Keina Poliana Pivarro Dalmolin

Clonagem de um alelo do gene *SPT15* em *Saccharomyces cerevisiae* para aumento da produção de etanol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador (a):
Prof[a] Dra. Elisabete José Vicente

São Paulo
2011

RESUMO

Dalmolin KPP. Clonagem de um alelo do gene *SPT15* em *Saccharomyces cerevisiae* para aumento da produção de etanol [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Em 2006, Alper e colaboradores trabalharam com a maquinaria de transcrição global da linhagem haplóide de levedura *S. cerevisiae* BY4741 e demonstraram que uma linhagem recombinante portadora de cópias adicionais de um alelo codificador do fator de transcrição *SPT15* mutagenizado em três diferentes posições ($Phe^{177}Ser$, serina da posição 177 substituída por fenilalanina; similarmente, $Tyr^{195}His$, e $Lys^{218}Arg$), denominado alelo *spt15-300*, presentes em plasmídeo de múltiplas cópias, passa a utilizar mais rapidamente a glicose, e apresenta aumento do rendimento de produção de etanol em 15%. Considerando-se que, o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de etanol combustível do mundo, o melhoramento genético de linhagens *S. cerevisiae* visando o aumento de capacidade de produção de etanol é extremamente relevante. Neste trabalho, foi realizada a clonagem de uma cópia do alelo *spt15-300*, aqui chamado *spt15**. Para tanto, inicialmente o DNA genômico da linhagem *S. cerevisiae* S288C foi extraído, purificado e utilizado como molde para amplificação por SOEing-PCR. O alelo triplo mutado *spt15** foi clonado inicialmente no plasmídeo comercial pGEMT-Easy e, em seguida, introduzido no plasmídeo epissomal pMA91, onde passou a ser expresso sob a regulação do promotor e terminador de transcrição da fosfoglicerato quinase (PGK) de *S. cerevisiae* (plasmídeo pMA91*spt15**). Após várias etapas de construções moleculares, foi obtido o fragmento de DNA δpPGK*spt15**tPGKδ, para ser empregado na transformação genética, por δ-integração, de linhagens *S. cerevisiae* de laboratório. Os transformantes da linhagem *S. cerevisiae* YPH252 foram selecionados por complementação gênica do fenótipo Leu+. Verificou-se que, em relação à linhagem hospedeira YPH252, os clones recombinantes YHP252/pMA91*spt15** e YHP252/δpPGK*spt*15*tPGKδ consomem de maneira mais eficiente a glicose e aumentam o rendimento de produção de etanol. Ainda, o seqüenciamento do alelo *SPT15* da levedura industrial PE-2, obtido por amplificação por PCR, revelou que este apresenta 100% de identidade com o alelo presente nas linhagens BY4741 e S288C. Isto permite que se criem ótimas perspectivas para um trabalho futuro de inserção de cópias do alelo *spt15** no genoma das linhagens *S. cerevisiae* industriais, por *δ*-integração.

Palavras-chave: Fator de transcrição global de *S. cerevisiae*. Produção de etanol. Gene *SPT15*. *δ*-integração.

ABSTRACT

Dalmolin KPP. Cloning of an *SPT15* allele gene in *Saccharomyces cerevisiae* for the increasing of ethanol production. [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

In 2006 Alper and his colleagues worked with the global transcription machinery of the yeast haploid strain *S. cerevisiae* BY4741 and proved that a recombinant strain carrying additional copies of a transcription factor SPT15-encoding allele mutagenized in three different positions ($Phe^{177}Ser$, serine in the position 177 replaced by phenylalanine; similarly, $Tyr^{195}His$ and $Lys^{218}Arg$), called *spt15-300* allele, present on the multicopy plasmid, uses glucose more speedily and renders the ethanol production income 15% larger. Considering that Brazil is one of the world's greatest producers and exporters of ethanol fuel, the genetic improvement of the *S. cerevisiae* strains aiming at increasing the production capacity of ethanol is extremely important. In the present work, it has been performed the cloning of a copy of the *spt15-300* allele, here called *spt15**. In order to do that, the genomic DNA of the *S. cerevisiae* S288C strain was extracted, purified and used as a mold for the amplification through SOEing PCR. The *spt15** triple-mutated allele was initially cloned in the commercial plasmid pGEMT-Easy and next introduced in the episomal plasmid pMA91, where it began to be expressed under the regulation of the transcription promoter and terminator of *S. cerevisiae* (plasmid pMA91*spt15**) phosphoglycerate kinase (PGK). After many phases of molecular constructions the DNA δpPGK*spt15**tPGKδ fragment was obtained to be employed in the genetic transformation of laboratory *S. cerevisiae* strains using δ-integration. The *S. cerevisiae* strain transformants were selected through genetic complementation of the phenotype Leu^{+}. It could be observed that, in relation to the host strain YPH252, the recombinant clones YHP252/pMA91*spt15** and YHP252/δpPGK*spt*15*tPGKδ consume glucose more speedily and renders the ethanol production larger. Furthermore, the allele *SPT15* sequencing of the industrial yeast PE-2, obtained through PCR amplification, revealed that the latter presents an identity rate of 100% with the allele present in the strains BY4741 and S288C. This allows the creation of optimum perspectives for a future work concerning the insertion of copies of the *spt15** allele in the genome of the industrial *S. cerevisiae* strains using δ-integration.

Key words: *S. cerevisiae* global transcription factor. Ethanol production. *SPT15* gene. δ-integration.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etanol no Brasil

Atualmente, a bioenergia ainda não é uma alternativa capaz de solucionar totalmente o problema energético, mas já oferece o potencial de substituir parcialmente os combustíveis fósseis nos meios de transporte. O termo bioenergia não inclui a biomassa tradicional, isto é, aquela derivada de madeira/lenha coletada, para uso doméstico, nem a biomassa proveniente de desmatamento. Na área de bioenergia destaca-se o etanol para uso em veículos.

O Brasil é o país do mundo que reúne o maior quantitativo de vantagens comparativas para liderar a agricultura para a bioenergia. A primeira vantagem comparativa que se destaca é a perspectiva de incorporação de áreas à agricultura de energia, sem competição com a agricultura de alimentos. O segundo aspecto a considerar é a possibilidade de múltiplos cultivos dentro do ano calendário. Por situar-se, predominantemente, na faixa tropical e subtropical do planeta, o Brasil recebe intensa radiação solar, ao longo do ano. A energia solar é a base da produção da bioenergia e a densidade desta, por unidade de área, depende, diretamente, da quantidade de radiação solar incidente. Em decorrência de sua extensão e localização geográfica, o Brasil apresenta diversidade de clima, exuberância de biodiversidade e detém um quarto das reservas superficiais e sub-superficiais de água doce. Finalmente, o Brasil é reconhecido por haver assumido a liderança na geração e implantação de tecnologia de agricultura tropical, associada à uma pujante agroindústria, em que um dos paradigmas é justamente a agroindústria de etanol, reconhecida como a mais eficiente do mundo, em termos de tecnologia de processo e de gestão, sendo atualmente um dos maiores industrializadores e exportadores de álcool do mundo. Na safra de 2009, a produção foi de aproximadamente 19 bilhões de litros de etanol, sendo o segundo maior produtor mundial perdendo apenas para os Estados Unidos. Estes atributos foram conquistados na década de 70, pela intervenção do poder público a partir da criação do Próalcool em 1975, quando o mercado nacional passou a utilizar o álcool em veículos automotivos.

