

ANÁLISE DA VIABILIDADE DE
TRANSFORMAÇÃO DE DIFERENTES
LEVEDURAS DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO UTILIZANDO O SISTEMA
CANI (CGC)

Juliana Ferreira de Meio

Dissertação (Mestrado) apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP Instituto Butantã IPT, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Biotecnologia).

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador (a): Dra. Elisabete José Vicente

São Paulo, 2006

ABREVIATURAS

?: comprimento de onda

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrometro

Ab: absorvância

Ade: mutante de levedura na síntese de adenina

Ap^R: resistência a ampicilina

CGC: cassete de expressão contendo cDNA da glicoamilase sob controle transcricional de promotor e terminador *PGK*, ladeado por fragmentos do gene *CANI*

DNA: ácido desoxirribonucléico

his: mutante de levedura na síntese de histidina

IPTG: isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo

Kb: quilo base = 1000 pares de bases

leu: mutante de levedura na síntese de leucina

lys: mutante de levedura na síntese de lisina

MAT a: gene de tipo de acasalamento a

MAT ?: gene de tipo de acasalamento ?

nm: nanômetros

pb: pares de bases

PCR: reação de polimerase em cadeia

PEG: polietilenoglicol

pg: picograma

PGK: gene que codifica a fosfoglicerato quinase

r.p.m.: rotações por minuto

SD: meio mínimo de cultivo de leveduras em glicose

trp: mutante de levedura na síntese de triptofano

ura: mutante de levedura na síntese de uracila

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

YPD: meio completo de cultivo de leveduras em glicose

RESUMO

Por serem microrganismos eucariontes, as leveduras são capazes de realizar modificações pós-traducionais das proteínas. Conseqüentemente, a levedura apresenta enormes vantagens para ser empregada como hospedeira de plasmídios recombinantes, portadores de informações genéticas provenientes de outros organismos eucariontes. Neste trabalho, foi utilizado um sistema de transformação genética construído por Camargo (1994), que possui como gene repórter o cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori*, sob o controle do promotor e terminador *PGK* de *Saccharomyces cerevisiae*. Esse vetor possui as extremidades do gene *CAN1* de *S. cerevisiae*, que, por recombinação homóloga, provoca disrupção gênica resultante da integração na região homóloga do gene *CAN1* da levedura transformada. Ao longo das últimas duas décadas, outras leveduras têm sido apresentadas como sistemas alternativos de expressão por apresentarem vantagens sobre *S. cerevisiae*. O uso de leveduras não convencionais (leveduras outras que não *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*) vem aumentando drasticamente com o passar dos últimos anos. Isto despertou o interesse em examinar o sistema de transformação por disrupção de *CAN1* em outras leveduras de interesse biotecnológico. Inicialmente, empregando-se a técnica de PCR, verificou-se o potencial de aplicação do sistema CGC como vetor de clonagem em várias leveduras. Algumas leveduras contêm em seu cromossomo o gene alelo *CAN1* funcional e são sensíveis a um aminoácido básico análogo da arginina, a L-canavanina (um potente inibidor de crescimento de muitos microrganismos). Após o processo de transformação com o sistema CGC, as células foram selecionadas pelo cultivo em meio mínimo, acrescido de L-canavanina. Em seguida os transformantes foram analisados quanto a aquisição da capacidade de produzir halos de amilólise em meio sólido contendo 0,5% de amido, sendo este degradado por reações de hidrólise em carboidratos menores, pela ação da

enzima a amilase que rompe as ligações glicosídicas α -1,4 da amilose originando uma mistura de maltose, amilopectina e glicose. Rompe também as ligações α -1,4 da amilopectina originando uma mistura de polissacarídeos denominadas destrinas. Neste trabalho apenas *Candida glabrata*, *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram integração do fragmento CGC, confirmado por PCR e produção da glicoamilase pela formação de halos de amilólise. Foi avaliada a estabilidade do sistema nestas diferentes leveduras, tendo sido verificado que a incorporação heteróloga manteve-se 100% estável após 144 gerações sem pressão seletiva.

ABSTRACT

For being microorganisms eukaryotes, the leavenings are capable to carry through modifications pos-traducionais of proteins. Consequently, the leavening presents enormous advantages to be used as hostess of recombinant, carrying plasmídios of genetic information proceeding from other organisms eukaryotes. In this work, a system of genetic transformation was used constructed by Camargo (1994), which it possesses as gene reporter the DNA of glicoamilase of *Aspergillus. awamori*, under the control of the promoter and terminador PGK of *Saccharomyces cerevisiae*. This vector possesses the extremities of gene CAN1 of *S. cerevisiae*, that, for homologous recombination, it provokes resultant genetic disruption of the integration in the homologous region of gene CAN1 of the transformed leavening. To the long one of last the two decades, other leavenings have been presented as alternative systems of expression for presenting advantages on *S. cerevisiae*. The use of not conventional leavenings (leavenings others that not *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*) comes drastically increasing with passing of the last years. This being the interest in examining the system of transformation for disrupção of CAN1 in other leavenings of biotechnological interest. Inicialmente, using itself it PCR technique, verified the potential of application of system CGC as vector of cloning in some leavenings. Some leavenings contain in its chromosome the functional gene alelo CAN1 and are sensible to an analogous basic amino acid of the arginine, the L-canavanina (a powerful inhibitor of growth of many microorganisms). After the process of transformation with system CGC, the cells had been selected by the culture in half minimum, increased of L-canavanina. After that the transforming ones had been analyzed how much the acquisition of the capacity to produce halos of amilolise in half solid contend 0.5% of starch, being this degraded by hydrolysis

reactions in lesser carbohydrates, for the action of the enzyme? amilase that it breaches the glicosídicas linkings?-1,4 of amilose originating a maltose mixture, amilopectina and glucose. ?-1,4 of the amilopectina also breaches the linkings originating a mixture of destrinas called polissacarídeos. In this work only *Candida glabrata*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae* had presented integration of it breaks up CGC, confirmed for PCR and production of glicoamilase for the halo formation of amilolise. The stability of the system in these different leavenings was evaluated, having been verified that the heteróloga incorporaco remained 100% after steady 144 generations without selective pressure.

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEVEDURAS

Leveduras constituem um grupo de microrganismos eucariontes, unicelulares, que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por cissiparidade e que realizam fermentação alcoólica (Lodder J, *et al.*, 1969). Embora as leveduras sempre tenham sido utilizadas empiricamente pelo homem no processo de fermentação alcoólica, o conhecimento da participação destes organismos vivos na fermentação somente foi demonstrado em 1876 por Louis Pasteur, sendo que 12 anos depois, Hansen isolou leveduras de processo de fermentação e propagou a cultura pura.

As leveduras apresentam grande importância sob vários aspectos biotecnológicos: são agentes de fermentação alcoólica (produção de álcool industrial e produção de bebidas alcoólicas destiladas e não destiladas); são utilizadas na panificação; são importantes fontes de proteína e de fatores de crescimento, são utilizadas como suplemento protéico na alimentação animal e humana. Todavia, algumas espécies apresentam-se patogênicas a plantas, animais e ao homem (Tuse, 1984).

Existe uma grande biodiversidade de leveduras na natureza, sendo que até o momento existem apenas 700 espécies descritas e assim, esse número representa uma pequena fração do total existente em nosso planeta (Walker, 1998). Dentro dos ascomicetos, estima-se a existência de 62.000 gêneros e 669.000 espécies cuja maioria ainda não foi descrita (Hawksworth *et al.*, 1994). Com o surgimento de novas demandas de mercado, e a vasta possibilidade de aplicação desses microrganismos, vem crescendo o interesse no isolamento e preservação de um crescente número de novas espécies de leveduras.

1.2. LEVEDURAS COMO ORGANISMO HOSPEDEIRO DE GENES HETERÓLOGOS

O pão, a cerveja e o vinho representam os produtos mais expressivos do processo de utilização das leveduras. Em todos esses processos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem um papel de destaque, onde além de ser considerada um dos microrganismos mais úteis ao homem, é um dos sistemas eucarióticos mais bem conhecidos. Sua genética é bem dominada e seu genoma foi totalmente seqüenciado (Goffeau *et al.*, 1997), fato este que representou uma das maiores conquistas da Biologia do século XX.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pôde ser empregada em estudos de genética molecular a partir do final dos anos 70, quando se conseguiu pela primeira vez a transformação genética da levedura (Hinne *et al.*, 1978). No campo da pesquisa aplicada, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* logo se destacou como um interessante candidato para a expressão de genes heterólogos de interesse biotecnológico. Embora a bactéria *Escherichia coli* represente um dos mais poderosos sistemas de expressão heteróloga, várias proteínas eucarióticas de interesse comercial não puderam ser expressas eficientemente neste microrganismo procariótico. Entre as razões para esses insucessos poderíamos citar: conformação incorreta da molécula protéica, ausência de modificações pós-traducionais e baixos níveis de expressão. Alguns desses problemas puderam ser resolvidos quando as mesmas proteínas foram expressas em *Saccharomyces cerevisiae*. O ambiente intracelular da levedura é adequado para a ocorrência de várias reações que normalmente ocorrem em células de mamíferos (Castilho-Valavicius *et al.*, 1992). Mecanismos de transcrição, tradução e processamento pós-transcricional e pós-traducional, são semelhantes àqueles observados em células de eucariontes superiores

(Kingsman e Kingsman, 1988). Modificações pós-traducionais, tais como, acetilação, fosforilação e glicosilação, podem ser necessárias para otimização da atividade protéica. Proteínas heterólogas, quase sempre resultam em produtos com diferentes modificações em relação à proteína nativa. Diferente de muitas proteínas heterólogas expressas em *Escherichia coli*, por exemplo, proteínas expressas em *S. cerevisiae* são acetiladas e, portanto, mais semelhantes às proteínas humanas. Este fato faz com que a levedura seja um dos organismos escolhidos para expressão funcional de genes eucarióticos clonados (Romanos *et al*, 1992).

Por vir sendo utilizada há milênios sem causar problemas de patogenicidade, a levedura *S. cerevisiae* é um dos poucos microrganismos que recebeu status de GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA americano.

Ao longo das últimas duas décadas, outras leveduras têm sido apresentadas como sistemas alternativos de expressão por apresentarem vantagens sobre *S. cerevisiae* e, assim, o uso de leveduras não convencionais (leveduras outras que não *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*) vem aumentando dramaticamente com o passar dos últimos anos. Uma categoria de leveduras que vem sendo muito utilizada é o das leveduras metilotróficas, que utilizam o metanol como fonte de carbono e energia, podendo-se citar como exemplos *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* e *Candida boidinii* (Wolf, 1996).

A comparação genômica em eucariotos era limitada pela considerável distância filogenética entre o primeiro organismo cujo genoma havia sido totalmente seqüenciado, a levedura *S. cerevisiae* (Goffeau, A. *et al*, 1996); um nemátóide, *Cenorhabditis elegans* (The *C. elegans* sequencing consortium, 1998); um inseto, *Drosophila melanogaster* (Amanatides, *et al*, 2000); uma planta dicotiledônea, *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), e o *Homo sapiens* (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

De acordo com Bernardo Dujon (2004) que trabalhou com grupos distantes de hemiascomicetos, *Candida glabrata*, o segundo maior causador de candidíase humana, está filogeneticamente mais próximo à *Saccharomyces cerevisiae* do que a *Candida albicans*, uma vez que a levedura.

Na indústria, *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada em processos industriais com fermentação de alimentos como pão, cerveja, extrato de levedura, produção de aroma e sabor em alimentos, vinho, sakê, aguardente, bebidas destiladas em geral, glicerol, suplementação para ração animal e na produção de álcool combustível. Com a tecnologia do DNA recombinante, tanto *S. cerevisiae*, quanto leveduras relacionadas ganharam grande impulso na produção de proteínas heterólogas, como biofármacos (Walker, 1998).

Com o desenvolvimento tecnológico, as indústrias estão buscando cada vez mais novas alternativas para aperfeiçoar a produção, e com isso vem crescendo o interesse de leveduras recombinantes.

Porém, existe um tópico muito importante quando se trata de microrganismo recombinante: a comercialização desse produto gerado por um organismo geneticamente modificado, que envolve outros campos de discussão como, científico, econômico, técnico, marketing, segurança, regulamentos legais e éticos, que precisam ser resolvidos entre todos envolvidos no processo e não somente os que lucram com a comercialização do produto (Walker, 1998). Os aspectos legais, econômicos e sociais da utilização de produtos geneticamente modificados, estão sendo revistos com muito interesse pelos órgãos competentes, pois muitas desses produtos recombinantes já estão sendo comercializados e muitos outros ainda estão sendo desenvolvidos.

No Brasil, um dos setores que desperta grande interesse para a aplicação de leveduras é o da indústria de etanol combustível. Devido à crise mundial do petróleo, houve o interesse em aumentar a produção de etanol, especialmente no Brasil, que teve em 1975 o incentivo

governamental, com a aprovação do Plano Nacional de Álcool (PNA), através da fermentação do caldo da cana por leveduras de panificação (Walker, 1998).

1.3. VETORES DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS E SISTEMAS DE TRANSFORMAÇÃO

Em paralelo ao desenvolvimento de técnicas de transformação genética para leveduras, novos vetores também vêm sendo desenvolvidos, onde geralmente são bifuncionais, que podem ser usados tanto em bactéria quanto em leveduras. Esses vetores contem uma origem de replicação em bactéria, que permite sua propagação em alto número de cópias, uma seqüência que confere resistência a antibióticos, permitindo assim a seleção dos transformantes e seqüências que complementam marcas auxotróficas, que permite a seleção dos clones transformantes em leveduras.

