



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Desenvolvimento de linhagem auxotrófica de *Pichia pastoris* para o metabolismo de leucina

Maritza Ocampo Betancur

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Co-orientadora: Dra. Viviane Castelo Branco Reis

Brasília, 2014

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Desenvolvimento de linhagem auxotrófica de *Pichia pastoris* para o metabolismo de leucina

Maritza Ocampo Betancur

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Co-orientadora: Dra. Viviane Castelo Branco Reis

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Brasília, 2014

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia celular,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação do professor
Fernando Araripe Gonçalves Torres com apoio financeiro da CAPES e FAP-DF.

Banca Examinadora

Professor Dr. Fernando Araripe G. Torres

Universidade de Brasília

Presidente da Banca

Dra. Lorena Derengowski

Universidade de Brasília

Examinadora Externa

Professora Dra. Nádia Skorupa Parachin

Universidade de Brasília

Examinadora Interna

Professora Dra. Lídia Maria P. de Moraes

Universidade de Brasília

Membro Suplente

“No fim tudo dá certo, e se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”

Fernando Sabino

*Dedico esta conquista a todas aquelas pessoas que
de alguma maneira me ajudaram a realizá-la.
Em especial aos meus pais por terem me
ensinado o valor dos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela oportunidade de estar aqui, não só me formando academicamente, mas também crescendo como pessoa, aprendendo outra língua, conhecendo outra cultura, vivendo novas experiências.

A minha família pelo constante apoio, porque apesar da distância sempre estiveram presentes me dando força para conseguir concluir este meu sonho.

Ao meu pai Alonso por seu exemplo de vida.

À minha querida mãe Maria Eugenia por suas palavras de amor e seus sábios conselhos nos momentos mais difíceis.

À minha irmã pelo carinho e por fazer minha vida mais divertida.

Ao professor Fernando Araripe pela oportunidade, por acreditar em mim, pelos ensinamentos e por toda sua ajuda no meu processo de adaptação neste país.

À Viviane Reis pela orientação durante todo o projeto, sempre disposta a ensinar e tirar dúvidas. Obrigada pela confiança depositada em mim.

À professora Lídia Pepe Moraes pelos ensinamentos e ajuda na bancada.

Às amigas do colégio Elizabeth, Christina e Karla por estarem sempre disponíveis para me escutar quando mais o precisava.

À amiga Tatiana pela convivência. Obrigada por tudo!!

Aos amigos Hernán, Glória, Laura e Juan por terem me recebido quando cheguei ao Brasil e pelos momentos de distração.

A todos os colegas do laboratório Biomol, em especial aos amigos do Lab 2 que mais que companheiros são minha família aqui: Juliana, Luíza, Gisele, Túlio, Chris, Marciano, Myrna, Daniel, Bruno, Gabi, Raquel e Danuza.

Aos amigos Luanne, Zé Carlos, Osmar, Carol e Alyson, fazem falta no laboratório.

Aos funcionários da Biomol Ivonildes, Fátima e Thompson pelo apoio técnico. Sem sua ajuda seria muito difícil realizar qualquer projeto.

A todos os professores que participaram da minha formação.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência para a correção do meu trabalho.

À Capes e à FAP-DF pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

“Não vemos as coisas como elas são, mas como nós somos.”

Anais Nin

ÍNDICE

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e símbolos	v
Resumo	vii
Abstract	viii
Resumen	ix
Introdução	1
<i>P. pastoris</i>	1
Vetores de expressão	3
Promotores	3
Marcas de seleção	4
Linhagens hospedeiras de <i>P. pastoris</i>	5
Sistema Cre/loxP	7
Via de síntese de leucina	8
1 Objetivos	10
1.1 Objetivo geral	10
1.2 Metas	10
2 Estratégia	11
2.1 Construção de cassete de deleção	11
2.2 Construção de vetor para expressão de CreA	13
2.3 Construção de vetor contendo gene <i>LEU2</i>	13
3 Materiais e Métodos	15
3.1 Materiais	15
3.1.1 Microrganismos	15

3.1.2 Meios de cultura	16
3.1.3 Tampões e soluções	18
3.1.4 Marcadores moleculares para DNA	22
3.1.5 Kits	22
3.1.6 Enzimas de restrição	23
3.1.7 Vetores	23
3.1.8 Oligonucleotídeos (<i>primers</i>)	25
3.2 Métodos	26
3.2.1 Cultivo de micro-organismos	26
3.2.2 Preparação de células bacterianas competentes	26
3.2.3 Ligação de fragmentos de DNA	26
3.2.4 Transformação bacteriana por choque térmico	27
3.2.5 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)	27
3.2.6 Preparação de DNA plasmidial em grande escala (maxiprep)	28
3.2.7 Digestão de DNA com enzimas de restrição	28
3.2.8 Análise eletroforética de DNA	29
3.2.9 Purificação e eluição de fragmentos de DNA	29
3.2.10 Precipitação de DNA	29
3.2.11 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> (vetores integrativos)	29
3.2.12 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> (vetores autorreplicativos)	30
3.2.13 Avaliação do crescimento em meio líquido	31
3.2.14 Extração de DNA total de levedura	31
3.2.15 Análise de fluorescência no Typhoon scanner	31
3.2.16 Indução e expressão de proteínas recombinantes	32
3.2.17 Microscopia de fluorescência	32