O Proálcool foi um programa bem-sucedido de substituição em larga escala dos derivados do petróleo. Foi desenvolvido para evitar o aumento das dependências externas de divisas quando dos choques de preço do petróleo. O Programa Nacional do Álcool ou Proálcool foi criado em 14 de novembro de 1975 pelo decreto nº 76.593, com

o objetivo de estimular a produção do álcool, visando o atendimento das necessidades do mercado interno e externo e da política de combustíveis automotivos.

Atualmente, a maioria do etanol produzido é usado como biocombustível, representando mais de 40% do total de gasolina consumida no país. (Farrell et al., 2006; Hill et al., 2006; Goldemberg, 2007; Basso et al., 2008).

O uso do etanol como fonte de energia pode ser considerado como neutro do ponto de vista do balanço de carbono, pois a geração de gás carbônico, em qualquer etapa do ciclo de produção, seja através da queima, da fermentação e da combustão nos veículos automotores, é absorvida pela lavoura de cana-de-açúcar durante o seu crescimento na safra seguinte. Assim, a produção industrial de álcool combustível a partir da biomassa se destaca como uma excelente estratégia tanto do ponto de vista econômico quanto energético e ambiental. A descoberta de fontes alternativas de energia tem despertado o interesse de cientistas, governos e da população em geral, em virtude tanto da já prevista escassez de petróleo nas próximas décadas, como também pelo aumento da poluição ambiental ocasionada pelo uso de combustíveis fósseis. (Farrell et al., 2006; Hill et al., 2006; Goldemberg, 2007).

1.2 Levedura

As leveduras fazem parte de um grupo de microrganismos eucariontes unicelulares amplamente distribuídas na natureza. Elas têm sido utilizadas pelo homem há milhares de anos, em processos de fermentação alcoólica e preparo de pães, causando um grande impacto na produção de alimentos e influenciando no desenvolvimento socioeconômico da humanidade. Embora as leveduras sempre tenham tido importantes papéis nesses processos, o conhecimento da participação de organismos vivos na fermentação somente foi demonstrado em 1876, por Louis Pasteur. Posteriormente, Hansen isolou leveduras de processos de fermentação e propagou culturas puras. Esse fato propiciou grande desenvolvimento dos processos fermentativos e, também, inúmeros trabalhos visando à obtenção de novas linhagens de levedura que foram adequadas para cada processo (Hammond, 1993; Voorst et al., 2006).

Por serem organismos unicelulares, as leveduras apresentam as mesmas facilidades de manipulação e crescimento que as bactérias; porém, com uma série de vantagens adicionais, no que se refere à produção de proteínas heterólogas de origem eucarionte, como: 1) ambiente intracelular favorável à correta formação das proteínas de eucariotos; 2) mecanismos de transcrição e processamento pós-transcricional que são

semelhantes àqueles observados em células de eucariontes superiores; 3) tradução e capacidade de processar modificações pós-traducionais para produção de proteínas heterólogas, como: glicosilação, acilação e fosforilação (Miyamoto et al., 1985; Kukuruzinska et al., 1987; Hammond et al., 1993; Kurtzman, 1994; Mellor et al, 1998; Walker, 1998) que contribuem para a manutenção da integridade estrutural, solubilidade, atividade biológica e localização celular das proteínas. Além disso, as leveduras possuem capacidade de secreção eficiente, o que facilita a separação dos produtos recombinantes a partir do meio de cultura.

Dentre as várias leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* é a mais estudada e empregada em processos industriais, como, produção de alimentos, pães, extrato de levedura, suplementos alimentares para ração animal, aroma e sabor de alimentos; bebidas (cerveja, vinho, cachaça, bebidas destiladas em geral); produção de álcool combustível, etc. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, tanto a levedura *S. cerevisiae* como outras leveduras ganharam ainda mais importância biotecnológica devido aos seus potenciais de produção de várias proteínas heterólogas (Walker, 1998). Ainda, *S. cerevisiae* é reconhecida pelo FDA americano ("Food and Drug Administration Department USA") como um organismo seguro, "GRAS" ("Generally Recognized As Safe"), para ser empregado como suplemento alimentar ou alimento para humanos e animais, não oferecendo riscos de contaminação por substâncias tóxicas ou alergênicas normalmente presentes em bactérias (Romanos et al., 1992).

Inúmeros estudos foram realizados e hoje *S. cerevisiae* é o eucarioto que tem a genética e fisiologia melhor estudadas, tendo sido concluído, em abril de 1996, o seqüenciamento completo do seu genoma que contém 12 milhões de bases, distribuídas em 16 cromossomos lineares de tamanho variando entre 250 e 2.000 Kb. O mapa físico das seqüências do DNA e das seqüências das proteínas foi depositado em bancos de dados públicos (Goffeau et al., 1996, 1997).

Atualmente, é de grande importância o conhecimento da seqüência completa do genoma de *S. cerevisiae,* fato este que permitiu abrir a perspectiva da exploração da genética genômica dessa levedura. Esse tipo de abordagem permitiu a constatação e comprovação de que, na linhagem selvagem S288C de *S. cerevisiae,* os retrotransposons da família Ty1 são os mais abundantes (Goffeau et al., 1996), e tal fato vai de encontro com o conhecimento estabelecido de que também Ty1 são os retrotransposons mais comuns presentes nas várias linhagens de *S. cerevisiae* de coleções de cultura de laboratório. Embora haja relatos de que algumas linhagens *S.*

cerevisiae selvagens tenham poucas ou nenhuma cópia de elementos Ty1 e tenham cerca de 10 a 15 cópias de elementos Ty2, esse fato merece ser mais bem estudado, pois o número de cópias de elemento Ty1 das linhagens de laboratório havia sido inicialmente, subestimado, já que se pensava que havia apenas de 30 a 35 cópias por genoma (Boeker e Sandmeyer, 1991). Hoje, após os conhecimentos derivados da análise genômica, sabe-se que os elementos Ty1 estão representados no genoma de *S. cerevisiae* em um número muito superior de cópias. Quando foi obtido o conhecimento da seqüência completa do material genético de *S. cerevisiae,* verificou-se que, no genoma haplóide da linhagem S288C, os elementos Ty1 estão presentes em 217 cópias, das quais 32 são seqüências completas (Goffeau et al., 1996; Kim et al., 1998; Plant et al., 2000; Legras e Karst, 2003).

A partir da primeira publicação mostrando a expressão de um gene heterólogo em *S. cerevisiae*, esse microrganismo vem sendo largamente empregado como sistema hospedeiro (Romanos et al., 1992). A extensão e diversidade de produtos expressos nesse microrganismo são significativas, variando desde simples enzimas a hormônios, fatores de crescimento, proteínas sanguíneas ou estruturas complexas como anticorpos. Nas indústrias que empregam fermentação, tais como cervejeira, de produção de bebidas destiladas, etanol combustível ou panificação, os esforços têm sido realizados no sentido de introduzir genes heterólogos codificadores de proteínas com atividades enzimáticas que possibilitem o melhoramento da eficiência e/ou capacidade do processo.

