um vetor que confere resistência a canamicina (Km^R) derivado do pUC18 (os mesmos sítios múltiplos de clonagem), com 4 Kb que apresenta como inserto o gene codificando somente a região da nuclease madura, ladeada por dois sítios de *Bam*HI (Spratt *et al.*, 1986). Cedido por Dr. Michael Benedick (University of Houston, Houston, TX).

Figura 8. pBS24Ub. Este plasmídeo é um vetor bifuncional com 15 Kb derivado do pBS24.1 que contém o promotor *ADH2/GAPDH*, o gene da ubiquitina (*UBI*) da levedura e os marcadores de seleção *URA3* e *LEU2* para leveduras e Ap^R para bactérias (Sabin *et al.*, 1989).

Figura 9. pUbNuc. Plasmídeo idêntico ao da figura 8 com inserção do fragmento de 789 pb nos sítios de *SacII* e *SnaI*, referente ao gene da nuclease de *Serratia marcescens*. Construído neste trabalho.

Figura 10. pUC18. Plasmídeo de alto número de cópias, que foi construído com diferentes partes de outros relacionados. Apresenta um sítio múltiplo de clonagem com 54 pb e o gene que codifica para a enzima β-lactamase.

4.2. SOLUÇÕES E TAMPÕES

As soluções foram preparadas segundo Sambrook *et al.*, 1989.

4.2.1. Solução I: 25mM TRIS-HCl, 10mM EDTA, 50mM glicose. O pH final deve ser 8.0.

4.2.2. Solução II: 0.2N hidróxido de sódio, 1% SDS.

4.2.3. Solução III: 3M acetato de sódio, 2M ácido acético. Ajustar o pH para 4.8.

4.2.4. Solução RNAaseA: 10 mg/ml em NaOH 0.1M

4.2.5. Solução LTE: 10 mM TRIS, 1mM EDTA, 100mM LiAc

4.2.6. Solução PLTE: 50% PEG 4000, 10 mM TE, 10mM LiAc

4.2.7. Solução Salina: NaCl 0.85% em água destilada

4.2.8. Solução BR (Barnes & Rine, 1987): 100mM NaCl, 50mM TRIS pH 7.4, 10mM MgSO₄, 1mg BSA/ml, 1mM PMSF, 5mM D-aminobenzamidina, "glass-beads" (100mg, 0.5 mm de diâmetro).

4.2.9. Solução corante para dosagem de proteínas: 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 dissolvidos em 50 ml de etanol 95% por vigorosa agitação. Esta solução é misturada com 100 ml de 85% ácido orto-fosfórico, diluída com água destilada para 1 litro e filtrada. O reagente é estável a temperatura ambiente por 2 semanas.

4.2.10. Solução A para SDS-PAGE: 30% Acrilamida (p/v) e 0.8% Bisacrilamida (p/v) em água bidestilada, armazenada a 4°C em frasco escuro.

4.2.11. Solução B para SDS-PAGE: 18,7 g TRIS em água bidestilada. Ajusta-se o pH para 8.8 com HCl 6 N. O volume é completado para 100 ml e no final, adiciona-se 0.4 g de duodecil sulfato de sódio (SDS).

4.2.12. Solução C para SDS-PAGE: 6.04g de TRIS em água bidestilada. Ajusta-se o pH para 6.8 com HCl 6 N. O volume é completado para 100 ml e no final, adiciona-se 0.4 g de SDS.

4.2.13. Solução de Persulfato de amônio (APS): 10 g de persulfato de amônia em 100 ml de água.

4.2.14. Solução corante para proteínas: 50% Isopropanol, 10% TCA, 1% Azul de Coomassie (Brilliant Blue G-250, Sigma) ou 50% Metanol, 10% Ácido acético, 0.2% Azul de Coomassie (Brilliant Blue G-250, Sigma).

4.2.15. Solução descorante forte para proteínas: 50% metanol, 10% ácido acético.

4.2.16. Solução descorante média para proteínas: 25% metanol, 5% ácido acético.

4.2.17. Solução descorante fraca para proteínas: 10% metanol, 7% ácido acético.

4.2.18. Solução salina de fosfato (PBS) 0.1 M pH 7.2: 8.2 g/l NaCl, 1.05 g/l Na_2HPO_4 , 0.31 g/l NaH_2PO_4 .

4.2.19. Solução bloqueadora: 5% leite desnatado em pó (Molico) em 100 ml de PBS pH 7.2.

4.2.20. Solução de lavagem para Western Blot: PBS pH 7.2 ou PBS pH 7.2 com Triton X-100 0.1%.

4.2.21. Anticorpo anti-nuclease: anticorpo policlonal produzido em coelhos com a enzima purificada. Solução estoque 50% em glicerol. Gentilmente cedido por Dr. Michael Benedik, University of Houston, Houston, TX.

4.2.22. Conjugado: anti-IgG de coelho Horseradish-peroxidase (BIO-RAD), diluída 1/100 em solução bloqueadora.

4.2.23. Solução cromógena para Western Blot: 39 ml de PBS pH 7.2, 10 ml de etanol absoluto, 1 ml de 4-Cl-Naftol e 30 μl de peróxido de hidrogênio 30%.

4.2.24. Normal Melting Agar (NMA) 1%: 1000 mg de agar em 100 ml de PBS pH 7.4.

4.2.25. Low Melting Agar (LMA) 0.7%: 105 mg de agar em 15 ml de PBS pH 7.4. Manter a 4°C.

4.2.26. Solução de Lise para ensaio Cometa: 146.1 g de NaCl, 37.2 g de Na_2EDTA , 1.2 g de Tris em um litro de água destilada. Adicionar 8 g de NaOH e agitar durante a noite e estabilizar o pH em 10.0. Esterilizar.

4.2.26.1. Solução Ativa: 71 ml de solução anterior, 0.8 ml de Triton X 100, 8 ml de DMSO, agitar e colocar a 4°C, ao menos meia hora antes do experimento.

4.2.27. Solução de Neutralização para ensaio Cometa: 0.4 M Tris pH 7.5, 1 litro.

4.2.28. Solução estoque de Brometo de Etídio: 5mg em 50 ml de água destilada (B). A solução de utilização é feita com 300 µl de solução B em 2.7 ml de água destilada.

4.2.29. Solução de X-Gal: 20 mg/ml.

4.2.30. Solução de IPTG: 200 mg/ml.

4.2.31. Solução de zimoliase: 2 mg/ml.

4.3. TAMPÕES

Todos os tampões, quando não citadas as referências, foram preparados segundo Sambrook *et al.*, 1989.

4.3.1. TE: 20mM TRIS-HCl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0.

4.3.2. STET: 8% de sacarose, 50 mM TRIS pH 8.0, 50 mM EDTA, 5% Triton X-100.

4.3.3. TBE 10X: 0.89mM TRIS; 0.89 mM ácido bórico; 0.2mM EDTA.

4.3.4. Tampão de Amostra (10X) para eletroforese em gel de agarose: 10X TBE, 30% glicerol (v/v), 0.1% azul de bromofenol (p/v).

4.3.5. Tampão de corrida para SDS-PAGE (10X): 30 g TRIS, 144 g Glicina e 10 g SDS em 1 litro de água bidestilada.

4.3.6. Tampão de amostra para SDS-PAGE: 240 mM TRIS pH 6.8, 0.8% SDS, 200 nM 2-mercaptoetanol, 40% Glicerol, 0.02% Azul de bromofenol. Este tampão é armazenado em alíquotas a -20°C.

4.3.7. Tampão de transferência para Western blot: 25 mM TRIS, 192 mM Glicina, 20% Metanol.

4.3.8. Tampão frio (para eletroforese em pH 13, ensaio Cometa): 1mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH em 2 litros de água destilada a 4°C.

4.4. MEIOS DE CULTURA

Os meios sólidos para bactérias como para leveduras são idênticos aos meios líquidos, somente acrescidos de 2% de ágar-ágar Difco.

4.4.1. Cultivo das Leveduras: (preparados segundo Rose *et al.*, 1990)

4.4.1.1. Meio completo (YPD): 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 1 ou 2% de glicose, 2% de ágar-ágar.

4.4.1.2. Meio mínimo + glicose (SD): 0.67% Bacto base de nitrogênio de levedura sem aminoácidos Difco, 1% ou 8% de glicose, 2% ágar-ágar suplementado com aminoácidos ou bases nitrogenadas necessários para suprir as deficiências de auxotrofia das linhagens em cultivo, exceto aquela pela seleção da qual se busca (conc. final = 40µg/ml). Os clones transformados com os vetores de expressão foram estocados sempre em meios com 8% de glicose para se garantir a repressão do promotor *GAPDH2/ADH2*.

4.4.1.3. Meio mínimo Asp+Glu (SD_{aspglu}) pH 6.0: 0.67% Bacto base de nitrogênio de levedura, 0.4% L-ácido aspártico, 0.4% L-ácido glutâmico, ajustar o pH para 6.0 com KOH, autoclavar e completar com glicose e água.

4.4.1.4. Meio mínimo tamponado em pH 7.0: para 100 ml, usar 4.97 ml de K₂HPO₄ 1M e 5.03 ml de KH₂PO₄ 1M.

4.4.1.5. Meio mínimo + glicerol (SG): meio mínimo, com 1% de glicerol 95% e complementado com os aminoácidos específicos.

4.4.1.6. Meio mínimo + rafinose (SR): meio mínimo, complementado com 2% de rafinose.

4.4.2. Cultivo de Bactérias: (preparados segundo Maniatis *et al.*, 1982)

4.4.2.1. Meio Completo LB: 1% triptona Difco, 1% cloreto de sódio, 0.5% extrato de levedura.

4.4.2.2. Meio YT: 0.8% triptona, 0.5% cloreto de sódio, 0.5% extrato de levedura.

4.4.2.3. Meio Suplementado com antibióticos: ampicilina foi adicionada ao meio numa concentração final de 100 µg/ml e canamicina numa concentração final de 50 µg/ml.

4.4.2.4. Meio SOC: 2% triptona, 0.5% extrato de levedura, 10mM cloreto de sódio, 2.5mM cloreto de potássio, 10mM cloreto de magnésio, 10mM sulfato de magnésio, 20mM glicose.

4.5. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO DE BACTÉRIAS

4.5.1. Mini-preparação

Após o crescimento das culturas de bactérias em 3 ml de meio YT com antibiótico (a 37°C com agitação por uma noite), estas foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi lavado em 250 µl de NaCl 10 mM (para remover a nuclease extracelular) e ressuspenso nesta ordem em: 100 µl de solução I, 5 minutos a temperatura ambiente, 200 µl de solução II, 5 minutos e 150 µl de solução III, 5 minutos em gelo. Os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 10000 rpm e ao sobrenadante foi adicionado 1 ml de etanol absoluto, precipitado em freezer -20°C por 30 minutos e após centrifugação a 12000 rpm, durante 20 minutos, o precipitado foi ressuspenso em 200µl de TE e tratado com a mesma quantidade de fenol tamponado.

Após lavagem do fenol, o DNA plasmidiano foi precipitado com etanol absoluto e 0.1M NaCl em freezer, por 20 minutos, e lavado duas vezes com etanol 70%, para finalmente ressuspender o sedimento em 30-50 µl de água ultra pura. A quantidade de DNA foi determinada em transiluminador U.V. e as amostras foram estocadas em freezer.

4.5.2. Maxi-preparação

As culturas de bactérias com os respectivos plasmídeos foram inoculadas em 200 ml de meio LB em frascos erlenmeyer de 1litro, contendo antibiótico adequado, e incubada durante a noite sob forte agitação. As células foram coletadas por centrifugação a 5000g/10'/4°C, lavadas em 10

ml de salina gelada e transferidas para tubos de 50 ml, onde foram submetidas a centrifugação de 5000g/10'.

O sedimento foi ressuspenso em 5 ml de solução I (+5 mg/ml de lisozima) e incubado por 10 minutos em gelo, acrescido de 10 ml de solução II, durante 10 minutos a temperatura ambiente e 7.5 ml de solução III, por 20 minutos em gelo. Seguiu-se centrifugação a 12000g durante 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi centrifugado a 12000g/10'/4°C novamente, após adição de igual volume de isopropanol e o sedimento ressuspenso em 2 ml de TE (+30 µl de RNase A 10mg/ml). A mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Para extração de proteínas associadas ao DNA, foram adicionados 100mM de NaCl, 1.5% de SDS e submetidos à extração com fenol:clorofórmio. O NaCl foi ajustado para 300 mM e o DNA precipitado com 2.5 volumes de etanol 100% por 30 minutos em freezer.

Após centrifugação a 12000g, 15 minutos a 4°C, o sedimento foi lavado 2 vezes com etanol 70%, dissolvido em 150 ml de água e estocado em freezer.

4.6. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO DE LEVEDURA

As células foram cultivadas em 1.5 ml de SD8% (devidamente complementado com os aminoácidos) durante 24 horas e centrifugadas em rotor SS34 a 6.000 rpm por 5 min (centrífuga Hitashi Himac CR20B2). O precipitado foi ressuspenso em 100µl de tampão STET e as células são lisadas com 0.2 g de "glass beads" (425-600 microns, Sigma), em agitador por 5 minutos, seguida da adição de 0.1 ml de tampão STET. As amostras foram fervidas por 3 minutos, esfriadas rapidamente em gelo e centrifugadas 10 minutos a 4°C.

Uma alíquota de 100µl ml de sobrenadante adicionada de 50µl ml de acetato de amônia 7.5M, foi, então, incubada a 4°C por 1 hora, seguida da centrifugação por 10 minutos. 100µl do sobrenadante foi

precipitado com etanol absoluto e lavado com etanol 70%, duas vezes. Após a secagem do precipitado, 20µl de água ultra pura foram adicionados para ressuspender o precipitado e metade deste volume usado para transformar bactéria.

Este experimento foi utilizado para checarmos a presença do plasmídeo de interesse na levedura, quando eram realizadas transformações diretas para estas, sem passar pela bactéria.

4.7. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO DNA EM GEL DE AGAROSE

Para análise e separação de fragmentos de DNA foram utilizados géis de agarose 0.7 e 0.8% em tampão TBE. As amostras de DNA foram diluídas em tampão de amostra 1X e a corrida foi realizada a 80V por 2 horas.

4.8. QUANTIFICAÇÃO DE DNA

4.8.1. Determinação espectrofotométrica (Sambrook *et al.*, 1989)

A quantidade de luz ultra violeta absorvida pelo DNA em estudo foi medida a 260 e 280 nm em espectrofotômetro Hitashi U-2000 (Hitashi Koki Co., Ltda., Tokyo, Japan). A primeira leitura foi empregada para o cálculo da concentração de DNA, considerando que uma unidade de Abs₂₆₀ corresponde a 50 µg DNA/ml. A relação Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ forneceu uma estimativa da pureza do ácido nucleico, de tal modo que os valores situados entre 1.8 e 2.0 foram indicativos de preparações de alto grau de pureza.

4.8.2. Quantificação Fluorescente com Brometo de Etídio

Após corrida eletroforética em gel de agarose, a quantidade de DNA presente na amostra foi estimada por comparação da intensidade da fluorescência emitida por esta com aquelas exibidas pelos fragmentos de

DNA ladder 1 Kb presentes em concentração conhecida. Quando o procedimento necessitou de maior precisão foi empregado o sistema Eagle Eye^R II (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA-USA), conforme instruções do fabricante.

4.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR - "POLIMERASE CHAIN REACTION") PARA OBTENÇÃO DO FRAGMENTO *nuc*

A PCR foi realizada segundo "kit comercial PCR Reagent System" da Life Technologies, Inc. de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 100 ng do DNA plasmidiano e 100 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador ("primer") numa reação de 100 µl. A quantidade de cada "primer" utilizado foi calculado pela seguinte fórmula:

$$(n) \text{ ml} = \frac{(n) \text{ bases do "primer"} \times 330 \times 10^{-4} \times 1000}{(\text{absorbância a } 260 \text{ nm}) \times 35}$$

onde:

330 é o peso molecular médio de um nucleotídeo;

35 é a quantidade de DNA fita simples correspondente a 1 unidade de absorbância a 260 nm em µg/ml;

1000 é fator de correção de µl para ml;

10⁻⁴ é fator de ajuste para 10⁻⁴ µmol (ou seja, 100 pmol)

simplificadamente:

$$(n) \text{ ml} = \frac{(n) \text{ bases do "primer"} \times 0.9482}{(\text{absorbância a } 260 \text{ nm})}$$

4.9.1. Preparo da mistura de reação:

Reagentes:	Volume (conc. final)
Tampão sem Mg^{+2} (10X)	10 μ l (1X)
MgCl ₂ (50 mM)	3 μ l (1.5 mM)
Mistura dNTPs	2 μ l (0.2 mM cada)
"primer" 1 (30mM)	1.6 μ l (0.5 μ M)
"primer" 2 (30 mM)	1.6 μ l (0.5 μ M)
DNA molde (pBGS18Nuc8 - 100 ng/ μ l)	0.5 μ l (50 ng)
Vent polimerase (5U/ μ l - Biolabs)	0.5 μ l (2.5U)
Água ultra pura	80.8 μ l
Volume total	100 μ l

Após a mistura dos reagentes o material foi transferido para um Ciclador Térmico (MI Research - PTC-200) e a amplificação feita por 30 ciclos de 95°C por 2 minutos, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido por um período final de extensão de 10 minutos a 72°C.

4.10. CLIVAGEM DOS PLASMÍDIOS E FRAGMENTOS DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para a digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição, foi feita a mistura de reação em menor volume possível utilizando-se 2 unidades da enzima de restrição desejada por μ g de DNA e tampão adequado para a mesma. A temperatura e o tempo de incubação foram seguidos de acordo com as instruções dos fabricantes.

As enzimas de restrição utilizadas foram: *Sall*, *SstII*, *SphI*, *EcoRV*, *EcoRI*, *BamHI*, e *XbaI*, todas da Gibco-BRL.

As digestões duplas com *Sall* e *SstII* e *Sall* e *XbaI* foram realizadas em duas etapas distintas. Primeiramente o DNA foi clivado com *Sall* nas condições específicas para a enzima. Após a inativação desta com fenol:clorofórmio o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol a -20°C e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e, lavado duas vezes com etanol

70%. Após centrifugação, o DNA foi ressuspenso em quantidade de água suficiente para preparar a mistura de reação com as enzimas *SstII* ou *XbaI*.

No caso do fragmento *nuc* produto de PCR, a *Vent* polimerase foi removida anteriormente à ação das enzimas, pelo mesmo procedimento descrito acima. Este método evita o preenchimento das extremidades coesivas geradas pela clivagem com as enzimas de restrição.

4.11. SEQUENCIAMENTO DO GENE *nuc* OBTIDO A PARTIR DO “PCR”

4.11.1. Clonagem dos fragmentos dos genes *nuc* no plasmídeo pUC18

Os DNAs dos plasmídeos pUbNuc2 e 3 foram extraídos de bactéria, clivados com as enzimas *Sall/SstII* para liberação do fragmento referente ao gene *nuc* e este, foi eluído a partir de gel de agarose 0.7%.

Para clonagem no vetor pUC18, o gene da nuclease não poderia estar inteiro, porque seria transcrito pelo promotor da β -galactosidase, eliminando os possíveis transformantes. Assim, a estratégia utilizada para a clonagem, foi realizar uma clivagem do fragmento com *EcoRV*, de maneira que fossem liberadas duas bandas (de aproximadamente 440 e 315 pb, respectivamente), e a seguir, estas foram reclivadas com as enzimas *Sall* ou *XbaI*. Os fragmentos originados desta clivagem seriam então: *nuc(XbaI/EcoRV)* e *nuc(EcoRV/Sall)*. Ambos foram ligados no vetor pUC18, também cortado de duas maneiras: pUC18(*XbaI/SmaI*) e pUC18(*SmaI/Sall*), respectivamente.

A ligação ocorreu utilizando-se quantidades equimolares de fragmento, 10 vezes maiores do que as do vetor. Os volumes de ambos os DNAs não excederam 8 μ l. Como controle foi utilizada a mesma quantidade de vetor sem inserto. Foi adicionada à mistura de reação 0.5 unidades Weiss da DNA ligase do bacteriófago T4 (GibcoBRL) e procedeu-se incubação durante uma noite a 16°C. Depois da ligação, alíquotas de 5 μ l de cada mistura foram transferidas para tubos tipo eppendorf contendo células

competentes da linhagem DH5 α de *E. coli*, e em seguida, submetidos à eletro-transformação.

4.11.2. Detecção dos Clones portadores dos fragmentos do gene *nuc*.

Após a transformação bacteriana, conforme item XXX, as amostras foram plaqueadas em meio LB contendo X-Gal (40 μ l/placa) e IPTG (8 μ l/placa) para determinação dos clones que apresentavam o inserto do gene *nuc*. Tais clones deveriam apresentar cor branca, diferentes daquelas que não tinham o inserto, que deveriam ser azuis.

4.11.3. Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento do gene no plasmídeo pUC18 foi realizada segundo instruções do fabricante, usando o "kit comercial ALFexpress™ AutoRead™", Pharmacia Biotech.

4.12. REAÇÃO DE LIGAÇÃO DO FRAGMENTO *nuc* NO VETOR pBS24Ub:

Para ligação do fragmento *nuc* originado do PCR, ao plasmídeo pBS24Ub, este foi previamente clivado com as enzimas de restrição *Sa*I e *Sst*II conforme item 4.10. Após a eluição do gene obtido pela reação de PCR, este também foi submetido à ação das enzimas *Sa*I e *Sst*II. A purificação dos DNAs e remoção dos restos de enzimas, ocorreu através da extração com fenol:clorofórmio, seguida de precipitação com etanol.

Cerca de 100 ng do plasmídeo foram transferidos para um tubo tipo "eppendorf" com duas vezes uma quantia equimolar do fragmento *nuc*. Foram adicionados 2/10 de volume de tampão da enzima (5 vezes concentrado) e 1/10 do volume da enzima DNA ligase do fago T4 (GIBCO BRL - 10U/ μ l). A mistura de reação foi incubada durante uma noite a 16°C e 5 μ l foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α .

4.13. ELUIÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GÊIS DE AGAROSE ATRAVÉS DO USO DO “Kit COMERCIAL Prep-A-Gene” (BioRad Laboratories, Richmond, CA-USA)

Após a eletroforese em gel de agarose, visualização do DNA de interesse e quantificação deste em transiluminador ultravioleta, o pedaço de gel contendo o fragmento desejado foi cortado e colocado dentro de um tubo tipo “eppendorf”. O peso do pedaço de agarose foi estimado em balança comercial (1 mg = 1 ml). Usou-se 5 µl de matriz para cada µg de DNA a ser adsorvido.

Baseado no volume do pedaço de gel e a quantidade de matriz calculada, foram adicionados 3 volumes do tampão de ligação (perclorato de sódio), e a mistura foi incubada durante 10 minutos a 42°C, para a dissolução da agarose. A quantidade de matriz foi então, adicionada e a solução permaneceu 15 minutos a temperatura ambiente para ligação do DNA à matriz.

Após centrifugação, o precipitado contendo o DNA ligado foi inicialmente lavado em uma quantidade de tampão de ligação equivalente a 25 vezes a quantidade de matriz adicionada, e depois, por duas vezes, com o tampão de lavagem preparado previamente (etanol 100% / tampão de lavagem V/V). Depois da última lavagem e centrifugação, todos os traços de líquido do tubo foram removidos em centrífuga a vácuo e o DNA ligado foi eluído com ao menos 1 volume de tampão de eluição a 37°C por 20 minutos. Este DNA, após quantificação, foi usado para restrição com enzimas, clonagem e ligação.

4.14. TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* POR ELETROPORAÇÃO (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA-USA)

4.14.1. Preparação das células

Um volume de 10 ml de cultura de *E. coli* com 16 horas de crescimento foi inoculado em 1 litro de meio LB e incubado a 37°C com agitação até atingir Ab_{600} 0.5-0.7. As células foram centrifugadas em rotor gelado a 6000 rpm e lavadas três vezes com água gelada em diferentes volumes (1000, 500 e 20 ml, respectivamente). Após a última lavada, estas foram ressuspensas em um volume final de 2 ml de glicerol 10% frio. Alíquotas de 40 µl desta suspensão foram mantidas a -80°C.

4.14.2. Eletro-transformação

Após as células serem descongeladas, 40 µl de suspensão foram adicionados a 5µl da mistura de ligação ou quantidade equivalente a 100 ng de DNA de interesse, e esta mistura permaneceu no gelo durante 1 minuto. O aparelho de eletroporação deve ser calibrado para uma capacitância de 25 µF e resistência de 200Ω. A mistura foi transferida para a cubeta de eletroporação de 0.2 cm e submetida à aplicação do pulso elétrico. Imediatamente foi acrescentado 1 ml de meio SOC para ressuspender as células e incubá-las durante 1 hora a 37°C. Após este período, estas foram semeadas em 3 placas (200, 100 e 50 µl, respectivamente) contendo meio LB sólido complementado com o antibiótico adequado para seleção do plasmídeo.

4.15. ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DOS TRANSFORMANTES DE BACTÉRIA

Os transformantes obtidos através da eletroporação foram incubados a 37°C, em 5 ml de meio YT com antibiótico, durante uma noite.

Após extração plasmidiano dos transformantes de *E. coli* DH5α carregando os putativos plasmídeos pUbNuc, estes foram clivados com as enzimas *Sall* e *SstII*, para verificar se havia a liberação de um fragmento de 789 pb, referente ao gene *nuc* da *Serratia marcescens*.

As misturas de digestão dos transformantes foram aplicadas em gel de agarose 0.8% e o perfil de bandas gerado foi analisado em transiluminador ultravioleta. Os transformantes que apresentaram o padrão esperado foram crescidos novamente em meio YT para extração de DNA plasmidiano (item 3.5.2.), agora em larga escala, e o DNA obtido foi usado para transformar células de leveduras.