4 Resultados	33
4.1 Clonagem do gene <i>LEU2</i>	33
4.2 Construção do cassete de deleção	35
4.3 Determinação das concentrações de G418 e higromicina B	40
4.4 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> X-33	41
4.5 Seleção de clones Leu ⁻	42
4.6 Confirmação da deleção do gene <i>LEU2</i>	45
4.7 Construção de vetor para expressão da recombinase CreA	48
4.8 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> LK e reciclagem da marca <i>kan^R</i>	56
4.9 Avaliação da recuperação da prototrofia	59
4.10 Construção de vetor pGFP-L2	60
4.11 Transformação de <i>P. pastoris</i> M12 com o vetor pGFP-L2	66
5 Discussão	70
6 Conclusões e perspectivas	81
7 Referências	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de ruptura gênica.	6
Figura 2. Sistema <i>Cre/loxP</i> .	8
Figura 3. Via de biossíntese dos aminoácidos leucina, valina e isoleucina em <i>P. pastoris</i> .	9
Figura 4. Estratégia para a criação de uma linhagem de <i>P. pastoris</i> <i>Leu⁻</i> e para a construção de um vetor contendo o gene <i>LEU2</i> como marca de seleção.	11
Figura 5. Etapas para a construção do cassete de deleção utilizado na ruptura do gene <i>LEU2</i> no genoma de <i>P. pastoris</i> .	12
Figura 6. Remoção da marca dominante do genoma de <i>P. pastoris</i> <i>leu2::kan</i> utilizando a recombinase <i>CreA</i> expressa pelo vetor pYRCre2.	13
Figura 7. Construção do vetor pGFP-L2 para expressão intracelular de proteína verde fluorescente em <i>P. pastoris leu2</i> .	14
Figura 8. Sequência do fragmento amplificado com os primers PpLeu-F1 e PpLeuR-2.	33
Figura 9. Amplificação por PCR dos cassetes <i>kanloxP</i> e <i>zeoloxP</i> e do gene <i>LEU2</i> de <i>P. pastoris</i> .	34
Figura 10. Clonagem do gene <i>LEU2</i> no vetor pGEM-T Easy.	35
Figura 11. Sequência do fragmento amplificado com os primers ZeoBlas-F3 e ZeoBlas-R3 a partir do vetor pPICK α .	36
Figura 12. Sequência do fragmento amplificado com os primers ZeoBlas-F3 e ZeoBlas-R3 a partir do vetor pPICZ α A.	37
Figura 13. Linearização do vetor pGEM-LEU.	38
Figura 14. Clonagem dos cassetes <i>kanloxP</i> e <i>zeoloxP</i> no vetor pGEM-LEU.	39
Figura 15. Determinação da concentração adequada da droga G418.	40
Figura 16. Determinação da concentração adequada da droga higromicina B.	41
Figura 17. Resultado da transformação de <i>P. pastoris</i> X-33 com os	42

cassetes de deleção LEU Δ kan e LEU Δ zeo.

Figura 18. Seleção de clones Leu ⁻ após transformação com o cassette LEU Δ kan.	43
Figura 19. Seleção de clones Leu ⁻ após transformação com o cassette LEU Δ zeo.	43
Figura 20. Crescimento dos clones transformantes em meio mínimo suplementado com leucina 0,05% e isoleucina 0,05%.	44
Figura 21. Crescimento de <i>P. pastoris</i> X-33 e do clone Leu ⁻ em meio mínimo com e sem sulfato de amônio.	45
Figura 22. Sítios de anelamento dos <i>primers</i> utilizados para confirmar deleção do gene <i>LEU2</i> e tamanhos dos fragmentos que seriam amplificados.	46
Figura 23. PCR para confirmar deleção do gene <i>LEU2</i> .	47
Figura 24. Mapa físico do vetor pYRCre.	48
Figura 25. Remoção do P _{GALI} no pYRCre e amplificação por PCR do P _{TEF1} .	49
Figura 26. Clonagem do P _{TEF1} no pCR-Blunt.	50
Figura 27. Clonagem do P _{TEF1} no pYRCre (miniprep).	51
Figura 28. Clonagem do P _{TEF1} no pYRCre (digestão).	51
Figura 29. Sítios de anelamento dos <i>primers</i> para amplificar um fragmento de ~5,0 kb com o fim de determinar a orientação do P _{TEF1} no pYRCre.	52
Figura 30. PCR para determinar orientação do P _{TEF1} no pYRCre.	53
Figura 31. Sítios de anelamento dos <i>primers</i> para amplificar um fragmento de ~2,3 kb com o fim de determinar a orientação do P _{TEF1} no pYRCre.	54
Figura 32. PCR para confirmar orientação do P _{TEF1} no sentido anti-horário no vetor pYRCre2.	55
Figura 33. Mapa físico do vetor pYRCre2.	55
Figura 34. Transformação com o vetor pYRCre2.	56

Figura 35. Confirmação da remoção da marca de seleção dominante.	57
Figura 36. PCR para confirmar a remoção da marca de seleção dominante.	58
Figura 37. Comportamento das linhagens auxotróficas em relação à assimilação de leucina.	59
Figura 38. Mapa físico do vetor pPIC9-eGFP.	60
Figura 39. Remoção do gene <i>HIS4</i> do vetor pPIC9-eGFP.	61
Figura 40. Clonagem do gene <i>LEU2</i> no pPIC9-eGFP.	62
Figura 41. Obtenção do gene <i>eGFP</i> e remoção do peptídeo sinal do fator alfa do vetor pPIC-LEU.	63
Figura 42. Clonagem do gene <i>eGFP</i> no pPIC-LEU.	64
Figura 43. Orientação do gene <i>LEU2</i> no vetor pGFP-L2.	65
Figura 44. Mapa físico do vetor pGFP-L2.	65
Figura 45. Curva de crescimento das linhagens M12 e X-33 em meio YPD.	66
Figura 46. Transformação com o vetor pGFP-L2.	67
Figura 47. Expressão intracelular de eGFP (Typhoon).	68
Figura 48. Expressão intracelular de eGFP (Microscopia).	69
Figura 49. Um resumo da via de biossíntese de isoleucina.	74
Figura 50. Espectros de excitação e emissão da GFP.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais linhagens hospedeiras de <i>P. pastoris</i> .	5
Tabela 2. Enzimas de restrição utilizadas.	23
Tabela 3. Vetores utilizados.	24
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados.	25
Tabela 5. Genes de vias biossintéticas mutagenizados ou deletados em <i>P. pastoris</i> .	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	adenina
C	citossina
CFU	<i>colony-forming unit</i>
cm	centímetro
Da	Dalton
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
G	guanina
g	grama
<i>g</i>	força gravitacional
h	hora
Hyg B	higromicina B
kb	quilobase
L	litro
Leu	leucina
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
OD ₆₀₀	densidade celular óptica medida a 600 nm
pb	par de base

PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
p/v	peso por volume
RNase A	ribonuclease A
rpm	rotações por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
T	timina
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
U	unidade
v	volume
V	volts
v/v	volume por volume
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
°C	graus Celsius
μF	microfarad
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
Ω	ohm