1.3 Transformação genética de *Saccharomyces cerevisiae*

O termo transformação genética tem sido usado para descrever a entrada de fragmentos de DNA no interior de células procarióticas e eucarióticas, conseqüentemente, acarretando mudanças em seus fenótipos (Gietz e Woods, 2001). O sucesso da primeira transformação genética de *S. cerevisiae*, reportada a mais de 30 anos (Beggs, 1978; Hinnen et al., 1978), permitiu que se abrissem caminhos para a inserção de genes exógenos. Desde então, diversos métodos de transformação genética de leveduras foram descritos: esferoplastos (Burgers e Percival, 1987); células intactas utilizando sais de lítio, primeiramente foi estabelecido por Ito e colaboradores em 1983 e, subseqüentemente foi melhorado por vários autores (Gietz et al., 1995); utilizando grânulos de vidro (Costanza e Fox, 1989); eletroporação (Becker e Guarente, 1991).

Na tentativa de entender o processo, alguns estudos sugerem que o DNA pode se ligar à superfície da célula de levedura (Gietz et al., 1995), e que fatores que facilitam a ligação do DNA à superfície da célula aumentam a eficiência da transformação (Zheng et al., 2005). Entretanto, a ligação e a adsorção forte do DNA à superfície da célula resultariam em uma redução da eficiência da transformação (Gietz et al., 1995). A permeabilidade crescente da parede da levedura ao DNA também aumentaria a eficiência da transformação (Meilhoc et al., 1990).

Para a transformação genética de *S. cerevisiae* podemos encontrar plasmídeos com características variadas, que podem ser classificados da seguinte forma: YIp, YEp, YRp (Botstein e Davis, 1982; Ausubel et al., 1992; Griffith et al., 1993):

- Plasmideos integrativos ("Yeast Integrative plasmids" – YIp): estes plasmídeos não possuem origem de replicação de levedura e, portanto, não se replicam autonomamente dentro da célula. São mantidos na levedura, somente após a integração em seu cromossomo, o que ocorre em uma única ou poucas cópias por célula, que se mantém na descendência da célula originalmente transformada. A eficiência de transformação destes plasmídeos é muito baixa, resultando em 1 a 10 transformantes/µg de DNA plasmidial. A freqüência de perda destes plasmídeos pela célula da levedura transformada é da ordem de 0,1% por geração, sendo considerado um plasmídeo muito estável (Rose e Broach, 1991; Ausubel et al., 1992).

A integração de um plasmídeo integrativo no cromossomo da levedura pode ocorrer das seguintes maneiras:

1) integração por adição: quando há um único evento de recombinação ou "crossing-over" e o plasmídeo se integra no cromossomo, ficando flanqueado por repetições diretas da região homóloga. Quando é utilizada uma grande quantidade de DNA na transformação, podem ocorrer inserções múltiplas em tandem, devido, provavelmente, a repetições dos eventos de recombinação (Romanos et al., 1992).

2) integração por substituição: quando acontecem eventos de recombinação, que levam a uma substituição de uma seqüência cromossomal pela sua correspondente seqüência homóloga presente no plasmídeo, sem haver integração do plasmídeo inteiro. Este fenômeno é interpretado como sendo resultante de um duplo "crossing-over" ou de conversão gênica (Orr-weaver et al., 1983 e Hou et al., 2009).

Para transformar a levedura, muitas vezes é utilizado um plasmídeo integrativo, previamente linearizado dentro da região que apresenta homologia ao *locus* cromossômico da levedura, onde se deseja fazer a integração. Foi verificado que as

extremidades geradas pelo corte da dupla fita do plasmídeo são altamente recombinogênicas, aumentando assim a eficiência de transformação deste plasmídeo de 10 a 1000 vezes, em comparação à do plasmídeo circular intacto. Esta estratégia também é útil quando se deseja integrar um plasmídeo complexo, que possui vários genes de levedura, preferencialmente num único sítio específico do genoma (Orr-weaver et al., 1983).

- Plasmídeos epissômicos ("Yeast Epissomal plasmids" – YEp): estes plasmídeos contêm a origem de replicação do plasmídeo 2µm natural de levedura *S. cerevisiae*. Transformam esta levedura com alta eficiência (10^4 a 10^5 transformantes/µg de DNA plasmidial), mantendo-se em, aproximadamente, 30 cópias por célula. Porém, os transformantes obtidos com estes plasmídeos são menos estáveis que aqueles obtidos com plasmídeos integrativos, ocorrendo perda mitótica da ordem de 1% por geração em meio não seletivo (Rose e Broach, 1991; Ausubel et al., 1992).

Quando o gene defectivo para a biossíntese de leucina (d-*LEU2*) é usado como marcador de seleção dos transformantes obtidos com plasmídeos epissômicos, estes permanecem na levedura em um alto número de cópias por célula (100 a 200 cópias), de forma a compensar, presumivelmente, a baixa expressão do gene d-*LEU2*.

- Plasmídeos replicativos ("Yeast Replicative plasmids" - YRp): estes plasmídeos replicam-se autonomamente na célula de levedura, graças a presença de fragmentos de DNA cromossomais denominados ARS (seqüências de replicação autônoma), que funcionam como origem de replicação. A eficiência de transformação destes plasmídeos é da ordem de 10^3 a 10^4 transformantes/µg de DNA plasmidial e estão presentes de 1 a 20 cópias por célula. Os transformantes de levedura obtidos com estes plasmídeos são extremamente instáveis, ao longo das divisões mitóticas e meióticas, devido a sua ineficiência de transmissão as células filhas. Estes transformantes, quando cultivados em meio completo, apresentam uma perda de plasmídeo maior que 1% por geração e, mesmo em meio mínimo, condição onde lhe é imposta elevada pressão seletiva, o plasmídeo é perdido em alta freqüência (Botstein e Davis, 1982; Ausubel et al., 1992; Romanos et al., 1992; Miller e Kowalski, 1993).

Para a inserção de genes heterólogos na célula da *S. cerevisiae* foram desenvolvidos diferentes vetores de transformação genética. Estes vetores são chamados de bifuncionais, pois contém uma origem de replicação para *E. coli* e outra para *S. cerevisiae*; marcador de seleção para bactérias, como genes que conferem resistência a antibióticos; e marcador de seleção para levedura como: gene *LEU2*,

URA3, *TRP1* e *HIS3*, que promovem a complementação de uma mutação auxotrófica presente na linhagem de *S. cerevisiae* hospedeira, permitindo a seleção (por complementação gênica) das células de levedura transformadas em meio carente do aminoácido ou da base nitrogenada em questão. Também é possível selecionar transformantes de leveduras que tenham recebido vetores de transformação contendo genes que conferem resistência a antibióticos de 4º geração como higromicina ou geneticina (G418) (Romanos et al., 1992; Hadfield et al., 1993; Kim et al., 2001; Sambrook e Russel, 2001). Em nosso laboratório, foi desenvolvido um vetor que permite a seleção dos clones transformantes de linhagens selvagens *S. cerevisiae* pela aquisição da resistência a canavanina (Camargo 1994 e Camargo 2000).