Um sistema de transformação genética depende de alguns fatores, como a introdução de uma molécula de DNA exógeno, a manutenção desta informação no organismo hospedeiro e a possibilidade de seleção desse evento (Wery *et al.*, 1999).

Somente após Hinnen *et al.* (1978) terem demonstrado ser possível a transformação genética de protoplastos da levedura *S. cerevisiae*, pôde-se utilizar este microrganismos como hospedeiro para a expressão de proteínas heterólogas.

A maioria dos vetores de expressão construída apresenta genes marcadores para a seleção dos transformantes, sendo os mais freqüentes *URA3* e *LEU2* (Ratzkin e Carbon, 1980); promotores para controlar a expressão dos genes heterólogos (Shuster, 1989); e, origem de replicação em *S. cerevisiae* e *E. coli*, permitindo que alguns passos da manipulação genética sejam realizados em bactérias, onde o rendimento na produção de plasmídios é maior (Schenberg e Bonatelli, 1987).

A maioria dos plasmídios de levedura utilizados para a expressão de proteínas heterólogas pertence à classe dos epissomais (Yep – Yeast Epissomal Plasmids), que apresentam características importantes como alta eficiência de transformação, grande número de cópias por célula e segregação correta durante a divisão celular (Broach, 1983).

Plasmídios centroméricos (YCp), apresentam regiões centroméricas, plasmídios lineares (YLp), que apresentam centrômeros e dois telômeros e plasmídios integrativos, que são mais estáveis, embora com número de cópias menor (Schenberg e Bonatelli, 1987). Plasmídios replicativos (YRp), contêm uma seqüência de replicação autônoma de levedura (ARS), sendo capazes de se replicar autonomamente na levedura (Struhl *et al.*, 1979).

Atualmente, há grande interesse em desenvolver novos vetores, que dispensem a utilização de marcas auxotróficas para seleção e células recombinantes, uma vez que a presença destas marcas limita-se às leveduras de laboratório, não abrangendo as linhagens industriais, que geralmente são prototróficas. Portanto, estratégias alternativas, como a disrupção do gene da permease da arginina (*CAN1*) que permite a seleção positiva dos clones transformantes resistentes à L-canavanina (*CAN1*), são mais adequadas para transformação e conseqüente seleção de linhagens industriais prototróficas recombinantes (Camargo, 2000).

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

As primeiras proteínas recombinantes foram obtidas na levedura utilizando-se promotores da via glicolítica, como é o caso da produção do alfa interferon humano utilizando o promotor do gene da álcool desidrogenase I (*ADH1*) (Hitzeman *et al.*, 1981).

O promotor *PGK*, do gene da fosfoglicerato quinase, foi utilizado para a produção de proteínas heterólogas (Tuite *et al.*, 1982; Chang *et al.*, 1986) com níveis de expressão

semelhantes aos obtidos com o promotor *ADHI*. Sistemas baseados no controle pelo promotor do gene da gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) (Bitter e Egan, 1984), permitiram a expressão da timidina-quinase do Herpes vírus (Zhu *et al.*, 1984) e transcriptase reversa do HIV (Barr *et al.*, 1987b).

Altos níveis de expressão também podem ser obtidos quando apenas porções derivadas destes promotores são utilizadas (Rosenberg *et al.*, 1990). Baseados nestas características foram construídos promotores híbridos, contendo regiões do promotor *GAPDH* e regiões reguladoras de promotores indutíveis como *GALI* (Bitter e Egan, 1988), *GAL7* (Wagenbach *et al.*, 1991) e *ADH2* (Cousens *et al.*, 1987).

1.10. PROMOTOR PGK

O gene da fosfoglicerato quinase de *Saccharomyces cerevisiae* é altamente expresso “in vivo” e possui sinais transcrpcionais tanto na região promotora quanto na região codificadora.(Ogden *et al.*, 1986; Dobson *et al.*, 1982; Mellor *et al.*, 1985).

A eficiência do promotor PGK tem sido demonstrada pelos altos níveis de expressão de vários genes heterólogos em leveduras (Tuite *et al.*, 1982; Mellor *et al.*, 1983; Kingsman *et al.*, 1985).

Recentemente, em estudos com o promotor PGK, identificou-se a posição da seqüência de ativação “upstream”, sendo que a deleção deste elemento causa uma significativa queda nos níveis de transcrição (Ogden *et al.*, 1986). Em vários genes de leveduras têm sido demonstrados que também possuem esta seqüência de ativação (Guarente, L., 1984). Em alguns casos esta seqüência de ativação está envolvida na interação específica DNA-Proteína (Giniger *et al.*, 1985; Hope, I.A. and Struhl, K.,1985; Arcangioli, B. and Lescure, B.,1985; Hope, I.A. and Struhl, K., 1986;).

Genes heterólogos sob o comando do promotor PGK, estão sujeitos à indução pela glicose, o que leva a conclusão de que o promotor PGK está sujeito à regulação pela fonte de carbono; entretanto o grau de indução ainda não foi determinado.

Todo o controle da expressão do gene glicolítico em leveduras ainda não está bem elucidado, entretanto Clifton and Fraenkel (1981) relataram a identificação de um gene que se acredita estar envolvido neste processo, que é chamado de GCR ('glycolysis regulation'). A mutação nesse gene resulta em 50-80% e 90-95% na redução da enzima glicolítica em substratos fermentáveis e não fermentáveis. Isto sugere que o produto do GCR está envolvido no mecanismo que controla a expressão do gene glicolítico.

1.4. O SISTEMA *CAN1* DE TRANSFORMAÇÃO

O gene *CAN1*, localizado no braço esquerdo do cromossomo V de *S. cerevisiae*, codifica a proteína permease da arginina (*CAN1p*) (Opekarová *et al.*, 1998).

Em 1979, Broach e colaboradores isolaram o gene *CAN1* de *S. cerevisiae* e construíram o plasmídeo TLC-1. Alguns anos depois, Hoffmann (1985) caracterizou esse gene, descrevendo-o com 2381 pares de bases.

A permeabilidade celular controlada pelo gene *CAN1*, é mediada por uma proteína associada à membrana celular. Durante o crescimento em meio mínimo, a permease da arginina é o único sistema de transporte desse aminoácido para dentro da célula (Broach *et al.*, 1979 e Whelan *et al.*, 1979). O transporte da arginina através da membrana plasmática em levedura é mediado pelo amino ácido permease que é codificado pelo gene *GAP 1* e pelo gene constitutivo altamente específico *CAN1*. O *Can1p* é altamente específico. O *CAN1* de *Saccharomyces cerevisiae* possui grande afinidade e especificidade a arginina e lisina, sendo

que tem maior afinidade a arginina do que pela lisina. (Alena Matijèková e Hana Sychrová, 1997).

Linhagens de levedura, com o gene *CANI* funcional, são sensíveis a um aminoácido análogo da arginina, que foi isolado da leguminosa *Canavalia ensiformis* na forma de L-canavanina (The Merck Index, 1976). A L-canavanina é um potente inibidor do crescimento de muitos microrganismos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae* (The Merck Index, 1976).

A célula produzindo a permease da arginina incorpora o aminoácido arginina e por consequência a L-canavanina caso esteja presente no meio o que provocará uma inibição do crescimento celular enquanto o gene *CANI* estiver sendo expresso. Porém, se o gene *CANI* sofrer uma mutação, deixará de produzir a permease da arginina, não permitindo a entrada da L-canavanina, fazendo com que ocorra crescimento celular após alguns dias de incubação.

Neste trabalho, foi utilizado um sistema desenvolvido em nosso laboratório que já havia sido comprovado ser capaz de transformar com eficiência e estabilidade diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Este sistema de transformação genética é capaz de integrar-se no gene da permease da arginina (*CANI*), causando disrupção gênica e permitindo a seleção dos clones transformantes que se tornam resistentes à L-canavanina (análogo tóxico da arginina) Figura 1, introduzindo assim, uma informação genética adicional, que se mantém estável como parte do genoma da célula hospedeira.

O vetor em questão é composto pelo promotor e terminador transcricional da fosfoglicerato quinase (*PGK*), inserido dentro da seqüência do *CANI*, contendo como gene repórter o cDNA da glicoamilase de *A. awamori*.

Neste trabalho, além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram utilizadas outras leveduras como *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces bayanus*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces fragilis* e *I. orientalis*, tendo como objetivo examinar a eficiência de

transformação do sistema CGC e sua viabilidade como vetor de transformação genética de outras leveduras além de *S. cerevisiae*, bem como atividade enzimática da glicoamilase secretada pelas células transformadas e a estabilidade da informação genética integrada nos cromossomos dos transformantes.

1.4. O SISTEMA CANAVANINA

Muitos dos aminoácidos não protéicos sintetizados por plantas superiores fazem parte de uma grande diversidade de metabólitos secundários. (Robinson, 1975; Fowden, 1976). Muitos desses aminoácidos não protéicos são relatados estruturalmente como constituintes de proteínas (Fowden, Lewis, and Tristram, 1967). Um excelente exemplo é a L-canavanina, a guanidinoxi análogo estrutural da L-arginina,

As funções bioquímicas e fisiológicas de aminoácidos não protéicos ainda não são completamente entendidas mas tem sido estabelecido seu modo de ação.

A habilidade da canavanina de inibir o crescimento microbiano tem sido estudada por mais de vinte e cinco anos. Horowitz and Srb (1948) mostrou a toxicidade da canavanina em *Neurospora* e relatou que a arginina neutraliza a inibição do crescimento canavanina-dependente.

As propriedades antimetabólicas da L-canavanina tem sido demonstrada com um amplo espectro de organismos, como pode ser observado na tabela abaixo:

ORGANISMOS	EFEITOS BIOLÓGICOS	REFERÊNCIAS
<i>Streptococcus bovis</i>	Estimula o crescimento em baixa concentração de CO ₂ e de arginina	Prescott <i>et al.</i> , 1957
<i>Staphylococcus aureus</i>	Diminuição da atividade enzimática	Richmond, 1959 ^a
<i>Saccharomyces</i> , <i>Torulopsis</i> e outras leveduras	Severa redução de crescimento	Miller & Harrison, 1950; Walker, 1955 ^a

<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Redução da atividade respiratória	Seaston <i>et al.</i> , 1973
<i>Candida albicans</i>	Redução da sobrevivência com exposição a luz UV	SArachek <i>et al.</i> , 1969

É enfatizado que a canavanina pode competir com a arginina e efetivamente inibe enzimas do metabolismo da arginina. Além disso, Tschiersch (1966) demonstrou que a canavanina inibe não competitivamente as enzimas álcool desidrogenase, β -glucosidase, oxinitrilase entre outras.

As potentes propriedades antimetabólicas dos aminoácidos não protéicos têm sido firmemente estabelecidas (Fowden, Lewis, and Tristram, 1967; Bell, 1972). Como no caso da canavanina, estes metabólicos tóxicos são frequentemente relatados como aminoácidos que entram na formação de proteínas. Estas considerações devem ter levado Fowden (1965) a postular que a via metabólica culmina na síntese de certos aminoácidos não protéicos podendo refletir em uma brusca alteração no complemento genético responsável pela formação de aminoácidos essenciais.

As plantas superiores sintetizam uma série de aminoácidos não protéicos nos quais são altamente tóxicos a vários herbívoros e constituem 10% do peso seco da semente. (Freeland and Janzen, 1974). A presença de altas concentrações desses aminoácidos tóxicos em plantas leguminosas deve resultar de respostas bioquímicas destas plantas pela pressão seletiva de animais e plantas patogênicas (Rehr, Bell, Janzen and Feeny, 1973^a).

A L-canavanina, um guanidinoxy análogo a L-arginina, é um representante deste grupo. Isto forneceu valiosa contribuição dentro dos efeitos biológicos e do modo de ação do amino-ácido não protéico que age como análogo do amino ácido protéico. A arginil – tRNA sintetase é a enzima responsável pela incorporação da canavanina na cadeia polipeptídica. Esta proteína, contendo a canavanina é responsável por alterações no metabolismo de DNA, RNA, tanto quanto a síntese protéica. A canavanina também afeta reações catalíticas e

regulatórias do metabolismo da arginina, captação da arginina, formação de componentes estruturais e outros processos celulares. Nessas vias, a canavanina altera reações bioquímicas essenciais e torna-se um potente antimetabólito da arginina em espécies selvagens. As propriedades deletérias da canavanina rendem uma alta toxicidade secundária da planta que provavelmente atua como um agente aleloquímico que detém atividade alimentar de insetos e outros herbívoros. (Rosental, 1977).