RESUMO

A levedura *Pichia pastoris* tem sido amplamente utilizada na produção de proteínas recombinantes devido a características como fácil manipulação, rápido crescimento e capacidade de fazer modificações pós-traducionais mais similares às dos mamíferos. Apesar do vasto uso desta levedura como sistema de expressão, há poucas marcas de seleção disponíveis para sua manipulação genética. As marcas existentes podem ser auxotróficas (genes de vias biossintéticas como *HIS4*, *ARG4*, *URA3*, *ADE1*, dentre outros) ou dominantes (geralmente genes que conferem resistência a drogas). O limitado número de marcas seletivas atualmente disponíveis restringe a construção de cepas de *P. pastoris* contendo mais de uma modificação genética. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi interromper, pela primeira vez, o gene *LEU2* no genoma de *P. pastoris* com o fim de gerar uma linhagem auxotrófica para o aminoácido leucina que pudesse ser utilizada como hospedeira para vetores contendo este gene como marca de seleção. A ruptura gênica foi obtida pela transformação da levedura com um cassete de expressão contendo os genes *kan^R* (resistência a kanamicina/G418) ou *Sh ble* (resistência a zeocina) flanqueados por regiões 5' e 3' do gene *LEU2* para promover a recombinação homóloga neste *locus*. Para construir esse cassete de deleção o gene clonado *LEU2* teve um fragmento de aproximadamente 400 pb excisado após digestão com enzimas de restrição sendo substituído pelo cassete de expressão flanqueado por sequências *loxP*. Após transformação e seleção de mutantes auxotróficos, a marca dominante foi removida. Para tanto, a levedura foi transformada com um vetor contendo o gene que codifica para a proteína CreA, uma recombinase sítio-específica que catalisa a reação de recombinação entre duas sequências *loxP*. Finalmente, para testar esta nova linhagem, foi construído um vetor contendo *eGFP* como gene repórter e o gene *LEU2* como marca de seleção. A transformação da linhagem auxotrófica *leu2* com esse vetor confirmou a recuperação da prototrofia e a capacidade da levedura para produzir a proteína heteróloga intracelularmente.

ABSTRACT

The yeast *Pichia pastoris* has been widely used for the production of recombinant proteins due to several characteristics such as easy genetic manipulation, fast growth and the ability to carry out post-translational modifications similarly to mammals. Despite the wide use of *Pichia pastoris* as expression system there are few selectable markers available for its genetic manipulation. The existing markers can be auxotrophic (genes of biosynthetic pathways, for example *HIS4*, *ARG4*, *URA3*, *ADE1*, among others) or dominant (mainly genes that confer drug resistance). The limited number of available selectable markers restricts the construction of strains with more than one recombinant modification. The aim of this study was to interrupt, for the first time, the *LEU2* gene in the *P. pastoris* genome to generate an auxotrophic strain for the amino acid leucine which could be used as host strain for vectors carrying the *LEU2* gene as selectable marker. The disruption was achieved transforming the yeast with an expression cassette that contained the *kan^R* (kanamycin/G418 resistance) or *Sh ble* genes (zeocin resistance) flanked by regions from the *LEU2* gene to promote homologous recombination at that *locus* in the *P. pastoris* genome. To construct that deletion cassette the cloned *LEU2* gene had an excised fragment of approximately 400 bp after digestion with restriction enzymes. That fragment was substituted by the expression cassette flanked by *loxP* sequences. After transformation and selection of auxotrophic mutants the dominant marker was removed. To accomplish this, the yeast was transformed with a vector carrying the gene that codes for the CreA protein, a site-specific recombinase that catalyzes the recombination reaction between two *loxP* sequences. Finally, to test the new strain, it was constructed a vector containing *eGFP* as a reporter gene and the *LEU2* gene as a selectable marker. Transformation of *P. pastoris leu2* with that vector confirmed the recovery of the prototrophy and the ability of the yeast to produce the intracellular heterologous protein.

RESUMEN

La levadura *Pichia pastoris* ha sido ampliamente utilizada para la producción de proteínas recombinantes debido a características como fácil manipulación, rápido crecimiento y la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales similares a las de los eucariotas. A pesar del gran uso de esta levadura como sistema de expresión hay pocas marcas de selección disponibles para su manipulación genética. Las marcas existentes pueden ser auxotróficas (genes de vías biosintéticas como *HIS4*, *ARG4*, *URA3*, *ADE1*, entre otros) o dominantes (principalmente genes que confieren resistencia a drogas). El limitado número de marcas de selección disponibles actualmente restringe la construcción de cepas de *P. pastoris* con más de una modificación recombinante. En este contexto, el objetivo de este estudio fue interrumpir, por primera vez, el gen *LEU2* en el genoma de *P. pastoris* con el fin de generar una cepa auxotrófica para el aminoácido leucina que pudiera ser utilizada como hospedera para vectores que tengan el gen *LEU2* como marca de selección. La ruptura se logró al transformar la levadura con un casete de expresión que contenía el gen *kan^R* (resistencia a kanamicina/G418) o el gen *Sh ble* (resistencia a zeocina) flanqueado por regiones del gen *LEU2* para promover recombinación homóloga en ese *locus* del genoma de *P. pastoris*. Para esto se clonó el gen *LEU2* y se digirió con enzimas de restricción para retirar un fragmento de aproximadamente 400 pb el cual se reemplazó por el casete de expresión flanqueado por secuencias *loxP*. Después de la transformación y selección de mutantes auxotróficos se removió la marca dominante. Para esto se transformó la levadura con un vector que contenía el gen que codifica para la proteína CreA, una recombinasa sitio-específica que cataliza la reacción de recombinación entre dos secuencias *loxP*. Finalmente para evaluar la nueva cepa se construyó un vector que contenía el gen *eGFP* como reportero y el gen *LEU2* como marca de selección. La transformación de *P. pastoris leu2* con este vector confirmó la recuperación de la prototrofia y la capacidad de la levadura para producir la proteína heteróloga intracelularmente.

INTRODUÇÃO

Pichia pastoris

Por mais de 20 anos a expressão heteróloga baseada em leveduras tem sido utilizada na produção e secreção de proteínas recombinantes de humanos, animais, plantas, bactérias, fungos e vírus. Em muitos casos, as leveduras foram usadas para produzir proteínas heterólogas que não podiam ser isoladas em quantidades suficientes a partir da fonte tradicional assim como proteínas desenhadas especialmente que não são encontradas na natureza (DAMASCENO et al., 2012). Uma das leveduras mais empregadas para expressão heteróloga é *Pichia pastoris*. Trata-se de uma levedura metilotrófica, ou seja, é capaz de crescer em metanol como única fonte de carbono. Pertence ao grupo dos ascomicetos, é homotética e haploide a menos que seja submetida a condições de limitação por nitrogênio (CELIK e CALIK, 2012).