Por outro lado, a co-transformação permite a introdução de informações genéticas na célula de levedura hospedeira, empregando-se um vetor sem marca de seleção. Por essa estratégia, a levedura é transformada, simultaneamente, com dois ou mais plasmídeos, um deles levando um marcador de seleção e o outro carregando o gene de interesse (Prado e Aguilera, 1994). Assim, os co-transformantes, células portadoras do gene de interesse (transgênicas) sem qualquer marcador de seleção positiva podem ser selecionados. As seqüências de DNA, a serem introduzidas na célula hospedeira, podem ser oligonucleotídeos (Yamamoto et al., 1992), plasmídeos lineares, circulares e fragmentos de DNA obtidos por PCR (Duno et al., 1999; Rubió 2001; Guerra et al., 2006); podendo ser empregadas moléculas diferentes em uma mesma co-transformação, que podem permanecer na célula, replicando-se de maneira autônoma, integrando-se ao genoma, ou recombinando-se *in vivo* entre elas ou com o plasmídeo de seleção (Prado e Aguilera, 1994). Dada a versatilidade da metodologia, a co-transformação tem sido amplamente utilizada na levedura *S. cerevisiae* para a substituição de um gene pelo seu alelo mutado (Camargo 1994 e Camargo 2000)

1.4 Transformação de *S. cerevisiae*

Durante a transformação de células de levedura, pode acontecer do plasmídeo se integrar em regiões homólogas do DNA cromossomal. Este fenômeno sempre ocorre quando são utilizados plasmídeos integrativos, mas também pode acontecer, embora em baixa freqüência, quando se empregam plasmídeos de replicação autônoma (YRp) ou epissomais (YEp) (Rothstein, 1991).

Em 1989, Lopes et al. verificaram que o plasmídeo pMIRY2, que contém um fragmento de 4,5 Kb da seqüência do rDNA de *S. cerevisiae*, quando linearizado com as

enzimas de restrição *Sma*I ou *Hpa*I, dentro da seqüência não transcrita *NTS2* do rDNA, é capaz de transformar geneticamente *S. cerevisiae,* integrando-se em aproximadamente 140 cópias por célula haplóide. Em condições ótimas de cultivo, a expressão da proteína 3-fosfoglicerato quinase, resultante da clonagem do gene PGK nas células de *S. cerevisiae* transformadas, foi de 50% do total das proteínas solúveis. Em trabalhos posteriores, esta mesma equipe também demonstrou que a integração das cópias múltiplas acontece por amplificação de um pequeno número de cópias inicialmente integradas no *locus* do rDNA, quando é aplicada uma forte pressão de seleção, criada pela baixa expressão do gene d-*LEU2* ou dos alelos defectivos de *TRP1* ou *URA3.* (Lopes et al., 1991).

Fujii e colaboradores em 1990, com o objetivo de transformar uma linhagem de levedura industrial e obter múltiplas cópias integradas do gene da α-aceltolactato descarboxilase (*aldc)* bacteriano, para o seu melhoramento na produção de cerveja, construiram o plasmídeo pIARL28 que contém o fragmento *Eco*RI-*Eco*RI de 3Kb do rDNA. Neste caso, para a seleção dos transformantes, não foi utilizada a complementação pelo gene d-*LEU2*, mas sim a seleção direta por resistência à geneticina (G418). Após a transformação da levedura, foram obtidos clones com 27 cópias do plasmídeo completo inseridas no genoma, que se apresentavam altamente instáveis; e, clones com 10 ou 12 cópias do plasmídeo, que tinham perdido as seqüência plasmidiais sem interesse (gene de resistência ao $G418^R$ e *lacZ*) e eram mais estáveis.

1.5 Transformação de *S. cerevisiae* por δ – integração

Outra maneira para obter transformantes portadores de múltiplas cópias de genes integrados em nível cromossômico consiste na utilização de vetores capazes de realizar transposição, nos quais o gene de interesse está flanqueado por elementos transponíveis de *S. cerevisiae* (Ty). Estes vetores permitem que a informação genética desejada se integre aleatoriamente, de 30 a 40 vezes no genoma de cada célula, amplificando assim, a informação gênica que se deseja expressar (Boeke et al., 1985; Boeke et al., 1988; Garfinkel, 2005).

Os retrotransposons de *S. cerevisiae* têm sido estudados há mais de 20 anos. O primeiro retroelemento descrito foi o Ty1, que foi descoberto quando se começou a estudar as bases moleculares de uma mutação sofrida no gene *SUP4* desta levedura. Esse elemento foi identificado como sendo uma seqüência repetida de localização variável no cromossomo (Cameron et al., 1979). Em *S. cerevisiae* podem ser

encontradas pelo menos cinco diferentes tipos de famílias de retrotransposons, as quais têm sido bem estudadas comparativamente às suas seqüências: Ty1- Ty5. As famílias mais estudadas são Ty1 e Ty2, que compartilham de muitas características (Voytas, 1996; Plant et al., 2000).

O conhecimento da seqüência completa do material genético de *S. cerevisiae* possibilitou a constatação de que, no genoma haplóide da linhagem S288C, os elementos Ty1 estão presentes em 217 cópias, das quais 32 são completas; e, que as cópias de Ty2 estão presentes em 34 sítios, das quais 13 são elementos completos (Goffeau et al., 1996; Goffeau et al., 1997; Kim et al., 1998; Plant et al., 2000). Estes transposons são ladeados por longas seqüências terminais ("long terminal repeats" - LTR), que no caso de Ty1 e Ty2, são denominados elementos δ.

Os elementos δ (LTR de Ty1, que também são conservados em Ty2) são os LTR mais abundantes no genoma das linhagens da levedura *S. cerevisiae* de coleções de cultura. Estes elementos já foram usados como alvo de inserção de informações genéticas clonadas em linhagens *S. cerevisiae* haplóides de coleções de cultura (Garfinkel, 2005; Guerra et al, 2006); e de linhagens selvagens industriais (Guerra et al, 2006).

Recentemente, nosso grupo de pesquisas demonstrou que a δ - integração também pode ser empregada, com sucesso, para a transformação genética de linhagens *S. cerevisiae* selvagens industriais. O vetor que promove a δ - integração, pGEM-TEasyδ, não contém qualquer marcador de seleção positiva, por isto é realizada uma co-transformação juntamente com o plasmídio pAJ50 (2µm, *LEU2*, $G418^R$), que permite a seleção de transformantes de linhagens de coleção de culturas por complementação gênica e, de linhagens industriais, pelo marcador de resistência a geneticina (Guerra et al. 2006).

1.6 Fatores de transcrição de *Saccharomyces cerevisiae*

Transcrição é a síntese de moléculas de RNA, usando a molécula de DNA como molde. A síntese ocorre pela união entre si dos nucleotídeos A, U, C e G, que se alinham seguindo a ordem marcada pelos nucleotídeos complementares do DNA e usando a energia da hidrólise do ATP (Eisenmann et al., 1992).

Enquanto a RNA polimerase bacteriana precisa apenas de uma proteína acessória, um fator sigma, para reconhecer um promotor e iniciar especificamente a

transcrição, todas as RNA polimerases eucarióticas precisam de várias proteínas conhecidas como fatores de transcrição.

Genes de organismos eucariotos são transcritos por três enzimas diferentes: RNA polimerase I, para genes que codificam RNAs ribossômicos (rRNAs); RNA polimerase III, para genes codificadores de RNA transportadores (tRNAs) e outros pequenos RNAs (sRNAs); e, RNA polimerase II, para genes que codificam RNA mensageiros (mRNAs), nos quais estão as seqüências de nucleotídeos necessárias para a montagem das proteínas pelo processo da tradução. A proteína TATA binding (TBP) é fundamental para a transcrição de todas as três RNA polimerases nucleares (Eisenmann et al., 1992).