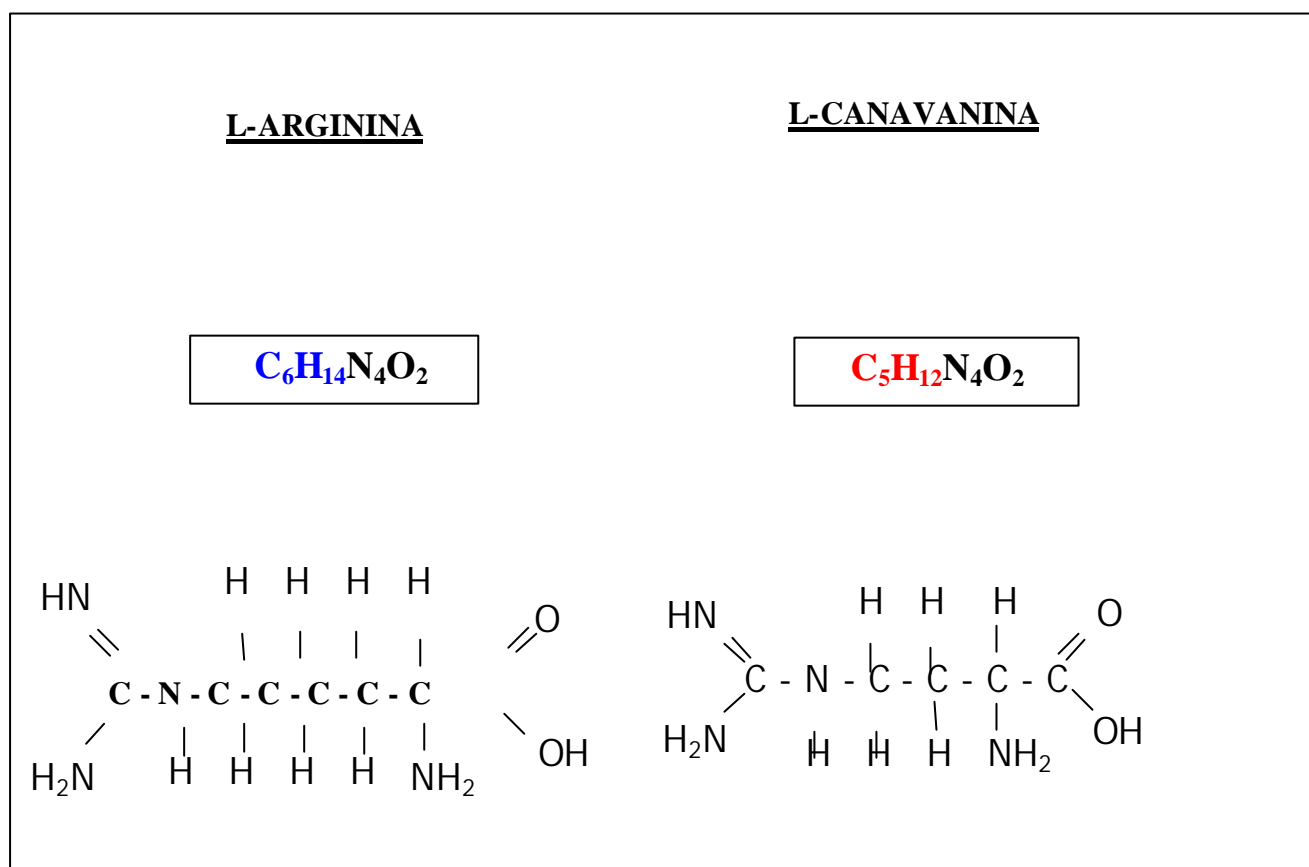


Figura 1. Fórmulas do aminoácido L-arginina e de seu análogo L-canavanina. (The Merck Index, 1976; Lehninger *et al.*, 1993)

Figura Y. Estrutura molecular do amido.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi analisar a capacidade de abrangência do sistema CGC em transformar outras leveduras que não *Saccharomyces cerevisiae*, através da disrupção do gene da permease da arginina (*CANI*).

Para tanto, o sistema CGC de transformação foi estudado quanto a:

- 2.1. Detecção do gene *CANI* nas diferentes leveduras através da amplificação por PCR;
- 2.2. integração do fragmento de DNA linear CGC em diferentes gêneros e espécies de leveduras;
- 2.3. confirmação da presença do fragmento CGC integrado no gene *CANI* do genoma das leveduras;
- 2.4. Análise quanto a estabilidade da informação genética integrada nos genomas das diferentes leveduras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS E VETORES DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

3.1.1. LEVEDURAS:

Tabela 1. Leveduras utilizadas.

LINHAGEM	CARACTERÍSTICA GENOTÍPICA	PROCEDÊNCIA
<i>S. cerevisiae</i> S288C	<i>S. cerevisiae</i> MAT ^α , wt, CAN1, linhagem padrão, com genoma seqüenciado.	ICB/USP
<i>Pichia pastoris</i>	Linhagem prototrófica	ICB/USP
<i>Candida tropicalis</i>	Linhagem prototrófica	ICB/USP
<i>Schizosaccharo myces pombe</i>	Linhagem prototrófica	ICB/USP
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Linhagem prototrófica	ICB/USP
<i>Hansenula anomala</i>	Linhagem prototrófica	ICB/USP
<i>Candida lusitaneae</i>	Linhagem prototrófica	ICB/USP
<i>Candida glabrata</i>	Linhagem prototrófica	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Linhagem prototrófica	UNESP

<i>Issatchenkia orientalis</i>	Linhagem prototrófica	UNESP
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Linhagem prototrófica	ICB/USP
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Linhagem prototrófica	ICB/USP

ICB/USP – Linhagens já existentes na coleção de cultura do laboratório

UNESP – Linhagens gentilmente cedidas pela Universidade Estadual de São Paulo – Araraquara

Fundação Oswaldo Cruz – Linhagens gentilmente cedidas pela coleção da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro.

3.1.2 BACTÉRIA:

Tabela 2. Bactéria utilizada.

LINHAGEM	CARACTERÍSTICA GENOTÍPICA	PROCEDÊNCIA
DH5?	<i>Escherichia coli</i> . F'/endA1 hsdR17(r _k -m _k +) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Na ^f) relA1 ?(lacZYA-argF)U169 (?80dlac?(lacZ)M15)	ICB/USP

3.1.3. VETORES DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA:

Tabela 3. Vetores de transformação genética utilizadas.

VETOR	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
pUCGC CGC	pUC19 contendo CGC, 7,8Kb (Figura 2) Fragmento de DNA dupla fita ladeado por seqüências a montante e a jusante do gene <i>CAN 1</i> de <i>S. cerevisiae</i> contendo o cassete de expressão do cDNA da glicoamilase de <i>Aspergillus awamori</i> . Contém a seqüência promotora PGK, da glicoamilase, seqüência estrutural da glicoamilase e terminador de transcrição da glicoamilase, 7,8Kb	Camargo, 1994. Camargo, 2000.

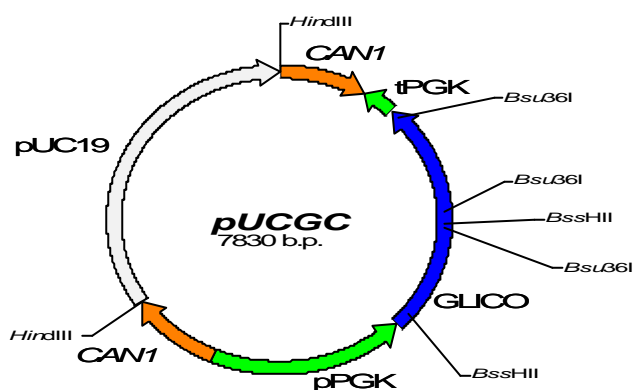


Figura 2. Esquema representativo do vetor pUCGC e dos respectivos sítios de restrição que libera o fragmento CGC. (CAN1 – seqüência do gene que codifica a permease da arginina, glico – glucoamilase, pPGK – promotor da fosfoglicerato quinase, tPGK – terminador da fosfoglicerato quinase).

3.2. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS

Tabela 4. Meios de cultura e condições de crescimento de bactérias. (todos de procedência Difco)

MEIO / COMPOSIÇÃO / INFORMAÇÕES ADICIONAIS	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	
	MEIO LÍQUIDO	MEIO SÓLIDO
<p>LB (Luria Broth): bacto triptona 1%; cloreto de sódio 0,5%. Meio sólido + 2% ágar-ágar. Esterelizado por autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Adição de 100 µg/mL de ampicilina caso necessário. (SAMBROOK <i>et al.</i>, 1989)</p>	<p>Aeração em “Shaker” New Brunswick Scientific a 37°C e 150 rpm</p>	<p>Estufa a 37°C</p>
<p>SOC: Triptona 2%; Extrato de levedura 0,5%; NaCl 10mM; KCl 2,5mM; MgCl₂ 10mM; MgSO₄ 10mM; glicose 2%. Esterelizado por autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Adição de 100 µg/mL de ampicilina, caso necessário. Utilizado na transformação por eletroporação. (SAMBROOK <i>et al.</i>, 1989)</p>		

3.2.2.. LEVEDURAS

Tabela 5. Meios de cultura e condições de crescimento de levedura.

MEIO / COMPOSIÇÃO / INFORMAÇÕES ADICIONAIS	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	
	MEIO LÍQUIDO	MEIO SÓLIDO
<p>YPD (meio completo): peptona 2%; extrato de levedura 1%; glicose 2%. Meio sólido + 2% ágar-ágar. Esterilizado por autoclavação a 120° por 20 minutos. (SHERMAN <i>et al.</i>, 1979).</p>	<p>Aeração em “Shaker” New Brunswick Scientific a 28°C e 150 rpm</p>	<p>Estufa a 28°C</p>
<p>SD (meio mínimo): bacto base de nitrogênio de levedura sem aminoácidos 0,67%; glicose 2%. Meio sólido + 2% ágar-ágar. Autoclavado a 120° por 20 minutos. Suplementado se necessário, com 40 ?g/mL de aminoácidos ou com 60 ?g/mL de L-canavanina. (SHERMAN <i>et al.</i>, 1979).</p>		

3.3. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes empregados no preparo das soluções foram de qualidade analítica e de procedência dos fabricantes Sigma, Merk ou Gibco-BRL.

Todas as soluções foram preparadas conforme descrito por Sambrook *et al.*, 1989, exceto quando indicado.

3.3.1. SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA, EM PEQUENA E GRANDE ESCALA

- ✍ Solução I: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; glicose 50 mM
- ✍ Solução II: NaOH 0,2N; SDS 1%(p/v)
- ✍ Solução III: Acetato de sódio 3M, pH 4,8
- ✍ Solução Tampão de eluição (TE): Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM
- ✍ Solução tampão de suspensão (TR): Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1,0 mM
- ✍ Solução tampão de lavagem (STE): Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1,0 mM; NaCl 100 mM
- ✍ Solução de polietileno glicol e cloreto de sódio (PEG-NaCl): PEG 8000 13% (P/v); NaCl 1,6M
- ✍ Solução de Cloreto de lítio: LiCl 5M – utilizada na concentração final de 2,5M
- ✍ Clorofil: clorofórmio 24 partes; álcool isoamílico 1 parte; tampão TE
- ✍ Fenol tamponado: fenol destilado; solução tampão Tris-HCl 1M, pH 8,0. A solução de fenol foi equilibrada várias vezes com Tris-HCl 0,1M, pH 8,0,

até atingir o pH 7,5. Uma vez tamponada, foi estocada com um volume igual de Tris-HCl 0,01M, a 4°C em frascos de vidro ambar.

- ✍ Solução de RNase A (Sigma): RNase A 10mg; Solução III 1mL. A solução foi fervida em banho-maria por 10 minutos e estocada a temperatura de -20°C.

3.3.2. SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

- ✍ Solução tampão tris-borato (TBE): Tris-HCl 0,89M; Ácido bórico 0,29M; EDTA 8mM, pH 8,0. Solução estoque 10 vezes (10X) concentrada e diluída em água destilada para concentração final de 1 parte de tampão para 20 partes de água (0,5X), quando utilizada para eletroforese em gel de agarose.
- ✍ Gel de agarose para eletroforese de DNA: agarose (Sigma tipo II) 0,8%(p/v); tampão TBE diluído em água destilada para concentração final de 0,5X. O gel de agarose foi misturado ao tampão TBE e aquecido até dissolução.
- ✍ Solução de Brometo de Etídio (EtBr): EtBr 10 mg; água destilada 1mL. Solução estoque preparada na concentração de 10mg/mL em água destilada e utilizada na concentração final de 5 ? g/mL.
- ✍ Solução tampão de amostra para DNA (“Stop mix”): azul de bromofenol 0,5%; Tris 100mM pH 8,0; glicerol 50%. O tampão de amostra foi preparado 10 vezes (10X) concentrado e utilizado na concentração final de 1X na mistura de DNA.

3.3.3. SOLUÇÕES PARA TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS

- ✍ LiAc 100Mm
- ✍ PEG (50% W/V) - PM: 3350
- ✍ LiAc 1M
- ✍ ss-DNA (2mg/mL)

3.4. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

3.4.1. PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES

De uma cultura pré-crescida durante a noite, 1mL foi inoculado em 100 mL de meio LB, seguindo-se incubação a 37 °C com agitação em “shaker” a 110 rpm, até atingir uma absorbância em 600 nm em torno de 0.5-0.6. A suspensão foi então coletada em tubos de centrífuga, deixada em repouso no gelo por cerca de 15-30 minutos e centrifugada a 4.500 g, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensionado em 100 mL de água destilada estéril a 4°C. As células foram centrifugadas como descrito no item anterior. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 50 mL de água destilada estéril gelada e centrifugada novamente. As células foram ressuspensas em 2 mL de glicerol a 10% a 4°C e centrifugadas pela última vez. As células foram ressuspensas num volume final de 300 µl com glicerol 10% gelado (concentração de $1-3 \times 10^{10}$ células/mL). A suspensão de células foi alíquotada em tubos “Eppendorf” de 1,5 mL em alíquotas de 40 µl e armazenada à temperatura de -70 °C.