Dentre as características apresentadas por *P. pastoris* como sistema de expressão destaca-se a sua fácil manipulação genética — as técnicas necessárias para fazer modificações no nível molecular são similares àquelas utilizadas em *Saccharomyces cerevisiae*, um dos sistemas experimentais mais bem caracterizados (CREGG et al., 2000). Outra propriedade é a habilidade de crescer (e expressar genes heterólogos) em altas densidades celulares podendo alcançar até 200 g/L de peso seco durante uma fermentação em batelada alimentada com limitação de glicose (HEYLAND et al., 2010). Também possui a capacidade de produzir altos níveis de proteínas recombinantes, por exemplo, 14,8 g/L de colágeno de rato foram produzidos em uma fermentação em batelada alimentada utilizando um clone contendo 15 cópias integradas do gene heterólogo (WERTEN et al., 1999). Como os níveis de proteínas endógenas que *P. pastoris* secreta ao meio são muito baixos, a produção extracelular de proteínas recombinantes é um primeiro passo no processo de purificação da proteína de interesse (CREGG et al., 2000). Por último, a levedura tem a habilidade de realizar modificações pós-traducionais como clivagem proteolítica, glicosilação e formação de ligações dissulfeto (LIN CEREGHINO et al., 2002). Todas estas vantagens fazem com que atualmente *P. pastoris* seja a plataforma escolhida para estudar a produção de várias proteínas

de interesse industrial, como a transglutaminase de milho (LI et al., 2013) e a quimosina B bovina (NOSEDA et al., 2013), que têm aplicações na indústria alimentícia.

Aproximadamente 40 anos atrás foi descoberta a capacidade de algumas espécies de leveduras de crescer em metanol (OGATA et al., 1969). Imediatamente, houve interesse em utilizar esses micro-organismos na produção de *single-cell protein* (SCP) para alimentação animal devido ao baixo custo da síntese de metanol a partir de gás natural metano. Durante os anos 70 a companhia Phillips Petroleum desenvolveu meios de cultura e métodos para crescer *P. pastoris* em metanol de maneira contínua e a altas densidades celulares. Entretanto, o preço do metano aumentou drasticamente devido à crise do petróleo. Isto, junto com a diminuição do preço da soja que era a principal fonte alternativa de proteína para ração animal, fez com que a produção de SCP não fosse economicamente viável. Posteriormente, nos anos 80, esta mesma companhia, em parceria com o Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA), desenvolveu *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga (CREGG et al., 2000). Atualmente o sistema está patenteado por meio da Research Corporation Technologies (Tucson, AZ, USA) e a empresa Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) disponibiliza o kit de expressão para seu uso em pesquisa.

A primeira etapa na via de utilização do metanol é a oxidação deste álcool a formaldeído gerando peróxido de hidrogênio, reação catalisada pela enzima álcool oxidase (AOX). *P. pastoris* possui dois genes que codificam para esta enzima: *AOX1* e *AOX2*. O primeiro é responsável pela maioria da álcool oxidase expressa na célula. A afinidade de AOX pelo O₂ é baixa, o que é compensado com a síntese de grandes quantidades da enzima. Quando a levedura é crescida em metanol, AOX representa 35% da proteína total celular, porém, em culturas crescidas em glicose, etanol ou glicerol sua expressão é indetectável (CREGG et al., 2000; POTVIN et al., 2012).

P. pastoris pode ser modificada geneticamente para produzir proteínas tanto para pesquisa básica quanto para usos industriais (LIN CEREGHINO et al., 2002). A expressão de um gene heterólogo em *P. pastoris* requer três etapas básicas: a inserção do gene em um vetor de expressão; a integração desse vetor dentro do genoma da levedura e a seleção de clones que potencialmente estiverem expressando o gene de interesse (LI et al., 2007).

Vetores de expressão

Os vetores de expressão para *P. pastoris* possuem um cassete de expressão contendo obrigatoriamente os seguintes elementos: um promotor, uma sequência terminadora da transcrição e, entre eles, um ou mais sítios de restrição para a clonagem do gene heterólogo. Para a secreção de proteínas recombinantes, alguns cassetes de expressão contêm sinais de secreção como o da fosfatase ácida de *P. pastoris* ou o fator alfa de *S. cerevisiae*. Outro elemento presente nestes vetores é uma marca de seleção que permita a identificação de clones transformantes. Como as etapas de clonagem geralmente são realizadas em *E. coli*, os vetores para *Pichia* possuem uma origem de replicação para bactéria além de uma marca de seleção para transformação em ambos os organismos (CREGG et al., 2000; LI et al., 2007).

Promotores

Os promotores utilizados nos vetores de expressão para *P. pastoris* podem ser induzíveis ou constitutivos. Entre os induzíveis, o mais usado é o promotor do gene *AOX1* graças a sua força e por ser altamente regulado. Usando-se o P_{AOX1} a transcrição do gene heterólogo é controlada por um mecanismo de repressão/desrepressão. A repressão pela fonte inicial de carbono (glicerol) garante uma alta densidade celular antes de começar a produção da proteína após indução com metanol (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; LI et al., 2007). Outros promotores induzíveis são os dos genes que codificam a enzima formaldeído desidrogenase (P_{FLDI}) e uma proteína de membrana do peroxissomo (P_{PEX8}) que além do metanol, podem ser induzidos com metilamina e ácido oleico respectivamente. Embora o P_{PEX8} proporcione uma alternativa ao sistema induzível por metanol, não é muito usado devido a seu baixo nível de expressão.

Dentre os promotores constitutivos destacam-se aqueles que transcrevem genes da via glicolítica como P_{GAP} (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e P_{PGKI} (fosfoglicerato quinase). Estes promotores permitem a expressão de genes heterólogos em meios contendo glicose ou glicerol como substrato. P_{TEFI} (fator de alongação da tradução) é também um promotor constitutivo que apresenta uma força comparável ao P_{GAP} (POTVIN et al., 2012).