A transcrição de RNA mensageiro (mRNA) em eucariotos é um processo altamente regulado que requer a associação seqüencial e coordenada de fatores de transcrição gerais (GTFs), co-reguladores, e da RNA polimerase II no promotor, para então formar um complexo de pré-iniciação (PIC) e dar início à transcrição. O mecanismo comum para ativação da transcrição requer a ligação das proteínas ativadoras diretamente, via interação seqüência específica, ou indiretamente, na seqüência ativadora upstream (UAS), para recrutar complexos co-ativadores incluindo SAGA (Spt-Ada-Gen5-acetiltransferase), TFIID (Fator Geral de Transcrição) e o Complexo Mediador. Estes complexos co-ativadores facilitam a ligação dos fatores de transcrição gerais, tais como TBP que por fim recrutam a RNA polimerase II (Davison et al., 1983; Fire et al., 1984; Martinez et al., 1994; Hahn, 2004; Sermwittayawong e Tan., 2006; Mohibullah e Hahn., 2008).

Genes codificadores de proteínas podem ser divididos em duas partes: seqüência estrutural, também chamada de codificadora, composta pelos nucleotídeos que codificam a proteína propriamente dita; e, uma porção regulatória, chamada de promotor, na qual ocorre a maior parte do processo de regulação da expressão gênica. Existem pelo menos três características comuns à grande maioria dos promotores classe II: presença de um ponto de iniciação da transcrição (TSP), presença do TATA box; e, seqüências reconhecidas por proteínas reguladoras, chamadas ativadoras ("enhancer" ou "upstream activating sequences") ou silenciadores ("silencers" ou "upstream repressing sequences"). O TSP e TATA box podem ainda ser agrupados no que se chama de "cerne" ou núcleo do promotor, que apresenta, em geral, aproximadamente 100 pares de bases (Figura 1) (Huisinga e Pugh, 2004; Huisinga e Pugh, 2007; Baker e Grant, 2007; Hou et al., 2009).

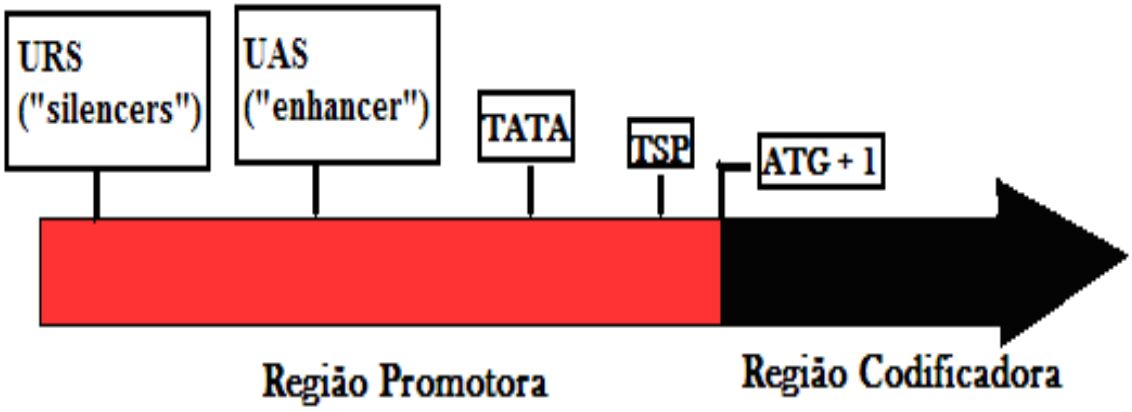

Figura 1. Esquema geral da estrutura de um gene de eucariotos, indicando os sítios encontrados nas regiões promotoras: TSP (Ponto de Inicio da Transcrição), TATA Box, e elementos regulatórios em cis (UAS e URS), além do ATG (ponto de início da transcrição), onde se inicia a transcrição.

Há mais de 30 anos, Michael Goldberg e David Hogness notaram uma seqüência rica em A-T (adenina e timina) à montante dos genes histona H2A de *Drosophila melanogaster,* similar em seqüência, mas não na posição da bem conhecida Pribnow-box (melhor conhecida como "seqüência -10") de promotores procarióticos. Pouco depois, seqüências similares foram identificadas à montante de muitos outros promotores eucariotos e vírus. Esta seqüência rica em A-T foram encontradas entre -25 e -30 pb, na região 5' do sítio de iniciação da síntese de mRNA. Análises mutacionais logo permitiram o entendimento de sua importância para atuação inicial da transcrição. Assim, a seqüência rica em A-T foi chamada de "Goldberg-Hogness"Box, mas agora é referida como TATA Box. Atualmente, considera-se sua seqüência consenso, com 8 pb TATA(T/A)A(T/A)(A/G) (Bjornsdottir e Myers, 2008; Tora e Timmers, 2010).

O TATA box é um sítio rico em adenina e timina que se localiza à montante do ponto de iniciação da transcrição, em geral -25 a -30 pb em eucariotos superiores; e, -40 a -120 pb em leveduras, ao qual se liga a proteína TATA-binding (TBP). Alguns promotores apresentam também um sítio localizado próximo ao TSP que é chamado de Iniciador (Inr), que possui importância relevante, principalmente em promotores que não possuem TATA box, pois se acredita que seja alvo de ligação de fatores de transcrição, inclusive TBP (Martinez et al., 1994; Tora e Timmers, 2010).

RNA polimerase II não possui a habilidade de reconhecer e se ligar aos promotores, sendo necessária a formação de um complexo de pré-iniciação da transcrição para sinalizar a existência de um gene que deve ser expresso.

O complexo de pré-iniciação da transcrição é constituído por mais de 30 polipeptídeos diferentes, entre os quais se destacam os Fatores Gerais de Transcrição (GTFs), conhecidos pela nomenclatura TFII(X) (para fatores de transcrição da classe II). Estudos pioneiros de sistemas de transcrição *in vitro* utilizando GTFs altamente purificados determinaram as proteínas que são fundamentais para a iniciação da transcrição, bem como para a manutenção de um nível basal de transcrição, sendo elas: TBP (componente de TFIID), TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF e TFIIH, além da RNA polimerase II (Buratowski et al., 1989; Hahn et al., 1989; Lee et al., 1992 ; Martinez et al., 1994; Yotov et al., 1998; Hahn, 2004).

1.7 Gene *SPT15*

A inserção do elemento δ (do transposon Ty) na região 5' de um gene causa seu fenótipo nulo, devido à mudança na iniciação de sua transcrição que passa a ser, com maior freqüência, a montante do elemento δ inserido, acarretando a transcrição incorreta deste gene (Eisenmann et al., 1989).

O gene supressor de Ty, denominado *SPT15* de *S. cerevisiae,* foi originalmente identificado por seleção genética de mutações que restauraram na expressão de genes que haviam sido interrompidos por inserções no elemento δ do transposon Ty. *SPT15* codifica o fator de transcrição Spt15, e está localizado no cromossomo V. Este gene é essencial para o crescimento celular, e codifica a proteína TATA-binding (TBP). Mutações neste gene, que não levam à letalidade, conferem vários fenótipos pleiotrópicos, incluindo alterações no início da transcrição de várias proteínas (Eisenmann et al., 1989; Yamaguchi et al., 2001).

A proteína TBP é um monômero de 38 kDa, considerada um dos fatores de transcrição universal mais conservado, requerida por todas as três RNAs polimerases eucarióticas. TBP possui uma estrutura em forma de "sela molecular", que apresenta motivos do tipo dedo de zinco, por meio dos quais se associa ao DNA, em sua parte côncava; composta por duas α-hélices (H) e cinco folha-β preguiadas (S) antiparalelas conectadas na ordem S1-H1-S2-S3-S4-S5-H2. TBP contém um domínio C-terminal altamente conservado (80% deste domínio é necessário para transcrição), dividido em duas regiões, com 90 aminoácidos cada, diretamente repetidas; e, uma região divergente N-terminal (Figura 2A). A "sela molecular" TBP, ao contrário da maioria das outras proteínas, liga-se ao sulco menor do DNA, decorrente da interação de uma seqüência específica de 8 pb, induzindo um dobramento de 80º no DNA, em direção ao sulco

maior. A parte convexa da superfície da sela é potencialmente necessária para ligação de outros fatores de transcrição ou mesmo de ativadores de transcrição gene específicos (Figura 2B) (Chasman et al., 1993; Kou et al., 2003).