4.16. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURAS PELO MÉTODO DE ACETATO DE LÍTIO (Gietz *et al.*, 1992)

Para transformar as linhagens de leveduras com os plasmídeos de interesse, foram realizados pré-inóculos destas linhagens em 5 ml de meio YPD2%, submetidos à incubação em agitador (30°C) durante uma noite. Foram utilizados 500µl para inocular 50 ml de meio YPD2%.

As células foram incubadas nas mesmas condições até atingir a D.O. de 0.5 (Abs₅₅₀), centrifugadas a 6000 rpm. por 6 minutos e lavadas em 10 ml de água estéril. Após nova centrifugação nas mesmas condições, 1 ml de água foi usado para ressuspender e transferi-las para tubos tipo "eppendorf". Seguiu-se uma rápida centrifugação de 5 segundos, adição de 1 ml de LTE, centrifugação de 8 segundos e adição de 50 µl de LTE para cada 10ml de YPD2%.

As misturas para transformação realizaram-se com 50 µl de células, 2-3 µg de DNA plasmidiano e 50 µg de DNA de esperma de salmão (carreador), acrescidas de 300 µl de PLTE. Foram preparados dois controles: a) somente células e b) células com o plasmídeo vazio pBS24Ub. Os tubos foram incubados durante 30 minutos a 30°C e submetidos a choque térmico durante 15 minutos a 42°C.

Após duas centrifugações de 5 segundos, os precipitados foram ressuspensos em 1000 e 500 µl de solução salina, respectivamente. As células foram plaqueadas em meio SD8% complementado com os aminoácidos exigidos para complementação das auxotrofias de cada

linhagem e as placas foram incubadas a 30°C durante vários dias (de 3 a 10), dependendo das linhagens.

4.17. PREPARAÇÃO DE PRÉ-INÓCULOS DAS LINHAGENS DE *S. cerevisiae*

Para amplificação do número de cópias dos plasmídeos por célula, os clones foram pré-inoculados em meio líquido SD8%-*ura* e crescidos por 48 horas a 30°C, com agitação. Todos os pré-inóculos foram realizados desta maneira. Após este período, o número de células totais foi contado em câmara de Neubauer e usado para preparar os inóculos em quantidades apropriadas para cada ensaio.

Nos ensaios de "DROP TEST" após a contagem do número de células, são preparadas soluções estoque com 10000 ufc/ μ l para uso nos inóculos.

4.18. CULTIVO DOS TRANSFORMANTES PARA ANÁLISE RÁPIDA DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM MEIO LÍQUIDO

Após crescimento do pré-inóculo, 1.5×10^6 cel/ml foram inoculadas em 25 ml de meio SD1% (menos o aminoácido usado como marcador de seleção) e incubadas nas mesmas condições durante até 96 horas.

A cada 24 horas, foram tiradas alíquotas para contagem do número de células totais e viáveis. Estas últimas foram detectadas em meio agar YPD2% após dois dias de incubação em estufa 28°C. A taxa de sobrevivência (N) foi calculada através da relação número de células viáveis (NV) sobre o número de células totais (NT).

4.19. CULTIVO DOS TRANSFORMANTES PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM MEIO SÓLIDO (“DROP TEST”)

Suspensões estoques dos diferentes transformantes contendo 10000 ufc/ μ l preparadas conforme item 3.20, foram usadas para o ensaio. Aliquotas de 3 μ l foram pingados sobre placas contendo os diferentes meios YPD2% e SD1%, e estas foram incubadas durante 4-8 dias a 28°C. A comparação entre os clones que melhor expressavam a nuclease foi feita visualmente através da avaliação do crescimento nos diferentes meios.

As células que apresentaram crescimento foram retiradas com alça de platina, ressuspensas em solução salina e replaqueadas em meio SD8%, para testar a viabilidade.

4.20. DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NOS MEIOS DE CULTIVO COMPLETO E MÍNIMO

O consumo da glicose nos meios mínimo e completo pelas linhagens de *S. cerevisiae* foi medido através do uso do “kit comercial Glicose E-Enzimática” (CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos).

Para tal, seguimos as instruções do fabricante, dosando alíquotas, diluídas 10 e 20 vezes, das primeiras 12 horas consecutivas e depois, 24, 48 e 72 horas em espectrofotômetro, Abs₅₀₅. Todas as medições foram feitas em duplicata. A curva padrão foi realizada com concentrações conhecidas de glicose nos diferentes tempos.

4.21. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DOS TRANSFORMANTES DE *S. cerevisiae*

A estabilidade dos transformantes de levedura foi avaliada através da porcentagem de perda, por geração, do plasmídeo introduzido por transformação genética. Foram realizados "5" repiques dos clones de interesse em meio YPD2%, um a cada 30 horas. Após o cultivo do último repique, as células foram diluídas em solução salina até $Abs_{600} \sim 0.1$, semeadas em placas com ágar YPD2% ou SD8%-LEU e incubadas em estufa 28°C por 2 a 3 dias. Uma vez calculada a porcentagem de clones Leu⁻, a porcentagem de perda por geração foi calculada conforme descrito abaixo:

% de perda do plasmídeo/geração = % colônias Leu⁻/N^o gerações em YPD

onde:

$$X = X_0 \cdot 2^n$$

X = número final de células

X₀ = número inicial de células

n = número de gerações

4.22. CULTIVO DOS TRANSFORMANTES PARA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM MEIOS DE CULTIVO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Foram escolhidos para estudos mais detalhados sobre a expressão da nuclease de *Serratia*, os clones que apresentaram menor taxa de sobrevivência nos ensaios anteriores (ítems 4.18 e 4.19). Os inóculos foram feitos com 1.5×10^6 cel/ml em 25 ml dos meios YPD2%, SD1%, SR2% e SG1%. O tempo total de incubação foi de 96 horas. Para as curvas de crescimento, alíquotas foram tiradas a cada 2,5 horas (nas primeiras 10

horas de cultivo), incluindo o tempo zero que era o inóculo inicial, e depois a cada 24 horas.

O número de células totais e viáveis foram analisados em câmara de Neubauer e meio agar YPD2%, respectivamente, e a densidade óptica verificada nos intervalos de 24 horas.

4.23. OBTENÇÃO DE EXTRATOS CELULARES DE *S. cerevisiae*

Os transformantes de *S. cerevisiae* foram inoculados em 25 ml de diferentes meios de cultivo e três alíquotas de 1 ml de meio foram colhidas após 24, 48, 72 e 96 horas. O meio de cultura foi separado das células através de microcentrifugação por 1 minuto. Os sedimentos (numerados de 1 a 3) foram congelados a -20°C até o momento do uso.

4.23.1. Para dosagem da concentração de proteínas – SEDIMENTO 1

Para a dosagem da concentração proteica de diferentes soluções e preparações, foi utilizada a técnica descrita por Bradford (1976), com discretas modificações.

As amostras de sedimento 1 foram ressuspensas em 100 µl de solução salina e submetidas a três ciclos consecutivos de gelo seco/37°C para lise das células. O sobrenadante, referente ao extrato celular foi usado para dosagem. A curva padrão foi feita com albumina em concentrações conhecidas com 4 pontos cobrindo a faixa desejada. Após misturada, a solução foi mantida de 5 a 30 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida em 565 nm contra um branco preparado da mesma forma que as amostras, mas apenas com a salina para diluição de proteínas. Foram aplicadas nos géis uma faixa de (10 a 60 ng/ml).

4.23.2. Para SDS-PAGE e Western Blot – SEDIMENTO 2

Para aplicação no gel de proteínas alíquotas dos sedimentos 2

também foram submetidas a 3 ciclos consecutivos de congelamento em gelo seco e descongelamento a 37°C mas sem adição de salina. Foram adicionados tampão de amostra para proteínas, em quantidade suficiente para gerar uma concentração final de 15 µg/ml em cada 20 µl. Para cada poço do gel, foram aplicados 20 µl da preparação.

4.23.3. Para Análise da Atividade da Nuclease *in vitro* – SEDIMENTO 3

Para análise da atividade da nuclease *in vitro*, (espectrofotômetro e gel de agarose), a lise das células presentes nas alíquotas de sedimento 3, foram obtidas após agitação intensa, com 100 µl da solução BR e centrifugação. Alíquotas de 100 µl do sobrenadante foram retiradas e guardadas em freezer -20°C até o momento do uso.

4.24. PRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS DE *Serratia marcescens*

Células de *S. marcescens* foram crescidas em 50 ml de meio LB durante uma noite, com agitação, a 30°C. Após este período, alíquotas de 10 ml foram retiradas e centrifugadas em centrífuga SORVALL durante 20 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi separado das células e a ele acrescido 5 ml de solução de TCA 50%. A mistura permaneceu em gelo durante 1 hora, para precipitação das proteínas presentes. Após centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, o precipitado foi lavado por 3 vezes com acetona, seco em centrífuga a vácuo e ressuspenso em 30 µl de tampão para proteínas. As amostras foram fervidas durante 5 minutos e estocadas em freezer.

4.25. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA - SDS PAGE

A caracterização do perfil proteico das células foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em sistema descontínuo, a partir do protocolo descrito por Laemli (1970) e Studier (1973), com pequenas alterações.

4.25.1. Preparo do gel de separação: os volumes das diversas soluções estão indicados abaixo.

SOLUÇÕES	CONCENTRAÇÃO DE ACRILAMIDA	
	12%	15%
água bidestilada	6.75 ml	5 ml
solução A	8.25 ml	10 ml
solução B	5 ml	5 ml
APS 10%	66 µl	66 µl
TEMED	10 µl	10 µl

4.25.2. Preparo do gel de empilhamento: os volumes das diversas soluções estão indicados abaixo.

SOLUÇÕES:	VOLUME:
água bidestilada	6 ml
solução A:	1.5 ml
solução C:	2.5 ml
APS 10%	30 µl
TEMED	10 µl

Para o preparo das amostras, os diversos preparados são diluídos em tampão de amostra e fervidos por 3 minutos, para redução e desnaturação das proteínas. A eletroforese foi realizada a 40 mA durante 4 horas até que as proteínas atingissem o final do gel de separação.

4.25.3. Coloração para identificação de proteínas

Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em corante para proteínas por 2 horas e em seguida descorado em soluções descorante forte, média e fraca (20 minutos cada).

4.25.4. Secagem:

O gel foi transferido para um papel de filtro Whatman nº 1, coberto com plástico aderente tipo "magipack" e colocado no aparelho de secagem (BioRad - modelo 583) durante 15 minutos até 2 horas a 60°C, dependendo do tamanho do gel.

4.26. "WESTERN BLOT"

A técnica de "Western Blot", descrita por Towbin *et al.*, (1979) e Brunette (1981), foi utilizada para a caracterização imunológica da nuclease encontrada nos extratos celulares das linhagens de *S. cerevisiae* e meio de cultura de *Serratia marcescens*.

Antecipadamente foram cortadas 10 folhas de papel Whatmann nº1 e uma membrana de nitrocelulose nas mesmas medidas do gel de poliacrilamida. Estas folhas foram submersas durante 10 minutos em tampão de transferência. Sob uma primeira placa de grafite molhada com tampão de transferência, foi feito um sanduíche na seguinte ordem: 5 folhas de papel de filtro, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida e 5 folhas de papel de filtro. A segunda placa de grafite é colocada sobre o sanduíche e o conjunto rapidamente encaixado em cuba de transferência. Os eletrodos são conectados na seguinte sequência: ânodo - membrana de nitrocelulose - gel - cátodo.

O cálculo da voltagem é feito de acordo com a área do gel multiplicada por 0.8. A transferência foi realizada por 1 hora em voltagem constante. Após o término da eletroforese, corou-se a membrana de

nitrocelulose por 5 minutos em solução corante e descorou-se em água para testemunhar a eficiência da transferência.

A membrana de nitrocelulose contendo os peptídeos foi incubada com solução bloqueadora por 1 hora a temperatura ambiente ou pela noite a 4°C, com agitação e submetida à 3 lavagens de 20 minutos cada, com 50 ml de PBS 0.2M pH 7.2. Após as lavagens, incubou-se a membrana com o primeiro anticorpo anti-nuc (policlonal), diluído 1:1500 em solução bloqueadora, por 1 hora a temperatura ambiente, ou pela noite a 4°C, com agitação. A seguir, a membrana foi lavada 3 vezes por 30 minutos à temperatura ambiente com PBS 0.2M pH 7.2.

A adição do segundo anticorpo (conjugado) ocorreu após as lavagens, e prosseguiu-se incubação por 1 hora também à temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi retirado com novo ciclo de 3 lavagens com PBS pH 7.2. Finalmente foi realizada a revelação para evidenciar as bandas que interagiram com o anticorpo. Este processo foi feito com a solução cromógena, à temperatura ambiente, sob agitação, com observação atenta. As bandas apareceram em poucos minutos e a reação foi interrompida pela substituição desta solução por água destilada. Para estocar a membrana, esta foi lavada 3 vezes com PBS pH 7.2, seca entre papéis de filtro e envolta em papel alumínio sob proteção da luz, calor e umidade.

4.27. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA NUCLEASE EM ESPECTROFOTÔMETRO

A atividade da nuclease presente no sobrenadante de culturas de *Serratia marcescens* e nos extratos celulares das diferentes linhagens de levedura, contendo o plasmídeo pUbNuc, foi detectada através do aumento da absorbância em espectrofotômetro.

A reação foi montada utilizando-se TRIS 0.5M pH 8.0, 20mM de MgSO₄, 1 µg de DNA plasmidiano e 100 µl do extrato celular das

leveduras (obtidos segundo item 4.23.3). Como controle positivo utilizou-se 100µl do sobrenadante de uma cultura de 24 horas de *Serratia marcescens* e controle negativo 100 µl do extrato de *S. cerevisiae* com o plasmídio pBS24Ub. As reações ocorreram a 28°C em estufa e a atividade foi detectada em diferentes tempos em espectrofotômetro Hitashi U-2000 (Hitashi Koki Co., Ltda., Tokyo, Japan). O bloqueio da reação foi feito adicionando-se 5 µl de EDTA 0.5M. Os resultados foram plotados em gráficos.

4.28. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA NUCLEASE EM GEL DE AGAROSE

Alíquotas de 30 ml dos extratos celulares obtidos segundo item 4.23.3, foram adicionados a 500 ng de DNA plasmidiano e incubados a 30°C durante três horas, período após o qual, amostras de 20 ml foram aplicadas em gel de agarose 0.7% e submetidas à eletroforese durante 1 hora a 70 V.

Como controles positivo e negativos foram usadas as mesmas quantidades de sobrenadante das culturas de *S. marcescens* e *S. cerevisiae* + pBS24Ub, respectivamente, nas mesmas condições. Os resultados foram visualizados em luz U.V. e fotografados.

4.29. ENSAIO COMETA

O ensaio cometa foi utilizado para verificar os danos causados no DNA pela atividade da nuclease de *Serratia marcescens*, nas diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

Foram escolhidas as linhagens JSC302 e W303-1B, portando o plasmídeo controle pBS24Ub ou com inserto do gene *nuc*, pUbNuc. Após pré-inóculo realizado segundo item anterior, 1×10^6 cel/ml foram incubadas em meio SD1% durante 96 horas. Alíquotas de 2 ml foram retiradas e

separadas em duas de 1 ml. A primeira das alíquotas foi usada para preparação de esferoplastos visando facilitar a debilitação da membrana. Ambas foram utilizadas no ensaio uma vez que acreditávamos que para *Saccharomyces*, apenas o tampão de lise habitual do método não deveria ser suficiente.

4.29.1. Obtenção dos esferoplastos:

As células (1 ml) foram centrifugadas por 15 minutos a 3500 rpm, o sobrenadante foi desprezado e ao precipitado, foi adicionado 1 ml de solução SE e 20 µl de zimoliase. As células foram incubadas de 2 a 4 horas a 37°C, ou até formar protoplastos.

4.29.2. Preparação das Lâminas, Corrida e Coloração:

Em uma lâmina de vidro, foram adicionadas 100 µl de NMA 1% e cuidadosamente, este agar foi espalhado com a sobreposição de uma lamínula. O material permaneceu no fluxo laminar durante 4 horas e a lamínula foi então retirada. As lâminas permaneceram na bancada, até o dia seguinte para secagem. Após incubação em banho-maria por alguns minutos, 85 µl da solução de LMA foram adicionados à 20 µl da solução de células, e desta mistura foram retirados 85 µl e aplicados sobre a lâmina para formação de uma nova camada, agora de células+agar, após permanecer na geladeira por 10 minutos. A lamínula foi retirada, 85 µl de LMA foram adicionados, formando um sanduíche e novamente incubados em geladeira por mais dez minutos.

Metade das amostras foi submetida diretamente à eletroforese, e a outra metade foi lisada através da imersão das lâminas em solução de lise, durante 24 horas, a 4°C. As lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese com tampão EDTA+NaOH, por 30 minutos, após calibração da fonte em 13V e 230mA. Passado o tempo de incubação, o gel foi submetido a corrida durante 10 minutos. As lâminas foram submersas em neutralizador Tris-HCl, pH 7.5, por 5 minutos, fixadas em metanol por mais 5 minutos e secas em temperatura ambiente por 24 horas.

A coloração foi realizada com 100 ml de solução de brometo de etídio e os resultados foram analisados em microscópio fluorescente acoplado a um programa capaz de digitar a imagem obtida.

4.30. INFLUÊNCIA DO pH NA EXPRESSÃO DA NUCLEASE EM *S. cerevisiae*

Após pré-inóculo, 1×10^6 cel/ml das linhagens JSC302/pUbNuc3 e W303-1B/pUbNuc2 foram inoculadas em frascos contendo 25 ml de cada um dos meios SD1%, SD1%_{ASPGLU} pH 6.0 e SD1% pH 7.0. Aliquotas de 1 ml foram retiradas a cada 24 horas e submetidas à extração das proteínas internas para aplicação em SDS-PAGE. Realizada a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas ao ensaio de "Western Blot".

4.31. Preparação de "MICRO-COSMOS"- para ensaio *in situ*

A detecção da viabilidade das linhagens portadoras do gene *nuc* em ambiente externo (solo), foi monitorada em duas abordagens: 20 g de solo + 100 ml de YPD2% e 20 g de solo + 100 ml de água destilada. Como inóculo, foram colocadas 1×10^6 cel/ml. Os frascos usados, do tipo erlenmeyer de 1 litro, foram deixados na bancada durante cerca de 20 dias.

Amostras de 1 ml foram retiradas a cada dois dias e após decantação das partículas sólidas, o sobrenadante foi diluído e plaqueado em placas de meios sólidos: YPD2% + cicloheximida, ampicilina, canamicina e estreptomicina (100 µg/ml), SD8% + adenina, histidina, triptofano, leucina, uracila (40 mg/ml) e SD8% + adenina, histidina, triptofano. Os antibióticos foram usados para limitar o crescimento de bactérias que pudessem impedir a visualização das leveduras e os aminoácidos foram usados para determinar a porcentagem de perda do plasmídeo. O cálculo foi realizado

através da multiplicação do número de células presentes nas placas de SD8%_{ade,his,trp} por 100 e divisão pelo número de células presentes nas placas, SD8%_{ade,his,trp,leu,ura}.

Características do solo foram identificadas visualmente e o pH foi medido com fita.

5. RESULTADOS

5.1. CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pUbNuc VISANDO A EXPRESSÃO DO GENE DA NUCLEASE DE *Serratia marcescens* NA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

No sistema de expressão da nuclease utilizado neste trabalho, a enzima, uma vez expressa, permanece dentro da célula, após o processamento *in vivo* da ubiquitina, presente na extremidade amino da proteína de fusão, por ação da ubiquitina hidrolase da célula hospedeira. O resultado final é uma proteína autêntica sem a metionina na extremidade amino (Sabin *et al.*, 1989). Este sistema foi utilizado em nosso laboratório anteriormente para expressão da proteína de 18 Kda de *Mycobacterium leprae*, com resultados muito satisfatórios (Pinho *et al.*, 1994 e 1995). Além deste motivo, a facilidade de clonagem do gene de interesse e os altos níveis de proteína expressa encontrada nos extratos celulares, foram decisivos na escolha do vetor de clonagem.

5.1.1. Estratégia de Clonagem

Para a clonagem do gene *nuc* no vetor pBS24Ub, foi preciso inicialmente construir sítios para as enzimas *Sal*I e *Sst*II ladeando este gene. Estes sítios foram criados através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Inseto e plasmídeo foram então clivados com as enzimas *Sal*I e *Sst*II e ligados para a obtenção do plasmídeo quimérico denominado **pUbNuc** (figura 11).

Figura 11. Estratégia de clonagem do gene *nuc* de *Serratia marcescens* no plasmídeo pBS24Ub para expressão na levedura *S. cerevisiae*.

Segundo a estratégia de clonagem adotada, a ligação do fragmento de interesse no plasmídeo ocorre na orientação correta, além de permitir uma rápida análise dos transformantes de bactérias com enzimas de restrição. Após a confirmação da presença do gene de interesse, células de levedura foram transformadas com os plasmídeos pUbNuc. Os transformantes foram a seguir analisados quanto à expressão do gene *nuc* em diferentes meios de cultivo.

5.1.2. Desenho e Síntese dos Oligonucleotídeos para Amplificação do Fragmento de DNA Contendo o Gene da Nuclease

O gene da nuclease encontrava-se clonado no plasmídeo pBGS18Nuc8 (figura 7). Para amplificar este fragmento ladeado pelos sítios suscetíveis às enzimas de restrição desejadas, bem como, contendo a sequência correspondente ao sítio de clivagem da proteína de fusão, foram desenhados oligonucleotídeos específicos, complementares ao início e ao final da fase de leitura aberta do gene da nuclease. As sequências estão mostradas abaixo, na figura 12.

Foram adicionados também, mais dois sítios para outras enzimas de restrição, isto porque, as endonucleases *SaI* e *SacII* necessitam de alguns nucleotídeos adjacentes ao sítio específico de ação, provavelmente para adquirir estabilidade durante a clivagem. Estes sítios também seriam úteis para facilitar possíveis clonagens posteriores. A síntese dos oligonucleotídeos foi realizada no Instituto Ludwig de Pesquisas contra o Câncer, no laboratório da Profa. Dra. Luiza Lina Villa.

a) "Primer" do início do gene (43 nucleotídeos):

b) "Primer" do final do gene (45 nucleotídeos)

Figura 12. Oligonucleotídeos sintetizados para amplificação do fragmento do gene da nuclease a partir de PCR. a) início do gene mostrando a sequência de fusão entre a ubiquitina (UBH) e a nuclease e o sítio para SstII; b) final do gene com o codon de terminação e os sítios para Sall e XhoI.

5.1.3. Obtenção do Fragmento do Gene *nuc* de *Serratia* Através de "PCR"

Para a obtenção do fragmento contendo o gene da nuclease ladeado pelos sítios de restrição das enzimas Sall e SstII, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como citado anteriormente, usando como molde o plasmídeo pBGS18Nuc8, que continha a sequência do gene *nuc*, sem peptídeo sinal.

Neste trabalho, inicialmente, começamos o ensaio com a enzima *Taq* polimerase, de uso frequente no laboratório com resultados obtidos são satisfatórios. Várias concentrações de magnésio foram usadas para analisar qual a melhor para a atividade da enzima, porém, as amplificações do gene *nuc* não ocorreram perfeitamente e muitas bandas de inespecificidade foram obtidas (resultados não mostrados). A concentração que melhor resultado gerou foi a de 0.5 mM de Mg^{+2} (figura 13, canaleta 7).

Antes de terminarmos uma análise da concentração ideal, passamos a empregar outra enzima, a *Vent* polimerase, cuja atividade apresenta uma taxa de erros muito menor. No gel da figura 13, mostramos o resultado de vários sistemas de amplificação usando diferentes quantidades do íon magnésio e da enzima *Vent* polimerase. O sistema montado com 0.5 mM de Mg^{+2} +*Taq* polimerase, cuja amplificação tinha sido verificada anteriormente, foi usado como controle positivo, além do próprio controle do "kit".

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 0.8% mostrando a amplificação do gene *nuc* de *Serratia marcescens* depois do PCR. 1) Ladder 1Kb; 2-5) Reações com a *Vent* polimerase em concentrações de 0.5 mM; 1.0 mM ; 1.5 mM e 2.0 mM de $MgCl_2$; 6) Controle do "kit"; 7) Reação com a *Taq* polimerase, 0.5 mM de magnésio usada como controle positivo.

O fragmento de interesse apenas foi amplificado nos sistemas de reação: a) com 1 mM de $MgCl_2$ + *Vent* polimerase (canaleta 3) e b) controle com 0.5 mM de $MgCl_2$ + *Taq* polimerase (canaleta 7). As outras concentrações testadas deste íon mostraram-se inibitórias. Concentrações maiores do que 0.5 mM geraram condições inespecíficas para a amplificação do fragmento.

Figura 14. Sequência do gene *nuc* de *Serratia marcescens*, mais os sítios de restrição adicionados após a reação de PCR. Nucleotídeos marcados em azul: Sítios alvo para enzimas de restrição, vermelho: aminoácidos presentes nas regiões conservadas, que estão associadas à atividade da enzima:

Para aplicação no gel, foram usados 5 µl de um total de 100 µl de reação, demonstrando que a amplificação pela *Vent* polimerase foi cerca de 3X mais eficiente do que com a *Taq* polimerase. O controle do próprio "kit" de PCR, que também deveria amplificar um fragmento de aproximadamente 700 pb. foi muito ineficiente, uma vez que a banda amplificada, muito pouco concentrada (Figura 13, canaleta 6), não pode ser visualizada na foto.

Para confirmar que o fragmento obtido através da PCR era o gene da nuclease, buscamos na região central da sequência deste gene (figura 14), um sítio alvo único para enzima de restrição. O sítio escolhido foi o da enzima *EcoRV*, exatamente a 315 pb do início do gene. Desta maneira, se o fragmento obtido correspondesse à nuclease, após a clivagem com a enzima, seriam geradas duas bandas de 315 e 441 pb, respectivamente.