Marcas de seleção

Apesar do amplo uso de *P. pastoris* como sistema de expressão há poucas marcas de seleção disponíveis para sua manipulação genética. As marcas existentes estão limitadas a genes de vias biossintéticas (*HIS4*, *ARG4*, *URA3*, *URA5*, *ADE1*, *CYS4* e *FLD1*) que são usados com sua correspondente linhagem auxotrófica como hospedeira, ou a genes que conferem resistência a drogas (*Sh ble*, blasticidina S desaminase e *kan^R*, que conferem resistência a zeocina, blasticidina e G418, respetivamente) (THOR et al., 2005; NETT e GERNGROSS, 2003; WHITTAKER e WHITTAKER, 2005).

O limitado número de marcas de seleção disponíveis restringe a construção de linhagens de *P. pastoris* com mais do que algumas modificações recombinantes. Isto se torna um problema quando é necessário produzir proteínas hetero-oligoméricas, ou proteínas que requeiram modificações pós-traducionais, como a glicosilação mediada por enzimas que não são codificadas pelo genoma da levedura (NETT et al., 2005). Da mesma forma, marcas de seleção variadas são necessárias quando se deseja alterar/adicionar vias metabólicas (engenharia metabólica). Este também é o caso de estudos de pesquisa básica sobre a fisiologia de *P. pastoris* com o fim de compreender a autofagia de peroxissomos e a organização e biogênese de organelas da via secretora (NETT e GERNGROSS, 2003). Este tipo de pesquisa envolve a integração e deleção de um grande número de genes, requerendo várias modificações genéticas e, por tanto, várias etapas de seleção. É por isto que, para o uso de *P. pastoris* como sistema modelo, faz-se necessário o desenvolvimento de novas marcas de seleção.

Linhagens hospedeiras de *P. pastoris*

Todas as linhagens de expressão de *P. pastoris* são derivadas da linhagem nativa NRRL-Y 11430. Mutantes auxotróficos e linhagens deficientes em proteases encontram-se disponíveis para serem usadas como hospedeiras dos vetores de expressão. A tabela 1 relaciona as linhagens mais comumente utilizadas apresentando seus respectivos genótipos e fenótipos.

Tabela 1. Principais linhagens hospedeiras de *P. pastoris*.

Linhagen	Genótipo	Fenótipo	Referência
X-33	<i>Δhis4 : : HIS4</i>	selvagem	(HIGGINS et al., 1998)
GS115	<i>his4</i>	His ⁻	(CREGG et al., 1985)
KM71	<i>Δaox1 : : SARG4 his4 arg4</i>	Mut ^S , His ⁻	(CREGG e MADDEN, 1987)
MC100-3	<i>Δaox1 : : SARG4 Δaox2 : : Phis4 his4 arg4</i>	Mut ⁻ , His ⁻	(CREGG et al., 1988)
SMD1168	<i>Δpep4 : : URA3 his4 ura3</i>	His ⁻ , deficiente em proteinase A	(GLEESON et al., 1998)
SMD1165	<i>pbr1 his4</i>	His ⁻ , deficiente em proteinase B	(GLEESON et al., 1998)
SMD1163	<i>pep4 pbr1 his4</i>	His ⁻ , deficiente em proteinases A e B	(GLEESON et al., 1998)
GS190	<i>arg4</i>	Arg ⁻	(LIN CEREGHINO et al., 2001)
JC220	<i>ade1</i>	Ade ⁻	(LIN CEREGHINO et al., 2001)
JC254	<i>ura3</i>	Ura ⁻	(LIN CEREGHINO et al., 2001)
YC12	<i>cys4</i>	Cys ⁻	(LI et al., 2001)
JC239	<i>met2</i>	Met ⁻	(THOR et al., 2005)
YJN165	<i>ura5</i>	Ura ⁻	(NETT e GERNGROSS, 2003)
YJN408	<i>arg1</i>	Arg ⁻	(NETT et al., 2005)
YJN409	<i>arg2</i>	Arg ⁻	(NETT et al., 2005)
YJN410	<i>arg3</i>	Arg ⁻	(NETT et al., 2005)
YJN411	<i>his1</i>	His ⁻	(NETT et al., 2005)
YJN412	<i>his2</i>	His ⁻	(NETT et al., 2005)
YJN413	<i>his5</i>	His ⁻	(NETT et al., 2005)
YJN414	<i>his6</i>	His ⁻	(NETT et al., 2005)

O uso de genes de vias biossintéticas como marcas de seleção requer de linhagens hospedeiras que sejam auxotróficas para o nutriente em questão devido à ausência de uma cópia funcional desse gene no seu genoma. Desta forma, a menos que a levedura seja transformada com um

alelo funcional do gene para recuperar a prototrofia, uma linhagem auxotrófica só consegue crescer em meio contendo o apropriado fator de crescimento (PRONK, 2002). Linhagens contendo combinações de até quatro genes não funcionais encontram-se disponíveis (LIN CEREGHINO et al., 2001).

Em particular, linhagens defectivas na síntese de aminoácidos são de grande interesse não apenas para estudos de seleção/complementação, mas também para serem usadas na marcação de proteínas recombinantes com análogos de aminoácidos ou aminoácidos contendo isótopos, para estudos de biologia estrutural por ressonância magnética nuclear (WHITTAKER e WHITTAKER, 2005).

Linhagens auxotróficas podem ser obtidas por mutações pontuais no gene biossintético ou por deleção completa ou de uma parte desse gene (ruptura gênica). A segunda forma é mais estável, pois evita reversões que podem ocorrer no caso das mutações pontuais. Para a ruptura gênica são construídos cassetes contendo uma marca de seleção, normalmente dominante, flanqueada por regiões do gene alvo. Por recombinação homóloga este cassette substitui o gene nativo (figura 1). Para se evitar a presença da marca dominante na linhagem, técnicas de recombinação intramolecular podem ser aplicadas, por exemplo, o uso do sistema *Cre/loxP*.