3.4.2. TRANSFORMAÇÃO

As células foram retiradas do freezer -70°C , colocadas imediatamente no gelo e utilizadas somente depois de descongeladas. Cerca de 40 μL da suspensão de células foi colocada em tubos gelados de microcentrífuga com 2 μL de DNA. O aparelho eletroporador “Gene-Pulser” da BioRad foi calibrado de acordo com a cubeta utilizada. A mistura célula/DNA foi transferida para a cubeta a 4°C e esta inserida no eletroporador. Em seguida o pulso foi aplicado nas condições estabelecidas (voltagem: 2,5 kv, capacitor: 25 μF , resistor: 200 Ω e constância do tempo: 4,6-4,8 seg.). Imediatamente após o pulso, as cubetas foram removidas da câmara de aplicação do pulso e foi adicionado às células 1 mL de meio SOC. A suspensão foi então transferida para um tubo de ensaio e incubada a 37°C com agitação de 110 rpm, por 1 hora. Após esse tempo de incubação, visando a expressão do gene de resistência presente no plasmídeo, a suspensão bacteriana foi semeada em placas contendo meio sólido seletivo e as placas incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

3.5. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL BACTERIANOS

A extração de DNA plasmidial foi feita segundo metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989).

3.5.1. PREPARAÇÕES DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA

Os clones de *E.coli* foram inoculados em 5 mL de meio LB contendo ampicilina à concentração final de 100 µg/mL de meio. O inóculo foi incubado a 37°C durante a noite (aproximadamente 16 horas) com agitação a 110 rpm. Uma alíquota de 3 mL foi centrifugada em 2 tubos do tipo “Eppendorf” a 4.500 g por 2 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o excesso retirado com uma pipeta de ponteira fina. O sedimento foi ressuspensado em 300 µL de solução I com pipeta. A seguir, adicionaram-se 300 µL de solução II, e o tubo foi mantido em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se 300 µL de solução III, e armazenou-se o tubo por 10 minutos no gelo. Decorrido este tempo, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 4 °C a 10.000 g. O sobrenadante foi recuperado e a este foram acrescentados 600 µL de solução clorofórmio/álcool isoamílico (solução 24:1), misturado por inversão e centrifugado por 2 minutos a 4.500 g, à temperatura ambiente. A fase aquosa foi então recuperada e a esta foram acrescentados 600 µL de álcool isopropílico (isopropanol). A solução foi misturada por inversão e deixada por 30 minutos à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 10.000 g, por 15 minutos a 4 °C. O sedimento foi lavado com etanol 70% a 4°C e seco a vácuo durante 10 minutos. O resíduo seco foi ressuspensado em 50 µL de água bi-distilada estéril contendo 1 µg de RNase. O material foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8%.

3.5.2. PREPARAÇÕES DE DNA PLASMIDIAL EM MÉDIA ESCALA (MIDI-PREPARAÇÃO)

Os clones de *E.coli* foram inoculados em 50 mL de meio LB contendo ampicilina à concentração final de 100 µg/mL de meio. O inóculo foi incubado a 37°C durante a noite (aproximadamente 16 horas) com agitação a 110 rpm. A cultura foi centrifugada a 4°C por 5 minutos a 4500g e o sobrenadante, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspensão em 1000 µL de solução I com pipeta. A seguir, adicionaram-se 2000 µL de solução II, e o tubo foi mantido em repouso por 5 minutos à temperatura de 4°C. Adicionaram-se 1500 µL de solução III, e, armazenou-se o tubo por 30 minutos a 4°C. Decorrido este tempo, o tubo foi centrifugado por 15 minutos a 4°C a 8500g. A fase aquosa foi então recuperada e a esta foram acrescentados 8 mL de álcool isopropílico (isopropanol). A solução foi misturada por inversão e deixada por 30 minutos à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 10.000 g, por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol 70% a 4°C e seco à vácuo durante 10 minutos. O resíduo seco foi ressuspensão em 2 mL de fenol tamponado e o tubo foi agitado vigorosamente e então centrifugado por 2 minutos a 4500g. Esta operação foi repetida utilizando-se solução clorofórmio/álcool isoamílico (solução 24:1). A fase aquosa, contendo o DNA, foi transferida para outro tubo, ao qual foram adicionados 2 volumes de isopropanol à temperatura ambiente. Após os 15 minutos de incubação, foi realizada outra centrifugação por 15 minutos a 7800g, e o sobrenadante obtido foi descartado. O precipitado foi dissolvido em 0,4 mL de TE e transferido para microtubo “Eppendorf”. Foram adicionados 60 µL de acetado de sódio 3M e 1 mL de etanol -20°C. Após incubação por 10 minutos a -20°C, centrifugou-se 2 minutos a 15000g. O precipitado final foi dissolvido em 0,2 mL de TE, ao qual foram adicionados 20

µL de RNase A (1mg/mL) e incubado por 30 minutos a 37°C. A precipitação do DNA foi realizada adicionando-se 20 µL de NaAc 3M, 0,3 µL de etanol -20°C com incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. A ressuspensão do DNA foi feita em 100 µL de TR.

3.6. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA EM GEL DE AGAROSE (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A análise do DNA quanto às características físicas tais como, integridade, pureza, conformação e tamanho molecular, foram feitas por meio da técnica de eletroforese. Estes dados foram obtidos através de análise dos perfis de migração dos fragmentos de DNA em géis de agarose, submetidos à eletroforese. A concentração de agarose dos géis variou de 0,7 a 0,8%, todos contendo 5 µg/mL de brometo de etídio, agente que atua intercalando-se às moléculas de DNA, permitindo sua visualização em transluminador com luz ultravioleta. Como padrão de tamanho molecular, foi utilizado DNA Ladder 1KB; 1KB plus e Lambda/*Hind III*. O tampão de corrida utilizado foi o TBE 0,5X. Para a fotodocumentação dos géis, foi utilizado o aparelho "Eagle-eye" da "Stratagene".

3.6.1. MARCADORES DE PESO MOLECULAR PARA DNA

Os marcadores de peso molecular de DNA, DNA µ / *HindIII* utilizados como referências de tamanho nas análises dos fragmentos (bandas) de DNA obtidos após a digestão

com as enzimas de restrição que são da marca Gibco – BRL e foram submetidos à corrida eletroforética para análise dos perfis de migração em gel de agarose.

Tamanho dos fragmentos (em pares de bases): 23.130pb; 9.416pb; 6.557pb; 4.361pb; 2.322pb; 2.027pb; 0,5pb.

3.7. TRATAMENTO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Os tratamentos de DNA com as enzimas de restrição ou com enzimas modificadoras foram feitos conforme as recomendações sugeridas nos catálogos dos fabricantes New England Biolabs ou Gibco-BRL.

3.7.1. DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As digestões do DNA com enzimas de restrição foram realizadas em sistemas de 10 a 50 μ l, observando-se os tampões de restrição apropriados, de acordo com os fabricantes, e adicionados a partir de estoques concentrados 10X. As digestões foram realizadas na temperatura adequada a cada enzima, geralmente a 37 $^{\circ}$ C por 2 a 5 horas e, ocasionalmente, durante a noite.

A quantidade de DNA digerida variou de acordo com o experimento, utilizando-se de 1 a 2 U/ μ L (unidades) de enzima para cada μ g de DNA.

3.8. TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS (Gietz *et al.*, 1992)

Um pré-inóculo de células foi incubado em 2 a 5 mL de YPD durante 16 h a 30°C. A partir de 0,5 mL deste primeiro cultivo foi realizado um inóculo em 50 mL de YPD, para uma densidade de células inicial de 5×10^6 cel/mL. Esta cultura foi incubada em shaker a 200 rpm até $A_{550nm} = 0,5$. Após este período, a cultura foi centrifugada por 8 minutos a 3000g (aproximadamente 5000rpm). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 25 mL de água, seguindo-se nova centrifugação em demelhantes condições. A água foi descartada, e o sedimento foi ressuspensas em 1 mL de LiAc 100mM e transferido para tubo (de 1,5 mL) de microcentrífuga. O material foi centrifugado por 15 segundos, todo o LiAc foi retirado, e o sedimento ressuspensas em 500 μ L de LiAc 100mM.

As células foram agitadas em "vortex" e 50 μ L foram pipetados para outro tubo. Todo o LiAc foi removido e o material novamente centrifugado. Foram adicionados, nesta ordem, sobre o sedimento de células:

? 240 μ L de PEG (50%W/V) - PM: 3350 – Sigma.

? 36 μ L de LiAc 1M.

? 25 μ L de ss-DNA (2mg/mL).

? 50 μ L de suspensão de DNA e água (0,1 a 10 μ g de DNA).

Cada tubo foi agitado em "vortex" até completa ressuspensão do sedimento e incubado em estufa a 30°C, por 30 minutos. Após esta primeira incubação, os tubos foram incubados em banho-maria a 42°C, por 20 a 25 minutos. O material foi centrifugado a 6000 ou 8000 rpm por 5 segundos e o sobrenadante removido. Foi adicionado 1 mL de água estéril e realizada a ressuspensão vagarosa com pipeta. As células foram semeadas em placas de seleção de 2 a 200 μ L/placa. Para transformação de leveduras com o fragmento CGC, os transformantes

foram selecionados em meio SD sem aminoácidos, adicionado de 60 μ g/mL de L-canavanina (concentração final).

3.9. SELEÇÃO DOS TRANSFORMANTES

Para a seleção das células transformadas com os fragmentos integrativos CGC, adicionou-se 60 μ g/mL de uma droga fungistática ao meio, a L-canavanina, o que possibilitou a seleção direta dos transformantes. A inserção do fragmento CGC no gene *CAN1* interrompe a produção da permease da L-arginina, impedindo a entrada deste aminoácido na célula e conseqüentemente impedindo também a entrada do análogo tóxico L-canavanina. Desta forma as linhagens recombinantes transformadas perdem a sensibilidade a este agente e formam colônias sobre o meio contendo L-canavanina.

Para certificar se a linhagem a ser transformada era sensível a L-canavanina, cultivou-se as leveduras em meio mínimo líquido e meio mínimo sólido acrescido com diferentes concentrações de L-canavanina que foi de 60 a 500 μ g/ml, no período de 5 dias.

3.10. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DO FRAGMENTO INTEGRADO NO GENOMA DA LEVEDURA

Para a análise da estabilidade do inserto integrativo CGC, nos clones recombinantes, foi avaliada a porcentagem de perda da informação clonada por geração. Foram feitos repiques sucessivos em meio não-seletivo a cada 24 horas, durante 5 dias. O inóculo inicial, assim como todos os repiques, continham aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/mL de YPD. A cada 24 horas, as culturas foram lavadas, diluídas e semeadas, por um

lado, em meio mínimo sólido (SD) acrescido dos aminoácidos necessários ou do fungistático L-canavanina e, por outro lado, no meio completo (YPD). Após incubação em estufa a 28°C durante 48 horas, as colônias foram contadas, comparando-se o número de colônias crescidas nas placas de meio mínimo com as crescidas nas de meio completo. As colônias de transformantes crescidas em meio seletivo foram submetidas à análise de PCR para a determinação da presença do fragmento CGC. O número de gerações estimado e a perda de plasmídeo por geração foi calculada, respectivamente, conforme as seguintes fórmulas (RUBIÓ, 1996; CAMARGO, 1994):

$$N = \frac{\ln(X/X_0)}{\ln 2}, \text{ onde:}$$

N = número de gerações
X = número final de células
X₀ = número inicial de células
ln = logaritmo neperiano (ln2= 0,6931)

$$P = C / N, \text{ onde:}$$

P = % de perda do plasmídeo ou da
informação clonada por geração
C = % de colônias não produtoras
N = número de gerações sem pressão seletiva

3.11. EXTRAÇÃO DE DNA CROMOSSÔMICO DE LEVEDURAS

As extrações de DNA cromossomal total das leveduras foram feitas pelo protocolo de Sherman, 1990.

3.12. REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR)

A confirmação da integração do fragmento CGC no cromossomo das leveduras transformadas, foi obtida através de Reação de Amplificação em cadeia da DNA Polimerase (PCR) (figura 3). O molde utilizado foi o DNA total obtido da extração dos diferentes clones transformantes da levedura.

Para as reações de PCR, foram empregados os seguintes iniciadores (“primers”):

Primer 1 – Sequência referente à extremidade 3’ do fragmento CGC, composto por fragmento da região interna do gene *CAN 1* de *S. cerevisiae*, que amplifica no sentido reverso 5’TCA AAG CTT GCA TAA ATC TG 3’ (Camargo, 2000).

Primer 2 – Sequência referente a extremidade 5’ do fragmento CGC, composto por fragmento da região interna do gene *CAN1* de *S. cerevisiae*, que amplifica no sentido “forward” 5’ GTT GAA GCT TCA CAA ACA CAC 3’ (Camargo, 2000).

Todos os iniciadores utilizados nas reações foram sintetizados pela GIBCO-BRL. Os reagentes empregados nas reações, assim como, a enzima Platinum Pfx DNA polimerase, foram provenientes da Invitrogen.

As reações seguiram as indicações do fabricante da enzima, inclusive o programa aplicado. O equipamento utilizado foi o DNA enzinae – MJ Research – modelo PTTC-200 Peltier Thermal Cycler.