A confirmação do gene de interesse pôde ser obtida através da eletroforese em gel de agarose 1%, após tratamento com a enzima *EcoRV* (figura 15). De fato, na canaleta 3, podemos notar a presença das duas bandas de interesse, confirmando que o fragmento amplificado corresponde ao gene da nuclease da *Serratia*.

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1.0% mostrando o fragmento do gene *nuc* amplificado por PCR após clivagem com a enzima *EcoRV*. 1) Ladder 1Kb; 2) 100 ng do fragmento *nuc* não cortado; 3) 300ng do fragmento *nuc/EcoRV*.

5.1.4. Ligação do Fragmento do Gene *nuc* no Vetor pBS24Ub e Transformação de células de *E. coli* DH5 α

Uma vez confirmada a amplificação do fragmento de DNA contendo a sequência codificadora da nuclease, o próximo passo foi inseri-la no vetor bifuncional pBS24Ub. Inseto e vetor foram clivados com as enzimas *Sall* e *SstII* antes da reação de ligação. Preparou-se a mistura de ligação conforme item 4.12. de MM, e, após incubação por 18 horas, esta foi usada para a transformação da linhagem de *E. coli* DH5 α , após diversas tentativas sem sucesso com a linhagem HB101. Foram obtidos 112 transformantes/ml, dos quais 50 foram submetidos à análise de restrição.

Sete transformantes (14%) apresentaram plasmídeos com inserto de um fragmento de 789 pares de base, que poderia corresponder ao gene da nuclease (Figura 16). Estes transformantes foram denominados de **pUb nuc 1** a **pUb nuc 7**, respectivamente. Os fragmentos liberados, por sua vez, apresentaram padrões de migração um pouco diferenciados. Foram usados para a transformação de levedura, os plasmídeos extraídos dos transformantes de *E. coli* DH5 α números 2, 3, 4 e 5.

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 0.7%. Análise de restrição dos plasmídeos extraídos dos 7 transformantes de *E. coli* DH5 α . 1) ladder 1Kb; 2 a 8) plasmídeos pUbNuc1 a pUbNuc7 clivados com *Sall* e *SstII*.

5.2. TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Par o experimento de transformação da levedura *S. cerevisiae*, foram escolhidas quatro linhagens diferentes para comparação da expressão e atividade da nuclease. Foram elas: JSC302, W303-IB, STX507-5D e JRY418, todas auxotróficas para uracila (*ura3*) e/ou leucina (*leu2*) (MM, item 4.1.2). Entre estas linhagens, esperávamos melhores resultados em *S. cerevisiae* JSC302, por apresentar características como: deficiência na síntese de proteases e uma cópia suplementar do gene *ADR1^C*, regulador positivo do *UAS_{ADH2}*, integrado no genoma, com expressão constitutiva (Shuster, 1989); e em *S. cerevisiae* JRY481 e STX507-5D, por serem mutantes *rad52*, deficientes na via de reparação de quebras de dupla-fita no DNA.

Dos plasmídeos obtidos, 4 foram usados para transformação das leveduras e os resultados da transformação de cada linhagem estão apresentados na tabela 2.

TABELA 2. Transformantes obtidos das diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae* com os plasmídeos pUbNuc2, 3, 4 e 5.

Linhagem Plasmídeo	Nº TRANSF./ml	[DNA]	EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO (n Transf/µg DNA)
JSC302/pBS24Ub	1960	2 µg	980
JSC302/pUbNuc3	300	3 µg	100
JSC302/pUbNuc4	36	3 µg	12
JSC302/pUbNuc5	371	3 µg	123.6
W303/pBS24Ub	2024	3 µg	674
W303/pUbNuc2	423	3µg	141
W303/pUbNuc3	206	3 µg	68
JRY481/pBS24Ub	56	2.5 µg	22.5
JRY481/pUbNuc2	3	2.8 µg	1.07
JRY481/pUbNuc3	4	3 µg	1.3
STX507-5D/pBS24Ub	82	2.5 µg	32.8
STX507-5D/pUbNuc2	2	2.8 µg	0.71
STX507-5D/pUbNuc3	16	3 µg	5.3

Par todas as linhagens, o plasmídeo controle pBS24Ub, apresentou maior eficiência de transformação do que as que carregavam o plasmídeo nuc+. Das linhagens, *Saccharomyces cerevisiae* JSC302 e W303-1B (980 e 674 transformantes/ml, respectivamente) foram mais eficientemente transformadas do que as linhagens *rad52*, (22.5 transformantes/ml para JRY481 e 32.8 para STX507-5D).

Claramente, podemos observar que estas linhagens apresentaram dificuldades em serem transformadas. A relação média de eficiência entre estas, comparada com as células JSC302 e W303-1B, chega a ser de quase 30 vezes maior para as duas últimas. A transformação das linhagens com os plasmídios nuc+ parece ser prejudicada também. Estes resultados são fortemente evidenciados através da baixíssima eficiência de transformação das linhagens *rad52*, e em menor escala, mas igualmente baixa, nas células JSC302 e W303-1B.

Na linhagem JSC302 o plasmídeo pUbNuc4 não foi capaz de se manter na célula. As melhores taxas de transformação foram encontradas com pUbNuc3 e pUbNuc5. Por outro lado, pUbNuc2 transforma 2 vezes melhor do que pUbNuc3 em W303-1B. Na linhagem STX507-5D pUbNuc 3 é aproximadamente 6 vezes mais eficiente do que pUbNuc2.

5.3. INFLUÊNCIA DO pH NO CRESCIMENTO E EXPRESSÃO DA NUCLEASE DE *S. marcescens* NA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Conforme citado anteriormente, o pH do meio de cultivo pode influenciar a expressão e secreção da nuclease de *Serratia* em bactéria. Como o crescimento celular foi um dos parâmetros usados por nós para detectar a atividade da enzima em levedura, procuramos verificar qual meio de cultivo poderia oferecer as melhores condições de crescimento celular, e posteriormente, comparar este crescimento vinculado à expressão da nuclease. Com este intuito, alíquotas de culturas de *S. cerevisiae* JSC302

crescidas em diferentes meios, tamponados ou não, foram retiradas a cada 24 horas e o pH avaliado, bem como o crescimento celular (figura 17).

a)

b)

Figura 17. a) Análise da variação do pH em diferentes meios de cultivo; b) influência do pH no crescimento da linhagem *S. cerevisiae* JSC302.

Os meios utilizados foram SD1%, SD1%_{AspGlu} pH 6.0 e SD1% pH 7.0 (item 4.4.1 de MM). O tamponamento dos meios em pH 6.0 e pH 7.0 foi eficiente durante todo o período de crescimento celular (Figura 17a),

permitindo apenas uma pequena queda no pH (~2 décimos), ocorrida após 72 horas de cultivo. Diferentemente, em meio não tamponado, o pH tornou-se bastante ácido, em virtude da fermentação, chegando a valores próximos de 2.

Com relação ao crescimento celular, os meios de cultivo tamponado em pH 6.0 ou não tamponado foram totalmente neutros. Porém, em condições de tamponamento em pH 7.0, o número de células obtido no final do processo foi menor (~40%), conforme demonstrado na mesma figura.

Estes resultados mostraram que os meios SD1% sem tamponamento e SD1%_{AspGlu} eram os mais indicados para serem usados nos ensaios, uma vez que não interferiram no crescimento celular da linhagem JSC302 (extrapolado para a linhagem W303-1B também). Por outro lado, grande quantidade de célula não necessariamente implica em grande produção de nuclease. Para verificarmos, de fato, esta relação, realizamos ensaio de Western Blot de amostras das linhagens JSC302 e W303-1B crescidas nos diferentes meios.

No ensaio preparado para JSC302/pUbNuc3 (figura 18), podemos observar quantidades semelhantes de nuclease a partir de 48 horas, nos meios de cultivo SD1% (canaleta 5 e 8) e SD1%_{AspGlu} (canaletas 6 e 9). Amostras retiradas do cultivo em SD1% pH 7.0, somente apresentaram a banda referente à nuclease na alíquota de 72 horas (canaleta 10), e em menor quantidade do que as demais. Em 24 horas não há presença da banda referente à nuclease em nenhuma das culturas.

Portanto, aparentemente, o meio de cultivo tamponado em pH 7.0, além de não oferecer condições ótimas de crescimento para a célula, influencia negativamente a expressão da nuclease na linhagem JSC302.

Figura 18. Ensaio de Western Blot para análise da influência do pH na expressão da nuclease de *S. marcescens* nas culturas de *S. cerevisiae* JSC302. 1) controle Nuc de *S. marcescens*; 2) SD1%, 24 hs.; 3) SD1%AspGlu, 24 hs.; 4) SD1% pH 7.0, 24 hs.; 5) SD1%, 48 hs.; 6) SD1%AspGlu, 48 hs.; 7) SD1% pH 7.0, 48 hs.; 8) SD1%, 72 hs.; 9) SD1%AspGlu, 72 hs.; 10) SD1% pH 7.0, 72 hs.

Com relação à *S. cerevisiae* W303-1B/pUbNuc2 (figura 19), a expressão da nuclease pode ser detectada nas alíquotas de 48 horas (canaletas 5, 6, e 7, referente aos meios SD1%, SD1% pH 6.0 e SD1% pH 7.0) e na alíquota de 72 horas com meio sem tamponamento (canaleta 8). As quantidades detectadas foram iguais em todas as amostras.

Estes resultados permitiram concluir que o meio SD1% sem tamponamento era o mais indicado para crescimento das linhagens JSC302 e W303-1B e que a expressão da nuclease de *S. marcescens* em *S. cerevisiae*, de alguma forma também é influenciada pelo pH da cultura. A partir destes ensaios, todos os experimentos posteriores em meio mínimo foram preparados sem tamponamento.

Figura 19. Ensaio de Western Blot para análise da influência do pH na expressão da nuclease de *S. marcescens* nas culturas de *S. cerevisiae* W303-1B. 1) controle Nuc de *S. marcescens*; 2) SD1%, 24 hs.; 3) SD1%AspGlu, 24 hs.; 4) SD1% pH 7.0, 24 hs.; 5) SD1%, 48 hs.; 6) SD1%AspGlu, 48 hs.; 7) SD1% pH 7.0, 48 hs.; 8) SD1%, 72 hs.; 9) SD1%AspGlu, 72 hs.; 10) SD1% pH 7.0, 72 hs.

5.4. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE GLICOSE NOS MEIOS DE CULTIVO SD1% E YPD1%

O consumo de glicose nos meios de cultivo foi monitorado para efetuarmos uma análise mais detalhada do tempo de repressão do promotor *ADH2GAPDH* e início da sua ativação. Para tal, 1×10^6 cel/ml da linhagem JSC302, carregando o plasmídeo vazio, pBS24Ub, foram inoculadas nos meios de cultivo SD1% e YPD2% e incubadas durante 72 horas. Amostras foram tomadas e usadas para a dosagem da glicose e para contagem do número de células. O perfil de consumo de glicose apresentado por esta linhagem passou a ser usado como padrão para os ensaios de expressão da nuclease, nas outras linhagens.

a)

b)

Figura 20. Consumo de glicose X Crescimento celular em a) meio completo e b) meio mínimo.

Saccharomyces cerevisiae JSC302 apresentou melhor crescimento em meio completo atingindo D.O. de ~ 9 (figura 20a) e consumo de glicose bem mais rápido completo (quase toda consumida em 24 horas) do que em meio mínimo, onde a D.O. ficou em torno de 7 e ainda havia traços de glicose em 72 horas (figura 20b).

Comparando-se as curvas de crescimento, pode-se notar que a velocidade específica de crescimento (μ), durante a fase logarítmica, é maior em meio completo, $\mu = 0.14$ (figura 20a), do que em meio mínimo, $\mu = 0.11$ (figura 20b). O promotor *ADH2GAPDH* pode, então, estar em condições de desrepressão a partir de 24 horas para meio completo e 48 horas em meio mínimo.

5.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *nuc* SOB CONTROLE DO PROMOTOR *ADH2/GAPDH* EM CULTURAS LÍQUIDAS DE *S. cerevisiae*

Dos transformantes obtidos com as diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, apresentando os plasmídeos, pUbNuc2, pUbNuc3, pUbNuc4 e pUbNuc5 e os controles pBS24Ub, alguns foram escolhidos aleatoriamente e usados para análise rápida da expressão da nuclease em meio líquido, através da leitura da densidade óptica em Abs₆₀₀ (resultados não mostrados). A partir deste experimento, foram escolhidos os clones mais representativos da população para os ensaios, os quais foram realizados sempre em triplicata.

Após pré-inóculo, conforme descrito no item 4.17, 1×10^6 cel/ml de cada clone, foram transferidos para 5 ml de meio SD1% e complementado com os respectivos aminoácidos. Os frascos foram incubados em agitador e a taxa de sobreviventes (% sobreviventes) das culturas foi monitorada através da relação entre o número de células viáveis (Nv) pelo número de células totais (Nt).

Todos os transformantes com plasmídeos que contêm o gene da nuclease apresentaram taxas de sobrevivência muito menor do que os

transformantes com o plasmídeo controle (tabela 3). Esse resultado já é evidente a partir das alíquotas de 24 horas e é mais pronunciado nas células *rad52*, como de fato esperado. O que não era esperado, entretanto, era uma diminuição na sobrevivência desde as amostras de 24 horas. Isto porque, como visto anteriormente, a glicose em meio mínimo somente é totalmente exaurida a partir de 48 horas, havendo ainda pequena concentração na amostra de 72 horas. Este resultado poderia ser mais um indicativo de que o promotor não estava sendo suficientemente reprimido

Tabela 3. Taxa de sobrevivência das linhagens de *S. cerevisiae* transformadas com os plasmídeos pBS24Ub e pUbNuc2, 3, 4 ou 5 em meio SD1%.

LINHAGEM PLASMÍDEOS	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA % (Nv/Nt)			
	24 hs	48hs	72hs	96hs
JSC302/pBS24Ub	0.76	0.98	0.88	0.67
JSC302/pUbNuc3	0.54	0.36	0.001	0.000
JSC302/pUbNuc4	0.64	0.43	0.01	0.000
JSC302/pUbNuc5	0.61	0.42	0.03	0.000
W303-1B/pBS24Ub	0.92	0.92	0.58	0.67
W303-1B/pUbNuc2	0.68	0.41	0.00	0.000
W303-1B/pUbNuc3	0.72	0.42	0.00	0.000
STX507-5D/pBS24Ub	0.66	0.68	0.73	0.55
STX507-5D /pUbNuc2	0.16	0.001	0.00	0.00
STX507-5D /pUbNuc3	0.22	0.00	0.00	0.00
JRY418/pBS24Ub	0.58	0.84	0.66	0.54
JRY418/pUbNuc2	0.11	0.000	0.00	0.00
JRY418/pUbNuc3	0.18	0.0001	0.00	0.00

A sobrevivência das linhagens JSC302, carregando os plasmídeos pUbNuc3, 4 e 5, e W303-1B, com os plasmídeos pUbNuc2 e 3, diminuiu aproximadamente 40% na primeira amostragem, 60% na segunda e chegou a índices próximos de zero nas alíquotas de 72 e 96 horas.

O número de sobreviventes encontrados das células JSC302 e W303-1B com os plasmídeos nuc⁺ ficou em torno de 1×10^{-6} cel/ml e 1×10^{-5} cel/ml, respectivamente, o que está dentro da faixa encontrada para os sistemas suicidas descritos para bactérias, embora ainda seja muito alto. Por outro lado, a expressão da nuclease nas células *rad52* já foi letal a partir de 24 horas e não foram detectados sobreviventes nas amostras posteriores.

Com relação à morfologia, através da observação ao microscópio óptico, as células nuc⁺ foram tornando-se diferenciadas das células controle, principalmente no tamanho, sendo que as últimas eram bem maiores (resultados não mostrados).

Pode-se notar, adicionalmente, que as células controles também apresentam uma diminuição na taxa de sobreviventes durante o ensaio. Este dado foi considerado normal, mas ficamos atentos a possibilidade da ubiquitina presente no plasmídio pBS24Ub estar afetando o comportamento da célula.

Os resultados confirmam a expressão da nuclease de forma letal para levedura. Houve uma drástica diminuição da taxa de sobreviventes nos diferentes transformantes carregando os plasmídeos nuc⁺, principalmente nas linhagens *rad52*, JSC302/pUbNuc3 e W303-1B/pUbNuc2.

Em virtude do grande número de transformantes encontrados para as diferentes linhagens usadas, resolvemos que os experimentos posteriores deveriam ser padronizados com um clone de cada célula.

5.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA NUCLEASE EM MEIO SÓLIDO - "DROP TESTS"

Para confirmar os resultados encontrados em meio líquido e podermos escolher os clones mais representativos, realizamos ensaio DROP TEST, segundo Caumont e colaboradores (1996). Gotas de 3 µl de suspensões das células *S. cerevisiae* JSC302, W303-1B, STX507-5D e JRY481, contendo 10000 u.f.c./µl crescidas em meio SD8%-URA, foram depositadas em placas de cultivo contendo os meios YPD2% (figura 21) e SD1% (figura 22). Após período de incubação de 3 a 7 dias, o crescimento das células foi analisado visualmente e as placas foram fotografadas.

Em meio completo (figura 21), todos os clones carregando os plasmídeos controles apresentaram crescimento maior do que os demais,

embora pudessem ser detectadas diferenças entre as linhagens (as células *rad52*, por exemplo, cresceram bem menos). Contudo, o efeito da ação da nuclease somente foi evidente nas células STX507-5D/pUbNuc2 e 3, JRY481/pUbNuc2 e 3 e JSC302/pUbNuc3 e 5.

Quando as colônias obtidas neste ensaio foram retiradas e ressuspensas em solução salina para novamente serem plaqueadas em meio mínimo e completo, verificou-se que entre as células JSC302/UbNuc3, JSC302/UbNuc4, W303-1B/UbNuc2 e W303-1B/UbNuc3, foram contados 10^{-4} sobreviventes/ml, os quais haviam perdido o plasmídeo. Este experimento não foi realizado com as linhagens STX507-5D e JRY481, uma vez que estas não cresceram em meio completo.

Figura 21. Crescimento dos transformantes em meio completo YPD2% para análise da expressão da nuclease.

Na figura 22, analisamos os transformantes em meio mínimo. Podemos verificar que os controles cresceram mais do que as células que carregam o gene *nuc*, como no ensaio em meio líquido (item 5.5). Confirmando estes resultados, as linhagens *rad52* não foram capazes de crescer mesmo nas condições de repressão do promotor *ADH2GAPDH*, ou seja, nos primeiros dias (figuras 22c e 22d). Isto demonstra que a regulação

do promotor *ADH2/GAPDH* não está controlada. Esperava-se, o crescimento das células no início do cultivo, enquanto a glicose do meio ainda não havia sido exaurida.

a) JSC302

b) W303-1B

c) STX507-5D

d) JRY481

Figura 22. Crescimento dos transformantes em meio mínimo SD1% para expressão da nuclease.

Nas linhagens JSC302 (figura 22a) e W303-1B (figura 22b), o crescimento encontrado foi decorrente da presença da glicose no meio, atuando como repressora do promotor *ADH2/GAPDH*. Entre estas células, JSC302/pUbNuc5, JSC302/pUbNuc3 e W303-1B/pUbNuc2 demonstraram atividade da nuclease mais rapidamente. A taxa de sobrevivência destas células foi de 1×10^{-5} cel/ml para a primeira e 1×10^{-6} cel/ml para as duas últimas.

Escolhemos então, os transformantes *S. cerevisiae* JSC302/pUbNuc3, W303-1B/pUbNuc2, STX507-5D/pUbNuc2 e JRY481/pUbNuc2 para os ensaios posteriores.

5.7. ANÁLISE DO CRESCIMENTO DOS TRANSFORMANTES EM MEIOS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Os transformantes de *S. cerevisiae* foram escolhidos para análise mais detalhada da expressão da nuclease. Para ensaiar o comportamento destes clones com diferentes fontes de carbono, foram usados os meios YPD1%, SD1%, SG1% e SR2% (item 4.4.1). Nos dois primeiros meios, a glicose deveria funcionar como repressora da expressão da nuclease. Contudo, com rafinose e glicerol, fontes de carbono não fermentáveis e não repressoras do sistema, o fenótipo de morte deveria ser evidenciado mais rapidamente.

Dois tipos de análise foram feitas com relação ao crescimento das células nos meios de cultivo. A primeira foi através da leitura da Abs_{600} , onde o efeito da nuclease foi notado pela estabilidade da absorbância. Isto ocorre porque as células que expressam a nuclease se mantêm intactas com relação à parede celular e não são lisadas. A segunda, foi através da contagem do número de células viáveis presentes na cultura ao longo do tempo. O fenótipo de morte, neste caso, foi evidenciado mais claramente, através da queda da curva de crescimento.

5.7.1. Ensaio com a linhagem *S. cerevisiae* JSC302

Escolhemos os clones JSC302/pBS24Ub e JSC302/pUbNuc3 para o ensaio. Como verificado anteriormente, as linhagens portadoras do gene da nuclease cresceram menos quando comparadas com as células que apresentam apenas o plasmídeo sem inserto. Este resultado foi confirmado em todos os meios testados.

Com relação à célula controle, *S. cerevisiae* JSC302/pBS24Ub, o crescimento celular ocorreu normalmente e pôde ser visualizado em todas as quatro curvas produzidas com os resultados da D.O. e da contagem do número de células viáveis (figura 23). A densidade óptica e número de células encontradas nestas linhagens é maior em meio completo do que mínimo, como esperado. Os resultados foram: D.O. ~11 e ~7 e número de células/ml 1×10^9 e 1×10^8 , para meio completo e mínimo, respectivamente (figuras 23a e b). Nos meios com glicerol e rafinose, a célula controle apresentou crescimento comparável com o meio mínimo+glicose, havendo apenas uma pequena diminuição em D.O. e no número de células (figuras 23c e d).

Por outro lado, as células de *S. cerevisiae* JSC302/pUbNuc3, apresentaram resultados de crescimento bastante. Em meio completo, as células cresceram em função da presença do açúcar no meio de cultivo, não havendo diferença quando comparada com a célula controle. Já em meio mínimo, foi possível visualizar claramente o efeito da ação da nuclease, após 48 horas de cultivo, (glicose praticamente toda exaurida). O número de células diminuiu rapidamente, como verificado através da estabilidade da D.O. em torno de 4, e do número de viáveis.

Quando a fonte de carbono não foi a glicose, os resultados foram muito expressivos. As células portadoras do gene *nuc* não foram capazes de se manter viáveis nestes meios, e desde o início do inóculo, foi possível notar a diminuição do número de células e a estabilidade da D. O. em torno de 0.060. Ficou demonstrado que a expressão da nuclease ocorre

desde o início da cultura, evidenciando o sistema de regulação do promotor pela glicose.

Figura 23. Curva de crescimento das linhagens JSC302/pBS24Ub e JSC302/pUbNuc em diferentes meios de cultura: A) YPD2%, B)SD1%, C) SG1% e D)SR2%.

5.7.2. Ensaio com a linhagem W303-1B

As mesmas condições foram utilizadas para o ensaio com as células *S. cerevisiae* W303-1B/pBS24Ub e W303-1B/pUbNuc2 (figura 24).

Figura 24. Curva de crescimento das linhagens W303-1B/pBS24Ub e W303-1B/pUbNuc em diferentes meios de cultura: A) YPD2%, B) SD1%, C) SG1% e D) SR2%.

De modo geral, esta linhagem comportou-se de maneira semelhante à linhagem JSC302, durante o crescimento nos diferentes meios. Em meio completo, (figura 24a) ambas as células, com o plasmídeo controle e pUbNuc2, apresentaram curvas semelhantes (células no final: $\sim 1.5 \times 10^8$ /ml), mesmo com a presença do gene da nuclease no plasmídeo pUbNuc2. A D.O. se mostrou um pouco maior para W303-1B/pBS24Ub (9) do que para W303-1B/pUbNuc2 (8).

Em meio mínimo+glicose (figura 24b), o início do fenótipo de morte no transformante com o plasmídeo pUbNuc2, foi evidenciado a partir de 48 horas, como na linhagem JSC302, mas a diminuição total da viabilidade ocorreu apenas após 72 horas (D.O. = 4 e número de células 10^5 /ml). Nas células controle, a D.O. foi igual a 7 e o número de viáveis igual a $1,3 \times 10^8$ cel/ml.

As fontes de carbono rafinose e glicerol não permitiram o crescimento das células nuc+, mais uma vez confirmando o sistema de repressão e indução do promotor *ADH2GAPDH* (figura 24c e 24d). As linhagens controle, comportaram-se de maneira semelhante em ambos os meios, atingindo D.O. igual a 6 e número de células viáveis de aproximadamente 1×10^8 cel/ml.

5.7.3. Ensaio com as linhagens *rad52 S. cerevisiae* STX507 e JRY481.

Ensaio realizado com estas linhagens apenas mostraram resultados em meio completo e meio mínimo quando acrescidos de glicose como fonte de carbono (figura 25). Os meios com rafinose e glicerol (resultados não mostrados) não permitiram o crescimento de nenhuma das células. Mesmo os controles cresceram muito pouco para delinear uma curva (D.O. = 3 e número de células/ml = 1×10^4). O período usado para a análise foi de 96 horas.

As células controle cresceram normalmente nos dois meios de cultivo utilizados, embora menos vigorosamente do que as linhagens *RAD52*, como mostram os resultados de D.O. não ultrapassando o valor de 6. Aparentemente, as linhagens STX507-5D e JRY481 apresentaram o mesmo perfil de crescimento. Contudo, com os plasmídios nuc+, os resultados foram diferentes, principalmente quando comparamos estas linhagens com as outras duas. Se por um lado, estas linhagens não mostraram atividade da nuclease em meio completo, indicando a possível perda dos plasmídios, as *rad52* foram capazes de apresentar atividade mais eficiente e comparável à encontrada em meio mínimo (figuras 25b e d).