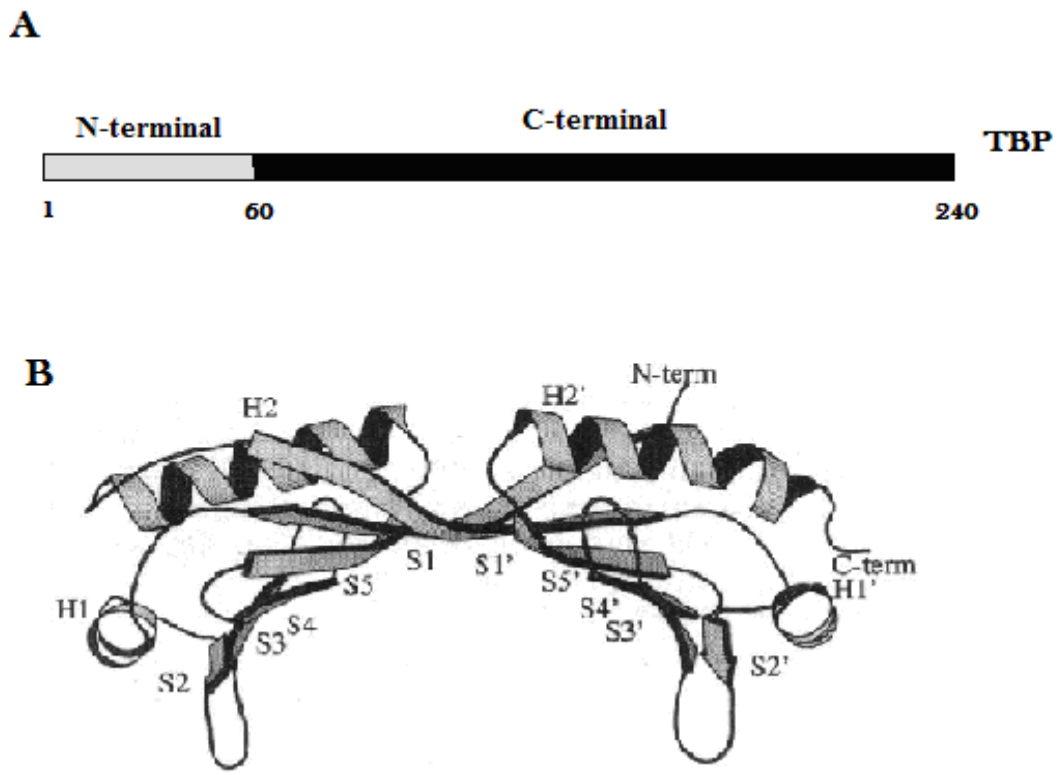

Figura 2. Proteína TATA-binding (TBP). **(A)** representação linear de TBP de levedura. O núcleo dominante conservado C-terminal que possui 180 aminoácidos está descrito em preto, e o domínio divergente N-terminal, em cinza. **(B)** representação da estrutura conhecida como "sela molecular" de TBP, possuindo duas α-hélices e cinco folhas-β antiparalelas conectadas na ordem S1-H1-S2-S3-S4-S5-H2 (modificado de Chasman et al., 1993).

A proteína TBP é um fator de transcrição essencial que afeta o reconhecimento do promotor e é requerido para a expressão da maioria, senão todos, os genes (Hampsey, 1998). Possui contato direto com uma grande variedade de fatores de transcrição de promotores específicos e gerais, incluindo TFIIA, TFIIB, o domínio C-terminal da subunidade grande da RNA polimerase II, fatores associados à TBP (TAFs), muitos ativadores de transcrição de gene específicos, complexo co-ativador de transcrição SAGA e reguladores de transcrição negativos (Cang et al., 1999; Kou et al., 2003; Biddick et al., 2008).

Em 2006, para avaliar a metodologia da "engenharia da maquinaria da transcrição global (gTME)" em sistemas eucarióticos, Alper et al construíram uma biblioteca genômica de seqüências mutantes obtidas por PCR mutagênica a partir do

gene codificador do fator de transcrição de *S. cerevisiae SPT15*. Esta biblioteca genômica foi empregada na transformação genética da linhagem haplóide de laboratório BY4741, que já possui em seu genoma uma cópia do alelo selvagem *SPT15* endógeno. Assim, cada um dos vários transformantes obtidos expressava cópia do gene *SPT15* selvagem, genômica e várias cópias de uma versão mutada presentes no plasmídeo. Os transformantes foram selecionados na presença de elevados níveis de glicose (100-120 g/L) e de etanol (5-6%). Este procedimento resultou no isolamento de um alelo *SPT15* mutado, denominado *spt15-300*, que confere maior resistência, ao clone transformante de levedura, à glicose e ao etanol. O alelo *spt15-300* contém uma tripla mutação, ou seja, resulta do efeito combinado de três mutações separadas no gene *SPT15:* $Phe^{177}Ser$ (a serina da posição 177 foi substituída por fenilalanina), similarmente, $Tyr^{195}His$, e $Lys^{218}Arg$ (Figura 3). Os clones transformantes contendo o alelo *spt15-300* apresentaram cerca de 100 genes diferentemente expressos, um grande aumento de viabilidade, quando cultivados na presença de elevadas concentrações de etanol (15%); e, aumento do rendimento (15%) de conversão de glicose a etanol, correspondendo a um aumento de 86% para 98% na produção de bioetanol. Além disto, estes clones apresentam fase de crescimento exponencial prolongada, o que permite superioridade em relação ao crescimento, maior produção de biomassa, nível superior de produção de etanol, e mais rápida utilização da glicose, em relação à linhagem hospedeira original (controle) (Alper et al., 2006).

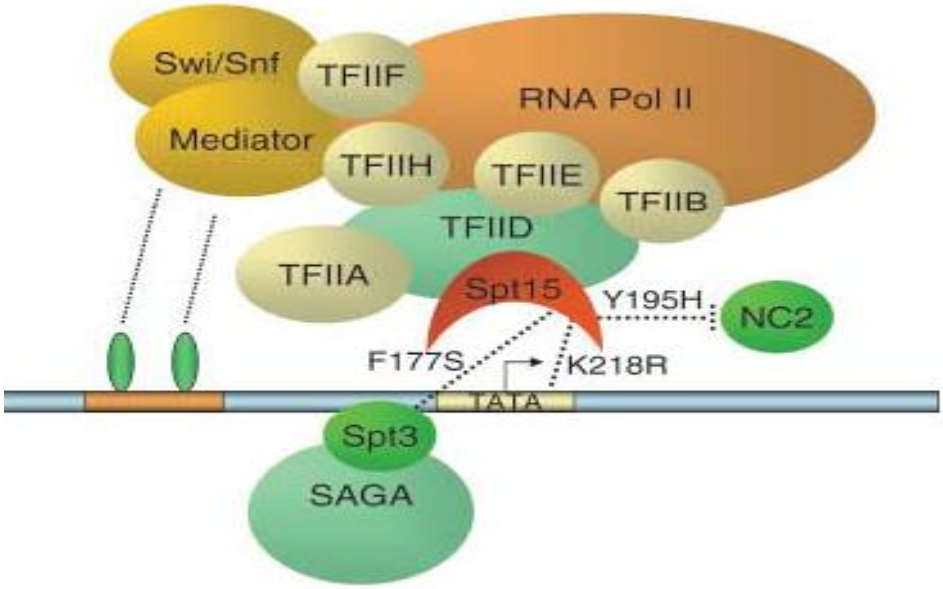

Figura 3. Esquema das três mutações (F177S, Y195H e K218R) na proteína Spt15 e seu efeito na maquinaria de transcrição global da levedura *S. cerevisiae*.
Fonte: Alper et al. (2006)