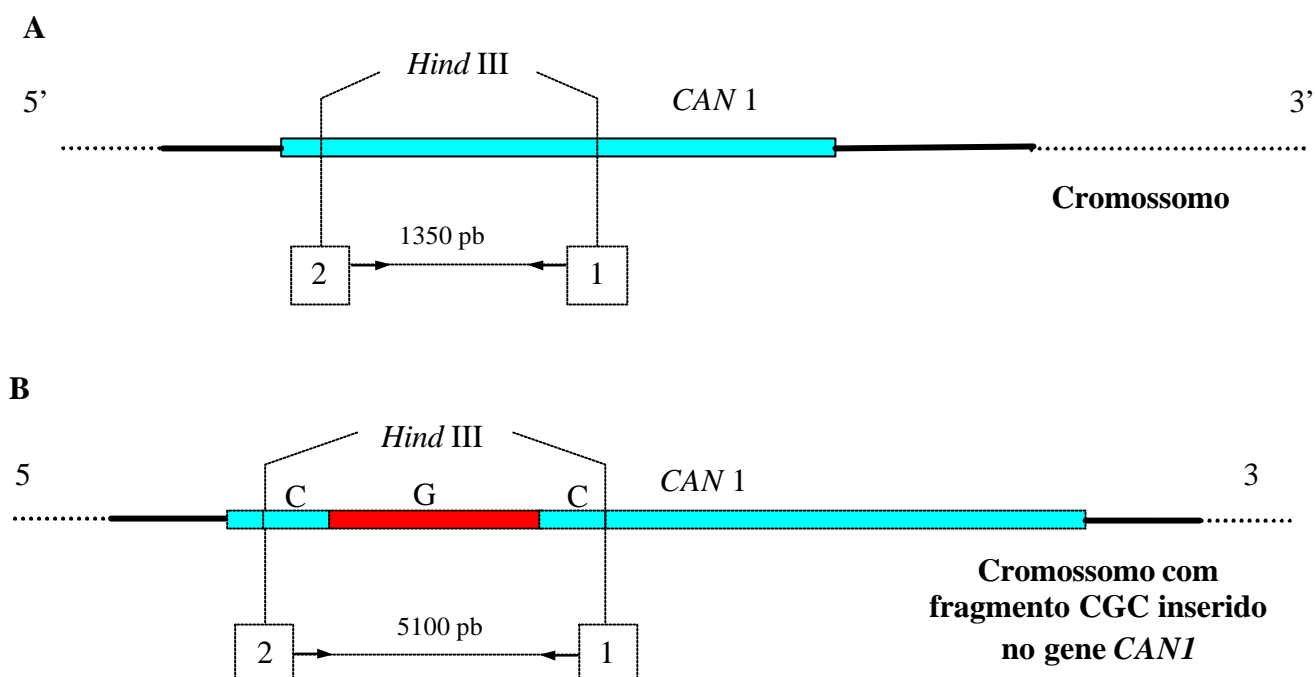


Figura 3. Esquema da localização dos iniciadores, indicando os tamanhos dos produtos amplificados por reação de PCR, onde (A) mostra o gene *CAN1* (funcional) presente no cromossomo V de *Saccharomyces cerevisiae*, e (B) gene *CAN1* interrompido pelo fragmento CGC.

3.13. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

Foi verificada a taxa de crescimento das leveduras transformadas com o fragmento CGC e das mesmas linhagens não transformadas. Para isso partiu-se de culturas contendo $2,0 \times 10^5$ células/ml em 25 ml de meio completo contendo amido e incubação a 28°C com agitação de 150 rpm.

A leitura de absorbância era feita em placas de microtitulação de 96 poços, com 200 microlitros de cada cultura. A leitura era feita sem diluição ou com diluição de 10 ou 100 vezes, de acordo com a fase de crescimento das culturas, de forma que a absorbância fosse

menor que 1,0. A leitura era obtida em aparelho eppendorf, num comprimento de onda de 600nm.

Retiraram-se pontos de leitura a cada 2 horas durante as primeiras 14 horas. Após esse período, os pontos foram analisados a cada 24 horas, durante 7 dias.

3.14.” BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (BLAST)”:

Utilizada acordo site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Foi utilizada a seqüência do gene *CAN1* que flanqueia o fragmento CGC para comparação entre seqüências no programa BLAST.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENÇÃO DO FRAGMENTO CGC

Para obtenção do fragmento CGC, o plasmídio quimérico denominado pUCGC foi submetido à análise de restrição pela enzima *Hind* III, que apresentou como perfil uma banda de 5,1Kb correspondente ao fragmento CGC e uma segunda banda de 2,7 Kb correspondente ao plasmídeo pUC19 linearizado (Figura 4).

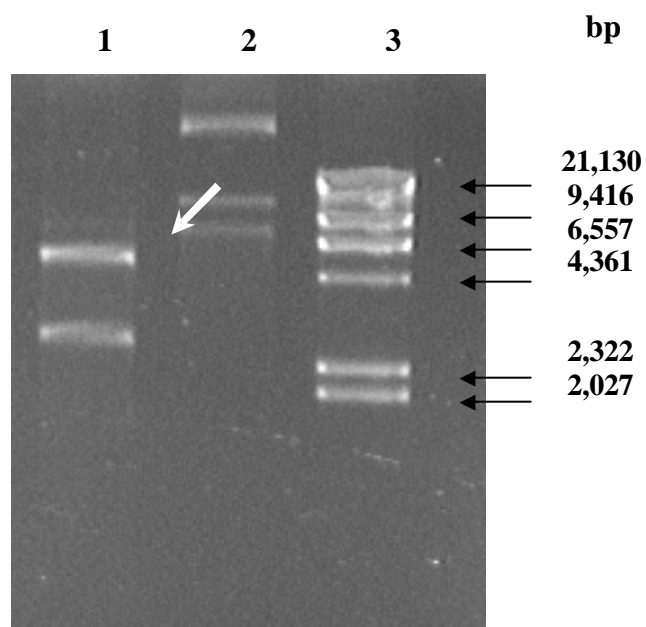


Figura 4. Fotografia do gel de agarose, corado com brometo de etídeo, após corrida eletroforética das amostras de DNA. Digestão do plasmídio pUCGC com a enzima *Hind* III, para obtenção do fragmento CGC. 1. pUCGC clivado com *Hind* III (a seta indica o fragmento CGC), 2. pUCGC não clivado, 3. ?*Hind* (50ng/ μ l)

4.2. TESTE DE SENSIBILIDADE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA L-CANAVANINA

Para a escolha das leveduras a serem utilizadas neste trabalho, foi realizado inicialmente um ensaio de sensibilidade, onde diferentes espécies de leveduras foram incubadas em meio de cultura mínimo (SD), acrescido de L-canavanina em diferentes concentrações crescentes (60, 100, 200, 250, 300 e 500 µg/mL). Essas culturas foram incubadas a 28°C com agitação de 100 rpm durante 5 dias, onde foi possível observar que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolitica*, *Hansenula anomala*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces bayanus* e *Issatchenia orientalis* apresentaram-se sensíveis à L-canavanina. As leveduras *Pichia pastoris*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis* e *Candida lusitaneae* por apresentarem resistência a altos níveis de L-canavanina foram ignoradas, uma vez que a possibilidade de integração do fragmento CGC nas mesmas era muito baixa (Tabela 6).

Tabela 6. Avaliação da sensibilidade de diferentes linhagens de leveduras à L-canavanina.

Concentração de canavanina (µg/ml)	60	100	200	250	300	500	PCR
<i>Candida glabrata</i>	R	R	R	S	S	S	+
<i>Candida lusitaneae</i>	R	R	R	R	R	R	-
<i>Candida tropicalis</i>	R	R	R	R	S	S	-
<i>Hansenula anomala</i>	S	S	S	S	S	S	-
<i>Issatchenia orientalis</i>	S	S	S	S	S	S	-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	R	R	R	R	R	R	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	S	S	S	S	S	S	-
<i>Pichia pastoris</i>	R	R	R	R	R	R	-

<i>Saccharomyces bayanus</i>	S	S	S	S	S	S	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S	S	S	S	S	S	+
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	S	S	S	S	S	S	-
<i>Yarrowia lipolitica</i>	S	S	S	S	S	S	-

4.3. COMPARAÇÃO DA HOMOLOGIA DO GENE *CAN1* DE *S. cerevisiae* EM DIFERENTES LEVEDURAS

Realizou-se análise por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) em todas as leveduras que apresentaram sensibilidade à L-canavanina, com o objetivo de detectar a homologia entre o fragmento CGC e o genoma das leveduras e detectar desta forma quais as leveduras que apresentariam recombinação homóloga com o fragmento CGC.

Para a detecção do gene *CAN1*, utilizaram-se os iniciadores específicos para a sequência do gene *CAN1* de *Saccharomyces cerevisiae* também utilizado na construção do plasmídeo integrativo pUCGC.

Como pode ser observado na Figura 5, apenas as leveduras *Saccharomyces bayanus*, *Candida glabrata* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram o gene *CAN 1* amplificado, e portanto foram submetidas à análise BLAST para verificar o grau de homologia entre o fragmento CGC e o genoma destas leveduras.

As espécies de leveduras que não apresentaram homologia por PCR foram ignoradas.

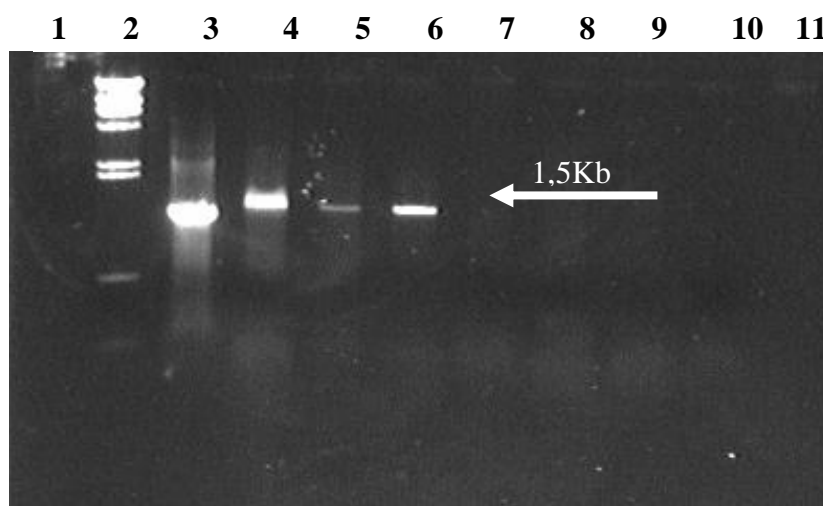


Figura 5. Fotografia do gel de agarose, corado com brometo de etídeo, após corrida eletroforética das amostras de DNA. Reação de PCR para verificação da presença do gene *CAN1* em diferentes leveduras. 1. Controle Negativo, 2. Hind (50ng/ μl), 3. Controle Positivo (linhagem S288c padrão de *S. cerevisiae*), 4. *Saccharomyces cerevisiae*, 5. *Candida glabrata*, 6. *Saccharomyces bayanus*, 7. *I. orientalis*, 8. *S. pombe*, 9. *Yarrowia lipolitica*, 10. *Hansenula anomala*, 11. *Kluyveromyces marxianus*,

Todas as leveduras que apresentaram sensibilidade à L-canavanina foram submetidas à análise por BLAST com o objetivo de verificar o grau de homologia ao fragmento de transformação CGC e assim confirmar os resultados obtidos pela análise de PCR. A comparação da homologia entre as seqüências do gene *CAN1* e as leveduras, foi realizada pelo sistema BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), onde se verificou que somente as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 6), *Saccharomyces bayanus* (Figura 7) e *Candida glabrata* (Figura 8) apresentaram alto grau de homologia, 100%, 82% e 72% respectivamente, sendo que as demais leveduras analisadas apresentaram graus de homologia não significativos. Desta maneira, estas três leveduras foram selecionadas para se prosseguir o trabalho.

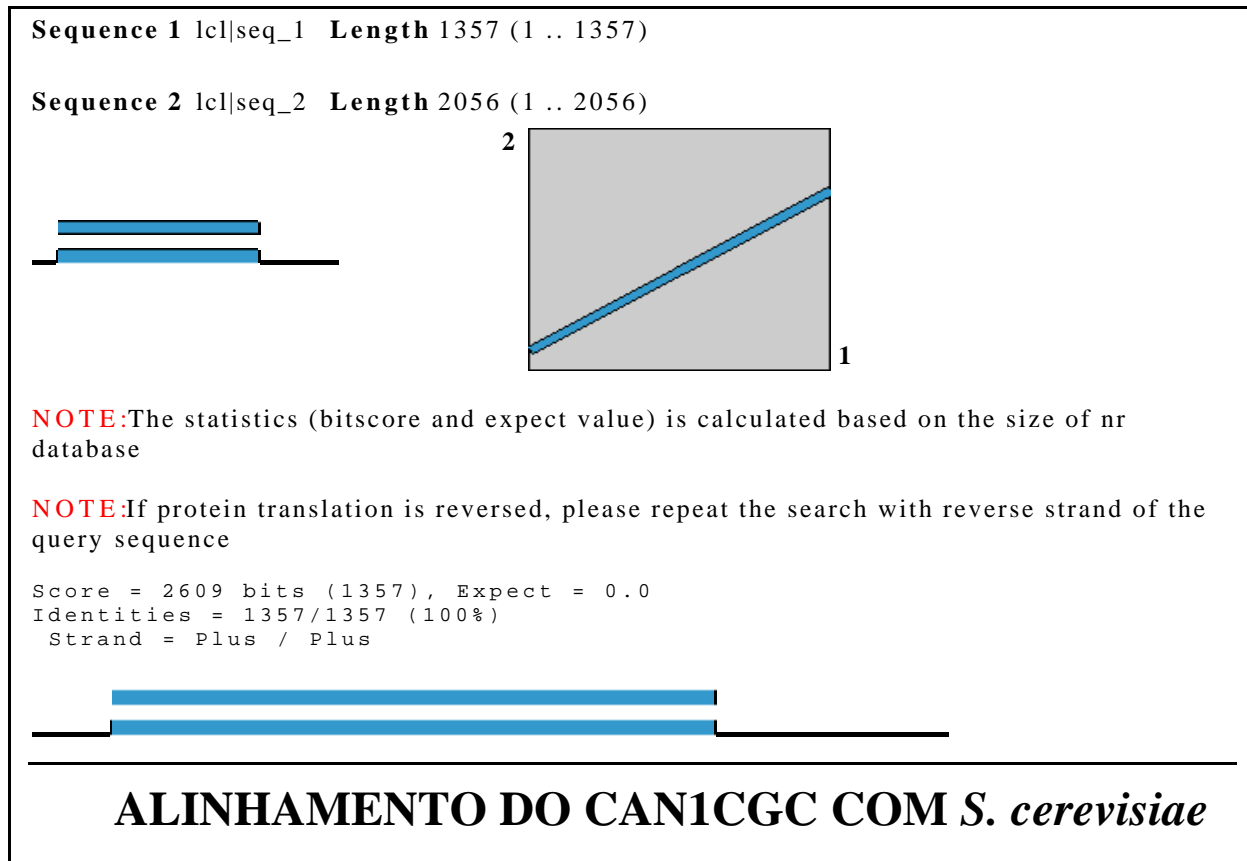


Figura 6. Análise de BLAST entre o gene *CAN1* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*