O comportamento destas em meio completo (figura 25a e 25c) foi semelhante, dando início à morte celular já em 24 horas, sendo que nas alíquotas de 48 horas, não conseguimos mais detectar a presença de células viáveis e a D.O. permaneceu constante em torno de 0.060.

Figura 25. Curva de crescimento das linhagens *rad52* controle e *nuc+*. A) STX507-5D/YPD1%, B) STX507-5D/SD1%, C) SG1% e D) SR2%.

5.8. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DOS TRANSFORMANTES

A estabilidade dos plasmídeos durante o crescimento das linhagens JSC302 e W303-1B foi analisada após sucessivos inóculos em meio completo YPD2%, através do cálculo de perda por geração (tabela 4). A porcentagem de perda do plasmídeo pBS24Ub foi menor na linhagem JSC302 (8.2%) do que na linhagem W303-1B (9.4%). Estes resultados mostram que o simples fato do plasmídeo controle estar na linhagem W303-1B, já o torna 25% mais instável do que quando em JSC302. A cada geração, 1% dos plasmídeos em W303-1B são perdidos, contra 0.76% em JSC302.

Diferentemente, quando analisamos as linhagens com os plasmídeos *nuc+*, a porcentagem de perda foi expressivamente maior,

aumentando a taxa de perda por geração. Esta perda foi associada à presença do gene da nuclease.

Tabela 4. Análise da estabilidade dos plasmídeos pBS24Ub, pUbNuc2 e pUbNuc3.

Linhagem/ Plasmídeo	Nº Gerações 24 horas	% Perda	% Perda/ Geração
JSC302/ PBS24Ub	10.81	8.2	0.76
JSC302/ PUbNuc3	9.5	50.2	5.3
W303-1B/ pBS24Ub	9.3	9.4	1
W303-1B/ pUbNuc2	9	69.9	7.79

O plasmídeo pUbNuc3 apresentou porcentagem de perda de 50.2% em JSC302, e, pUbNuc2 apresentou 69.9% em W303-1B. O aumento na instabilidade foi cerca de 6.12 vezes para pUbNuc3 e 7.4 vezes para pUbNuc2. Portanto, a presença do gene *nuc* confere aumento na instabilidade do plasmídeo pBS24Ub que ultrapassa os 5% por geração.

Estes dados suportam os encontrados no ensaio "DROP TEST" em meio completo, onde as células com e sem plasmídeo apresentaram crescimento semelhante.

5.9. ENSAIO DA ATIVIDADE DA NUCLEASE *in vitro*

5.9.1. Em gel de agarose

Alíquotas de 1 ml de culturas das linhagens *S. cerevisiae* JSC302 e W303-1B contendo, seja o plasmídeo controle, seja os plasmídeos suicidas, crescidas em meio SD1%, foram retiradas em diferentes tempos e processadas de acordo com MM, item 4.28. Amostras

de 100 µl dos extratos celulares, após processamento, foram adicionadas a 1 µg de DNA do plasmídeo pU2 e incubadas a 30°C durante período de 6-8 horas. Após este tempo, amostras de 20 µl foram aplicadas em gel de agarose 0.7% e submetidas à eletroforese ($V = 70$) durante 40 minutos. Como controle positivo, foi utilizada a mesma quantidade do sobrenadante da cultura de *Serratia marcescens* crescida em meio LB, extraída após 24 horas de cultivo.

Na figura 26, pode-se verificar a atividade da nuclease produzida em *Saccharomyces cerevisiae* JSC302. A degradação total do DNA plasmidiano, decorrente da ação da nuclease, ocorreu a partir de 48 horas (canaletas 5) e continuou nas amostras de 72 e 96 horas (canaletas 7 e 9, respectivamente).

As canaletas 2, 4, 6 e 8 representam as amostras usadas como controle negativo, isto é, extratos das células com os plasmídeos sem o gene *nuc* e que não foram capazes de degradar o DNA plasmidiano. O controle com DNA do plasmídeo pU2 está mostrado na canaleta 1, intacto. O controle positivo, onde ocorreu degradação total decorrente da nuclease presente no sobrenadante de *S. marcescens*, cultura de 24 horas, está mostrado na canaleta 10.

Figura 26. Ensaio *in vitro* da atividade da nuclease nos extratos celulares de *S. cerevisiae* JSC302. 1) DNA controle do plasmídeo pU2; 2, 4, 6 e 8) extrato das células JSC302/pBS24Ub+pU2, alíquotas de 24, 48, 72 e 96 horas; 3, 5, 7 e 9) extrato das células JSC302/pUbNuc3 + pU2, alíquotas de 24, 48, 72 e 96 horas; 10) sobrenadante de *S. marcescens* + pU2.

A análise da atividade da nuclease produzida na levedura. *S. cerevisiae* W303-1B pode ser verificada na figura 27. A degradação do DNA foi evidente já a partir das alíquotas de 24 horas (canaleta 4), reforçando a idéia de que a repressão do promotor não é eficientemente controlada. Nas alíquotas de 48 e 72 horas, há a presença de um fraco rastro de degradação o qual não é observado nas outras amostras. Em 96 horas (canaleta 10), a degradação foi total. O controle positivo com sobrenadante de cultura de *Serratia marcescens* (canaleta 1) apresentou nível de degradação igual ao encontrado nas amostras de 24 e 96 horas de W303-1B.

Fica claro, a partir deste experimento, que a nuclease está presente no interior das células e que sua atividade é detectável, mesmo nas frações de 24 horas, cuja quantidade “esperada” de proteína produzida deveria ser inexpressiva.

Figura 27. Ensaio *in vitro* da atividade da nuclease nos extratos celulares da *S. cerevisiae* W303-1B. 1) sobrenadante de *S. marcescens*+pU2, cultura de 24 horas, 2) ladder 1 Kb; 3, 5, 7 e 9) extratos celulares das células W303-1B/pBS24Ub+ pU2 nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas; 4, 6, 8 e 10) extrato celular das células W303-1B/pUbNuc2+pU2 nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

5.9.2. Em espectrofotômetro

Para termos uma comparação da atividade da nuclease secretada pela *Serratia* e da nuclease presente na levedura, usamos como substrato DNA do plasmídeo pU2, e medimos a taxa de degradação deste, através do aumento da absorbância em 260 nm, medida em espectrofotômetro.

O gráfico da figura 28 mostra as curvas obtidas nos diferentes ensaios. A nuclease produzida pela *Serratia* foi extremamente eficiente na degradação do DNA plasmidiano. Em 3.5 horas, a Abs_{260} chegou ao limite máximo obtido no ensaio ($=0.48$). Em experimentos realizados anteriormente, com sobrenadante das culturas de *Serratia*, verificamos que a degradação ocorreu muito rapidamente, em menos de 5 minutos (resultados não mostrados).

Figura 28. Análise *in vitro* da atividade da nuclease presente nos extratos celulares das linhagens de *S. cerevisiae* JSC302 e W303-1B e no sobrenadante de *Serratia marcescens*, sobre DNA plasmidiano.

As nucleases produzidas pelas linhagens *S. cerevisiae* JSC302 e W303-1B, apresentaram um perfil semelhante ao encontrado para nuclease produzida pela *Serratia*, embora a D.O. não tenha chegado a 0.4. A Nuc produzida pela linhagem JSC302 foi mais rápida na clivagem do substrato (~7 hs), do que a produzida na linhagem W303-1B (14 hs), embora o resultado final do ensaio, $Abs_{280} = 0.34$, tenha sido atingido por ambas.

Comparando as curvas de atividade das nucleases produzidas nas linhagens de *S. cerevisiae*, nota-se que a produzida em JSC302 apresenta linearidade, ao contrário da produzida por W303-1B, que permaneceu durante aproximadamente 4 horas inativa e após este período iniciou a clivagem do DNA.

A diferença encontrada no perfil de atividade das nucleases produzidas em diferentes células demonstra que: a) como esperado, a atividade da nuclease produzida pela célula de origem é ótima e maior do que a encontrada nas células de *S. cerevisiae*; b) a Nuc produzida em JSC302 é mais eficiente do que a produzida em W303-1B, porque consegue atingir o pico máximo de degradação em menor tempo (~9 horas antes).

5.10. ESTUDO SOBRE A SITUAÇÃO DO DNA CROMOSSOMAL APÓS A INDUÇÃO DA NUCLEASE NAS LINHAGENS DE *S. cerevisiae* JSC302 E W303-1B

Os ensaios realizados até este ponto, já nos certificavam de que a nuclease de *Serratia* estava sendo produzida na levedura e que esta enzima era capaz de diminuir a viabilidade das células *in vivo*, detectada nos ensaios de sobrevivência em meio sólido (item 5.6), líquido (item 5.7) e *in vitro* (item 5.8). Porém, embora sua atividade também fora comprovada nos ensaios *in vitro*, através da degradação de DNA plasmidiano (item 5.8), continuávamos sem saber se a diminuição da viabilidade das células era proveniente da degradação de RNAs presentes no citoplasma, ou do DNA cromossomal, como era de fato, o objetivo deste trabalho.

Visando esclarecer esta dúvida, foi realizado o teste do Cometa. Através deste teste, que se baseia numa metodologia na qual ocorre lise da célula, mas não do núcleo, pode-se verificar a condição do DNA cromossomal. As células são fixadas em gel e submetidas à eletroforese, de maneira que se o DNA estiver degradado, sairá através dos poros nucleares e migrará conforme a corrente elétrica, gerando um rastro muito semelhante à cauda de um cometa, donde a denominação do teste.

Como o protocolo básico para este ensaio foi desenvolvido para células sanguíneas, tivemos que introduzir algumas modificações para as células de levedura. Infelizmente, não conseguimos padronizar um protocolo capaz de lisar a célula sem destruir o núcleo. Apesar disto, embora a lise não tenha ocorrido, foi possível verificar diferenças significativas nas linhagens expressando ou não o gene *nuc* (figuras 29 e 30).

Como podemos analisar através das figuras 29a e 30a, as células controles de *S. cerevisiae* JSC302 e W303-1B, respectivamente, apresentaram-se intactas, de tamanho normal e com o núcleo bastante fluorescente e definido. O citoplasma, por sua vez, também apresentou leve fluorescência, com certeza decorrente da presença de RNAs.

Em contraste, as células *nuc+*, produzindo a nuclease de *Serratia*, apresentaram-se bastante alteradas em relação aos controles (figuras 29b e 30b). A primeira diferença, que é verificada de imediato, é o tamanho das células, cerca de 1,5 vezes maior do que o encontrado para as controles. Contudo, o que mais chama a atenção, é a falta de definição de núcleo e citoplasma, e sim, uma célula maior, com grande fluorescência interior, sem qualquer delimitação.

A fluorescência destas células foi aumentada e, muitas vezes, foi possível detectar uma pequena nuvem ao redor da membrana, possivelmente devido a fragmentos de ácidos nucleicos que dispersaram durante o ensaio.

a)

b)

Figura 29. Teste do Cometa realizado para a linhagem JSC302 a) com o plasmídeo controle pBS24Ub e b) com o plasmídeo nuc+ pUbNuc3.

a)

b)

Figura 30. Teste do Cometa realizado para a linhagem W303-1B a) com o plasmídeo controle pBS24Ub e b) com o plasmídeo nuc+ pUbNuc2.

5.11. SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS PELAS LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* JSC302 E W303-1B

Os clones das linhagens JSC302 e W303-1B, transformados, seja com o plasmídeo vazio, seja com o plasmídeo contendo a inserção, foram cultivados após o pré-inóculo, em 25 ml de meio SD1%-LEU e, alíquotas foram colhidas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo. Após separação do meio por centrifugação, as células foram lisadas por três ciclos rápidos de congelamento e descongelamento (MM, item 4.23.2) e o lisado foi analisado por SDS-PAGE 12% (MM, item 4.25) e “Western blot” (MM, item 4.26). A quantidade de proteínas nas amostras foi determinada segundo adaptação do método descrito por Bradford (1976) e padronizada para cada poço do gel de poliacrilamida em 15 µg/ml.

Como mostram as figuras 31 (*S. cerevisiae* JSC302) e 32 (*S. cerevisiae* W303-1B), não houve diferença entre os padrões eletroforéticos apresentados pelas linhagens com e sem a nuclease.

Figura 31. SDS-PAGE das proteínas presentes no extrato celular da linhagem JSC302 e sobrenadante de *Serratia marcescens*. 1) padrão de peso molecular; 2, 4, 6 e 8) JSC302/pBS24Ub, alíquotas de 24, 48, 72 e 96 horas; 3, 5, 7 e 9) JSC302/pUbNuc3, alíquotas de 24, 48, 72 e 96 horas; 10) sobrenadante de *S. marcescens*, 24 horas.

Embora tenha sido detectada grande variedade de proteínas nas amostras de ambas as linhagens, as quais poderiam estar se sobrepondo a banda referente à nuclease, quando o mesmo gel foi analisado com quantidades menores de peptídeos, também não foi possível identificar a presença da proteína de interesse (resultados não mostrados) na região de 29 kDa. As bandas referentes à nuclease presente no sobrenadante das culturas de *S. marcescens* foram indicadas nos géis das figuras 31 e 32, canaleta 10 e 2, respectivamente.

Figura 32. SDS-PAGE das proteínas presentes no extrato celular da linhagem W303-1B e sobrenadante de *Serratia*. 1) padrão de peso molecular; 2) sobrenadante de *S. marcescens*, 24 horas; 3, 5 e 7) W303-1B/pBS24Ub, alíquotas de 24, 48 e 72 horas; 4, 6 e 8) W303-1B/pUbNuc2, alíquotas de 24, 48 e 72 horas.

5.12. IDENTIFICAÇÃO DA NUCLEASE DE *Serratia marcescens* PELO ANTICORPO POLICLONAL ANTI-nuc POR “WESTERN BLOT”

Apesar da atividade da nuclease ter sido detectada *in vivo*, nas células de JSC302 através da diminuição do número de células viáveis, e *in vitro*, através da degradação do DNA plasmidiano pU2, como mostrado

anteriormente, não havia sido possível visualizar a banda referente à proteína no ensaio de SDS-PAGE. Neste caso, somente um método de identificação mais sensível e específico como o “Western blot” poderia realmente evidenciar em qual momento a nuclease é expressa e em quais quantidades.

Em ensaio realizado para a linhagem *S. cerevisiae* JSC302 (figura 33), a banda referente ao gene da nuclease foi identificada somente na alíquota de 72 horas (canaleta 7) em grande quantidade. Nas outras amostras, não há evidência alguma da presença da nuclease.

Figura 33. Western Blot das proteínas presentes no extrato celular de JSC302 transformada com os plasmídeos pBS24Ub e pUbNuc3. 1) padrão de peso molecular; 2, 4, 6 e 8) JSC302/pBS24Ub, alíquotas de 24, 48, 72 e 96 horas; 3, 5, 7 e 9) JSC302/pUbNuc3, alíquotas de 24, 48, 72 e 96 horas; 10) sobrenadante de *S. marcescens* 24 horas.

Com relação à célula W303-1B, os resultados mostraram-se diferentes (figura 34). Foram identificadas, em menor quantidade, bandas referentes à nuclease, nas alíquotas de 24 e 48 horas (canaletas 3 e 5, respectivamente). Este resultado confirma a hipótese do vazamento do promotor *ADH2GAPDH*, mostrando que este não é totalmente regulado. A quantidade de peptídeo visualizada em ambas as amostras é a mesma e cerca de 10 vezes inferior à secretada pela *Serratia marcescens* (canaleta 10).

Figura 34. Western Blot das proteínas presentes no extrato celular de W303-1B transformada com os plasmídeos pBS24Ub e pUbNuc2. 1) padrão de peso molecular; 2, 4, 6 e 8) W303-1B/pBS24Ub, alíquotas de 24, 48, 72 e 96 horas; 3, 5, 7 e 9) W303-1B/pUbNuc2, alíquotas de 24, 48, 72 e 96 horas; 10) sobrenadante de *S. marcescens* 24 horas.

A quantidade de proteína produzida nas duas linhagens de levedura, foi praticamente a mesma. Juntando-se as quantidades evidenciadas nas alíquotas de 24 e 48 horas de W303-1B, pode-se obter quantidade semelhante a encontrada na amostra de 72 horas de JSC302. A amostra da *Serratia marcescens*, apresentou variação no perfil de bandas, ora com duas (canaleta 10, figura 33), ora com uma (canaleta 10, figura 34).

5.13. SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS DE LEVEDURAS NO AMBIENTE

Como os melhores resultados foram apresentados com a linhagem JSC302, esta foi escolhida para o ensaio que simulou condições ambientais.

A sobrevivência das células trazendo o plasmídeo controle pBS24Ub e o plasmídeo com o gene *nuc*, pUbNuc3, em suspensões de solo/YPD2% e solo/água (tabela 5). Depois da incubação à temperatura ambiente durante cerca de 20 dias, o número de células, com plasmídeo controle (pBS24Ub) ou suicida (pUbNuc3) foi avaliado em placas de meio completo (YPD2%) e mínimo SD8%-Leu. Os experimentos em solo com água e YPD2% originaram resultados diferentes.

A sobrevivência das células presentes nas amostras de solo/água foi menor do que a encontrada em solo/YPD2%. Depois de 10 dias, menos de 0.0001% de células portando qualquer um dos plasmídeos nas duas condições de ensaio, sobreviveram. Analisando mais detalhadamente verificou-se que em solo com água, a sobrevivência da célula controle foi detectada em até seis dias, contra três (72 horas) dias para as células portando o plasmídeo pUbNuc3.

A porcentagem de morte das células *nuc*⁺ foi realmente maior. Três dias após o inóculo inicial, o número destas células diminuiu em 51%, sendo que no quarto dia já não foi possível detectar u.f.c, enquanto as células controle foram detectadas durante sete dias, no mínimo. Por outro lado, em experimentos com solo/YPD2%, embora as células *nuc*⁺ tenham apresentado taxa de sobrevivência menor do que as células controles, somente após seis dias de incubação o número de u.f.c. diminuiu drasticamente, enquanto, para as células controle, foram necessárias duas semanas. Estes resultados demonstram a ação do plasmídeo suicida em condições que simulam o ambiente.

Tabela 5. Sobrevivência da linhagem *S. cerevisiae* JSC302 e estabilidade dos plasmídeos pBS24Ub e pUbNuc3 no ambiente.

	JSC302/ PLASMÍDEO	SOLO/ÁGUA		SOLO/YPD2%	
		Nº cél/ml	% de perda do plasmídeo	Nº cel/ml	% de perda do plasmídeo
inóculo	pBS24Ub	1×10^6	-	1×10^6	-
	pUbNuc3	1×10^6	-	1×10^6	-
72 horas	pBS24Ub	1.3×10^6	1.6	0.98×10^7	21.2
	pUbNuc3	6.38×10^3	5.3	3.2×10^6	86.8
96 horas	pBS24Ub	3.2×10^6	0.7	5.39×10^6	49.5
	pUbNuc3	0	-	4.18×10^4	100
120 horas	pBS24Ub	2.5×10^2	8	3×10^3	100
	pUbNuc3	0	-	2×10^2	-
144 horas	pBS24Ub	0.38×10	5.3	1.83×10^2	100
	pUbNuc3	0	-	0	0

Em ambos os ensaios, foram detectadas grande quantidade de bactérias, mesmo com a adição de antibióticos (com diferentes mecanismos de ação) e fungos filamentosos, os quais prejudicaram a contagem das u.f.c.

5.14. ESTABILIDADE DOS PLASMÍDEOS NO AMBIENTE

A estabilidade dos plasmídeos foi analisada através da relação entre o número de células presentes em YPD2% e o número de células que cresceram em SD8%-LEU (tabela 6). Os plasmídeos foram mais estáveis em água do que em meio completo. A média de perda do plasmídeo controle nas primeiras 96 horas no ensaio solo/água foi de ~2%, aumentando com o passar dos dias, mas não ultrapassando o limite de 8% a cada 48 horas. A

porcentagem de perda do plasmídeo pUbNuc3, detectada na amostra de 72 horas, onde ainda foi possível contar células, foi de 5.31%.

No ensaio solo/YPD2% a porcentagem de perda do plasmídeo controle, foi aumentando significativamente após 96 horas de cultivo chegando a 100% em 5 dias. As células nuc+, por sua vez, perderam 100% de seus plasmídeos após 4 dias de cultivo.

O plasmídeo controle, de qualquer forma, se mostrou mais estável do que o plasmídeo pUbNuc3, conforme verificado também nos experimentos anteriores.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema suicida para leveduras, com potencial de atuar como mecanismo de contenção de leveduras geneticamente modificadas no ambiente. Neste sistema, a nuclease de *Serratia marcescens*, clonada no plasmídeo bifuncional pBS24Ub, e, cujo alvo de ação é o material genético (DNA e RNA), não é expressa em condições laboratoriais, onde altas concentrações de glicose reprimem a atividade do promotor *ADH2GAPDH*, sob o comando do qual foi colocado o gene da nuclease (Denis *et al.*, 1983; Cousens *et al.*, 1987; Cereguino e Scheffler, 1996). Assim, a levedura pode ser utilizada para produzir qualquer outra proteína de interesse, depois da purificação da qual, a morte celular pode ser programada. O ponto chave deste sistema é que o material genético, fonte de toda a informação biológica, é totalmente destruído, permitindo a liberação da massa de fermentação diretamente no meio ambiente.

Por outro lado, se a liberação da levedura for não intencional (contaminação), a ausência de glicose no ambiente desencadeará a expressão do gene da nuclease, evitando portanto, a sobrevivência das células recombinantes for a do nosso controle.

O problema da liberação de OGMs no ambiente vem sendo objeto de preocupação de vários segmentos da sociedade. Os estudos a este respeito publicados até hoje, em sua maioria, não são capazes de descrever exatamente qual o comportamento de tais microrganismos ou o espectro de suas interações com a microbiota natural nem tampouco, qual o destino dos ácidos nucleicos que são liberados com a lise das células, por exemplo. Muitos sistemas de contenção ou suicidas foram contruídos para bactérias usando a clonagem de genes codificadores de proteínas tóxicas, principalmente tendo como alvo para a membrana celular. Infelizmente, estes mecanismos acabam por facilitar a liberação do DNA para o meio, funcionando às avessas do proposto. Daí, a importância do nosso projeto. Além de ser totalmente inovador

para leveduras, o alvo de ação da proteína tóxica é o próprio material genético, o que estanca o processo de contaminação.

A realização do trabalho ocorreu em três partes distintas: a) clonagem do gene *nuc* no plasmídeo bifuncional pBS24Ub; b) análise da expressão da nuclease *in vivo* e *in vitro*; e c) análise da atividade da nuclease em condições extra-laboratoriais, simulando o ambiente extra-laboratorial.

6. 1. PRIMEIRA PARTE

Construção do Sistema de Expressão da Nuclease de Serratia marcescens em Saccharomyces cerevisiae

Para a construção do plasmídeo de interesse, pUbNuc, utilizamos o vetor **pBS24Ub**, por apresentar uma série de vantagens: presença do promotor híbrido indutível *ADH2/GAPDH* de *S. cerevisiae*; dos genes *URA3* e *leu2-d* como marcadores de seleção; gene da ubiquitina; e parte do do plasmídeo 2-micron, com suas funções preservadas, permitindo sua replicação em linhagens *cir*^p.

O promotor *ADH2GAPDH* foi utilizado por diferentes grupos de companhias de biotecnologia as quais produzem proteínas recombinantes em *S. cerevisiae* (Chiron Corporation Emeryville, EUA; Smith Kline Beecham Rixensart, Bélgica; Takeda Chemical Industries, Osaka, Japão), o que é já um indicativo de sua alta eficiência; e também em nosso laboratório, para a expressão da proteína de 18kDa de *M. leprae*, com alta eficiência (Pinho *et al.*, 1995).

A utilização de um vetor contendo como marcadores de seleção os genes *URA3* e *leu2-d*, também é muito vantajosa, pois, a seleção dos transformantes da levedura é realizada inicialmente em meio sem uracila, seguida de crescimento dos clones transformantes em meio sem leucina, o que leva a um notável aumento de cópias do vetor de expressão. Isto se deve ao fato de que o gene *leu2-d* apresenta uma deficiência no seu promotor, e, em consequência, é fracamente expresso, de tal forma que, para complementar a auxotrofia em levedura da linhagem hospedeira em leucina, é necessário ocorrer amplificação do vetor até aproximadamente 200 a 400 cópias por célula (Ehnhart & Hollenberg, 1983). Este mecanismo de amplificação do número de cópias do vetor de expressão não funciona quando se emprega, o marcador de seleção *LEU2*, ficando restrito à amplificação própria do plasmídeo 2-*micron*.

O sistema da ubiquitina permite o processamento da proteína de fusão *in vivo*, ou seja, a exata clivagem do produto de fusão entre a ubiquitina (extremidade amino) e a proteína heteróloga (extremidade carboxila), liberando uma proteína sem a metionina na extremidade amino (Sabin *et al.*, 1989), a qual quando não é removida pela metionil aminopeptidase endógena, pode alterar a função ou imunogenicidade da proteína (Barr, 1990). Foram expressas com este sistema, diversas regiões das proteínas de envelope e da integrase do HIV1 (Barr *et al.*, 1991).

Visando a clonagem do gene *nuc* de *Serratia marcescens* no plasmídeo pBS24Ub, empregamos a reação em cadeia da polimerase, para a formação de sítios adjacentes ao fragmento do gene de interesse. Esta estratégia foi adotada para facilitar a clonagem, evitando-se construções que envolvessem ligações de extremidades cegas ou adições de "linkers" aos fragmentos, bem como a necessidade de verificação da orientação do inserto e a reconstituição do sítio de clivagem da ubiquitina. Desta forma, o fragmento contendo o gene *nuc* de *S. marcescens* foi amplificado utilizando-se como

"primers" oligonucleotídeos especialmente desenhados para facilitar a posterior clonagem do gene.