5 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos indicam superioridade fermentativa, o consumo mais rápido de glicose e o maior rendimento de produção de etanol da linhagem *S. cerevisiae* recombinante YPH252/δpPGK*spt15**tPGKδ em comparação à linhagem recombinante YPH252/pMA91*spt15** e esta, por sua vez, foi superior à linhagem YPH252/pMA91 (controle negativo, com genoma equivalente ao da linhagem hospedeira);

- O plasmídeo pGEMTδBam*casspt15** foi construído com sucesso, permitindo em trabalhos futuros a obtenção de clones recombinantes *S. cerevisiae* derivadas de linhagens selvagens com cópias de *spt15** inseridas em seu genoma;

- O alelo *SPT15* presente na linhagem *S. cerevisiae* industrial PE-2 apresenta 100% de identidade do alelo da linhagem S288C. Como a linhagem laboratorial apresentou um incremento de sua capacidade de assimilação e fermentação de glicose, ótimos resultados também deverão ser alcançados por transformantes de PE-2 com cópias de *spt15** inseridas no genoma.

- Para a confirmação e determinação do ganho de capacidade de produção de etanol pelas novas linhagens recombinantes propostas neste trabalho, se fará necessário o desenvolvimento de ensaios de fermentação em biorreator, onde os vários parâmetros padrão são acompanhados e avaliados com precisão. Isto porque principalmente linhagem *S. cerevisiae* PE-2 já é ótima produtora de etanol e pequenos incrementos da capacidade de produção são de extrema importância, porém demandam capazes de analise com alta precisão, para sua confiabilidade.

REFERÊNCIAS*

Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. Science. 2006;134:1565-1568.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology. Harvard: Medical School; 1992. Cap. 13.

Baker SP, Grant PA. The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. Nature. 2007;13:5329-5340.

Basso LC, Amorim HV, Oliveira AJ, Lopes, ML. Yeast Selection for fuel ethanol production in Brazil. FEMS Yeast Res. 2008;8:1155-1163.

Becker DM, Guarente, L. High-efficiency transformation of yeast by eletroporation. Methods Enzymol. 1991;194:182-186.

Beggs JD. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature. 1978;275:104-108.

Biddick RK, Law GL, Chin KKB, Young ET. The Transcriptional Coactivators SAGA, SWI/SNF, and Mediator Make Distinct Contributions to Activation of Glucose-repressed Genes. J Biol Chem. 2008;283:33101-33109.

Bjornsdottir G and Myers LC. Minimal components of the RNA polymerase II transcription apparatus determine the consensus TATA box. Nucleic Acids Res. 2008;36:2906-2916.

Boeke JD, Garfinkel DJ, Styles CA, Fink GR. Ty elements transpose through an RNA intermediate. Cell. 1985;40:491-500

Boeke JD, XU H, Fink GR. A general method for the chromosomal amplification of genes in yeast. Science. 1988;239:280-282

Boeke JD, Sandmeyer SB. Yeast Transposable elements, by Broach JR, Pringle JR, Jones E. W. The Molecular and cellular of the yeast *Saccharomyces.* New York: Cold Spring Harbor Press; 1991. p. 1:193-261.

Botstein D, Davis RW. Principles and practice of recombinant DNA research with yeast. In: Strathern JN, Jones EW, Browach JR. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: metabolism and gene expression. New York: Cold Spring Harbor Laboratory;1982. p-607-637.

***De acordo com:**
International Committee of Medical Journal
Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Bomedical Journal: Sample references. Available from: http://www.icmje.org[2007 May 22].

Buratowski S, Hahn S, Sharp PA, Guarente, L. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. Cell. 1989;56:549-561.

Burgers PMJ, Percival KJ. Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. Anal Biochem. 1987;163:391-397.

Cang Y, Auble DT, Prelich G. A new regulatory domain on the TATA-binding protein. EMBO J. 1999;23:6662-6671.

Camargo ME. Construção de um vetor para transformar levedura através da disrupção do gene *CAN1* [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1994.

Camargo ME. Sistema para transformação de leveduras industriais e detecção de atividade recombinogênica [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2000.

Cameron JR, Loh EY, Davis RW. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. Cell. 1979;4:739-751.

Chasman DI, Flaherty KM, Sharp PA and Kornberg. Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:8174-8178.

Costanza MC, Fox TD. Transformation of yeast by agitation with glass beads. Genetics. 1989;120:667-670.

Davison BL, Egly J, Mulvihill ER, Chambon P. Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. Nature. 1983;301:680-686.

Duno M, Bendixen C, Krejci L, Thomsen B. Targeted deletion created in yeast vectors by recombination excision. Nucleic Acids Res. 1999;27(8):e1.

Eisenmann DM, Dollard C and Winston F. *SPT15*, the gene encoding the Yeast TATA binding factor TFIID, is required for normal transcription initiation in vivo. Cell. 1989;58:1183-1191.

Eisenmann DM, Arnd KM, Ricupero SL, Rooney JW and Winston F. SPT3 interacts with TFIID to allow normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae.* Genes Dev. 1992;6:1319-1331.

Farrell AE, Plevin RJ, Turner BT, Jones AD, O'hare M, Kammen DM. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. Science. 2006;311:506-508.

Fire A, Samuels M, Sharp PA. Interactions between RNA polymerase II, factors, and template leading to accurate transcription. J Biol Chem. 1984;259:2509-2516.

Fujii T, Kondo K, Shimizu F, Sone H, Tanaka J, Inoue T. Application of a ribosomal DNA integration vector in the construction of a brewer's yeast having α-acetolactate decarboxylase activity. Appl Environ Microbiol. 1990;56:997-1003.

Garfinkel DJ. Genome evolution mediated by Ty elements in *Saccharomyces*. Cytogenet. Genome Res. 2005;110:63-69.

Gietz D, Jean ST, Woods RA, Schiestl RH. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucl Acids Res. 1992;20:1425.

Gietz D, Schiestl RH. Transforming yeast with DNA. Methods in Molecular and Cellular Biology. 1995;5:255-269.

Gietz RD, Woods RA. Genetic transformation of yeast. Bio Techniques. 2001;30:816-831.

Goffeau A, Barrell B G, Bussey H, Davis R W, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel J D, Jacq C, Johnston M, Louis E J, Mewes H W, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver S G. Life with 6000 genes. Science. 1996;274:546-567.

Goffeau A, Park J, Paulsen IT, Jonniaux JL, Dinh T, Mondant P, Saier MHJR. Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. Yeast. 1997;13:43-54.

Goldemberg J. Ethanol for a sustainable energy future. Science. 2007;315:808-810.

Guerra OG, Rubio IG, Da Silva Filho CG, Bertoni RA, Dos Santos Govea EC, Vicente EJ. A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. J microbiol methods. 2006;3:437-445.