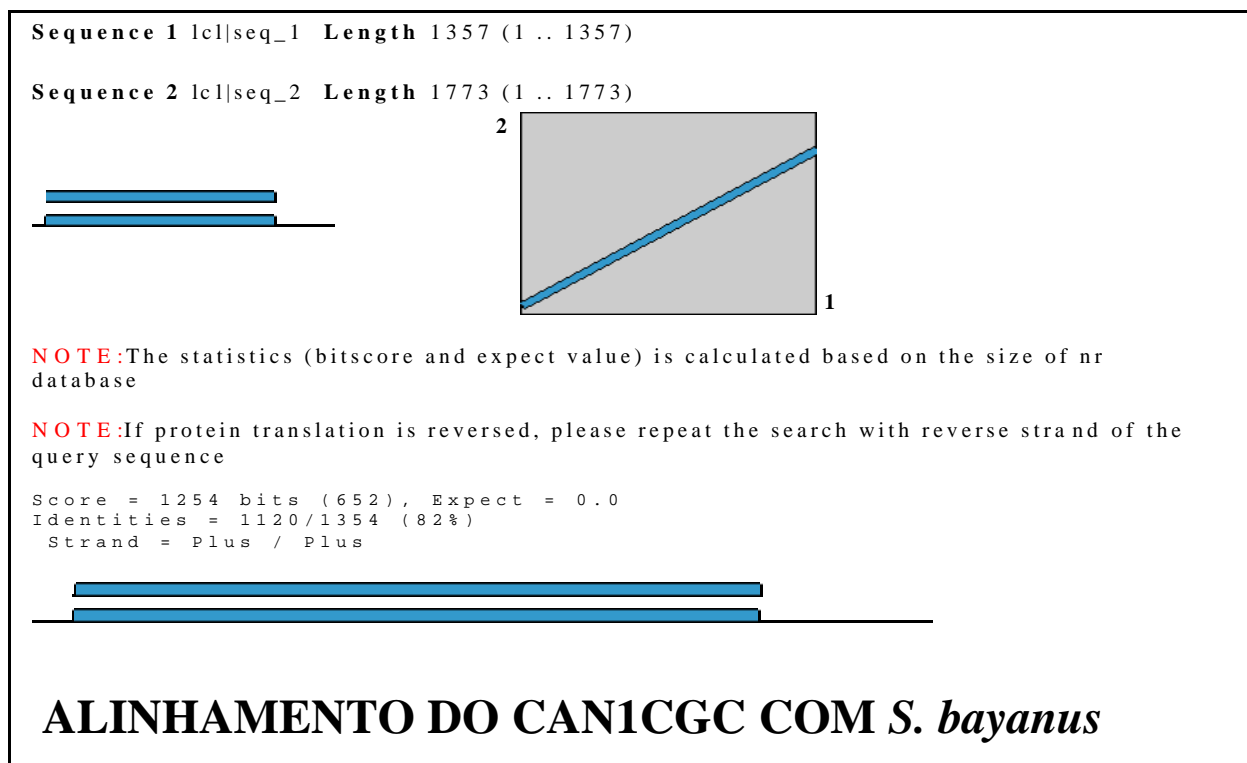


Figura 7. Análise de BLAST entre o gene *CAN1* e a levedura *Saccharomyces bayanus*

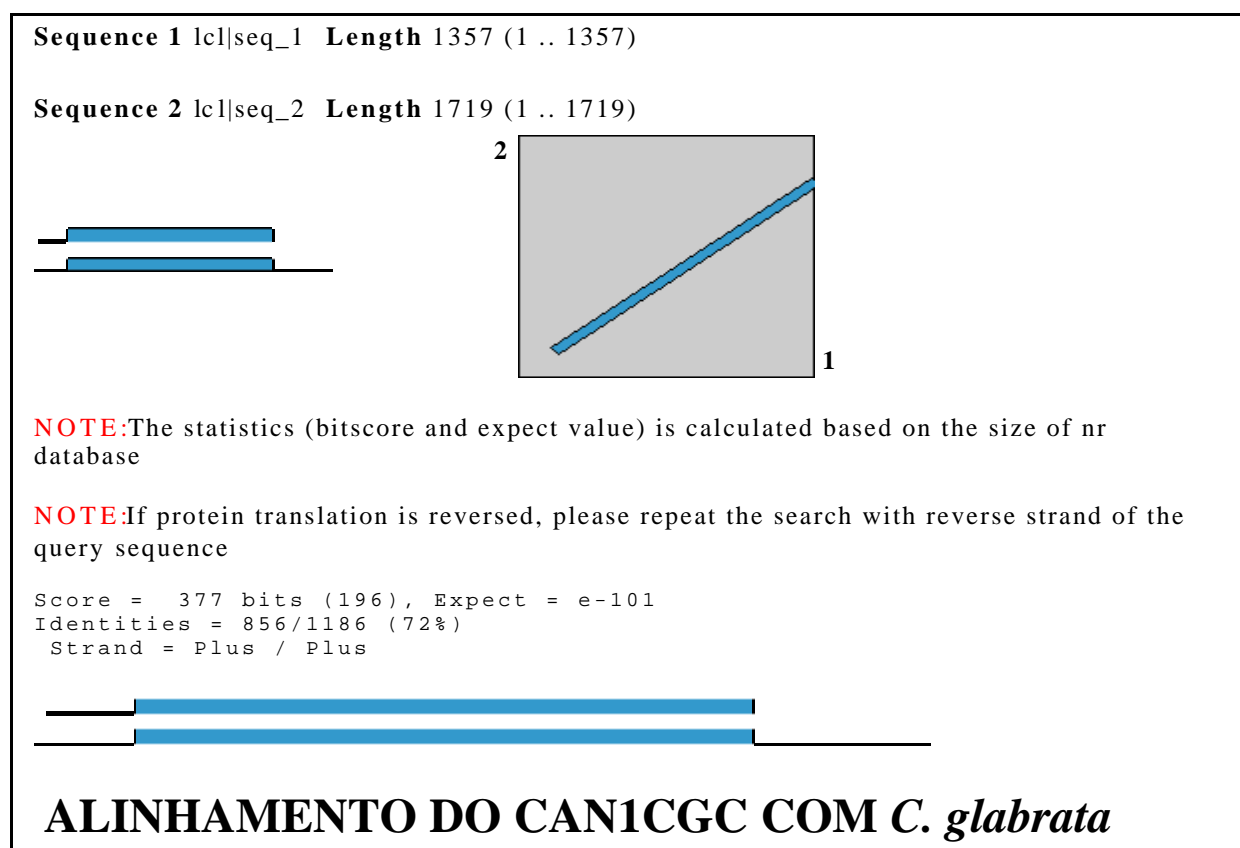


Figura 8. Análise de BLAST entre o gene *CAN1* e a levedura *Candida glabrata*

Realizaram-se também alinhamentos com a seqüência integral do gene *CAN1* de *Saccharomyces cerevisiae* utilizado para construção do vetor e as mesmas leveduras, onde pudemos verificar os mesmos resultados de homologia.

A busca por similaridade de seqüências de aminoácidos é realizada com o objetivo de identificar relações de evolução, estruturais e funcionais entre as seqüências que estão sendo estudadas. Esta busca é feita através de um alinhamento de seqüências, que é um processo computacional com o objetivo de dispor seqüências alinhadas de forma a ressaltar as similaridades entre elas e que permita dizer se as seqüências têm uma similaridade suficiente que justifique inferir que elas são homólogas. Embora os termos similaridade e homologia são muitas vezes confundidos, nesta situação eles possuem significados diferentes. Similaridade é uma quantidade que pode ser expressa em, por exemplo, porcentagem de identidade.

Homologia, por outro lado, se refere a uma conclusão tirada desses dados que dois genes tem uma história evolucionária comum.

4.4. TRANSFORMAÇÃO DAS LEVEDURAS SELECIONADAS COM O FRAGMENTO CGC E CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO NO GENOMA

As linhagens prototróficas das leveduras selecionadas pela presença do gene *CAN1* e sensíveis à L – canavanina foram submetidas à transformação com o fragmento CGC. Os transformantes foram selecionados através da aquisição de resistência à L-canavanina e observação de halo de degradação do amido (Figura 9, Figura 10 e Figura 11).



Figura 9. Clones da levedura *Saccharomyces cerevisiae* S288c transformada com o fragmento CGC que apresentaram halos de degradação do amido devido à expressão da glicoamilase recombinante (clone 1 – controle negativo; clone 2 S288c/CGC)

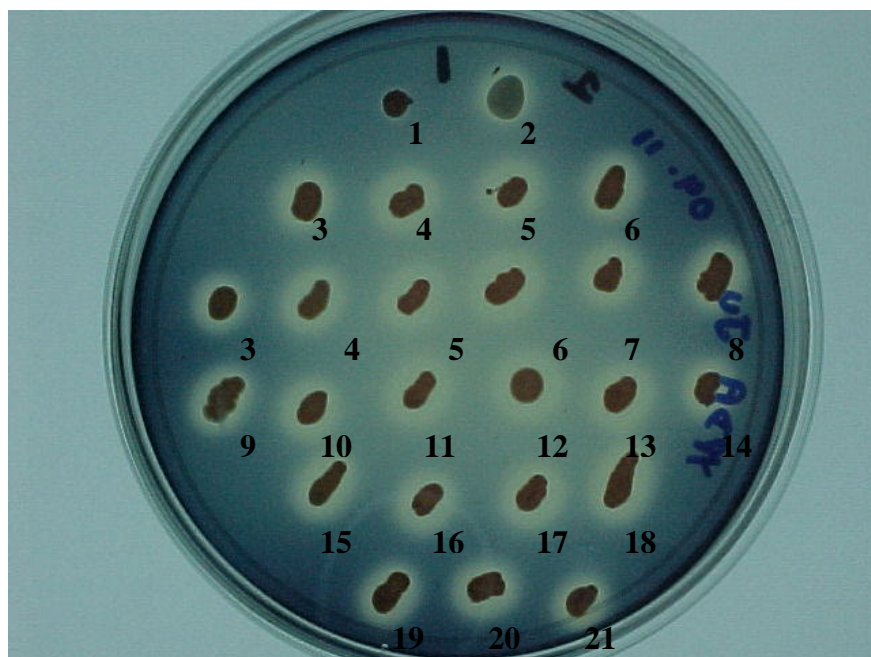


Figura 10. Clones da levedura *Saccharomyces bayanus* transformada com o fragmento CGC que apresentaram halos de degradação do amido devido à expressão da glicoamilase recombinante (clone 1 – controle negativo; clone 2 – S288c/CGC)

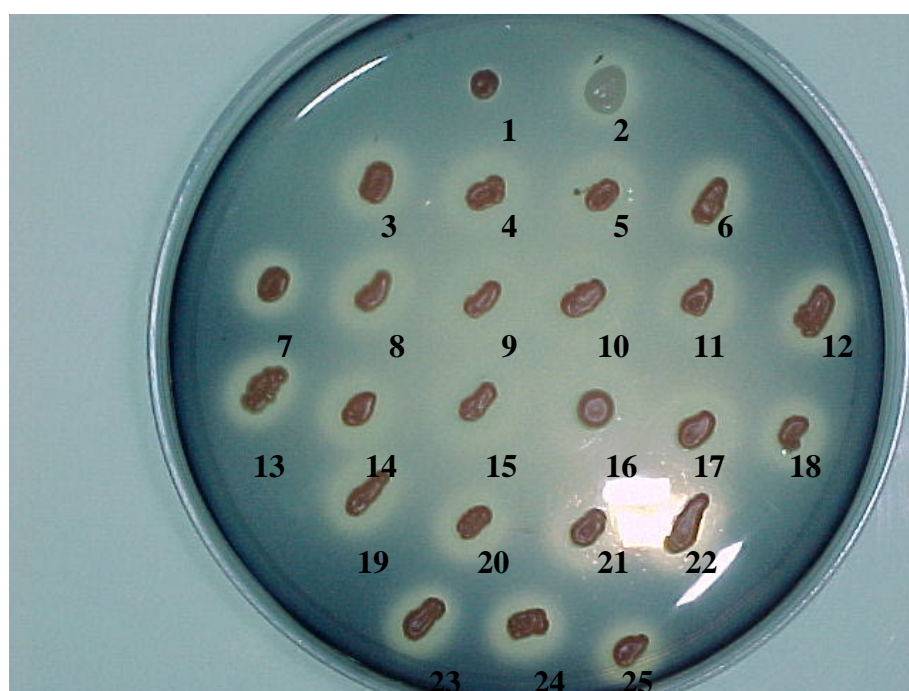


Figura 11. Clones da levedura *Candida glabrata* transformada com o fragmento CGC que apresentaram halos de amilólise devido à expressão da glicoamilase recombinante (clone 1 – controle negativo; clone 2 – S288c/CGC)

A confirmação da integração do fragmento CGC no genoma das leveduras transformantes foi realizada por PCR, através da amplificação da seqüência de DNA utilizando os iniciadores homólogos à seqüência do gene da permease da arginina, *CAN1*.