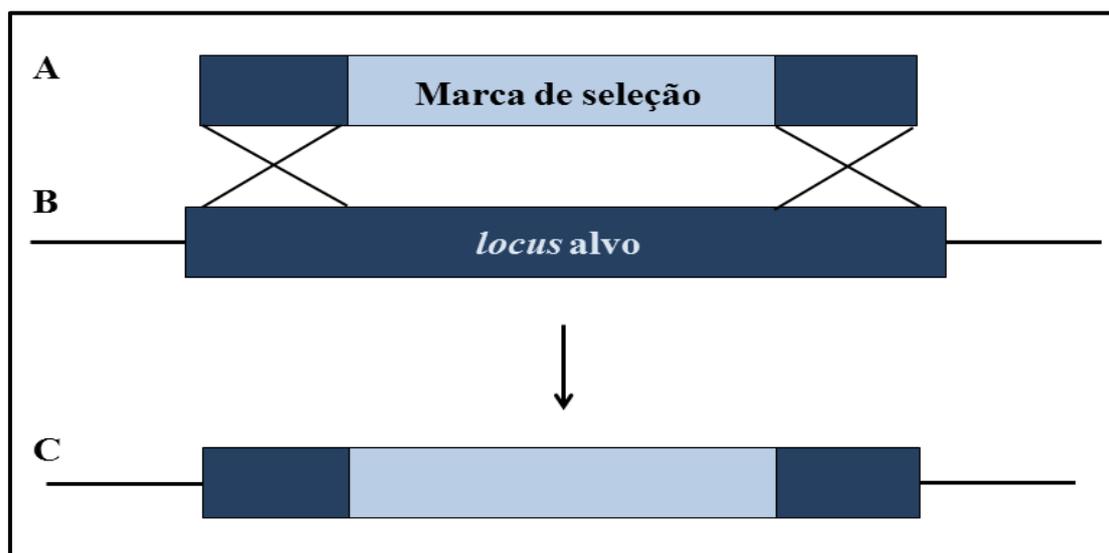


Figura 1. Estratégia de ruptura gênica. A. Cassete de deleção, B. *locus* alvo a ser interrompido, C. Genoma da levedura após recombinação homóloga com o cassette de deleção.

Sistema Cre/*loxP*

Este sistema se baseia no uso de uma enzima (CreA) que catalisa a recombinação entre dois de seus sítios de reconhecimento (*loxP*). Com este sistema é possível excisar ou inverter segmentos de DNA flanqueados por regiões *loxP* assim como gerar recombinação intermolecular entre diferentes moléculas de DNA. Aliás, o sistema pode ser usado como um interruptor genético nos estudos de ruptura gênica (NAGY, 2000).

CreA, proteína de ~38 kDa, é uma recombinase sítio-específica do bacteriófago P1 de *E. coli* que pertence à família das integrases (HAMILTON e ABREMSKI, 1984). Seu sítio de reconhecimento, *loxP*, é uma sequência consenso de 34 pb composto por um núcleo de 8 pb flanqueado por sequências palindrômicas de 13 pb como esquematizado na figura 2A. A sequência central assimétrica define a orientação do sítio *loxP*. Quando dois desses sítios estão orientados na mesma direção, a recombinação mediada por CreA permite remover a sequência de DNA flanqueada pelos mesmos, deixando no lugar uma sequência *loxP* como mostra a figura 2B (NAGY, 2000; PAN et al., 2011). O mecanismo de recombinação é o seguinte: uma molécula de recombinase se liga a uma das sequências palindrômicas de um sítio *loxP*, conseqüentemente as moléculas de recombinase formam um tetrâmero aproximando os dois sítios *loxP*. Os sítios *loxP* formados após a recombinação estão constituídos pelas duas metades complementares dos sítios pré-recombinação. Uma propriedade importante deste sistema é sua especificidade. Para que uma sequência específica de 34 pb ocorra de maneira aleatória são requeridos 10^{18} pb de DNA. O genoma completo de mamíferos é de 3×10^9 pb, sendo quase improvável que um sítio *loxP* seja encontrado fora do genoma do fago. Portanto, a introdução desses sítios por manipulação genética no genoma de eucariotos restringe a recombinação mediada pela CreA aos sítios *loxP* exógenos (NAGY, 2000).

O sistema de recombinação Cre/*loxP* tem sido adaptado para ser usado em várias leveduras como *S. cerevisiae* (GÜLDENER et al., 1996), *Kluyveromyces lactis* (STEENSMA e TER LINDE, 2001), *Pichia stipitis* (LAPLAZA et al., 2006) e *Pichia pastoris* (PAN et al., 2011).