Griffith AJF, Miller JH, Suzuki DT, Levontin, RC, Gelbart WM. An introduction of genetics analysis. 7. ed. Lord: WH freeman; 1993. v. 5. cap.13

Hadfield C, Raina KK, Shashi-menon K, Mount RC. The expression and performance of cloned genes in yeast. Micol Res. 1993;97:897-944.

Hahn S, Buratowski S, Sharp PA, Guarente L. Isolation of the Gene Encoding the Yeast TATA Binding Protein TFIID: A Gene Identical to the *SPT15* Suppressor of Ty Element Insertions. Cell. 1989;58:1173-1181.

Hahn S. Structure and mechanism of the RNA Polymerase II transcription machinery. Nat Struct Mol Biol. 2004;11:394-403.

Hammond JRM. Brewers' Yeast. In: Rose AH, Harrison JS. The Yeast. 2. ed. London: Academic Press; 1993. v. 5. cap. 2.

Hanahan D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J Mol Biol. 1983;166:557-580.

Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:11206-11210.

Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nature. 2007; 2:924-932.

Hinnen A, Hick JB, Fink GR. Transformation of yeast. Proc Natl Acad Sci USA. 1978;75:1929-1933.

Huisinga KL, Pugh BF. A Genome-Wide Housekeeping Role for TFIID and a Highly Regulated Stress-Related Role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell. 2004;13:573-585.

Hou L, Cao X, Wang, LU M. Effect of overexpression of transcription factors on the fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains. Lett Appl Microbiol. 2009;49:14-19.

Huisinga KL, Pugh BF, A Genome-Wide Housekeeping Role for TFIID and a Highly Regulated Stress-Related Role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell. 2004;13:573-585.

Huisinga KL, Pugh BF. A TATA binding protein regulatory network that governs transcription complex assembly. Genome Biol. 2007; 8:R46.

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. Transformation of intacts yeast cell treated with álcali cations. J Bacteriol. 1983;153:163-168.

Jimenez A, Davis J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. Nature. 1980;287:869-871.

Kim JM, Vanguri S, Boeke JD, Gabriel A, Voytas DF. Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. Genome Res. 1998;5:464-78.

Kou H, Irvin JD, Huisinga KL, Mitra M and Pugh BF. Strutural and Functional Analysis of Mutations Along the Crystallographic Dimmer Interface of the Yeast TATA Binding Protein. Mol Cell Biol. 2003;23:3186-3201.

Kurtzman CP. Molecular taxonomy of the yeast. Yeast. 1994;10:1727-40.

Kukuruzinska MA, Bergh MLE, Jackson BJ. Protein glycosylation in yeast: transcript heterogeneity of the ALG7 gene. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;56:915-944.

Lee DK, Dejong J, Hashimoto S, Horikoshi M, Roeder RG. TFIIA Induces Conformational Changes in TFIID via Interactions with the Basic Repeat. Mol Cell Biol. 1992;12:5189-5196.

Legras J, Karst F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. Mol Cell Biol. 2003;221:249-255.

Lopes TS, Klootwijk J, Veenstra AE, Van Der Aar P, Van Heerikhizen H, Raué HA, Planta RJ. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae:* a new vector for high-level expression. Gene. 1989;79:199-206.

Lopes TS, Hakkaart GJAJ, Koerts BL, Raué HA. Planta, R. J. Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. 1991;105:83-90.

Martinez E, Chiang C, Ge Hui and Roeder RG. TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. EMBO J. 1994;13:3115-3126.

Meilhoc E, Masson JM, Tessie J. High efficiency transformation of intact yeast cells by electroporation. Bio Technol. 1990;8:223-237.

Mellor J, Dobson MJ, Roberts NA, Tuite MF, Emtage JS, White S, Lowe PA, Patel T, Kingsman AJ, Kigsmans SM. Efficient synthesis of enzimatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. 1998;24:1-14.

Miller CH, Kowalski D. Cis-acting components in the replication origin from ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol. 1993;13:5360-5369.

Miyamoto C, Chizzonite R, Crowl R, Rupprecht K, Kramer R, Schaber M, Kumar G, Poonian M, Ju G. Molecular cloning and regulated expression of the human c-myc gene in *Escherichia* and *Saccharomyces:* comparison of the products. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82:7732-7735.

Mohibullah N, Hahn S. Site-especific cross-linking of TBP in vivo and in vitro reveals a direct functional interaction with the SAGA subunit Spt3. Genes Dev. 2008;22:2994-3006.

Orr-weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ. Genetic application of yeast transformation with linear and gapped plasmids. Methods Enzymol. 1983;101:228-230.

Plant EP, Goodwin TJ, Poulter RT. Tca5, a Ty5-like retrotransposon from *Candida albicans*. Yeast. 2000;16(16):1509-1518.

Prado F, Aguilera A. New in-vivo cloning methods by homologous recombination in yeast. Curr Genet. 1994;25:180-193.

Rodionov YV, Keppen OI, Sukhacheva MV. A Photometric Assay for Ethanol. Appl Biochem and Microbiol. 2002;38:395-396.

Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast a reiew. Yeast. 1992;8:423-488.

Rose MD, Broach JR. Cloning genes by complementation in yeast. Methods Enzymol. 1991;194:195-230.

Rothstein RJ. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. Methods Enzymol. 1991;194:281-301.

Rubio IGS. Novos vetores de rDNA – Transformação e co-transformação de *Saccharomyces cerevisiae*, levedura isolada de industriais e da biodiversidade amazônica [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2001.

Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press; 1989.

Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Salgado AM, Folly ROM, Valdman B, Cos O, Valero F. Colorimetric method for determination of ethanol by flow injection analysis. Biotechnol Lett. 2000;22:327-330.

Sermwittayawong D, Tan S, SAGA binds TBP via its Spt8 subunit in competition with DNA: implications for TBP recruitment. EMBO J. 2006;25:3791-3800.

Sherman F, Fink GR, Lawrence CW. Methods in yeast genetics: laboratory manual. Cold Spring harbor. New York: Cold Spring Laboratory. 1979.

Sikorski SR & Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 1989;122:19-27.

Tora L, Timmers HTHM. The TATA box regulates TATA-binding protein (TBP) dynamics *in vivo.* Cell Press. 2010;35(6):309-314.

Voorst FV, Houghton-larsen J, Jonson L, Kielland-brandt MC. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cere*visiae under ethanol stress. Yeast. 2006;2:351.

Voytas DF. Retroelements in genome organization. Science. 1996;274:737-738.

Walker GM. Yeast Phisiology and Biotechnology. New York: John Wily & Sons. 1998.

Yamaguchi Y, Narita T, Inukai N, Wada T, Handa H. *SPT* Genes: key Players in the Regulation of Transcription, Chromatin Structure and Other Cellular Processes. J Biochem. 2001;129:185-191.

Yamamoto T, Moerschell RP, Wakem LP, Ferguson D, Sherman F. Parameters affecting the frequencies of transformation and co-transformation with synthetic oligonucleotides in yeast. Yeast. 1992;8:935-948.

Yotov WV, Moreau A, St-amaud R. The alpha chain of the nascent polypeptide – associated complex functions as a transcriptional coativator. Mol Cell Biol. 1998;18:1303-1311.

Zheng H, Liu H, Chen S, Lu Z, Zhang Z, Dai-wen Pang, Xie Z and Shen P. Yeast transformation process studied by fluorescence ladeling technique . Bioconjug chem. 2005;16:250-254.