O melhor resultado de amplificação do gene *nuc* foi obtido com a enzima *Vent* polimerase usando 1 mM de magnésio (figura 13). As concentrações deste íon foram fundamentais para o sucesso da reação. Concentrações maiores foram inibitórias, talvez atuando sobre a atividade da polimerase ou mesmo, na ligação aos dNTPs (Innis *et al.*, 1990). Qualquer influência sobre os resultados de fatores como a concentração de primers, DNA, temperatura e a própria enzima, foi excluída, uma vez que, estes parâmetros foram sempre os mesmos para todas as reações.

A eficiência de transformação encontrada para bactérias foi muito baixa (112 transformantes/ml, dos quais somente sete apresentaram o inserto), após muitas tentativas sem sucesso. Este resultado nos levou a imaginar que o sistema de ligação não fora eficiente em decorrência da própria mistura de ligação (problemas com enzimas, tampões, etc) ou como acreditamos, fruto da ineficiência de clivagem por parte da enzima *SaI* e *SstII*. Isto porque, os sítios de clivagem destas enzimas encontravam-se muito próximos um do outro (no caso do vetor, menos de 8 nucleotídeos de distância entre ambos) ou muito perto das extremidades (no caso do fragmento). A enzima *SaI* necessita de alta concentração de sais para a sua atividade, sendo seu tampão único, como também, de ao menos dezenove nucleotídeos ladeando o sítio de clivagem, provavelmente para dar uma maior estabilidade à própria enzima durante a ligação ao substrato. Para contornar este problema, passamos a fazer as clivagens separadamente, primeiro com *SaI*, seguida de precipitação e lavagem, e depois com *SstII*. Outra estratégia foi desenhar os "primers" com nucleotídeos a mais, adjacentes ao sítio de clivagem desta enzima. Não podemos dizer exatamente, qual dos fatores foi o responsável, mas o aumento da eficiência de transformação pode ser notado.

Os plasmídeos dos transformantes obtidos foram clivados com ambas as enzimas, liberando o fragmento do gene *nuc* com diferentes perfis de migração (figura 16). Esta diferença provavelmente foi decorrente da concentração de DNA plasmidiano usada na digestão. Muitas vezes, o fato de serem aplicadas no gel quantidades grandes de DNA, interfere com a migração prejudicando a definição de bandas e mesmo sua localização. Foram então, escolhidos aleatoriamente, 4 plasmídeos para transformação das diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

Os resultados obtidos foram interessantes porque evidenciaram a importância da linhagem hospedeira na eficiência de transformação. Como citado anteriormente, foram usadas quatro linhagens apresentando características diferentes, com a intenção de comparar os resultados de expressão, produção e atividade da proteína heteróloga. As principais características destas linhagens são:

- 1) presença (*cir*⁺) ou ausência (*cir*⁰) do plasmídeo 2-*micron*;
- 2) deficiência na produção de proteases intracelulares: trabalhamos com linhagens que não eram deficientes para nenhuma protease intracelular, e também com outra, portadora de mutações nos três principais genes envolvidos com a produção de proteases em *S. cerevisiae* (*pep4-3*, *prb 1-1122*, *prc1-407*);
- 3) síntese constitutiva do fator de transcrição *ADR1* (*ADR1c*), resultante da integração cromossômica de um plasmídeo contendo uma cópia do gene *ADR1* regulada pelo promotor *GAPDH*;

- 4) deficiência no sistema de reparação de quebras no DNA (*rad52-1*) (Mortimer *et al.*, 1981).

Como se pode observar na tabela 2, a eficiência de transformação foi maior nas linhagens JSC302 e W303-1B e muito baixa nas linhagens *rad52*. Este resultado foi obtido para todos os plasmídeos usados, revelando notável deficiência na transformação das células *rad52*, quando comparadas com as demais. No processo de transformação, é importante ressaltar que o procedimento é danoso para as células por submetê-las a diferentes mecanismos de estresse. Os dois mutantes *rad52*, por suas características peculiares, provavelmente, sofreram mais para adaptarem-se às condições do ensaio. A própria baixa eficiência de transformação pelo plasmídeo controle, embora maior do que o *nuc+*, é uma confirmação disto. Chegamos a pensar na hipótese da ubiquitina ser tóxica para a célula, mas, após transformação da linhagem STX507-5D com o plasmídeo YEP352 (vazio), pudemos notar que a eficiência também foi muito baixa, comparável àquela encontrada para o plasmídeo pBS24Ub. Assim, a mutação *rad52* parece reduzir a capacidade de transformação das linhagens.

Outro resultado interessante é a maior eficiência de transformação de uma mesma linhagem com o plasmídeo controle, pBS24Ub, quando comparado com os demais plasmídeos *nuc+*, demonstrando que a simples presença do gene *nuc* interfere nos resultados. O gene da nuclease poderia estar sendo expresso na levedura, mesmo em condições de altas concentrações de glicose (repressoras), fruto de uma regulação do promotor *ADH2/GAPDH* não absolutamente controlada, permitindo um nível basal de transcrição. Se esta explicação é coerente, os transformantes obtidos provavelmente deveriam apresentar mutações no gene ou promotor para terem conseguido sobreviver. Entretanto, em experimentos posteriores, demonstramos que as células portadoras dos plasmídeos pUbNuc morrem em

condições de expressão da nuclease, indicando que a enzima está ativa. Então, a sua atividade poderia estar diminuída, mas não ausente. Embora este resultado se tenha repetido para todas as linhagens usadas, no caso dos mutantes *rad52*, um número muito pequeno de quebras no DNA, seria suficiente para provocar a morte, já que não podem ser reparadas.

6.2. SEGUNDA PARTE

Análise da Expressão do Gene *nuc* e Atividade da Nuclease in vivo e in vitro

A atividade da nuclease expressa na levedura foi analisada usando transformantes contendo os plasmídeos pBS24Ub e pUbNuc. Importava-nos conhecer o tempo de repressão do promotor *ADH2GAPDH* e a influência do meio de cultivo no crescimento celular e expressão da nuclease. A linhagem de *S. cerevisiae* JSC302 foi usada como padrão para os ensaios de consumo de glicose ao longo do crescimento celular (figura 20), em meios mínimo e completo. Como esperado, crescimento em meio completo foi mais rápido e, conseqüentemente, o consumo da glicose também; em 24 horas, as células haviam atingido a máxima densidade celular (fase estacionária) e as concentrações de glicose presentes, já não eram mais suficientes para reprimir o promotor. Em meio mínimo, onde a célula precisa sintetizar os diferentes aminoácidos, o crescimento e o consumo de glicose foram mais lentos, chegando em níveis de desrepressão somente após 48 horas. É importante considerar que estes resultados são referentes a um inóculo inicial padronizado em 1×10^6 cel/ml, condição utilizada em todos os ensaios.

Sabendo que o promotor *ADH2GAPDH* estava praticamente reprimido até 24 horas em meio completo e 48 horas em meio mínimo, procuramos identificar o meio que oferecia as melhores condições de crescimento e expressão do gene *nuc* nas leveduras. Isto porque, a maioria dos ensaios de expressão da nuclease eram baseados na diminuição do número de células, e porque sabíamos que a expressão da nuclease, em bactéria, poderia ser alterada pelas condições do meio de cultivo, principalmente o pH (melhores índices de expressão foram obtidos em pHs maiores do que 7.0) (Jepsen *et al.*, 1987; Biedermann *et al.*, 1990; Suh *et al.*, 1995; Suh e Benedik, 1996).

A linhagem de *S. cerevisiae* JSC302/pBS24Ub foi crescida em meio mínimo com 1% de glicose em três condições diferentes: a) não tamponado, b) tamponado em pH 6.0 e c) tamponado em pH 7.0. Sabe-se que a levedura, quando inicia o processo fermentativo consumindo a glicose como fonte de carbono, acidifica o meio de cultura, cujo pH pode chegar a valores próximos de 2.0. Embora a *nuc* na levedura não seria secretada, mas atuaria internamente, resultados de outros experimentos com a linhagem de *S. cerevisiae* JSC302 carregando um plasmídeo com o gene da nuclease, de maneira que ela fosse secretada, mostraram que o pH do meio também é fundamental para a secreção desta proteína em leveduras, principalmente porque, no caso destas células, o pH ácido, decorrente da fermentação, torna a proteína extremamente instável e susceptível à ação de proteases, como também fora verificado por Pinho *et al.* (1995).

Verificamos que o crescimento celular foi alterado somente em pH 7.0 (figura 17). Os meios tamponado em pH 6.0 ou não tamponado proporcionaram praticamente as mesmas condições de crescimento. Contudo, o fato da linhagem JSC302 estar crescendo melhor em meios não tamponado e tamponado em pH 6.0, não implica necessariamente que o gene da nuclease esteja sendo expresso em maior nível. Para estudarmos esta questão, usamos

as linhagens JSC302/pUbNuc3 e W303-1B/pUbNuc2 nos ensaios de Western Blot (figuras 18 e 19). Verificamos que a quantidade de nuclease produzida em pH 7.0 foi menor do que a encontrada nas outras amostras, nas alíquotas de 72 horas em ambas as células e 48 horas para JSC302. Nas outras amostras, a quantidade de proteína foi a mesma. Portanto, fica o indício de que há uma relação, também em leveduras, entre produção de nuclease e pH. Outros experimentos, porém, mais detalhados, devem ser realizados para confirmar este resultado. Para as finalidades deste trabalho, consideramos melhor utilizar meio mínimo com 1% de glicose sem tamponamento, por ser a condição na qual a nuclease foi detectada igualmente para as duas linhagens.

Passamos então aos ensaios de expressão da nuclease em meio líquido, como mostrado na tabela 3, que consistiam em seguir a sobrevivência das células ao longo do tempo de incubação em condições ótimas de crescimento em meio mínimo com 1% de glicose. Já em 24 horas houve diminuição do número de células viáveis, indicando atividade da enzima, principalmente nas células *rad52*, levando a uma notável diminuição do número de células viáveis durante o período usado para o experimento (tabela 3). Embora a repressão do promotor continuasse até aproximadamente 48 horas, detectávamos morte celular anterior a este período. Estes resultados, embora viessem a nosso favor, nos surpreenderam, uma vez que o sistema de expressão de proteínas heterólogas em leveduras, baseado no promotor *ADH2GAPDH*, é considerado especialmente interessante para a clonagem de proteínas tóxicas para a célula hospedeira, justamente por somente manifestar qualquer efeito deletério da proteína heteróloga, após se ter alcançado altas densidades celulares (Pinho *et al.*, 1995; Cereguino e Scheffler, 1996). Este mesmo sistema foi utilizado para a expressão da integrase do HIV-1, de maneira controlada (Caumont *et al.*, 1996), inclusive usando a linhagem JSC302, entre outras. Contudo, para a expressão da endonuclease de *E. coli*, *EcoRI*, na levedura, foi utilizado o sistema de expressão regulado pelo

promotor *GAL1*, supostamente mais interessante nestes casos (Barnes e Rine, 1984). Para explicar nossos resultados há duas possibilidades: a) existência de um nível de expressão basal do gene *nuc*; e b) quantidades pequenas de glicose (encontradas em 24 horas), não seriam suficientes para reprimir o promotor.

Diante destes resultados, para contornar o problema de um possível vazamento do promotor e permitir a formação de colônias sobre o meio sólido, empregamos 8% de glicose no meio das placas utilizadas para a seleção dos transformantes, de modo a manter o promotor reprimido por vários dias, até o aparecimento das colônias.

Mesmo assim, muitos transformantes das células *rad52*, morreram já nas placas obtidas da transformação, não sendo possível preparar inóculos destes em meio líquido forçando-nos, portanto, a realizar os ensaios com estas células a partir de clones distintos. As linhagens JSC302 e W303-1B, algumas vezes apresentaram este padrão, mas na maioria das vezes, foi possível utilizar os clones sem muitos problemas. Estas células levam vantagem em relação às demais por apresentarem seu sistema de reparação celular intacto, capaz de reverter os danos causados por baixos níveis de nuclease.

Comparativamente, a linhagem JSC302 apresentou viabilidade menor do que W303-1B, o que era esperado, em decorrência da expressão constitutiva do gene *ADR1*, cujo produto funciona como regulador positivo do promotor *ADH2/GAPDH*. As células controle, ao contrário, permaneceram viáveis, mesmo após 96 horas de cultivo. Os dados de sobrevivência destas células, portadoras do plasmídeo controle pBS24Ub, o qual expressa a ubiquitina, mostram uma pequena queda, não esperada, principalmente nas primeiras 24 horas, mas como citado anteriormente, não foi possível atribuir nenhum efeito deletério à ubiquitina.

Os ensaios foram repetidos em meio sólido completo (figura 21) e mínimo (figura 22) contendo apenas 1% de glicose de modo a poder visualizar o efeito

letal. Gotas de 3 ml de suspensões de células contendo 30000 u.f.c. foram depositadas sobre as placas e estas foram incubadas durante 7 dias. Em meio completo, apenas as linhagens *rad52* apresentaram resultados coerentes com os obtidos em meio líquido, enquanto as linhagens JSC302 e W303-1B apresentaram alta taxa de sobreviventes, variando entre 10^3 e 10^4 , respectivamente. Este caso indica que as condições de crescimento influenciam o tipo de resposta obtida. A tendência da célula foi eliminar o plasmídeo em YPD, por vários fatores como: a) não ser vital para a sobrevivência; b) apresentar tamanho maior que 16 kb; e c) apresentar um gene que codifica uma proteína extremamente tóxica. O resultado é que durante as gerações subsequentes, células sem o plasmídeo levam vantagem sobre as células *nuc+*. Quando as células presentes nas placas de meio completo foram transferidas para meio mínimo quase 100% destas haviam perdido o plasmídeo de interesse.

Resultados semelhantes foram obtidos por Caumont e colaboradores (1996) quando expressando a integrase do HIV-1 em meio completo. Sua atividade não pode ser detectada, ao contrário do que se observou em meio mínimo.

A análise de estabilidade dos plasmídeos nas linhagens JSC302 e W303-1B confirmou que a perda por geração é muito alta quando o gene *nuc* está presente, enfatizando os resultados obtidos em meio completo (líquido ou sólido). De fato, quando o plasmídeo está sem o gene *nuc*, a instabilidade fica em torno de 1% para ambas as linhagens, o que está dentro da faixa esperada para plasmídeos replicativos, principalmente grandes, como é o caso do pBS24Ub (Buckholz e Gleeson, 1991). O que não imaginávamos, é que a clonagem de um gene que codifica uma proteína tóxica levaria a uma instabilidade altíssima, de mais de 50%. Isto demonstra que de alguma forma a célula percebe a presença da toxina, talvez sua ação durante o início do cultivo, e elimina a fonte que a fornece. Curiosamente, no trabalho de

Caumont e outros (1996), a perda do plasmídeo em meio completo não foi muito alta, tornando sem explicação a ausência de atividade da integrase em meio completo.

Em meio mínimo, onde as condições de cultivo foram as mesmas, os resultados mostraram que as células apresentam alta taxa de mortalidade (mais de 98%). Um ponto interessante foi que as células sobreviventes, quando plaqueadas em meio mínimo, ainda apresentavam o plasmídeo de interesse, indicando, que provavelmente o gene *nuc*, ou o promotor, haviam sofrido alterações capazes de neutralizar a atividade enzimática da nuclease, como evidenciado para a maioria dos sobreviventes aos sistemas suicidas desenvolvidos em bactérias.

Os clones com os plasmídeos pUbNuc3 (JSC302) e pUbNuc2 (W303-1B) apresentaram melhores resultados e foram portanto escolhidos para os ensaios subsequentes. Em alguns deles, usamos as linhagens *rad52*, mas com algumas ressalvas, por não podermos repetir os ensaios com os mesmos clones, em razão da sua sensibilidade extrema.

A análise mais detalhada da expressão/regulação da nuclease foi alcançada em experimento utilizando diferentes fontes de carbono, além da glicose. O objetivo foi verificar se estes outros açúcares poderiam aumentar a mortalidade da célula, uma vez que não são repressores do promotor *ADH2GAPDH*. O ensaio foi realizado em meios de cultivo líquidos acrescidos de glicose (YPD e SD), rafinose ou glicerol (SD), como única fonte de carbono.

Em meio completo, os plasmídeos carregando o gene da nuclease, pUbNuc2 e pUbNuc3, foram perdidos permitindo crescimento das linhagens JSC302 e W303-1B, próximo ao encontrado para as células controle (figuras 23a e 24a). Resultados diferentes, porém, foram obtidos em meio mínimo. O consumo da glicose, decorrente do crescimento celular, provocou expressão da nuclease em início de fase estacionária verificada através da

diminuição da viabilidade das células e estabilidade da D.O. Como esperado, a atividade da nuclease foi melhor na linhagem JSC302, porque, em 24 horas a partir da expressão, o número de sobreviventes detectados foi inferior a 10^{-6} cel/ml (figura 23b), contra 10^{-5} cel/ml para W303-1B (figura 24b). A presença do gene *ADR1* com expressão constitutiva e a ausência de proteases, explicam este resultado. Se, nestas células, ocorre alguma expressão da nuclease nas condições de repressão, o efeito não foi identificado. A alta taxa de sobreviventes, encontrada em JSC302 e W303-1B, principalmente, pode estar relacionada, como em outros sistemas, à instabilidade da enzima (Erm, 1990), atividade específica baixa no citoplasma, mutação no gene *nuc* (Ahrenholtz et al., 1994), mutação no promotor, ausência de formação das pontes dissulfeto (Ball et al., 1992) ou mecanismo de reparação celular eficiente (Caumont et al., 1996). A fração de sobreviventes encontrados nos sistemas suicidas varia entre 10^{-7} e 10^{-3} por geração, (Contreras et al., 1993; Ramos et al., 1995). Uma outra explicação interessante, poderia estar relacionado ao transporte da nuclease até o núcleo da célula. Digamos que ela esteja sendo produzida em níveis basais, estes não seriam suficientes para a atividade da enzima superar o mecanismo de reparação e causar a morte celular? Não, se a enzima não chegar ao núcleo, ou, apresentar atividade baixa no citoplasma, ou ainda, não conseguir hidrolisar tão facilmente RNAs quanto DNAs. Sabemos que as células JSC302 não apresentam proteases, o que garante maior estabilidade para a proteína no citoplasma, do que em W303-1B (Caumont et al., 1996), mas não podemos afirmar que esta característica é a responsável pelos resultados obtidos.

As curvas originadas a partir dos dados obtidos com o ensaio das células *rad52* mostraram morte celular em ambos os meios de cultivo com glicose, corroborando as hipóteses apresentadas anteriormente (figuras 25a, b, c e d).

O efeito da expressão da nuclease em meio mínimo com fontes de carbono como a rafinose e o glicerol foi bastante drástico para as células W303-1B e JSC302. O possível efeito aumentado na linhagem JSC302, devido às suas características, não pode ser comparado com a linhagem W303-1B, porque a morte celular ocorreu desde os primeiros tempos de incubação, levando a zero o número de sobreviventes, confirmando a glicose como repressora do sistema.

Por outrolado, passamos à detecção da atividade da nuclease *in vitro*, utilizando como substrato DNA plasmidiano. Extratos celulares das linhagens com e sem a nuclease foram acrescidos ao DNA do plasmídeo pU2 e a mistura foi submetida à incubação a 30°C, por período de 18 horas. Alíquotas das amostras foram aplicadas em gel de agarose para eletroforese, ou tiveram a densidade óptica monitorada em espectrofotômetro. Os resultados foram muito estimulantes, demonstrando que a nuclease está presente nos extratos celulares das linhagens com plasmídeos pUbNuc, apresentando atividade muito próxima àquela encontrada no sobrenadante das culturas de *S. marcescens*. Além disto, detectamos a atividade da nuclease nos extratos de *S. cerevisiae* W303-1B, nas alíquotas de 24 horas. A hipótese de que a atividade encontrada nos extratos poderia ser decorrente da ação da nuclease NUC1, encontrada em mitocôndrias de leveduras, foi descartada com a análise das amostras dos extratos das células com o plasmídeo controle, onde o efeito não pôde ser verificado. Esta nuclease é a única não específica presente e expressa na levedura, ainda que em níveis muito baixos (Vicent *et al.*, 1988). Outra família de nucleases, denominada de *FEN1* consiste de nucleases de estrutura específica com função de recombinação, replicação e reparo, mas não apresentariam atividade comparável à encontrada nos extratos analisados (Lieber, 1997). A nuclease, portanto, é expressa em condições de repressão do promotor *ADH2GAPDH*, na linhagem W303-1B, permitindo inferir que o sistema de reparação da célula hospedeira é extremamente eficiente. Ensaio

do tipo Western Blot das proteínas presentes nos extratos celulares confirmaram estes resultados, revelando a presença de banda referente à nuclease, nas frações de 24 e 48 horas de *S. cerevisiae* W303-1B (em quantidades iguais) e na fração de 72 horas para JSC302. Usando o programa de análise de concentração de bandas do sistema "Eagle Eye", pudemos verificar que há um aumento de aproximadamente 40% na amostra de 48 horas, comparado com a de 24 horas. Este não pode ser detectado na foto, provavelmente por falta de sensibilidade do método fotográfico.

Diferentemente de W303-1B, em JSC302, a nuclease somente foi detectada na fração de 72 horas, embora tenhamos detectado a sua atividade em 48 horas nos ensaios *in vitro*. Este resultado pode ser comparado ao obtido com a expressão do gene da integrase do HIV-1, usando a mesma linhagem hospedeira (Caumont *et al.*, 1996). Um ponto interessante é que a quantidade de proteínas é padronizada para o ensaio, mas, como as células estão em condições fisiológicas diferentes nos vários tempos, podemos ter um efeito maior de atividade das proteases, principalmente nas alíquotas de 72 e 96 horas. Sabemos que a linhagem JSC302 é deficiente em proteases, o que poderia explicar a presença da banda em 72 horas. O que é intrigante é a ausência desta banda em 48 horas. Já na linhagem W303-1B, os resultados são mais coerentes, porque, sendo a célula selvagem para os genes que codificam proteases, a presença da banda da nuclease somente é identificada nas frações de 24 e 48 horas, onde a célula ainda mantém uma certa integridade funcional. Comparando-se estes resultados com os obtidos em gel de agarose, podemos dizer que a atividade da enzima é alta, porque, em condições de morte celular, as frações de 72 e 96 horas, embora em quantidade suficientemente pequena para não permitir a identificação pelo Western, têm a sua atividade é detectada. Por outro lado, o ensaio pode apresentar variações decorrentes da própria preparação, pois no Western realizado para verificarmos a influência do pH do meio na expressão do gene

nuc (ensaio discutido anteriormente), a enzima pôde ser detectada nas frações de 48 horas para JSC302 e 72 horas para W303-1B. A própria amostra de *Serratia marcescens*, sabidamente grande produtora, apresenta pouca quantidade de proteína nestes géis, evidenciando problemas durante a preparação do ensaio. Porém, uma pergunta bastante interessante nos foi levantada com relação ao gel mostrado na figura 27. Neste, podemos visualizar que o nível de degradação do DNA plasmidiano na alíquota de 24 horas foi o mesmo encontrado nas alíquotas de 72 e 96 horas dos extratos de W303-1B e no sobrenadante de *S. marcescens*. Por quê, então, a morte celular só ocorre após 48 horas? A quantidade de nuclease produzida na alíquota de 24 horas deve ser menor do que a encontrada nas alíquotas posteriores, e somente oferece um resultado semelhante quando em solução tampão, cujo pH é ótimo para atividade da enzima (8.0). Não podemos esquecer que os ensaios realizados *in vitro* usam extratos de células ressuspensos em solução que apresenta todas as condições importantes para a atividade enzimática. Possivelmente, *in vivo*, a nuclease está submetida a vários outros fatores internos inerentes à própria célula, que a tornam menos ativa.

Mesmo nestas "condições ideais", pudemos verificar, através da cinética de clivagem obtida em espectrofotômetro, que a nuclease produzida nas leveduras é muito mais lenta para degradar o material genético, do que a produzida na *Serratia*, que o faz em poucos minutos (figura 28). Este método permite a visualização da atividade da nuclease sobre o DNA a partir do aumento da absorbância, ocasionado pela formação de fragmentos tri, di e mononucleotídeos (Friedhoff *et al.*, 1996). A cinética de degradação obtida no ensaio, pode ser comparada à encontrada no trabalho acima citado. Embora a nuclease não apresente preferências de clivagem entre RNA e DNA, foi encontrada uma atividade um pouco melhorada em DNAs com alto conteúdo de G+C (Meiss *et al.*, 1995). Isto poderia explicar uma atividade *in vivo* menor em *Saccharomyces*, uma vez que apresenta conteúdo maior de T+A. Outros

fatores, como as concentrações de Mg^{+2} e pH interno, associados à presença da proteína no citoplasma, ambiente oxidante que não favorece a formação das pontes dissulfeto (Ball *et al.*, 1992), podem explicar uma atividade específica menor na levedura. A quantidade de enzima produzida, certamente muito maior na bactéria, e a presença de possíveis inibidores de nucleases presentes nos extratos celulares, também devem ser levados em consideração. Muro-Pastor e colaboradores (1997), identificaram nos extratos de *Anabaena sp.*, o produto do gene *nuiA*, como inibidor da atividade da nuclease não específica NucA, que apresenta 28% de homologia com a Nuc de *Serratia* (Muro-Pastor *et al.*, 1992). A manutenção da integridade dos aminoácidos essenciais para a formação do sítio catalítico da enzima, é extremamente importante para a proteína adquirir sua conformação e atividade (Lunin *et al.*, 1997; Benedik e Strych, 1998). A certeza de que o gene encontra-se inteiro, sem mutações pontuais que possam afetar a estrutura da nuclease, somente seria obtida se todos os transformantes usados fossem sequenciados. De qualquer forma, nem sempre utilizamos os mesmos clones para a realização dos ensaios, portanto o risco é ainda maior.