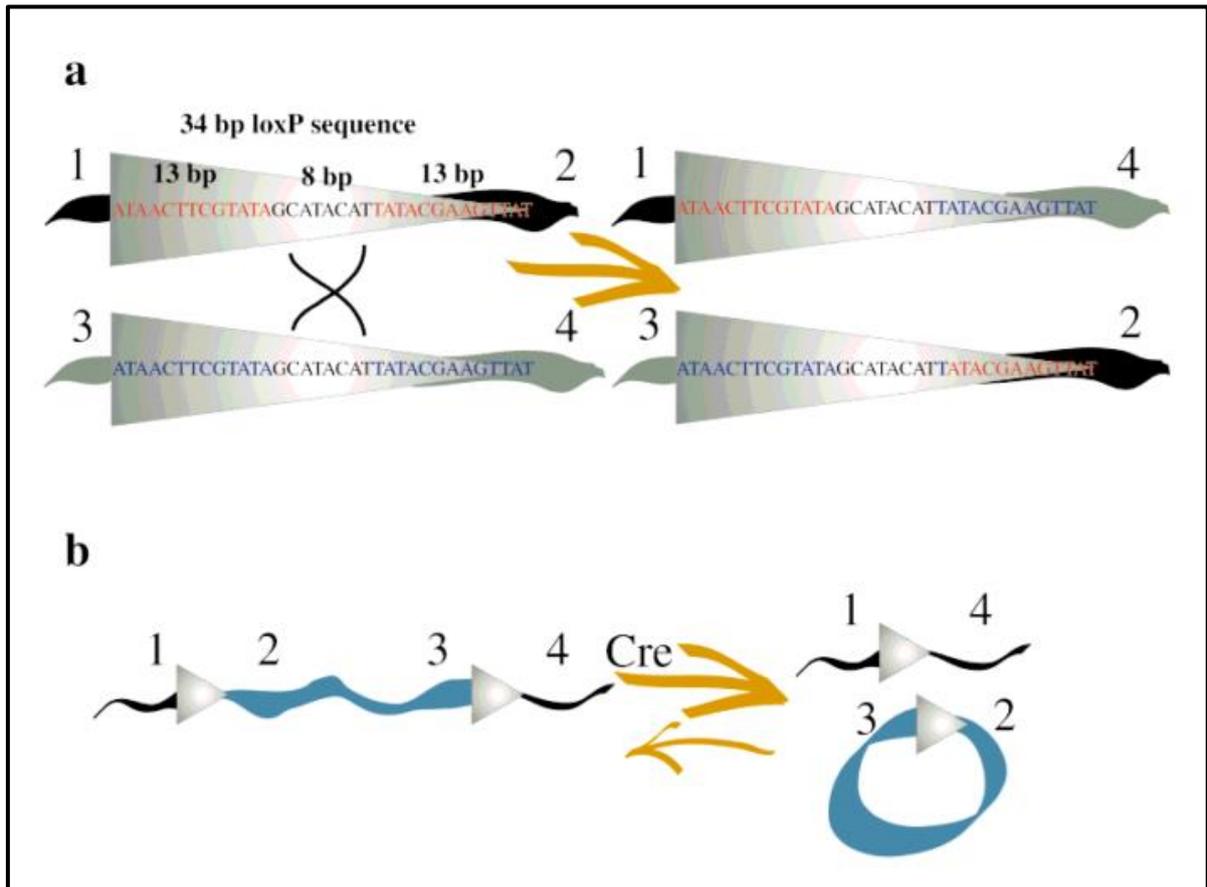


Figura 2. Sistema Cre/loxP. **A.** Representação dos sítios *loxP* e sua recombinação homóloga mediada pela recombinase CreA, **B.** Excisão de um fragmento de DNA flanqueado por regiões *loxP* quando estas encontram-se na mesma orientação. Figura extraída de NAGY, 2000.

Via de síntese de leucina

O gene *LEU2* codifica para β -isopropilmalato desidrogenase, enzima responsável por catalisar a terceira etapa da via de biossíntese de leucina em *P. pastoris*. A figura 3 apresenta a via de síntese dos aminoácidos leucina, valina e isoleucina destacando-se as etapas nas quais está envolvida a enzima β -isopropilmalato desidrogenase (EC 1.1.1.85).

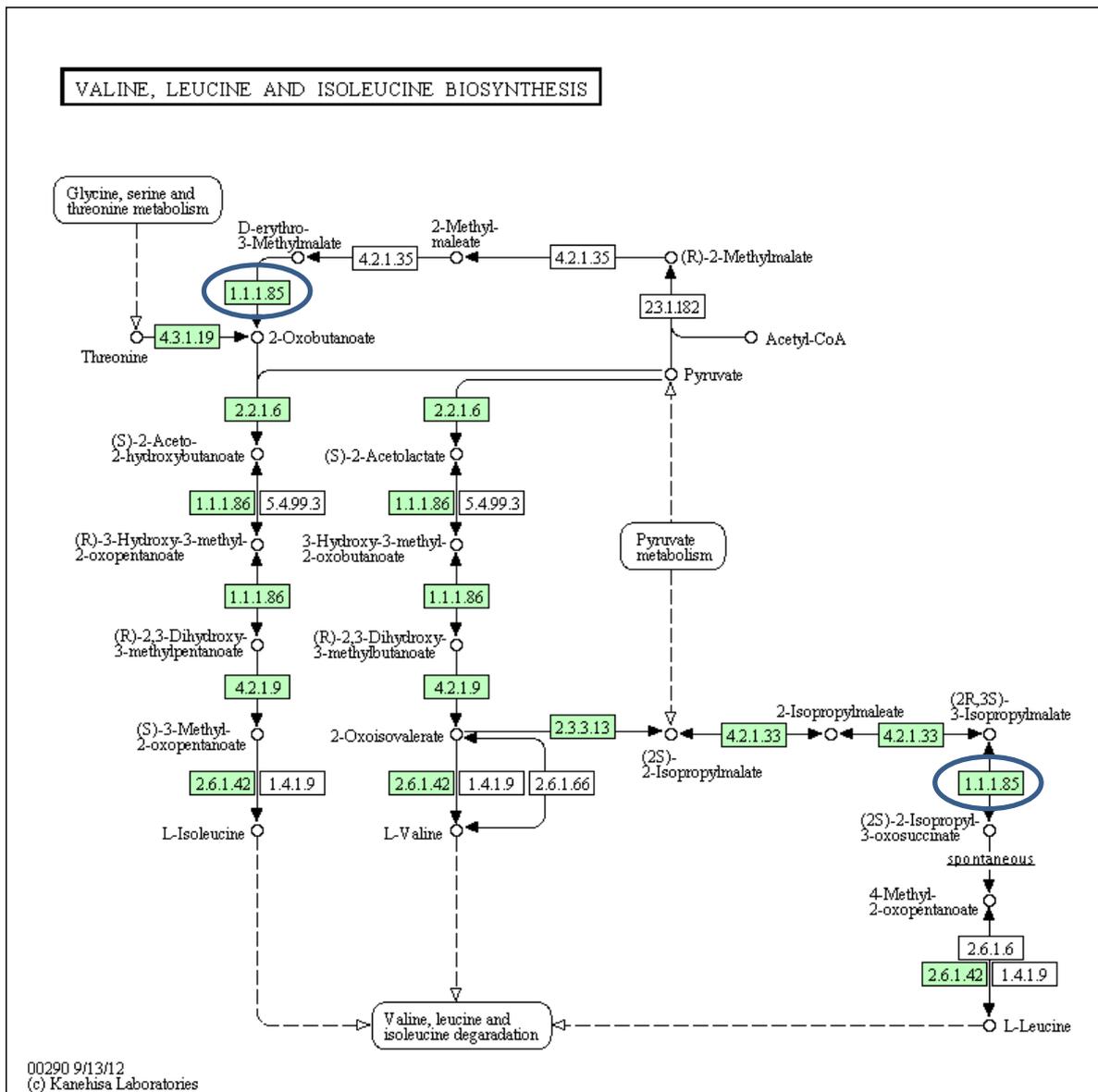


Figura 3. Via de biossíntese dos aminoácidos leucina, valina e isoleucina em *P. pastoris*. Figura extraída do *KEGG PATHWAY database*. Os círculos representam a enzima β-isopropilmalato desidrogenase codificada pelo gene *LEU2*.