Um dos iniciadores (iniciador 1) corresponde à região 3' do fragmento CGC, sendo que o outro (iniciador 2) à região 5' do fragmento CGC. Esta reação apresenta um produto de 5,1 Kb (Figura 12), indicando a integração do fragmento CGC na seqüência do gene *CAN1*, na região de homologia entre o gene e o fragmento, sendo que este fato indica que a interrupção do gene leva à sua inatividade, conferindo resistência à L-canavanina.

Já as reações, feitas nas mesmas condições, porém, DNA das células não transformadas, apresentaram um produto de 1,5Kb, que indica apenas a amplificação da região do gene *CAN1* homóloga aos iniciadores empregados, sem a interrupção do gene. Nesse caso, a célula produz a permease da arginina, sendo sensível à L-canavanina (Figura 12).

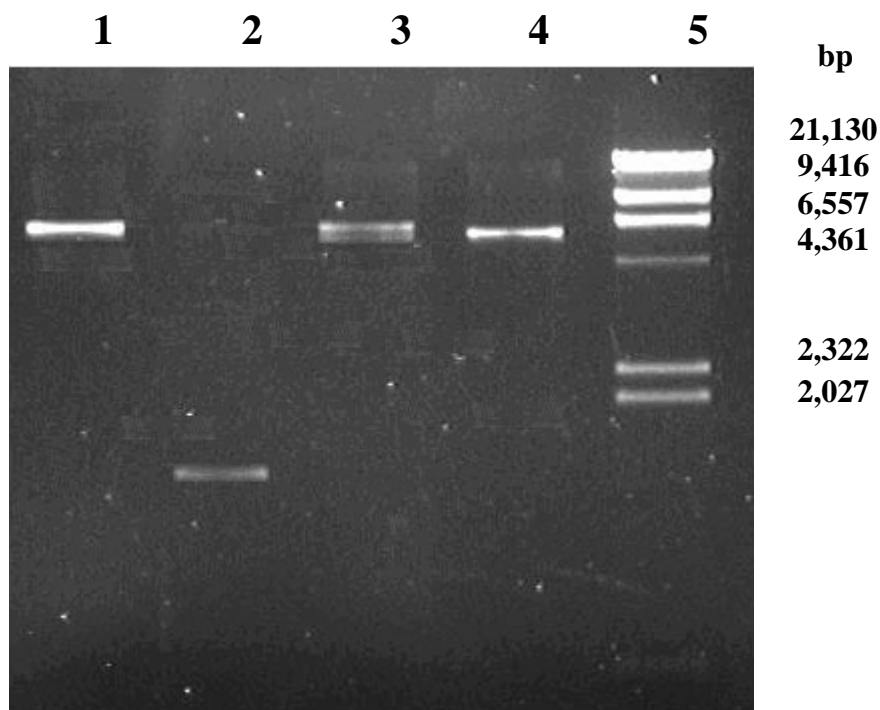


Figura 12. Fotografia do gel de agarose, corado com brometo de etídio, após corrida eletroforética das amostras de DNA. Análise de PCR para confirmação da integração do

fragmento CGC no genoma das leveduras: 1. *Saccharomyces cerevisiae*/CGC; 2. *Saccharomyces cerevisiae* não transformada ; 3. *Saccharomyces bayanus*/CGC , 4. *Candida glabrata* CGC; 5. ?Hind (50ng/ μ L).

4.5. ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO DO FRAGMENTO CGC EM DIFERENTES TIPOS DE LEVEDURAS

A transformação das leveduras foi realizada com 03 diferentes espécies, *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *Candida glabrata* que foram escolhidas, pois foram as únicas que apresentaram sensibilidade à L-canavanina e homologia ao gene *CANI*.

O fragmento CGC construído, obtido a partir de pUCGC, foi utilizado para a transformação das linhagens de levedura após seu tratamento com a enzima *HindIII* e obtenção somente do fragmento integrativo CGC.

Os resultados referentes à transformação de cada linhagem estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Eficiência de transformação das leveduras transformadas com o fragmento CGC (*).

Leveduras	N ^o total de transformantes	Eficiência de Transformação (n ^o transf./ μ g DNA)	Eficiência de Transformação (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57	11.4	100%
<i>Saccharomyces bayanus</i>	31	6.2	54%
<i>Candida glabrata</i>	25	5	43%

(*) Concentração de DNA a 5 μ g

4.6. ANÁLISE DA ESTABILIDADE DO FRAGMENTO CGC NAS DIFERENTES LEVEDURAS TRANSFORMADAS

A estabilidade do fragmento integrado no genoma das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* e *Candida glabrata*, durante o crescimento, foi analisada após 144 repiques sucessivos em meio completo YPD2% e semeadura em placas contendo meio sólido SD2% acrescido de L-canavanina, através do cálculo de perda por geração (tabela 8).

A porcentagem de perda do fenótipo de resistência à L-canavanina e, portanto do fragmento CGC integrado no genoma, foi zero em todas as linhagens transformadas analisadas. A estabilidade do sistema é, portanto, de 100% em todas as leveduras analisadas.

Conforme já mencionado, esta análise foi realizada por sucessivos repiques em meio não seletivo durante cerca de 144 gerações e, após este período, realizou-se análise por PCR, para confirmação que o fragmento ainda estava integrado no genoma das leveduras.

Os transformantes obtidos resultantes da transformação de *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *C. glabrata* com o sistema CGC, em todas as análises realizadas mostram-se ser 100% estáveis (tabela 8).

Tabela 8. Análise da estabilidade das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* e *Candida glabrata* apresentando o fragmento CGC

Linhagem	Nº de gerações em meio completo	% de Perda	% de Perda / Geração
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	144	0%	0%
<i>Saccharomyces bayanus</i>	144	0%	0%
<i>Candida glabrata</i>	144	0%	0%

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi utilizado um sistema de transformação genética construído anteriormente em nosso laboratório por Camargo, (1994), que permite a introdução de um gene exógeno de interesse em leveduras prototróficas contanto que sejam sensível à L-canavanina.

Esse sistema de transformação é composto por um fragmento linear de DNA de dupla fita, que contém um cassete de expressão formado pelo cDNA da glicoamilase de *A. awamori* sob regulação do promotor e terminador da fosfoglicerato quinase (*PGK*) de *S. cerevisiae*, flanqueado por seqüências do gene *CAN1* de *S. cerevisiae*. As extremidades do fragmento permitem recombinação gênica na região de homologia das leveduras que apresentam o gene *CAN1*. Esse fragmento, uma vez inserido provoca disrupção gênica do gene *CAN1*, fazendo com que a levedura não produza mais a permease da arginina, impedindo assim a entrada da L-canavanina na célula tornando-a resistente à droga. Sendo assim, podem ser selecionadas as células recombinantes independentemente da presença de marcas de auxotrofia.

Com a inserção do fragmento CGC (promotor PGK, seqüência sinal de *A. awamori*, seqüência estrutural do gene da glicoamilase de *A. awamori* e terminador de transcrição PGK) na região de homologia, a célula passa a ter um novo gene como parte de seu genoma. Dessa forma, passa a expressar um proteína que é produzida e/ou excretada pela célula, sendo que neste exemplo, os transformantes obtidos com o fragmento CGC excretam glicoamilase para o meio de cultura.

O uso de leveduras como organismo hospedeiro de genes heterólogos é conveniente, pois são microrganismos unicelulares que oferecem vantagens como fácil manipulação, fácil condição de crescimento e segurança. *Saccharomyces cerevisiae* é, sem dúvida, a levedura mais utilizada para ser hospedeira de expressão de proteínas heterólogas, mas já vem sendo

notadas algumas limitações para a utilização desta levedura, como por exemplo, os baixos níveis de expressão do produto de interesse, hiperglicosilação e retenção de proteínas dentro do espaço periplasmático. (Buckholz e Gleeson, 1991).

Tendo em vista a busca por um sistema mais eficiente de expressão de genes heterólogos, vem crescendo o número de leveduras não *Saccharomyces*, para serem utilizadas como hospedeiras, o que nos levou a testar a eficiência de transformação com o sistema CGC de diferentes leveduras de interesse biotecnológico.

Todas as leveduras selecionadas nesse trabalho são prototróficas e, primeiramente, foram testadas quanto à sensibilidade à L- canavanina. Foram usadas diferentes concentrações de L- canavanina (60, 100, 200, 250, 300 e 500? g/ml), sendo que algumas das leveduras se mostraram resistentes apenas a altas concentrações da mesma, como é o caso de *Candida tropicalis* e outras resistentes a todas as concentrações analisadas como a *Pichia pastoris*.

A inserção do fragmento CGC no genoma das células recombinantes, foi facilmente comprovada através dos produtos obtidos nas reações de amplificação por PCR. Quando é obtido um único produto, fragmento de DNA de 5,3Kb, demonstra a presença do cassete de expressão da glicoamilase inserido em todos os alelos *CAN 1*. Como um dos iniciadores é homólogo ao gene *CAN1* em uma região externa ao fragmento CGC, os resultados da amplificação por PCR indicam que a inserção do fragmento CGC ocorreu nos *loci* esperados. E verificou-se também que células que apresentavam um produto de PCR de apenas 1,5Kb não continham o cassete de expressão inserido em seu genoma.

Além disso, foram feitas análises de alinhamento de seqüências por BLAST onde apenas *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* e *Candida glabrata* apresentaram alto grau de homologia com o fragmento CGC de transformação, com 100%, 82% e 72% de homologia, respectivamente.

Após essas análises, as leveduras com alto grau de homologia ao fragmento CGC foram submetidas a processos de transformação. A linhagem S288c, considerada como referência de linhagem prototrófica, também foi transformada e a seleção ocorreu nas mesmas condições que as demais. Pode-se constatar que *S. cerevisiae* mostrou-se mais eficiente como hospedeira de transformação do que *Candida glabrata* e *Saccharomyces bayanus*, mesmo sabendo da proximidade filogenética que existe entre essas leveduras (Dujon, *et al.*, 2004).

Em leveduras como *Saccharomyces*, a recombinação é preferencialmente homóloga, podendo também ocorrer recombinação não homóloga e ilegítima, ou seja, recombinação entre seqüências curtas de homologia, porém com uma freqüência mais baixa que a homóloga (Tsukamoto *et al.*, 1996). Já em *Candida glabrata*, ocorrem os mesmos tipos de recombinação que em *S. cerevisiae*, sendo que já foram descritos altos níveis de recombinação não homóloga, caracterizando sítios específicos de não homologia. Isto abre um novo caminho, uma vez que pode ser explorado como novo método de mutagênese insercional (Cormack, *et al.*, 1998). Esses fatos confirmaram os resultados dos trabalhos anteriores, uma vez que as leveduras de gênero *Saccharomyces* apresentaram um maior eficiência de transformação em relação a *Candida glabrata*.

Todas as leveduras transformadas foram submetidas à análise de integração do gene repórter da glicoamilase. As colônias que cresceram em meio mínimo contendo L-canavanina foram repicadas em meio sólido com 0,5% de amido e submetidas a vapor de iodo, para observar a formação de halos de degradação do amido.

Os transformantes resistentes à L-canavanina obtidos com as três leveduras hospedeiras (*S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *C. glabrata*) produziram grandes halos de degradação do amido confirmando que o sistema CGC é capaz de transformar estas três leveduras. Ainda, fica comprovado que todo o sistema que garante a expressão e secreção do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *S. cerevisiae*, incluindo promotor *PGK*, terminador

de transcrição *PGK* de *S. cerevisiae*, bem como a sequência sinal do próprio gene da glicoamilase de *A. awamori* (presente no fragmento CGC) é funcional nestas duas outras leveduras.

Um fato relevante é que o fragmento é capaz de integrar em quantos genes *CAN1* existirem nas células, ou seja, independe da ploidia, pois a seleção se dá somente quando a célula adquire resistência à L-canavanina, deixando de ter qualquer gene *CAN1* funcional. De toda maneira é possível explicar a entrada do fragmento CGC em quantos genes *CAN1* existirem na célula, pois a seleção se dá somente quando a célula adquire resistência à L-canavanina, deixando de ter qualquer gene *CAN1* funcional. Com isso, pode-se afirmar que, quanto maior for o número de alelos *CAN1* presentes na célula, maior será o número de cópias inseridas do gene exógeno desejado na célula recombinante. Em muitos casos, esse fato pode ser de grande interesse, devido ao aumento da quantidade de proteína a ser produzida pela célula recombinante.

Para verificar a estabilidade do fragmento clonado na célula, a alteração fenotípica foi acompanhada ao longo de 144 gerações, e pudemos observar que a nova informação mantém-se integrada no genoma das células com 100% de estabilidade, não sendo possível detectar perda da atividade amilolítica e ou resistência à L-canavanina nas leveduras transformadas.

6. CONCLUSÕES

6.1. O sistema CGC é capaz de transformar outras leveduras além de *Saccharomyces cerevisiae*, como *Cândida glabrata* e *Saccharomyces bayanus*

6.2. Todos os transformantes obtidos com as linhagens *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *C. glabrata*, mostraram-se 100% estáveis.

6.3. Todas as seqüências que garantem o funcionamento adequado do cassete de expressão do cDNA da glicoamilase de *A. awamori* (promotor e terminador de transcrição *PGK* de *S. cerevisiae*, seqüência sinal e seqüência estrutural do cDNA da glicoamilase de *A. awamori*) adequadas para *S. cerevisiae* também se mostraram adequadas para *S. bayanus* e *C. glabrata*.