Até o momento, evidenciamos a morte celular relacionada à expressão da nuclease de *Serratia marcescens*, na levedura *S. cerevisiae*. Porém, não estava muito claro, se a nuclease quando sintetizada no citoplasma, conseguiria alcançar o núcleo da levedura, por não apresentar nenhuma sequência de localização nuclear (Chelsky *et al.*, 1989; Benton *et al.*, 1989). Ahrenholtz e colaboradores (1994) conseguiram demonstrar a atividade da Nuc em citoplasma de *E. coli*, contrariando as expectativas de que as pontes dissulfeto não fossem formadas e a atividade fosse destruída. Mas, no nosso caso, além destes fatores referentes à estabilidade da proteína, conformação e atividade ótima, a nuclease precisaria ainda alcançar o núcleo para fornecer os resultados que esperávamos. Como descrito anteriormente, Barnes e Rine (1984), estudando o fluxo de proteínas para o núcleo,

demonstraram que, em *S. cerevisiae*, a nuclease *EcoRI* é capaz de se dirigir para o núcleo e atravessar sua membrana através dos poros, cujo tamanho varia entre 45-55A (Reiner, 1983; Paine *et al.*, 1975), apenas por difusão. Em princípio, este tamanho permite a passagem de proteínas de até 60kDa. Se este argumento é válido, a nuclease também poderia alcançar o núcleo, uma vez que tem 28kDa. A favor desta hipótese, se a nuclease não estivesse sendo levada ao núcleo, provavelmente, os resultados obtidos com as linhagens *rad52* não seriam tão diferentes dos demais, pois, a única diferença marcante entre estas linhagens e as demais, é a ausência de sistema de reparação de quebras cromossômicas.

Assim, e porque nossa idéia afinal, era baseada na degradação do material genético, procuramos tentar responder a esta questão de maneira mais convincente. A princípio, pensamos em realizar uma eletroforese em campo pulsado ("pulsed field"), a fim de verificarmos o estado do DNA cromossomal durante o período de expressão do gene *nuc*. Mas, como a nuclease degrada o DNA e RNA em fragmentos mínimos, a visualização no gel seria ruim e pouco comprobatória. Um ensaio, veio então, ao encontro das nossas expectativas, pois que seria capaz de demonstrar exatamente a situação do DNA cromossomal dentro do núcleo, no estado da célula. Este ensaio, "o teste do cometa", foi recentemente descrito e vem sendo extensivamente utilizado pra estudos sobre apoptose (Nelms, Promega Notes 64) e danos causados no DNA de plantas e células de sangue (Navarrete *et al.*, 1996; Koppen e Verschaeve, 1996). O ensaio é baseado no fato de que quebras nas fitas de DNA criam fragmentos que quando embebidos em gel de agarose, migram em um campo elétrico, fora da região delimitada pelo núcleo. Diferentes condições de ensaio permitem a visualização de quebras simples ou duplas do DNA (McKelvey-Martin *et al.*, 1993). As células em estudo, são fixadas em gel de agarose após a lise de suas membranas, de maneira que o núcleo permaneça intacto. Estas células são submetidas à eletroforese e no

caso do DNA cromossomal estar fragmentado, é capaz de migrar pelos poros do núcleo conforme a corrente elétrica e formar um verdadeiro rastro, semelhante à cauda de um cometa.

Contudo, o ensaio foi desenvolvido para células do sangue e não encontramos referências disponíveis na literatura para leveduras. Foi portanto, foi preciso adaptar algumas condições do teste, preparando inicialmente, esferoplastos das leveduras para, depois, lisar a membrana. Esta padronização das condições foi extremamente trabalhosa e demorada, uma vez que se usássemos a solução de lise normal do ensaio, as leveduras não eram lisadas, e se preparássemos as leveduras deixando-as como esferoplastos, a lise era total e todo o material genético ficava espalhado no gel. Uma das metodologias, contudo, apresentou um resultado o qual poderia dar a resposta que queríamos. Foram preparados esferoplastos das leveduras e estas foram diretamente submetidas à eletroforese, sem sofrer incubação com o tampão de lise. Este método tornou o ensaio bem mais rápido do que o original. O rastro do cometa, infelizmente não foi observado, mas, como pudemos verificar nas figuras 29 e 30, houve diferenças significativas entre células controle e células apresentando o plasmídeo nuc+. Foi possível visualizar claramente núcleo e citoplasma nas células controle, e uma massa fluorescente, espalhada por toda célula, nas linhagens nuc+. Nossa explicação para o fato é a de que a célula não fora rompida, mas o material genético corado, permitindo a visualização clara de núcleo e citoplasma. Outro dado, foi o tamanho das células nuc+, muito maior que as do controle, o que também é indício de estado fisiológico comprometido. Navarrete e outros (1996) também descrevem a presença de várias células intactas com o núcleo inteiro e manchas nebulosas sem qualquer definição, as quais poderiam corresponder aos núcleos lisados. A explicação dada no caso é que, quando o envelope nuclear é lisado, a cromatina que está empacotada é liberada e imediatamente se dispersa em fibras de 10 nm (Moreno *et al.*, 1978). A lise celular também é descrita como dispensável. As

células neste caso, ficam com uma nuvem ao redor decorrente do material interno que se dispersa durante a corrida. Estes dados sugerem que o nosso ensaio, embora não tenha evidenciado um rastro de degradação, é indicativo da quebra do DNA. Fica claro, porém, que o método deve ser melhor padronizado para leveduras, estabelecendo-se exatamente o tempo para a lise da membrana, e talvez, aumentando a intensidade da corrente elétrica.

Mesmo assim, este tipo de análise nos auxiliou a dar como fechada a segunda parte do nosso trabalho, tendo demonstrado de diferentes formas a expressão da nuclease na levedura, associada à morte celular, através da degradação do material genético.

6.3. TERCEIRA PARTE

Expressão da Nuclease de *S. marcescens* por *S. cerevisiae* no Ambiente - Ensaio de Microcosmos

O objetivo final do nosso trabalho era mostrar que as células que apresentavam o gene da nuclease morriam mais rapidamente do que as células controle, não apenas em condições laboratoriais, como foi feito anteriormente, mas sobretudo em condições extra-laboratoriais, de modo a viabilizar o uso deste sistema para a contenção de leveduras recombinantes no meio ambiente e particularmente em solos. Estudos prévios mostraram que quando certos OGMs são introduzidos em ambientes pobres em nutrientes, o número de células cultiváveis diminui rapidamente, mas que estes podem permanecer viáveis e promover trocas genéticas, aumentando os fatores de risco potencial (Devanas *et al.*, 1986; Tiedje *et al.*, 1984; Winstanley, *et al.*,

1991). Para verificar se a levedura que construímos era realmente eficiente fora do laboratório, era preciso preparar o ensaio de microcosmos simulando algumas características ambientais. Para tal, foram simuladas duas situações: células presentes em terra+água (ambiente muito próximo ao natural), e células presentes em terra+YPD1%. As principais características do solo, retirado do campus da Universidade, foram analisadas basicamente para fornecer uma idéia de pH, constituição e aeração. O solo, argiloso, oferecia pH ácido (pH 5.0) e boa aeração. Os ensaios foram preparados com a linhagem JSC302 com o plasmídeo controle ou o plasmídeo pUbNuc3, por ter apresentado os melhores resultados. Parâmetros, tais como, taxa de adsorção aos sólidos, influência de outros microrganismos, presença de células viáveis mas não cultiváveis, foram descartados com o uso da linhagem controle, permitindo uma análise comparativa entre as células com e sem plasmídeo. As células foram então, inoculadas e, a cada 48 horas, amostras de 1 ml foram retiradas para a contagem do número de células totais (plaqueamento em YPD2% + vários antibióticos), células com plasmídeos e estabilidade destes (plaqueamento em meio SD8%-URA).

Mais uma vez, os resultados foram muito animadoras. De início, verificou-se que as células nuc+ morrem mais rapidamente do que as controles em ensaio solo+água, mostrando que o sistema suicida funciona em condições de microcosmo. Em solo+YPD, a permanência das células foi aumentada, em virtude da presença de nutrientes no meio. Por outro lado, a detecção das células nuc+ durante um período bem próximo ao encontrado para a célula controle, pode ser explicada pelo fato de que, como em condições laboratoriais, as células perdem os plasmídeos, principalmente durante os primeiros dias de ensaio. A estabilidade dos plasmídeo em solo+YPD comparada com solo+água foi muito menor. Nesta última condição, as células encontram-se em ambiente bastante restritivo, onde a competição por nutrientes é maior, e este fato, com certeza, favorece a manutenção dos

plasmídeos. Por isso, as células JSC302/pUbNuc3 não são mais detectadas no ensaio, já nas amostras de 3 dias. A célula, buscando a sobrevivência, mantém o plasmídeo contendo as marcas de auxotrofia, que, contraditoriamente, a levará à morte. A presença de sobreviventes após uma semana de ensaio não foi detectada, como em laboratório, mas a idéia de que o gene, cuja proteína é tóxica, pode ser integrado ao cromossomo, é largamente discutida como um fator que pode melhorar consideravelmente a estabilidade, bem como diminuir a transferência horizontal (Jansson, 1995; Bej *et al.*, 1988; Contreras *et al.*, 1991). Adicionalmente, a inserção de um cassete suicida no cromossomo não oferece vantagem ou desvantagens para as células que o carregam, em condições de repressão do promotor (Recorbet *et al.*, 1993). Sistemas suicida construídos recentemente têm conseguido minimizar os efeitos das mutações através da inserção de dois cassetes de expressão (Knudsen *et al.*, 1994; Ronchel *et al.*, 1995; Munthali *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1998;).

Outros fatores, como a presença de microrganismos como bactérias e fungos podem ter interferido nos resultados, levando a uma subestimativa do número de células de interesse (Colwell *et al.*, 1985). Por outro lado, o fato do solo não ser habitat natural de leveduras como *S. cerevisiae*, as quais ocorrem em ambientes de maior concentração de carboidratos (Campbell, 1985), pode ter influenciado os resultados. A taxa de permanência de *S. cerevisiae* JSC302 no ambiente foi menor do que a encontrada para *S. cerevisiae* WHL292 e *Hansenula polymorpha* LR9-Apr4, em outros ensaios, as quais permaneceram viáveis em torno de duas semanas (Tebbe *et al.*, 1995). Deve-se destacar que todas as três linhagens são geneticamente modificadas.

7. CONCLUSÕES

- 7.1. A nuclease de *Serratia marcescens* está presente nas células de levedura *S. cerevisiae* JSC302, W303-1B, JRY481, e STX507-5D, em condições de indução do promotor;
- 7.2. A cinética de morte celular é condizente com a cinética de indução do promotor *ADH2GAPDH*;
- 7.3. Mutantes *rad52* são muito mais sensíveis à ação da enzima do que as células *RAD52* JSC302 e W303-1B;
- 7.4. A eficiência de morte entre as linhagens JSC302 e W303-1B, é maior na primeira;
- 7.5. A nuclease é capaz de degradar o material genético *in vivo* e *in vitro*;
- 7.6. A escolha do promotor *ADH2GAPDH*, apesar de ideal pelo seu mecanismo de repressão, parece não ser apropriada no caso da clonagem de genes que codificam proteínas tóxicas, por apresentar indícios de vazamento;
- 7.7. A instabilidade do plasmídeo pBS24Ub compromete o sistema construído para utilização em laboratório. Melhores resultados poderiam ser obtidos com a utilização de plasmídeos integrativos, os quais estabilizam a informação desejada.
- 7.8. O sistema, embora ainda possa ser aperfeiçoado, mostrou-se bastante efetivo no que se propôs, matando a célula através da degradação do material genético, em condições controladas.

8. PERSPECTIVAS

A importância deste projeto reside não somente no seu aspecto inovador, mas principalmente, no amplo espectro de perspectivas que se abrem a partir de sua realização. Além deste aspecto do projeto, vários outros aspectos são dignos de menção. A própria nuclease de *Serratia* é uma enzima que por si só apresenta grande interesse biotecnológico, em pesquisa básica, e terapia gênica (Benedik e Strych, 1996). A idéia da clonagem na levedura instiga o estudo de várias questões sobre estabilidade de proteínas, atividade celular, expressão de proteínas que supostamente são secretáveis, dentro da célula, estudos sobre o transporte de proteínas, etc.

A construção de um sistema suicida baseado na degradação do material genético, que possa ser usado como sistema de biossegurança para leveduras, faz deste projeto um piloto para o estabelecimento de outros sistemas em diferentes espécies, e mais, diferentes microrganismos eucariotos, de uso rotineiro para produção de proteínas heterólogas no ambiente. Pode-se extrapolar a clonagem do gene da nuclease de *Serratia*, ou mesmo a clonagem de outros genes provenientes de diferentes microrganismos. Embora ainda possam existir outras razões, a mais importante para o desenvolvimento de sistemas de contenção ainda é a prevenção.

O uso de microrganismos na alimentação (Single Cell Protein – SCP), com o objetivo de complementar dietas pobres em proteínas, começou durante a Primeira Grande Guerra (Reed, 1981; Von Loesecke, 1946) e permanece nos dias de hoje, principalmente através do uso de leveduras como ração animal. Entretanto, o emprego de SCP de leveduras na alimentação humana tem como principal obstáculo o seu alto conteúdo de ácidos nucleicos, capaz de provocar uricacidemia e gota (Kharatyan, 1978; Kinsella, 1987). O emprego do sistema suicida descrito neste trabalho, para produção de SCP de leveduras, permitiria a obtenção de massa celular já destituída de ácidos nucleicos, o que poderia representar um avanço tecnológico considerável para o emprego de SCP na alimentação humana.

O passo inicial já foi dado. Seria interessante poder explorar ao máximo estes resultados, bem como os muitos apresentados em vários trabalhos de contenção de microrganismos, terapias gênicas, fermentações industriais, etc, buscando sempre o desenvolvimento de pesquisas voltadas para o interesse comum e o bem da sociedade como um todo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHSTETTER, J. e WOLF, D.H. Hormone Processing and Membrane Bound Proteinases in Yeast. **EMBO J.** **4**: 173-177, 1985.
- AHRENHOLTZ, I., LORENZ, M.G. e WACKERNAGEL, W. A Conditional Suicide-System in *Escherichia coli* Based on the Intracellular Degradation of DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, **60**, 3746-3751, 1994.
- AKIMOTO, S., ONO, K., ONO, T. e OHNISHI, Y. Nucleotide Sequence of the F Plasmid Gene *srnB* That Promotes Degradation of Stable RNA in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. **33**, 241-245, 1986.
- ANTOSIEWICZ, J., MILLER, M.D., KRAUSE, K.L. e McCAMMON, J.A. Simulation of Eletrostatic and Hydrodynamic Properties of *Serratia* Endonuclease. **Biopolymers**. **41**, 443-450, 1997.
- ASTOLFI FILHO, S.; GALEMBECK, E.V.; FARIA, J.B. e SCHENBERG FRASCINO, A.C. Stable Yeast Transformants that Secrete Functional α -amylase Encoded by Mouse Pancreatic cDNA. **Bio/Technology** **4**, 311-316, 1986.
- AUSTIN, H.K., HARTEL, P.G. e COLEMAN, D.C. Effect of Genetically-Altered *Pseudomonas solanacearum* on Predatory Protozoa. **Soil Biology and Biochemistry** **22**, 215-217, 1990.
- AVERY, O.T., MACLEOD, C.M. e McCARTY, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation in Pneumococcal Types. **Journal of Experimental Medicine** **79**, 137-159, 1944.
- BALL, T.K., SAURUGGER, P.N. e BENEDIK, M.J. The Extracellular Nuclease Gene of *Serratia marcescens* and its Secretion from *Escherichia coli*. **Gene** **57**, 183-192, 1987.

- BALL, T.K., WASMUTH, C.R., BRAUNAGEL, S.C. e BENEDIK, M.J. Expression of *Serratia marcescens* Extracellular Proteins Requires *recA*. **Journal of Bacteriology**. **172**, 342-349, 1990.
- BALL, T.K., SUH, Y. e BENEDIK, M.J. Disulfide Bonds are Required for *Serratia marcescens* Nuclease Activity. **Nucleic Acids Research**, **20**, 4971-4974, 1992.
- BARNES, G. e RINE, J. Regulated Expression of Endonuclease *EcoRI* in *Saccharomyces cerevisiae*: Nuclear Entry and Biological Consequences. **Proceedings National Academy of Sciences**. USA, **82**, 1354-1358, 1984.
- BARR, P.J.; POWER, M.D.; LEE-NG, C.T.; GIBSON, H.L. e LUCIW, P.A. Expression of Active Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bio/Technology**, **5**, 486-489, 1987.
- BARR, P.J.; MASON, O.; WONG, P.A.; GIBSON, H.L.; KIEFER, M.C. e BRAKE, A.J. Yeast Expression : Secretion and Intracellular Systems. In: ALITALO, K.K.; HUHTALA, M.L.; KNOWLES, J. e VAHERI, A. eds. **Recombinant System in Protein Expression**. Elsevier, EUA, 37-46, 1990.
- BARR, P.J.; SABIN, E.A.; LEE NG, C.T.; LANDSBERG, K.E.; STEIMER, K.S.; BATHURST, I.C. e SHUSTER, J.R. The Ubiquitin Fusion Approach to Heterologous Gene Expression in Yeast: High -level Production of Aminoterminal Authentic Proteins. In: HATCH, R.T.; GOOCHEE, C.; MOREIRA, T. e ALROY, Y. **Progress in the Development of Expression Systems and Processes for rDNA Products**. ACS Public, Washington D.C., 1-10, 1991.

- BECH, F. W., JORGENSEN, S.T., DIDERICHSEN, B. e KARLSTROM, O. Sequence of the *relB* Transcription Unit from *Escherichia coli* and Identification of the *relB* Gene. **EMBO Journal**, **4**, 1059-1066, 1985.
- BEESE, L.S. e STEITZ, T.A. **EMBO J.**, **10**, 25-33, 1991.
- BEGGS, J.D. Multiple Copy Yeast Plasmid Vectors. In: VON WETTSTEIN, D.; FRIIS, J.; KIELLAND-BRANDT, M. e STENDERUP, A. eds. **Molecular Genetics in Yeast**, Alfred Benzon Symposium 16 - Munksgaard, Copenhagen, 383-390, 1981.
- BEIER, D.R. e YOUNG, E.T. Characterization of a Regulatory Region Upstream of the *ADR2* locus of *S. cerevisiae*. **Nature** **300**: 724 728, 1982.
- BEJ, A.K., PERLIN, M.H. e ATLAS, R.M. Model Suicide Vector for Containment of Genetically Engineered Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, **54**, 2472-2477, 1988.
- BELIAEVA, M.I., KAPRANOVA, M.N., VITOL, M.Ia., GOLUBENKI, I.A. and LESHCHINSKAIA, I.B. Nucleic acids utilized as the main source of bacterial nutrition. **Mikrobiologiya** **45**, 420-424, 1976.
- BENEDIK, M.J. e STRYCH, U. *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. **FEMS Microbiology Letters** **165**, 1-13, 1998.
- BENTON, B.M., ENG, W-K., DUNN, J.J., STUDIER, W., STERNGLANZ, R. e FISHER, P.A. Signal-Mediated Import of Bacteriophage T7 RNA Polymerase into the *Saccharomyces cerevisiae* Nucleus and Specific Transcription of Target Genes. **Molecular and Cellular Biology**, **10**, 353-360, 1989.

- BERG, P., BALTIMORE, D., BRENNER, S., ROBLIN, R.O. III e SINGER, M. F. Asilomar Conference on Recombinant DNA Molecules. **Science**, **188**, 991-994, 1975.
- BITTER, G.A. e EGAN, K.E. Expression of Heterologous Genes in *Saccharomyces cerevisiae* from Vectors Utilizing the Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene Promoter. **Gene**, **32**, 263-274, 1984.
- BITTER, G.A. e EGAN, K.E. Expression of Interferon- α from Hybrid Yeast *GPD* Promoters Containing Upstream Regulatory Sequences from *GAL1-GAL10* Intergenic Region. **Gene**, **69**, 193-207, 1988.
- BIEDERMANN, K. JEPSEN, P.K.; RIISE, E. e SVENDSEN, I. Purification and Characterization of a *Serratia marcescens* Nuclease Produced by *E. coli*. **Carlsberg Res. Commun**, **54**, 17-27, 1989.
- BIEDERMANN, K., FIEDLER, H., LARSEN, B.S., RIISE, E., EMBORG, C. e JEPSEN, P.K. Fermentation Studies of the Secretion of *Serratia marcescens* Nuclease by *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. **56**, 1833-1838, 1990.
- BOSTIAN, K.A.; LEMICE, J.M.; CANNON, L.E. e HALVORSON, H.O. Physiological Control of Repressible and Phosphatase Gene Transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, **3**, 839-853, 1983.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. **Anal. Biochem.** **72**, 248-254, 1976.
- BRAKE, A.J.; MERRYWEATHER, J.P.; COIT, D.G.; HEBERLEIN, U.A.; MASIAZ, F.R.; MULLENBACH, G.T.; URDEA, M.S.; VALENZUELA, P. e BARR, P.J. α -Factor-directed Synthesis and Secretion of Mature

- Foreign Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **81**, 4642-4646, 1984.
- BRAKE, A.J. Secretion of Heterologous Proteins Directed by the Yeast α -Factor Leader. In: BARR, P.J.; BRAKE, A. e VALENZUELA, P. eds. **Yeast Genetic Engineering**. Butterworth, Boston, p. 269-280, 1989.
- BROACH, J.R. Construction of High Copy Yeast Vectors Using 2- μ m Circle Sequences. **Meth. Enzymol.** **101**: 307 - 325, 1983.
- BROKER, M. A study on the Survival of Wild-Type, Laboratory and Recombinant Strains of the Baker Yeast *S. cerevisiae* under Sterile and Nonsterile Conditions. **Zentral Hygienics**, vol. **190**, p. 547-557, 1990.
- BRUNETTE, W.M. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.** v. **112**, p.195-203, 1981.
- BOYER, H.B. e ROLLAND-DUSSOIX, D. A Complementation Analysis of the Restriction and Modification of DNA in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. **41**, p. 459-472, 1969.
- BUCKHOLZ, R.G. e GLEESON, M.A.G. Yeast Systems for The Commercial Production of Heterologous Proteins. **Bio/Technology**, vol. **9**, p. 1067-1072, 1991.
- BURKE, W.F. e SLINKER, B.S. A Simple Qualitative Method for the Detection of Nucleases. **Analytical Biochemistry**. v. **108**, p. 320-324, 1980.

- CARTER, B.L.A.; IRANI, M.; MACKAY, V.L. SCALE, R.L.; SLEDZIEWSKI, A.V. e SMITH, R.A. Expression and Secretion of Foreign Genes in Yeast, p. 141-162. In D.M. Glover (ed.), DNA Cloning, vol. III IRL Press Oxford, United Kingdom. 1987.
- CASTANON, M.J.; SPEVAK, W.; ADOLF, G.R.; CHLEBOWICZ-SLEDZIEWSKA, E. e SLEDZIEWSKI, A. Cloning of Human Lysozyme Gene and Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. **66**, p. 223-234, 1988.
- CASTILHO-VALAVICIUS, B.A., TAKITA, M.A., THOMPSON, G.M. e PIESTUN, V.S. The Molecular Genetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Society of Genetics**, v. **44**, p. 301-309, 1992.
- CAUMONT, A.B., JAMIESON, G.A., PICHUANTES, S., NGUYEN, A.T., LITVAK, S. e HENRI-DUPONT, C. Expression of functional HIV-1 integrase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* leads to the emergence of a lethal phenotype: potential use for inhibitor screening. **Curr. Genet** **29**, 503-510, 1996.
- CEREGHINO, G.P. e SCHEFFLER, I.E. Genetic Analysis of Glucose Regulation in *Saccharomyces cerevisiae* Control of Transcription Versus mRNA Turnover. **The EMBO Journal**, **15**, p. 363-374, 1996.
- CHANG, C.N.; MATTEUCCI, M.; PERRY, L.J.; WULF, J.J.; CHEN, C.I. e HITZEMANN, R.A. *Saccharomyces cerevisiae* Secretes and Corretly Processes Human Interferon Hybrid Proteins Containg Yeast Invertase Signal Peptides. **Mol. Cel. Biol.** **6**, p. 1812-1819, 1986.
- CHELSKY,D. RALPH, R. e JONAK, G, Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. **Molecular and Cellular Biology** **9**, p. 2487-2492, 1989.