6.4. As células transformadas dispensam pressão seletiva para a manutenção da nova informação clonada, sendo a L-canavanina necessária apenas para efetuar a seleção inicial;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANATIDES, P.G. *et al.*, The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** **287**, 2185-2195, 2000.
- ARCANGIOLI, B. AND LESCURE, B. **EMBO J.** **4**, 2627-2633, 1985.
- BARR, P.J., POWER, M.D., LEE-NG, C.T., GIBSON, H.L., LUCIW, P.A. Expression of active human immunodeficiency virus reverse transcriptase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bio/Technology**. **5**: 486-489.1987.
- BELL, E.A. Toxic amino acids in the leguminosae. In: J.B. Harborne (ed.) **Phytochemical Ecology**, pp. 163-177. Academic Press, New York, 1972.
- BITTER, G.A., EGAN, K.E. Expression of interferon- from hybrid yeast *GPD* promoters containing upstream regulatory sequences from *GALI-GAL10* intergenic region. **Gene**. **69**: 193-207.1988.
- BOSINSON, T. The organic Constituents of Higher Plants. **Their Chemistry and Interrelationships**. 3rd Edition. Cordous Press, North Amherst, Mass. 1975.
- BROACH, J. R.; STRATHERN, J. N.; HICKS, J. B. Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the *CAN1* gene. **Gene**, **8**:121-33, 1979.
- BROACH, J.R. Construction of high copy yeast vectors using 2- μ m circle sequences. **Meth. Enzymol.** **101**: 307-325.1983.
- BUCKHOLZ RG, GLEESON MA. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Biotechnology**, **9(11)**:1067-72, 1991
- CAMARGO, M.E. Construção de um vetor para transformar levedura através da disrupção do gene *CAN1*. **Dissertação de mestrado**, ICB-USP. 1994. p.86
- CAMARGO, M.E., Sistema para transformação de leveduras industriais e detecção de atividade recombinogênica. **Tese de Doutorado**. ICB-USP. 2000. p.97.

CASTILHO-VALAVICIUS, B.A., TAKITA, M.A., THOMPSON, G.M., PIESTUN, V.S.

The molecular genetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Society of Genetics**, v. **44**, p. 301-309.1992.

CHANG, C.N., MATTEUCCI, M., PERRY, L.J., WULF, J.J., CHEN, C.I., HITZEMANN,

R.A. *Saccharomyces cerevisiae* secretes and correctly processes human interferon hybrid proteins containing yeast invertase signal peptides. **Mol. Cel. Biol.** **6**: 1812-1819.1986.

CLIFTON, D. AND FRAENKEL, D.G. **J. Biol. Chem.** **256**, 13074-13078, 1981.

COOPER, T.G. Transport in *Saccharomyces cerevisiae*: In: Strathern, J.N.; Jones, E. W.;

Broach, J.R. (eds). **The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression**. New York: Cold Speing Harbor Laboratory, 1982, p.399-461.

CORMACK B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. **Curr Opin Microbiol.** **1(4)**:406-10, 1998.

COUSENS, L.S., SHUSTER, J., GALLEGOS, C., KU, L., STEMPIEN, M.M., URDEA, M.S., SANCHEZ-PESCADOR, R., TAYLOR, A., TEKAMP-OLSON, P. High-level expression of proinsulin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene.** **61**: 265-275.1987.

DEMAIN, A.L. & SOLOMON, N.A. **Industrial microbiology: introducing an issue on how products useful to man are manufactured by micro-organisms.** **Science.** **245**: 43-51. 1981.

DOBSON, M.J., TUIITE, M.F., ROBERTS, N.A., KINGSMAN, A.J.KINGSMAN, S.M., PERKINS, R.E., CONROY, S.C., DUNBAR, B. AND FOTHERGILL, L.E. **Nucleic Acids Res.** **10**, 2625-2637, 1982.

DUJON, B. *et al.* Genome evolution in yeasts. **Nature** **430**: 35-44, 2004

- FOWDEN, L. Amino acids biosynthesis. In: J.B. Pridham and T. Swain (eds.) **Biosynthetic Pathways in Higher Plants**, pp. 73-99. Academic Press, New York, 1965
- FOWDEN, L., LEWIS, D., TRISTRAM, H. Amino acids: Occurrence, biosynthesis and analogue behaviour in plants. In N. Sunderland (ed.) **Perspectives in Experimental Biology**, Vol. 2 pp. 263-272. Pergamon Press Oxford. 1976.
- FOWDEN, L., LEWIS, D., TRISTRAM, H. Toxic amino acids as antimetabolites. **Adv. Enzymol** **29**: 89-163, 1967.
- FREELAND, W.J., AND JANZEN, D.H. Strategies in herbivory by mammals: The role of plant secondary compounds. **A. Nat.**, **108**:269-289, 1974.
- GIETZ, D.; ST. JEAN, A.; WOODS, R.; SCHIESTL, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. **Nucl. Acids. Res.**, **20**: 1425, 1992.
- GINIGER, E., VARNUM, S.M. AND PTASHNE, M. **Cell** **40**, 767-774, 1985.
- GOFFEAU A, *et al.*, The yeast genome directory. **Nature. Supplement to 387(29)**: 546, 1-105. 1996.
- GOFFEAU, A., *et al.* The yeast genome directory. **Nature**. **385**: 5, 1997.
- GUARENTE, L., **Cell** **36**, 799-800, 1984
- HABER, J.E.; PÂQUES, F. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biol. Rev.** **63**: 349-404, 1999.
- HAMMOND, J. R. M. **Brewer's Yeasts. In: The Yeasts. 2 ed. Academic Press. 1993. v. 5, cap.2.**
- HAWKSWORTH, D.L. AND MOUCHACCA, J. Ascomycete systematics in the nineties. In Hawksworth D.L. (ed). **Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties**. New York: Plenum Press. 1994. p. 3-11.

- HINNEN, A.; HICKS, J. B.; FINK, G. R. Transformation of yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **75**: 1929-33, 1978.
- HITZEMAN, R.A., HAGIE, F.E., LEVINE, H.L., GOEDDEL, D.V., AMMERER, G., HALL, B.D. Expression of a human gene for interferon in yeast. **Nature**. **293**: 717-722. 1981.
- HOFFMANN, W. Molecular Characterization of the *CAN1* Locus in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, **260**: 11831-7, 1985.
- HOPE, I.A. AND STRUHL, K. **Cell** **43**, 177-188, 1985.
- HOPE, I.A. AND STRUHL, K. **Cell** **46**, 885-894, 1986.
- HOROWITZ, N.H., SRB, A.M. GROWTH INHITION OF *Neurospora* by canavanine and its reversal. **J. Biol. Chem** **174**: 371-378, 1948.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the genome human genome. **Nature** **409**, 860-921, 2001.
- KINGSMAN, S.M. & KINGSMAN, A.J. Genetic Engineering: In **Introduction to gene analysis and exploitation in eukaryotes**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1988. p.57-92, cap3.
- KINGSMAN, S.M., KINGSMAN, A.J., DOBSON, M.J., MELLOR, J. AND ROBERTS, N.A. **Biotech and Genetic Eng. Reviews** **3**, 377-416,1985.
- LEHNINGER, A. L. **Principles of biochemistry: with an extended discussion of oxygen-binding proteins**. 2 ed. New York: Worth. 1993.
- LEWIN, B. Gene VII / Benjamin Lewin; trad. Henrique Ferreira *et al.*, Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.
- LODDER J, KHOUDOKORMOFF B, LANGEJAN A. Melibiose-fermenting baker's yeast hybrids. **Antonie Van Leeuwenhoek**. Suppl 35, 1969.

- MATĪJÈKOVÁ, A., SYCHRIVÁ, H. Biogenesis of *Candida albicans* Can1 permease express in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters** **408**: 89-93, 1997.
- MELLOR, J., DOBSON, M.J., ROBERTS, N.A., KINGSMAN, A.J. AND KINGSMAN, S.M. **Gene** **33**, 215-226, 1985
- MELLOR, J., DOBSON, M.J., ROBERTS, N.A., TUIITE, M.F., EMTAGE, J.S., WHITE, S., LOWE, P.A., PATEL, T., KINGSMAN A.J. AND KINGSMAN, S.M. **Gene** **24**, 1-14, 1983.
- MILLER, G.C. CONSIGLI, R.A. The effect of canavanine on cultured mouse cells. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **146**: 549-552. 1974.
- OGDEN, J.E., STANWAY, C., KIM, S., MELLOR, J., KINGSMAN, A.J. AND KINGSMAN, S.M. **Mol. Cell. Biol.** **6**, 4335-4343, 1986.
- OPEKAROVÁ, M.; CASPARI, T.; PINSON, B.; BRÉTHES, D.; TANNER, W. Post-translational fate of *CAN1* permease of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, **14**: 215-24, 1998.
- PRESCOTT, J.M., RAGLAND, R.S., STUTTS, A.L. Effects of carbon dioxide on the growth of *Streptococcus bovis* in the presence of various amino acids. **J. Bacteriol.** **73**: 133-138, 1957.
- RATSKIN, B., CARBON, J. Functional expression of cloned yeast DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **74**: 487-491.1977.
- RATSKIN, B., CARBON, J. Functional expression of cloned yeast DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **74**: 487-491.1980.
- REHR, S.S., FEENY, P.P. AND JANZEN, D.H. Chemical defense in central American non-antacadias. **J. Anim. Ecol.**, **42**: 405-416, 1973.
- RICHMOND, M.D. The diferential effect of arginine and cavanine on growt and enzyme formation in *Staphylococcus aureus* 524SC. **Biochem. J.** **73**: 155-167, 1959.

- ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: A Review. **Yeast**, **8**: 423-488, 1992.
- ROSENBERG, S., COIT, F., TEKAMP-OLSON, P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase derived expression cassettes for constitutive synthesis of heterologous proteins. **Meth. Enzymol.** **185**: 341-351.1990.
- ROSENTHAL, G.A. The Biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. **The Quartely Review of Biology**, **52**: 155-178, 1977.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.**
- SARACHER, A., GOERING, R.V., BIS, J.T. Differential effects of growth temperatures on inactivation and matution of *Candida albicans* by ultraviolet radiation. **Arch. Mikrobiol.**, **67**: 189-198, 1969.
- SCHENBERG, A.C.G., BONATELLI JR, R. Plasmídios de eucariontes. In: COSTA, S.O.P. ed. **Genética Molecular e de Microorganismos**, Editora Manole, São Paulo, p. 497-509.1987.
- SEASTON, A., INKSON, C. EDDY, A.A. The absorption of protons with specific amino acids and carbohydrates by yeast. **Biochem. J.**, **134**: 1031-1043, 1973.
- SHERMAN, F.; FINK, G. R.; LAWRENCE, C. W. **Methods in Yeast Genetics: laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1979.**
- SHUSTER, J.R. Regulated transcriptional systems for the production of proteins in yeast: Regulation by carbon source. In: BARR, P.J., BRAKE, A., VALENZUELA, P. **Yeast Genetic Engineering. Butterworth**, Boston, p. 83-108.1989.
- STRUHL, K.; STINCHCOMB, D. T., SCHERER, S.; DAVIS, R. W. High –frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **76**: 1035-9, 1979.

- THE *Arabidopsis* GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature** **408**, 796-815, 2000.
- THE *C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence of the *C. elegans* a platform for investigating biology. **Science** **282**, 2012-2018, 1988.
- THE MERCK INDEX. **The Merck Index**. New York, Martha Windholz. Merck, 1976. p.221.
- TSCHIERSCH, B. Non-competitive inhibition of enzymatic reactions by canavanine. **Tetrahedron Letters**, **28**: 3237-3241, 1966.
- TSUKAMOTO, Y.; KATO, J.; IKEDA, H. Effects of mutations of RAD50, RAD51, RAD52 and related genes on illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, **142**:383-391, 1996.
- TUITE, M.F., DOBSON, M.J., ROBERTS, N.A., KING, R.M., BURK, D.C., KINGSMAN, S.M., KINGSMAN, A.J. Regulated high efficiency expression of human interferon in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.** **1**: 603-606.1982.
- TUSE, D. Single cell protein: current status and future prospects. **Crit Rev Food Sci.** **19** (4): 273-325.1984.
- WAGENBACH, M., O'ROURKE, K., VITEZ, L., WIECZOREK, A., HOFFMAN, S., DURFEE, S., TEDESCO, J., STETLER, G. Synthesis of wild type and mutant hemoglobins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bio/Technology.** **9**: 57-61. 1991.
- WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1998.
- WALKER, J.B. Canavanine and homoarginine as antimetabolites of arginine and lysine in yeast and algae. **J. Biol. Chem.**, **212**: 207-215, 1955.

- WERY, J.; VERDOES, J.C. E OUYEN, A.J.J. Genetics of non-*Saccharomyces* industrial yeasts. In: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2 ed., Washington: ASM Press, 1999. p. 447-59.
- WHELAN, W.L.; GOCKE, E.; MANNEY, T.R. The *can1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*: fine structure analysis and forward mutation rates. **Genetics** **91**: 35-38, 1979.
- WILKIE, D. Selective inhibition of mitochondrial synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by canavanine. **J. Mol. Biol.**, **47**: 107-113, 1970.
- WOLK, K. Nonconventional yeasts in biotechnology: A Handbook. ed., Springer – Velarg Berlin Heidelberg. 1996.
- ZHU XL, WARD C, WEISSBACH A. Control of Herpes simplex virus thymidine kinase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast promoter sequence. **Mol Gen Genet.****194(1-2)**:31-41, 1984