- CHEN, Y.C., SHIPLEY, G.L., BALL, T.K. e BENEDIK, M.J. Regulatory Mutants and Transcriptional Control of the *Serratia marcescens* Extracellular Nuclease gene. **Mol. Microbiol.**, **6**, p. 643-652, 1992.
- CHEN, L.Y., HO, H.C., TSAI, Y.C. and LIAO, T.H. Deoxyribonuclease of *Synecephalastrum racemosum* – Enzymatic properties and molecular structure. **Arch. Biochem. Biophys.** **303**, p. 51-56, 1993.
- CHEN, Y., SUH, Y., RIISE, E., KARTMANN, B., JIN, S. e BENEDIK, M. Inhibition of *Serratia marcescens* Nuclease Secretion by Truncated Nuclease Peptide. **Gene**. Vol. **172**, p. 9-16. 1996.
- CHERRY, J.R.; JOHNSON, T.R.; DOLLARD, C.A.; SHUSTER, J.R. e DENIS, C.L. Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylates and Inactivates the Yeast Transcriptional Activator ADR1. **Cell**, v. **56**, p. 409 - 419, 1989.
- CIRIACY, M. Genetics of Alcohol Dehydrogenase in *S. cerevisiae*. II. Two Loci Controlling Synthesis of the Glucose Repressible Alcohol Dehydrogenase II. **Mol. Gen. Genet.** **138**: 157 - 164, 1975.
- CIRIACY, M. Cis-Dominant Regulatory Mutations Affecting the Formation of Glucose Repressible Alcohol Dehydrogenase (ADHII) in *S. cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.** **154**: 213 -220, 1976.
- CIRIACY, M. Isolation and Characterization of Further Cis and Trans Acting Regulatory Elements Involved in the Synthesis of the Glucose Repressible Alcohol Dehydrogenase (ADHII) in *S. cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.** **176**: 427 - 431, 1979.
- COLWELL, R.R., BRAYTON, P.R., GRIMES, D.J., ROSZAK, D.B., HUQ, S.A. e PALMER, L.M. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and

- related pathogens in the environment: implications for the release of genetically engineered microorganisms. **Biotechnology** **3**, p. 817-820, 1985.
- CONTESTABILE, A. e STIRPE, F. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants as Agents for Suicide Transport and Immunolesioning in the Nervous System. **European Journal of Neuroscience**, v. **5**, p. 1292-1301, 1993.
- CONTRERAS, A., MOLIN, S. e RAMOS, J.L. Conditional-Suicide Containment System for Bacteria which Mineralize Aromatics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. **57**, p. 1504-1508, 1991.
- COTÉ, J. e RUIZ-CARRILLO, A. Primers for Mitochondrial DNA Replication Generated by Endonuclease G. **Science**, v. **261**, p. 765-769, 1993
- COUSENS, L.S.; SHUSTER, J.; GALLEGOS, C.; KU, L.; STEMPIEN, M.M.; URDEA, M.S.; SANCHEZ-PESCADOR, R.; TAYLOR, A. e TEKAMP-OLSON, P. High-Level Expression of Proinsulin in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, **61**, p. 265-275, 1987.
- CURTISS, R. III, INOUE, R.M., PEREIRA, D., HSU, J.C., ALEXANDER, L. e ROCK, L. Construction and Use of Safer Bacterial Host Strains for Recombinant DNA Research. p. 99-111. In: W. A. Scott, R. Werner (ed.), *Molecular Cloning of Recombinant DNA*, New York, Academic Press, 1977.
- DAVIS, A., MOORE, B.I., PARKER, D.S. e TANIUSHI, H. A Possible Precursor of Nuclease A, an Extracellular Nuclease of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. **18**, p. 6544-6553, 1977.

- DENIS, C.L.; FERGUSON, J. e YOUNG, E.T. mRNA Levels for the Fermentative Alcohol Dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* Decrease upon Growth on a Fermentable Carbon Source. **Journal of Biological Chemistry**, v. **258**, p. 1165-1171, 1983.
- DENIS, C.L., FERGUSON, J. e YOUNG, E.T. mRNA Levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a fermentable carbon source. **The Journal of Biological Chemistry** **258**, p. 1165-1171, 1983.
- DENIS, C.L. e GALLO, C. Constitutive RNA Synthesis for the Yeast Activator *ADR1* and Identification of the *ADR1-5'* Mutation: Implications in post-translational Control of *ADR1*. **Mol. Cell. Biol.**, **6**, p. 4026-4030, 1986.
- DE FLAUN, M.F. e PAUL, J.H. Detection of Exogenous Gene Sequences in Dissolved DNA from Aquatics Environments. **Microbial Ecology**, v. **18**, p. 21-28, 1989.
- DEVANAS, M.A., RAFAELI-ESHKOL, D.R. e STOTSKY, G. Survival of plasmid containing strains of *Escherichia coli* in soil: effect of plasmid size and nutrients on survival of hosts and maintenance of plasmids. **Curr. Microbiol.** **13**, p. 269-277, 1996.
- DE WILDE, M.; CABEZON, T.; HARFORD, N.; RUTGERS, J.; SIMOEN, E. e VAN WIFNENDAELE, F. Production in Yeast of Hepatitis B Surface Antigen by rDNA Technology. **Dev. Biol. Stand**, v. **59**, p.99-107, 1985.
- DINGWALL, C. e LASKEY, R.A. Protein Import into the Cell Nucleus. **Annual Review of Cellular Biology**, v. **2**, p. 367-390, 1986.
- DOBSON, M.J.; TUIITE, M.F.; MELLOR, J.; ROBERTS, N.A.; KING, R.M.; BURKE, D.C.; KINGSMAN, A.J. e KINGSMAN, S.M. Expression in

- Saccharomyces cerevisiae* of Human Interferon- α Directed by the TRP1 5' Region. **Nucl. Ac. Res.**, v. **11**, p. 2287-2303, 1983.
- DOHERTY, A.J.; WORRAL, A.F. e CONNOLLY, B.A. The Roles of Arginine 41 and Tyrosine 76 in the Coupling of DNA Recognition to Phosphodiester Bond Cleavage by DNAase I: A Study Using Site-directed Mutagenesis. **J. Mol. Biol.**, v. **251**, p. 366-377, 1995.
- DOYLE, J.D., SHORT, K.A., STOTSKY, G., KING, R.J., SEIDLER, R. e OLSEN, R.H. Ecologically Significant Effect of *Pseudomonas putida* PPO301 (pRO103), Genetically-Engineered to Degrade 2,4-dichlorophenoxy-acetate, on Microbiol Populations and Processes in Soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.**37**, p. 682-691, 1991.
- DOWLING, D.N. e O'GARA, F. Metabolites of *Pseudomonas* Involved in the Control of Plant Disease. **Trends Biotechnol.**, v. **12**, p. 1231-1237, 1994.
- DREW, H.R. e TRAVERS, A.A. DNA Structural Variations in the *E. coli* *tyrT* Promotor. **Cell**, **37**, p. 491-502, 1984.
- DUQUE, E., RAMOS-GONZALEZ, M.I., DELGADO, A., CONTRERAS, A. e MOLIN, S. Genetically Engineered *Pseudomonas* Strains for Mineralization of Aromatics: Survival, Performance, Gene Transfer, and Biological Containment. v. 46, p. 429-437. In: E. Galli, S. Silver e B. Witholt (ed.), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992
- EAVES, G.N. e JEFFRIES, C.D. Isolation and Properties of an Exocellular Nuclease of *Serratia marcescens*. **Journal Bacteriology**, **85**, p. 273-278, 1962.
- ECKSTEIN, F. **Annu. Rev. Biochem.**, v. **54**, p. 367-402, 1985.

- EDENS, L.; BOM, I.; LEDEBOER, A.M.; MAAT, J.; TOONEN, M.Y.; VISSER, C. e VERRIPS, C.T. Synthesis and Processing of the Plant Protein Thaumatin in Yeast. **Cell**, v. **37**, p. 629-633, 1984.
- EIKLID, K., OLSNES, S. e PHIL, A. Entry of Lethal Doses of Abrin, Ricin and Modeccin into the Cytosol of HeLa Cells. **Experimental Cell Research**, v. **126**, p. 321-326, 1980.
- EISEN, A.; TAYLOR, W.E.; BLUMBERG, H. e YOUNG, E.T. The Yeast Regulatory Protein *ADR1* Binds in a Zinc Dependent Manner to the Upstream Activating Sequence of *ADH2*. **Mol. Cell. Biol.**, v. **8**, p. 4552-4556, 1988.
- EISENSTEIN, B.I. Phase Variation of Type 1 Fimbriae in *Escherichia coli* is Under Transcriptional Control. **Science**, v. **214**, p. 337-338, 1981.
- EMR, S.D. Heterologous Gene Expression in Yeast. **Methods in Enzimology** **185**, p. 233, 1990.
- ENDO, Y., MITSUI, K., MOTIZUKI, M. e TSURUGI, K. The Mechanism of Action of Ricin and Related Toxic Lectins on Eucaryotic Ribosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. **262**, p. 5908-5912, 1987.
- ERHART, E. e HOLLENBERG, C.H. The Presence of a Defective **LEU2** Gene on 2 μ DNA Recombinant Plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is Responsible for Curing and High Copy Number. **J. Bacteriol.**, v. **156**, p. 625-635, 1983.
- EUROPEAN COMISSION. Directorate-General, Environment, Nuclear Safety and Civil Protection: List of SNIF's circulated under article 9 of Directive 90/220/EEC from the 21st October 1991 to the 24th October 1994. Brussels, (X1-A2.XI/559/94-Rev.1, 1994.

- FIBI, M.R., BROKER, M., SCHULZ, R., JOHANNSEN, R. e ZETTLMEISSEL. Inactivation of Recombinant Plasmid DNA from Human Erythropoietin-Producing Mouse Cell Line Grown on a Large Scale. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. **35**, p. 622-630, 1991.
- FIESCHKO, J.C.; EGAN, K.M.; RITCH, T.; KOSKI, R.A.; JONES, M. e BITTER, G.A. Controlled Expression and Purification of Human Immune Interferon from High Cell Density Fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotech. Bioeng.**, v.**29**, p. 1113-1121, 1987.
- FILIMONOVA, M.N., KRAUSE, K.L. e BENEDIK, M.J. Kinetic Studies of the *Serratia marcescens* Extracellular Nuclease Isoforms. **Biochemistry and Molecular Biology International**, vol. **33**, p. 1229-1236, 1994.
- FINLEY, D.; OZKAYNAK, E. e VARSHAVSKY, A. The Yeast Polyubiquitin Gene is Essential for Resistance to High Temperatures, Starvation and Others Stresses. **Cell**, v.**48**, p. 1035-1046, 1987.
- FINLEY, D.; ABOU-ZEID, C.; WATERS, M. e ROOK, G. The Use of Antigen Bearing of Nitrocellulose Particles Derived From Western Blot to Study Proliferative Responses to 27 Antigenic Fractions from *M. leprae* in Patients and Controls. **Immunology**, v. **67**: 75-80, 1989.
- FRANKEL, A., WELSH, P., RICHARDSON, J. e ROBERTUS, J.D. Role of Arginine 180 and Glutamic Acid 177 of Ricin Toxin A Chain in Enzymatic Inactivation of Ribosomes. **Molecular and Cellular Biology**, v. **10**, p. 6257-6263, 1990.
- FRIEDHOFF, P., GIMADUTDINOW, O. e PINGOUD, A. Identification of Catalytically Relevant Amino Acids of the *Serratia marcescens*

- Endonuclease by Alignment-guided Mutagenesis. **Nucleic Acids Research**, vol. **22**, p. 3280-3287, 1994.
- FRIEDHOFF, P., KOLMES, B., GIMADUTDINOW, O., WENDE, W., KRAUSE, K.L. e PINGOUD, A. Analysis of the Mechanism of the *Serratia* Nuclease Using Site-directed Mutagenesis. **Nucleic Acids Research**. **24**, p. 2632-2639, 1996a.
- FRIEDHOFF, P., MEISS, G., KOLMES, B., PIEPER, U., GIMADUTDINOW, O., URBANKE, C. e PINGOUD, A. Kinetic Analysis of the Cleavage of Natural and Synthetic Substrates by the *Serratia* Nuclease. **European Journal of Biochemistry**. **241**, p. 572-580, 1996b.
- FRIEDHOFF, P., MATZEN, S.E., MEISS, G. e PINGOUD, A. A Quantitative Microtiter Plate Nuclease Assay Based on Ethidium/DNA Fluorescence. **Analytical Biochemistry**. Vol. **240**, p. 283-288, 1996.
- FUJIMURA, H., SAKUMA, Y. e AMANN, E. Survival of Genetically-Engineered and Wild-Type Strains of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Under Simulated Environmental Conditions: a Contribution on Risk Assessment. **Journal of Applied Bacteriology**, v. **77**, p. 689-693, 1994.
- GERDES, K., LARSEN, J.E.L. e MOLIN, S. Stable Inheritance of Plasmid R1 Requires Two Different Loci. **Journal of Bacteriology**, v. **161**, p. 292-298, 1985.
- GERDES, K., BECH, F.W., JORGENSEN, S.T., LOBNER-OLESEN, A., RASMUSSEN, P.B., *et al.* Mechanism of Postsegregational Killing by the *hok* Gene Product of the *parB* System of Plasmid R1 and its Homology with the *relF* Gene Product of the *E. coli relB* Operon. **EMBO Journal**, v. **5**, p. 2023-2029, 1986a.

- GERDES, K., RASMUSSEN, P.B. e MOLIN, S. Unique Type of Plasmid Maintenance: Post-Segregational Killing of Plasmid-Free Cells. **Proceedings National Academy of Sciences**. USA, v. **83**, p.3116-3120, 1986b.
- GERDES, K., HELIN, K., CHRISTENSEN, O.W. e LOBNER-OLESEN, A. Translational Control and Differential RNA Decay are Key Elements Regulating Postsegregational Expression of the Killer Protein Encoded by the *parB* Locus of Plasmid R1. **Journal of Molecular Biology**, v. **203**, p. 119-129, 1988.
- GERDES, K., THISTED, T., e MARTINUSSEN, J., Mechanism of Post-segregational Killing by the *hok/sok* System of Plasmid R1: The *sok* Anti-sense RNA Regulates the Formation of a *hok* mRNA Species Correlated with Killing of Plasmid-free Cells. **Molecular Microbiology**, v. **4**, p. 1807-1818, 1990a.
- GERDES, K. , POULSEN, L.K., THISTED, T., NIELSEN, A.K., MARTINUSSEN, J. e ANDREASEN, P.H. The *hok* Killer Gene Family in Gram-negative Bacteria. **New Biology**, v. **2**, p. 946-956, 1990b.
- GERLITZ, M., HRABAK, O. e SCHWAB, H. Partitioning of Broad Host-Range Plasmid RP4 is a Complex System Involving Site-Specific Recombination. **Journal of Bacteriology**, v. **172**, p. 6194-6203, 1990.
- GERLT, J.A. In Nucleases (Lynn, s.m., Lloyd, R.S., e Roberts, R. J., eds.) 2nd ed., p. 1-34, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1993.

- GIETZ, D.; St. JEAN, A.; WOODS, R. e SCHIESTL, R. H. Improved Method for High Efficiency Transformation of Intact Yeast Cells. **Nucl. Acid. Res.** v. 20, p. 1425, 1992.
- GOLDSTEIN, J., POLLITT, N.S. e INOUE, M. Major Cold Shock Protein of *Escherichia coli*. **Proceedings National Academy of Sciences**. USA, v. 87, p. 283-287, 1990.
- GOULD, J.H., HARTLEY, M.R., WELSH, P.C., HOSHIZAKI, D.K., FRANKEL, A., ROBERTS, L.M. e LORD, J.M. Alteration of an Amino Acid Residue Outside the Active Site of the Ricin A Chain Reduces its Toxicity Towards Yeast Ribosomes. **Molecular and General Genetics**, v.230, p. 81-90, 1991.
- GRIFFITH, F., The Significance of Pneumococcal Types, **Journal of Hygiene**, v. 27, p. 113-159, 1928.
- GUARENTE, L.; YOCUM, R.R. e GIFFORD, P. A GAL10:CYC1 Hybrid Yeast Promoter Identifies the GAL4 regulatory Region as an Upstream Site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , v. 79, p. 7410-7414, 1982.
- HEINEMANN, J.A.e SPRAGUE, G.F.Jr. Bacterial Conjugative Plasmids Mobilize DNA Transfer Between Bacteria and Yeast. **Nature**, v. 340, p.205-209, 1989.
- HEINEMANN, J.A. e SPRAGUE, G.F. Jr., Transmission of Plasmid DNA to Yeast by Conjugation with Bacteria, **Methods in Enzymology**, v. 194, p. 187-195, 1991.
- HERRERA, J.E. e CHAIRES, J.B. Characterization of Preferred deoxyribonuclease I Cleavage Sites. **J. Mol. Biol.** , v. 236, p. 405-411, 1994.

- HINES, D.H., SAURUGGER, P.N., IHLER, G.M. e BENEDIK, M.J. Genetic Analysis of Extracellular Proteins of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.170, p. 4141-4146, 1988.
- HINNEN, A.; HICKS, J.B. e FINK, G. Transformation of Yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 75, p. 1929-1933, 1978.
- HINNEN, A.; MEYHACK, B. e HEIM, J. Heterologous Gene Expression in Yeast. In BARR, P.J.; BRAKE, A. e VALENZUELA, P. eds. Yeast Genetic Engineering, Butterworth, Boston, p. 193-213, 1989.
- HITZEMAN, R.A.; HAGIE, F.E.; LEVINE, H.L.; GOEDDEL, D.V.; AMERER, G. e HALL, B.D. Expression of a Human Gene for Interferon in Yeast. **Nature**, v.293, p. 717-722, 1981.
- HOPWOOD, D.A.; CHATER, K.F. e BIBB, M.J. Genetics of Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model Streptomyete. **Bio/Technology**, v. 28, p. 65-102, 1995.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. e WHITE, T.J. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. California, 1990.
- INOUE, M., NAKAZAWA, S.A. e NAKAZAWA, T. Molecular Cloning of the *xyIS* Gene of the TOL Plasmid: Evidence for Positive Regulation of the *xyIDEGF* Operon by *xyIS*. **Journal of Bacteriology**, v. 148, p. 413-418, 1983.
- IRANI, M.; TAYLOR, W.E. e YOUNG, E.T. Transcription of The *ADHII* Gene in *S. cerevisiae* is Limited by Positive Factors that Bind Competitively to

- its Intact Promoter Region on Multicopy Plasmids. **Mol. Cell. Biol.**, v. 7, p. 1233-1241, 1987.
- ITO, H.; MURATA, K. e KIMURA, A. Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations or Thiol Compounds. **Agric. Biol. Chem.**, v. 48, p. 341-347, 1984.
- JANSSON, J.K. Tracking Genetically Engineered Microorganisms in Nature. **Current Opinion in Biotechnology**, v.6, p.275-283, 1995.
- JELTSCH, A.; ALVES, J.; WOLFES, H.; MAASS, G. e PINGOUD, A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p. 8499-8503, 1993.
- JEPSEN, P.K., RIISE, E., BIEDERMANN, K., KRISTENSEN, P.C.R. e EMBORG, C. Two-Level Factorial Screening for Influence of Temperature, pH, and Aeration on Production of *Serratia marcescens* Nuclease. **Applied and Environmental Microbiology**. v.53, p. 2593-2596, 1987.
- JIN, S. Gene Regulation and Secretion of *Serratia marcescens* Extracellular Nuclease. PhD. Dissertation, University of Houston, TX, 1994.
- JIN, S., CHEN, Y., CRISTIE, G. E. e BENEDIK, M. Regulation of the *Serratia marcescens* Extracellular Nuclease: Positive Control by Homology of P2 Ogr Encoded by Cryptic Prophage. **Journal of Molecular Biotechnology**. Vol. 256, p. 264-278, 1996.
- JONES, P.G., VAN BOGELEN, R.A. e NEIDHARDT, F.C. Induction of Proteins in Response to Low Temperature in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 2092-2095, 1987.

- JULIUS, D.; BRAKE, A.; BLAIR, L.; KUNBAWA, R. e THORNER, J. Isolation of the Putative Gene for the Lysine-arginine Cleaving Endopeptidase Required for Processing of Yeast Prepro- α -factor. **Cell**, v. 37, p. 1075-1089, 1983b.
- KALDERON, D., RICHARDSON, W.D., MARKHAN, A.F. e SMITH, A.E. Sequence Requirements for Nuclear Location of Simian Virus 40 large-T antigen. **Nature**, v. 311, p. 499-509, 1984a.
- KALDERON, D., ROBERTS, B.L., RICHARDSON, W.D. e SMITH, A.E. A Short Amino Acid Sequence Able to Specify Nuclear Localization. **Cell**, v. 39, p. 499-509, 1984b.
- KHARATYAN, S.G., Microbes as food for humans. **Ann. Rev. Microbiol.** 32: 301-327, 1978.
- KINSELLA, J.E. Functional proteins from yeast nucleoprotein for food uses: methods for isolation. In KNORR, D. (ed.) Food biotechnology. Marcel Dekker Inc., New York, 1987. Chap. 14, p. 363-391.
- KLEMM, P., JENSEN, L.B. e MOLIN, S., A Stochastic Killing System for Biological Containment of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 481-486, 1995.
- KNUDSEN, S.M. e KARLSTROM, O.H. Development of Efficient Suicide Mechanisms for Biological Containment of Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 85-92, 1991.
- KNUDSEN, S.M., SAADBYE, P., HANSEN, L.H., COLLIER, A., JACOBSEN, B.L., SCHLUNDT, J. e KARLSTROM, O.H. Development and Testing of Improved Suicide Functions for Biological Containment of Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 985-991, 1995.

- KOLMES, B., FRANKE, I., FRIEDHOFF, P. e PINGOUD, A. Analysis of the Reaction Mechanism of the Non-specific Endonuclease of *Serratia marcescens* Using an Artificial Minimal Substrate. **FEBS Letters**. Vol. **397**, p. 343-346, 1996.
- KOPPEN, G. e VERSHAEEVE, L. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. **Mutation Research** **360**, p. 193-200, 1996.
- KURINENKO, B.M., BELIAEVA, M.I., CHEREPNEVA, I.E. e KUPRIANOVA-ASHINA, F.G. Permeability of dextran-bound nuclease through the vascular barrier and tumor cell membrane. **Vopr. Onkol.** **23**, p. 86-90, 1977a.
- KURINENKO, B.M., BELIAEVA, M.I., CHEREPNEVA, I.E. e VIESTURE, Z.A. Antitumor action of *Serratia marcescens* nuclease covalently bound to soluble dextrans. **Vopr. Onkol.** **23**, p. 94-98, 1977b.
- KURJAN, J. e HERKOWITZ, I. Structure of a Yeast Pheromone gene (MF $\square$): a Putative Precursor Contains four Tandem Copies of Mature $\square$ -factor. **Cell**, v. **30**, p. 933-943, 1982.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of The Head of The Bacteriophage T4. **Nature**, v. **227**, p. 680-695, 1970.
- LIEBER, M.R. The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eucaryotic DNA replication, recombination and repair. **BioEssays** **19**, p. 233-240, 1997.

- LORENZ, M.G. Gene Transfer via Transformation in Soil/Sediments Environments, p. 95-101. In: M.J. Gauthier (ed.), *Gene Transfer and Environment*. Springer-Verlag, KG, Berlin, 1992.
- LORENZ, M.G. e WACKERNAGEL, W. Bacterial Gene Transfer in the Environment. p. 43-64. In: W. Woehrmann e J. Tomiuk (ed.). *Transgenic Organisms. Risk Assessment of Deliberate Releases*. Birkhauser, Basel, 1993.
- LORENZ, M.G. e WACKERNAGEL, W. Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment. **Microbiological Reviews**, v. **58**, p. 563-602, 1994.
- LUNIN, V.Y.; LEVDIKOV, V.M.; SHLYAPNIKOV, S.V.; BLAGOVA, E.V.; LUNIN, V.V. WILSON, K.S. e MIKHAILOV, A.M. Three-dimensional Structure of *Serratia marcescens* Nuclease at 1.7Å Resolution and Mechanism of its Action. **FEBS Lett.**, **412**, p. 217-222, 1997.
- LUTSTORF, U. e MEGNET, R. Multiple Forms of Alcohol Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **126**, p. 933-944, 1968.
- McKELVEY-MARTIN, V.J., GREEN, M.H.L., SCHMEZER, P., POOL-ZOBEL, B.L., DE MEO, M.P. e COLLINS, A. The single cells gel eletroforesis assay (comet assay): A European Review. **Mutation Research**, **288** p. 47-63.
- MAEDA, M. e TAGA, N. Occurrence and Distribution of Deoxyribonucleic Acid-Hydrolyzing Bacteria in Sea Water. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** **14**, p. 157-169, 1974.

- MARIANI, C., DE BEUCKELEER, M. TRUETTNER, J., LEEMANS, J. e GOLDBERG, R.B. Induction of Male Sterility in Plants by a Chimaeric Ribonuclease Gene. **Nature**, v. **347**, p. 737-741, 1990.
- MARSTON, F.A. The Purification of Eucaryotic Polypeptides Expressed in *Escherichia coli*, p. 59-82. In D.M. Glover (ed.), DNA Cloning, vol. III IRL Press, Oxford, United Kingdom. 1987.
- MATIN, A. Molecular Analysis of the Starvation Stress in *Escherichia coli*. **Microbial Ecology**, v. **74**, p. 185-196, 1990.
- MATIN, A., AUGER, E.A., BLUM, P. e SCHULTZ, J.E. Genetic Basis of Starvation Survival in Nondifferentiating Bacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, v. **43**, p. 293-316, 1989.
- MEISS, G., FRIEDHOFF, P., HAHN, M., GIMADUTDINOW, O. e PINGOUD, A. Sequence Preferences in Cleavage of dsDNA and ssDNA by Extracellular *Serratia marcescens* Endonuclease. **Biochemistry**. **34**, p. 11979-11988, 1995.
- MERCK BIOCHEMIC. Service, **Molecular Biol.** 1 p.95 , 1995.
- MERMOD, N., LEHRBACH, P.R., REINEKE, W. e TIMMIS, K.N. Transcription of the TOL Plasmid Toluene Catabolic Pathway Operon of *Pseudomonas putida* is Determined by a Pair of Coordinately and Positively Regulated Overlapping Promoters. **EMBO Journal**, v. **3**, p. 2461-2466, 1984.
- MILLER, R.V. Bacterial gene Swapping in Nature. **Scientific American**, janeiro p. 67-71, 1998.

- MILLER, M.D., BENEDIK, M.J., SULLIVAN, M.C., SHIPLEY, N.S. e KRAUSE, K.L. Crystallization and Preliminary Crystallographic Analysis of a Novel Nuclease from *Serratia marcescens*. **Journal of Molecular Biology**. Vol. **222**, p. 27-30, 1991.
- MILLER, M.D. e KRAUSE, K.L. **Protein Sci.**, v. **5**, p. 24-33, 1996.
- MIYANOHARA, A.; TOH-E, A.; NOZAKI, C.; FUKUSABURO, H.; OHTOMO, N. e MATSUBARA, K. Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Yeast. **Proc, Natl. Acad. Sci.**, v. **80**, p. 51-55, 1983.
- MOLIN, S., KLEMM, P., POULSEN, L.K., BIEHL, H. GERDES, K. e ANDERSSON, P. Conditional Suicide System for Containment of Bacteria and Plasmids. **Bio/Technology**, v. **5**, p. 1315-1318, 1987.
- MOLIN, S., KLEMM, P., POULSEN, L.K., BIEHL, H., GERDES, K. e ANDERSSON, P. Biological Containment of Bacteria and Plasmids to be Released to the Environment. p. 127-136. In: W. Klingmuller (ed.). Risk Assessment for Deliberate Releases. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1988.
- MOLIN, S., BOE, L., JENSEN, L.B., KRISTENSEN, C.S. e GIVSKOV, M. Suicidal Genetics Elements and Their Use in the Biological Containment of Bacteria. **Annual Review of Microbiology**. v. **47**, p.139-166, 1993.
- MOLINA, L., RAMOS, C., RONCHEL, M.C., MOLIN, S. e RAMOS, J.L. Construction of an Efficient Biologically Contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays. **Applied and Environmental Microbiology** **64**, p. 2072-78, 1998.

- MORENO, M.L., SOGO, J.M. e DE LA TORRE, C. Higher plant nucleosomes. A micromethod for isolating and dispersing chromatin fibres. **New Phytol**, **81**, p. 681-683, 1978.
- MORTIMER, R.K., CONTOUPOULOU, R. e SCHILD, D. Mitotic chromosome loss in radiation-sensitive strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**, p. 5778-5782, 1981.
- MUNTHALI, M.T.; TIMMIS, K.N. e DIAZ, E. Restricting the Dispersal of Recombinant DNA: Design of a Contained Biological Catalyst. **Bio/technology**, **v.14**, p. 189-191, 1996.
- MURO-PASTOR, FLORES, E.; A.M., HERRERO, A. e WOLK, C.P. Transfer of a Genetic Marker From a Megaplasmid of a Different *Anabaena* Strain. **J. Bacteriol.**, **v. 176**, p. 1093-1098, 1994.
- MURO-PASTOR, A.M., HERRERO, A. e FLORES, E. The *nucA* Gene from *Anabaena* sp. Encoding an Inhibitor of the NucA Sugar-non-specific Nuclease. **Journal of Molecular Biotechnology**. Vol. **268**, p. 589-598, 1997.
- NAVARRETE, M.H., CARRERA, P., MIGUEL, M. e de la TORRE, C. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutation Research** **389**, p. 271-277, 1997.
- NELMS, B.E. Measuring Apoptosis in Individual Cells with the comet assay. **Promega Notes** **64**.
- NESTLE, M. e ROBERTS, W.K. An Extracellular Nuclease from *Serratia marcescens*. II Specificity of the Enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, **v.244**, p. 5219-5215, 1969.

- NEWPORT, J. e FORBES, D.J. The Nucleus: Structure, Function and Dynamics. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. **56**, p. 535-565, 1987.
- NYSTROM, T., ALBERTSON, N.H., FLARDH, K. e KJELLEBERG, S. Physiological and Molecular Adaptation to Starvation and Recovery from Starvation by the Marine *Vibrio*. **Microbial Ecology**, v. **74**, p. 129-140, 1990.
- NOVITZKY, J. A. Degradation of Dead Microbial Biomass in a Marine Sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. **52**, p. 504-509, 1986.
- OLSNES, S. e PIHL, A. Toxic Lectins and Related Proteins, p. 51-105. In: Cohen, P. e van Heyningen, S. (ed.), The Molecular Action of Toxins and Viruses. Elsevier/ Biomedical Press, Amsterdam, 1982.
- OLSNES, S. e SANDVIG, K. How Protein Toxins Enter and Kill Cells, p. 39-74. In: Frankel, A.E. (ed.), Immunotoxins. Kluwer Academic Pub., Norwell, Mass, 1988.
- ONO, K., AKIMOTO, S. e OHNISHI, Y. Nucleotide Sequence of the *pnd* Gene in Plasmid R483 and Role of the *pnd* Gene Product in Plasmolysis. **Microbiology and Immunology**, v. **31**, p. 1071-1083, 1987.
- OZKAYANAK, E. ; FINLEY, D. e VARSHAVSKY, A. The Yeast Ubiquitin Gene: Head-to-Tail Repeats Encoding a Polyubiquitin Precursor Protein. **Nature**, v. **312**, p. 663-666, 1984.
- PAINE, P.L., MOORE, L.C., e HOROVITZ, S.B. **Nature** **254**, p. 109-114, 1983.

- PANFILOVA, Z.I. and SALGANIK, R.I. Isolation of *Serratia marcescens* mutants superproducers of endonuclease by exposure to nitrosomethylurea in a synchronized culture. **Mikrobiologiya** **52**, p. 974-978, 1983.
- PANGALOS, M.N., FRANCIS, P.T., PEARSON, R.C.A., MIDDLEMISS, D. N. e BOWEN, D.M. Destruction of a Sub-Population of Cortical Neurones by Suicide Transport of Volkensin, a Lectin from *Adenia volkensis*. **Journal of Neuroscience Methods**, v. **40**, p. 17-29, 1991.
- PAUL, J.H., JEFFREY, W.H. e De FLAUN, M.F. Dynamics of Extracellular DNA in the Marine Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. **53**, p. 170-179, 1987.
- PAUL, J.H., JEFFREY, W.H., DAVID, A.W. De FLAUN, M.F. e CAZARES, L.H. Turnover of Extracellular DNA in Eutrophic and Oligotrophic Freshwater Environments of Southwest Florida. **Applied and Environmental Microbiology**, v. **55**, p. 1823-1828, 1989.
- PAQUIN, C.E. e WILLIAMSON, V.M. Ty Insertions at two Loci Account for Most of the Spontaneous Antimycin A Resistance Mutations During Growth at 15°C of *S. cerevisiae* Strain Lacking Alcohol-Dehydrogenase I. **Mol. Cell. Biol.**, v. **6**, p. 70-79, 1986.
- PEDERSEN, J., ANDERSEN, J., ROEPSTORFF, P., FILIMONOVA, M. e BIERDEMANN, K. Characterization of Natural and Recombinant Nuclease Isoforms by Electrospray Mass Spectrometry.
- PEDERSEN, J., FILIMONOVA, M., ROEPSTORFF, P. e BIERDEMANN, K. Characterization of *Serratia marcescens* Nuclease Isoforms by Plasma Desorption Mass Spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**. Vol. **1202**, p. 13-21, 1993.

- PINHO, J.R.R.; BARR, P.J.; VICENTE, E.J. e SCHENBERG, A.C. Expression of The 18Kda Protein of *Mycobacterium leprae* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, vol. 16, p. 1241-1246, 1994.
- PINHO, J.R.R.; CARDI, B.A.; ANDRADE, H.F.; BARR, P.J.; BATHURST, I.C.; VICENTE, E.J. e SCHENBERG, A.C.G. Immunogenic Properties of the *M. leprae* Recombinant 18kDa Antigen Purified from *Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of Delayed-Type Hipersensibility after Gamma-Irradiation. **International Journal of Leprosy**, vol. 63, p. 381-390, 1995.
- PINHO, J.R.R. Expressão do Antígeno de 18 KDa de *Mycobacterium leprae* na Levedura *S. cerevisiae* e Estudo das Propriedades Imunogênicas do Antígeno Recombinante. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1995.
- PHILLIPS, S.J., DALGARN, D.S. e YOUNG, S.K. Recombinant DNA in Wastewater: pBR322 Degradation Kinetics. **Journal of Water Pollution Control Fed.**, v. 61, p. 1588-1595, 1989.
- POSPELOV, V.A., SVETLIKOVA, S.B. e VOROBÉV, V.I. Structure of Chromatin Subunits: an endonuclease *Serratia marcescens* study. **Nucleic Acids Research**. v.4, p.3267-3279, 1977.
- POULSEN, L.K., LARSEN, N.W., MOLIN, S. e ANDERSSON, P. A Family of Genes Encoding a Cell-Killing Function May be Conserved in All Gram-Negative Bacteria. **Molecular Microbiology**, v.3, p. 1463-1472, 1989.
- POULSEN, L.K., REFN, A., MOLIN, S. e ANDERSSON, P. Topographic Analysis of the Toxic Gef Protein from *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 1627-1637, 1991.

- POULSEN, L.K., LARSEN, N.W., MOLIN, S. e ANDERSSON, P. Analysis of an *Escherichia coli* Mutant Strain Resistant to the Cell-Killing Function Encoded by the *gef* Gene Family. **Molecular Microbiology**, v.6, p. 895-905, 1992.
- PUYET, A.; GREENBERG, B. e LACKS, S.A. **J. Mol. Biol.** , v.213, p. 727-738, 1990.
- RAMOS, J.L., STOLZ, M.A., REINEKE, W. e TIMMIS, K.N. Altered Effector Specificities in Regulators of Gene Expression: TOL Plasmid *xy/S* Mutants and Their Use to Engineer Expansion of the Range of Aromatics Degraded by Bacteria. **Proceedings National Academy of Sciences, USA**, v. 83, p. 8467-8471, 1986.
- RAMOS, J.L. e TIMMIS, K.N. Experimental Evolution of Catabolic Pathways of Bacteria. **Microbiological Sciences**, v. 4, p. 228-237, 1987.
- RAMOS, J.L., MICHÁN, C., ROJO, F., DWYER, D. e TIMMIS, K.N. Signal-Regulator Interactions. Genetic Analysis of the Effector Binding Site of *xy/S*, the Benzoate-Activated Positive Regulator of *Pseudomonas* TOL Plasmid Meta-Cleavage Pathway Operon. **Journal of Molecular Biology**, v. 211, p. 373-382, 1990.
- RAMOS, J.L., ANDERSSON, P., JENSEN, L.B., RAMOS, C., RONCHEL, M.C., DIAZ, E., TIMMIS, K.N. e MOLIN, S. Suicide Microbes on the Loose. Biological containment could decrease the uncertainties surrounding the deliberate release of recombinant microorganisms. **Biotechnology** 13, p. 35-37, 1995.
- RATSKIN, B. e CARBON, J. Functional Expression of Cloned Yeast DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 74, p. 487-491, 1977.

- RECORBET, G., ROBERT, C., GIVAUDAN, A., KUDLA, B., NORMAND, P. e FAURIE, G. Conditional Suicide system of *Escherichia coli* released into soil that uses the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. **Applied and Environmental Microbiology** **59**, p. 1361-1366, 1993.
- REED, G. Use of microbial cultures: yeast products. **Food Technol.**, **35**, 89-94, 1981.
- REINER, P. **Journal of Biological Chemistry** **258**, p. 11427-11429, 1983.
- ROBERTS, R.C., HARRISON, M.B., FRANCIS, S.M.N. e WILEY, R.G. Differential Effects of Suicide Transport Lesions of the Striatonigral or Striatopallidal Pathways on Subsets of Striatal Neurons. **Experimental Neurology**, v. **124**, p. 242-252, 1993.
- ROMANOS, M.A., SCORER, C.A. e CLARE, J.J. Foreign Gene Expression in Yeast: a review. **Yeast**, v. **8**, p. 423-488, 1992.
- ROMANOWSKI, G., LORENZ, M.G., SAYLER, G. e WACKERNAGEL, W. Persistence of Free Plasmid DNA in Soil Monitored by Various Methods, Including a Transformation Assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. **58**, p. 3012-3019, 1992.
- ROMANOWSKI, G., LORENZ, M.G. e WACKERNAGEL, W. Use of Polymerase Chain Reaction and Electroporation of *Escherichia coli* to Monitor the Persistence of Extracellular Plasmid DNA Introduced into Natural Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. **59**, p. 3438-3446, 1993.
- RONCHEL, M.C.; RAMOS, C.; JENSEN, L.B.; MOLIN, S. e RAMOS, J.L. Construction and Behavior of Biologically Contained Bacteria for

- Environmental Applications in Bioremediation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. **61**, p. 2990-2994, 1995.
- ROSE, M.; GRISAFI, P. e BOTSTEIN, D. Structure and Function of the Yeast **URA3** Gene: Expression in *E. coli*. **Gene**, v. **29**, p. 113-124, 1984.
- ROSE, M.D.; WINSTON, F. e HIETER, P. Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- ROSENBERG, S.; COIT, D. e TEKAMP-OLSON, P. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Derived Expression Cassettes for Constitutive Synthesis of Heterologous Proteins. **Meth. Enzymol.**, vol. **185**, p. 341-351, 1990.
- ROSZAK, D.B. e COLWELL, R.R. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. **Microbiological Reviews**, v. **51**, p. 365-379, 1987.
- RUIZ-CARRILLO, A. e CÔTÉ, J. **J. Cell. Biochem., Suppl.** **17C**, **175**, 1993.
- RUSSEL, D.W.; SMITH, M.; WILLIANSOM, V.M. e YOUNG, E.T. Nucleotide Sequence of the Yeast Alcohol Dehydrogenase II Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. **258**, p. 2674-2682, 1983b.
- SABIN, E.A.; LEE-NG, C.T.; SHUSTER, J.R. e BARR, P.J. High-level Expression and in vivo Processing of Chimeric Ubiquitin Fusion Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bio/Technology**, v. **7**, p. 705-709, 1989.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. e MANIATIS, T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- SAKIKAWA, T., AKIMOTO, S. e OHNISHI, Y. The *pnd* Gene in *E. coli* Plasmid R16: Nucleotide Sequence and Gene Expression Leading to Cell Mg^{+2} Release and Stable RNA Degradation. **Biochimica and Biophysica Acta**. v. **1007**, p. 158-166, 1989.
- SAXENA, S.K., RYBAK, S.M., WINKLER, G., MEADE, H.M., McGRAY, P., YOULE, R.J. e ACKERMAN, E.J. Comparison of RNAses and Toxins Upon Injection into *Xenopus* Oocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. **266**, p. 21208-21214, 1991.
- SCHIMPFESSEL, L. Presence et Regulation de la Synthèse de Deux Alcool Deshydrogenases Chez la Levure. **Biochem. Biophys. Acta**, **151**, p. 317-329, 1968.
- SCHENBERG, A.C.G. e BONATELLI JR., R. Plasmídeos de Eucariontes. In: COSTA, S.O.P. ed. Genética Molecular e de Microrganismos, Editora Manole, São Paulo, p. 494-509, 1987.
- SCHUMANN, G., CANNON, K., Ma, W.P., CROUCH, R.J. e BOEKE, J.D. Antiretroviral effect of a gag-Rnase HI fusion gene. **Gene Therapy** **4**, 593-599, 1997.
- SEHNKE, P.C., PEDROSA, L., PAUL, A-L., FRANKEL, A.E. e FERL, R.J. Expression of Active, Processed Ricin in Transgenic Tobacco. **The Journal of Biological Chemistry**, v. **269**, p. 22473-22476, 1994.
- SHORTLE, D. A Genetic System for Analysis of Staphylococcal Nuclease. **Gene**, v. **22**, p. 181-189, 1983.
- SHUSTER, J.R. Regulated Gene Expression of Heterologous Proteins in Yeast. In: STEWART, G.G.; RUSSEL, I.; KLEIN, R.D.; HIEBSCH, R.R.

- eds. Biological Research of Industrial Yeasts II CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. p. 19-25, 1987.
- SHUSTER, J.R. Regulated Transcriptional Systems for the Production of Proteins in Yeast: Regulation by Carbon Source. In: BARR, P.J.; BRAKE, A. e VALENZUELA, P. Yeast Genetic Engineering. Butterworth, Boston, p. 83-108, 1989.
- SILVER, P., KEEGAN, L. e PTASHNE, M. Amino Terminus of the Yeast GAL4 Gene Product is Sufficient for Nuclear Localization. **Proceedings National Academy of Sciences. USA**, v. **81**, p. 5951-5955, 1984.
- SILVER, P.A. e HALL, M.N. Transport of Proteins into the Nucleus, p. 747-769. In: R.C. Das e P.W. Robbins (ed.), Protein Transfer and Organelle Biogenesis, Academic Press, Inc., New York, 1988.
- SMITH, R.A.; DUNCAN, M.J. e MOIR, D.T. Heterologous Protein Secretion from Yeast. **Science**, v. **229**, p. 1219-1224, 1985.
- SPECTOR, M.P. Gene Expression in Response to Multiple Nutrient-Starvation Conditions in *Salmonella typhimurium*. **Microbial Ecology**, v. **74**, p. 175-184, 1990.
- STEWART, G.J. The Mechanism of Natural Transformation, p. 139-164. In: S.B. Levy e R.V. Miller (ed.), Gene Transfer in the Environment. McGraw-Hill Book Co., New York, 1989.
- STIRPE, F. e HUGHES, R.C. Specificity of Ribosome Inactivated by Proteins with RNA N-Glycosidase Activity. **Biochemistry**, v. **262**, p. 1001-1002, 1989.

- STIRPE, F., BARBIERI, L., BATELLI, M.G., SORIA, M. e LAPPI, D.A. Ribosome-Inactivating Proteins From Plants: Present Status and Future Prospects. **Bio/Technology**, v. 10, p. 405-412, 1992.
- STOZKY, G. Gene Transfer Among Bacteria in Soil, p. 165-222. In: S.B. Levy and R.V. Miller (ed.), Gene Transfer in the Environment. McGraw-Hill Book Co., New York, 1989.
- STUDIER, F.W. Analysis of Bacteriophage T4 Early RNAs and Proteins on Slab Gels. **J. Mol. Biol.**, v. 79, p. 237-248, 1973.
- SUCK, D., LAHM, A. e OEFNER, C. **Nature**, v.332, p. 465-468, 1988.
- SUH, Y.; ALPAUGH, M., KRAUSE, K.L. e BENEDIK, M. Differential Secretion of Isoforms of *Serratia marcescens* Extracellular Nuclease. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 61, p. 4083-4088, 1995.
- SUH, Y.; JIN, S.; BALL, T.K. e BENEDIK, M. Differential Secretion of Isoforms of *Serratia marcescens* Extracellular Nuclease. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 4083-4088, 1996.
- SUH, Y., e BENEDIK, M. Secretion of Nuclease Across the Outer Membrane of *Serratia marcescens* and Its Energy Requirements. **Journal of Bacteriology**. Vol. 179, p. 677-683, 1997.
- SUSSMAN, R. e JACOB, F. Sur un Système de Répression Thermosensible Chez le Bactériophage (d'*Escherichia coli*. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 254, p. 1517, 1962.
- TAGUSHI, A.K.W. e YOUNG, E.T. The Identification and Characterization of **ADR6**, a Gene Required for Sporulation and for Expression of the

- Alcohol-dehydrogenase II Isozyme for *S. cerevisiae*. **Genetics**, v. **116**, p. 523-530, 1987a.
- TAGUSHI, A.K.W. e YOUNG, E.T. The Cloning and Mapping of **ADR6**, a Gene Required for Sporulation and for Expression of the Alcohol-dehydrogenase II Isozyme for *S. cerevisiae*. **Genetics**, v. **116**, p. 531-540, 1987b.
- TEBBE, C.C., WENDEROTH, D.F., VAHJEN, W., LUBKE, K. e MUNCH, J.C. Direct Detection of Recombinant Gene Expression by Two Genetically Engineered Yeasts in Soil on the Transcriptional and Translational Levels. **Applied and Environmental Microbiology**, v.**61**, p. 4296-4303, 1995.
- THORNER, J. Pheromonal Regulation of Development in *Saccharomyces cerevisiae*, p. 280-297. In *the Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Life Cycle and Inheritance*, J. Strathern, E. Jones, J. Broach, eds. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY. 1981.
- TIEDJE, J.M., COLWELL, R.R., GROSSMAN, Y.L., HODSON, R.E., LENSKI, R.E., MACK, R.N. e REGAL, P.J. The Planned Introduction of Genetically Engineered Microorganisms: Ecological Considerations and Recommendations. **Ecology**, New York, v. **70**, p. 298-315, 1989.
- TIMMIS, K. e WINKLER, U. Isolation of Covalently Closed Circular Deoxyribonucleic Acid from Bacteria Which Produce Extracellular Nuclease. **Journal of Bacteriology**. v. **113**, p.508-509, 1973.
- TOWBIN, H.; STOEHLIN, T. e BORDON, J. Electrophoretic Transfer of Protein From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedures

and Some Applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. **76**, p. 4350-4354, 1979.

TSCHUMPER, G. e CARBON, J. Sequence of a Yeast DNA Fragment Containing a Chromosomal replicator and the *TRP1* Gene. **Gene**, v. **10**, p. 157-166, 1980.

TUITE, M.F.; DOBSON, M.J.; ROBERTS, N.A.; KING, R.M.; BURK, D.C.; KINGSMAN, S.M. e KINGSMAN, A.J. Regulated High Efficiency Expression of Human Interferon- α in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, vol. **1**, p. 603-606, 1982.

TURK, V., REHNSTAM, A.S., LUNDBERG, E. e HAGSTROM, A. Release of Bacterial DNA by Marine Nanoflagellates, an Intermediate Step in Phosphorus Regeneration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. **58**, p. 3744-3750, 1992.

VALENZUELA, P.; MEDINA, A.; RUTTER, W.J.; AMMERER, G.; e HALL, B.D. Synthesis and Assembly of Hepatitis B Virus Surface Antigen Particles in Yeast. **Nature**, v. **2** 347-350, 1982.

VALENZUELA, P. ; COIT, D. e KUO, C.H. Synthesis and Assembly in Yeast of Hepatitis B Surface Antigen Particles Containing the Polyalbumin Receptor. **Bio/Technology**, v. **3**, p. 317-322, 1985a.

VALENZUELA, P. Synthesis and Secretion of Pharmaceutical Products by Yeast. **Biotech**, v. **1**, Gustav Fischer, Stuttgart, New York, p. 11-19, 1987.

VARSHAVSKY, A.; BACHMAIR, A.; FINLEY, D.; GONDA, D. e WUNNING, I. Targeting of Proteins for Degradation. In: BARR, P.J.; BRAKE, A. e VALENZUELA, P. eds. *Yeast Genetic Engineering*. Butterworth, Boston, p. 109-143, 1989.

- VINCENT, R.D.; HOFMANN, T.J. e ZASSENHAUS, H.P. Sequence and Expression of *NUC1*, the Gene Encoding the Mitochondrial Nuclease in *S. cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. **16**, p. 3297-3312, 1988.
- VON LOESECKE, H.W. Controversial aspects: yeast in human nutrition. **J. Am. Diet. Assoc.**, **22**, 485-493, 1946.
- YOUNG, E.T. e PILGRIM, D.B. Isolation and DNA Sequence of **ADH3**, a Nuclear Gene Encoding the Mitochondrial enzyme of Alcohol-dehydrogenase in *S. cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** , v. **5**, p. 3024-3034, 1985.
- YUSUPOVA, D.V., PORFIRÉVA, O.V., SOKOLOVA, R.B. e PETUKHOVA, E.V. The effect of SOS Response Inductors on the Kinetics and Rate of Synthesis of Extracellular Enzymes by *Serratia marcescens*. **Applied Biochemistry and Microbiology**. Vol. **31**, p. 271-276, 1995.
- WAGENBACH, M.; O'ROURKE, K.; VITEZ, L.; WIECZOREK, A.; HOFFMAN, S.; DURFEE, S.; TEDESCO, J. e STETLER, G. Synthesis of Wild Type and Mutant Hemoglobins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bio/Technology**, vol. **9**, p. 57-61, 1991.
- WANG, Z., CRAWFORD, D., PROMETTO III, A.L. e RAFFI, F. Survival and Effects of Wild-Type, Mutant, and Recombinant *Streptomyces* in a Soil Ecosystem. **Canadian Journal of Microbiology**, v. **35**, p. 535-543, 1989.
- WESTON, S.A.; LAHM, A. e SUCK, D. **J. Mol. Biol.** , v. **226**, p. 1237-1256, 1992.

- WILLIAMSON, D.H. The Yeast *ARS* Element, Six Years on: a Progress Report. *Yeast*, v. 1, p. 1-14, 1985.
- WILLIMSKY, G., BANG, H., FISCHER, G. e MARAHIEL, M.A. Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* Inducible Cold Shock Gene Affecting Cell Viability at Low Temperatures. **Journal of Bacteriology**, v. **174**, p. 6326-6335, 1992.
- WINKLER, U. Mutants of *Serratia marcescens* Defective or Superactive in the Release of a Nuclease. In Wittman H.G. and Schuster, H. eds. **Mol. Gen. Springer**, Berlin, p. 187-201, 1968.
- WINSTANLEY, C., MORGAN, G.A.W., PICKUP, R.W. e SAUNDERS, J.R. Use of a *xylE* marker gene to monitor survival of recombinant *Pseudomonas putida* populations in lake water by culture on selective media. **Appl. Environ. Microbiol.** **57**, p. 1905-1913.
- WINKLER, U. e TIMMIS, K. Pleiotropic Mutations in *Serratia marcescens* which Increase the Synthesis of Certain Exocellular Proteins and The Rate of Spontaneous Prophage Excision. **Mol. Gen. Genet.** , v.**124**, p. 197-206, 1973.
- ZEGGERS, I.; MAES, D.; DAOTHI, M.H.; POORTMANS, F.; PALMER, R. e WYNS, L. **Protein Sci.**, v. **3**, p. 2322-2339, 1994.
- ZHU, X.; WARD, C. e WEISSBACH, A. Control of *Herpes simplex* Virus Thimidine Kinase Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* by Yeast Promoter Sequence. **Mol. Gen. Genet.**, vol. **194**, p. 31-41, 1984.