Em *S. cerevisiae* o gene *LEU2* tem a mesma função e é uma das marcas de seleção mais usadas nos vetores de expressão para essa levedura (CELIK e CALIK, 2012). Antes da elaboração do presente projeto este gene não tinha sido utilizado como marca de seleção para *P. pastoris* assim como também não existia uma linhagem auxotrófica para o aminoácido leucina, o que motivou a construção de uma nova linhagem hospedeira com seu respectivo vetor contendo a marca *LEU2*.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Interromper o gene *LEU2* no genoma de *Pichia pastoris* com o fim de criar uma linhagem auxotrófica para o aminoácido leucina que possa ser usada como célula hospedeira para vetores de expressão contendo o gene *LEU2* como marca de seleção.

1.2 Metas

- Clonar o gene *LEU2*.
- Construir cassete de deleção contendo os genes *kan^R* ou *Sh ble*.
- Transformar *P. pastoris* com o cassete de deleção e selecionar clones *Leu⁻*.
- Construir vetor contendo o gene *CreA* sob controle do promotor *P_{TEF1}*.
- Transformar *P. pastoris leu2* com o vetor contendo o gene *CreA* para remover a marca de seleção dominante.
- Construir um vetor para a expressão de *eGFP* contendo o gene *LEU2* como marca de seleção.

2 ESTRATÉGIA

A estratégia global para criar uma linhagem de *P. pastoris* Leu^- e para construir um vetor contendo o gene *LEU2* como marca de seleção está esquematizada na figura 4.

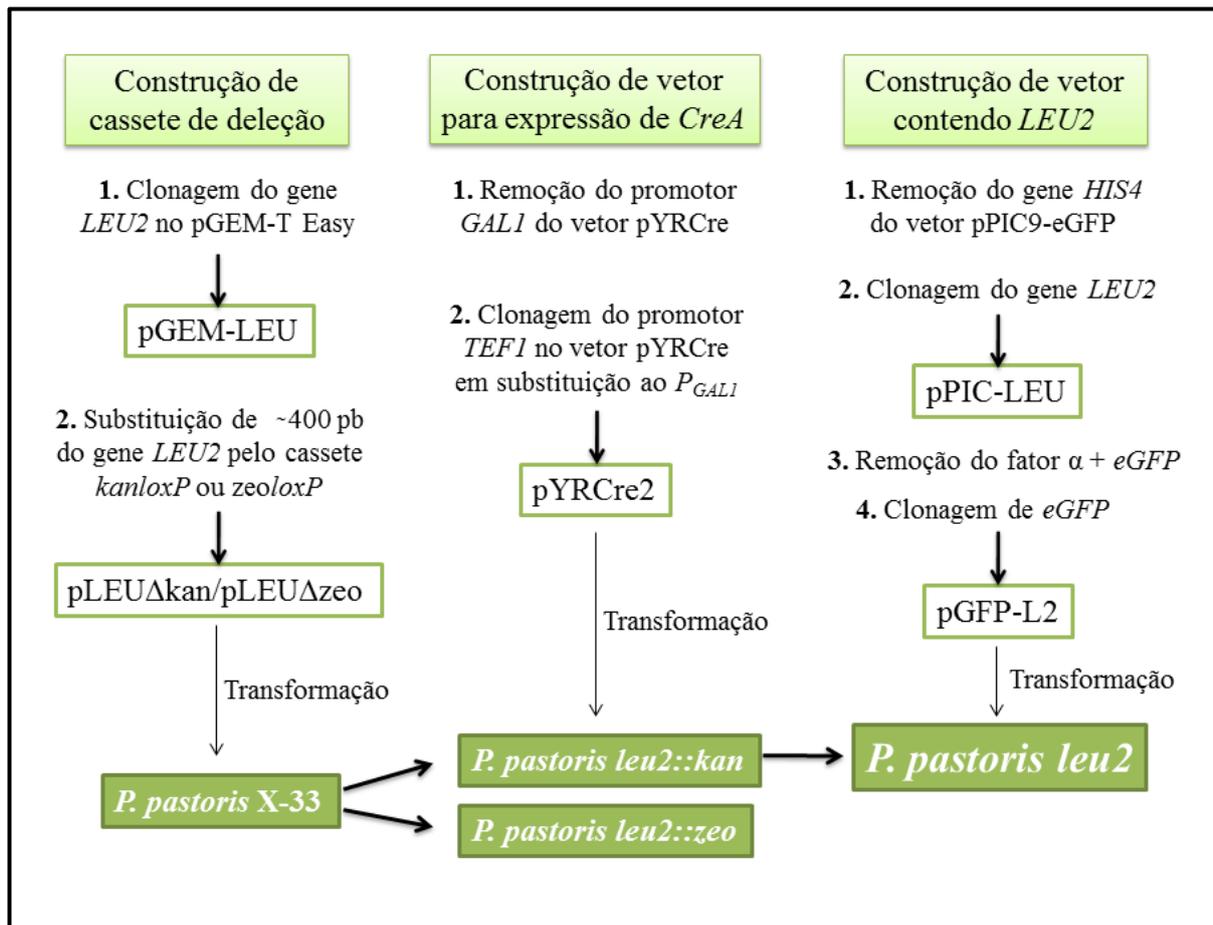


Figura 4. Estratégia para a criação de uma linhagem de *P. pastoris* Leu^- e para a construção de um vetor contendo o gene *LEU2* como marca de seleção.

2.1 Construção de cassete de deleção

Para construir o cassete de ruptura gênica, o gene *LEU2* de *P. pastoris* foi clonado no vetor pGEM-T Easy gerando o vetor pGEM-LEU. Após digestão desse vetor com enzimas de restrição foi excisado um fragmento de aproximadamente 400 pb do gene *LEU2* e substituído

por um cassete de expressão contendo uma marca de seleção dominante (resistência a antibiótico). Foram usados dois cassetes de expressão: um contendo o gene *kan^R* e outro contendo o gene *Sh ble*. Ambos os cassetes possuem um promotor para levedura, um promotor para *E. coli*, uma sequência terminadora da transcrição e, nas extremidades, sequências *loxP*. A clonagem desses cassetes de expressão no vetor pGEM-LEU gerou os vetores pLEUΔkan e pLEUΔzeo os quais foram digeridos com enzimas de restrição que clivam nas extremidades do gene *LEU2* para liberar os cassetes de deleção. A linhagem de *P. pastoris* X-33 foi transformada com ambos os cassetes gerando as linhagens *P. pastoris leu2::kan* e *P. pastoris leu2::zeo*. A figura 5 mostra todas as etapas da construção do cassete de deleção.

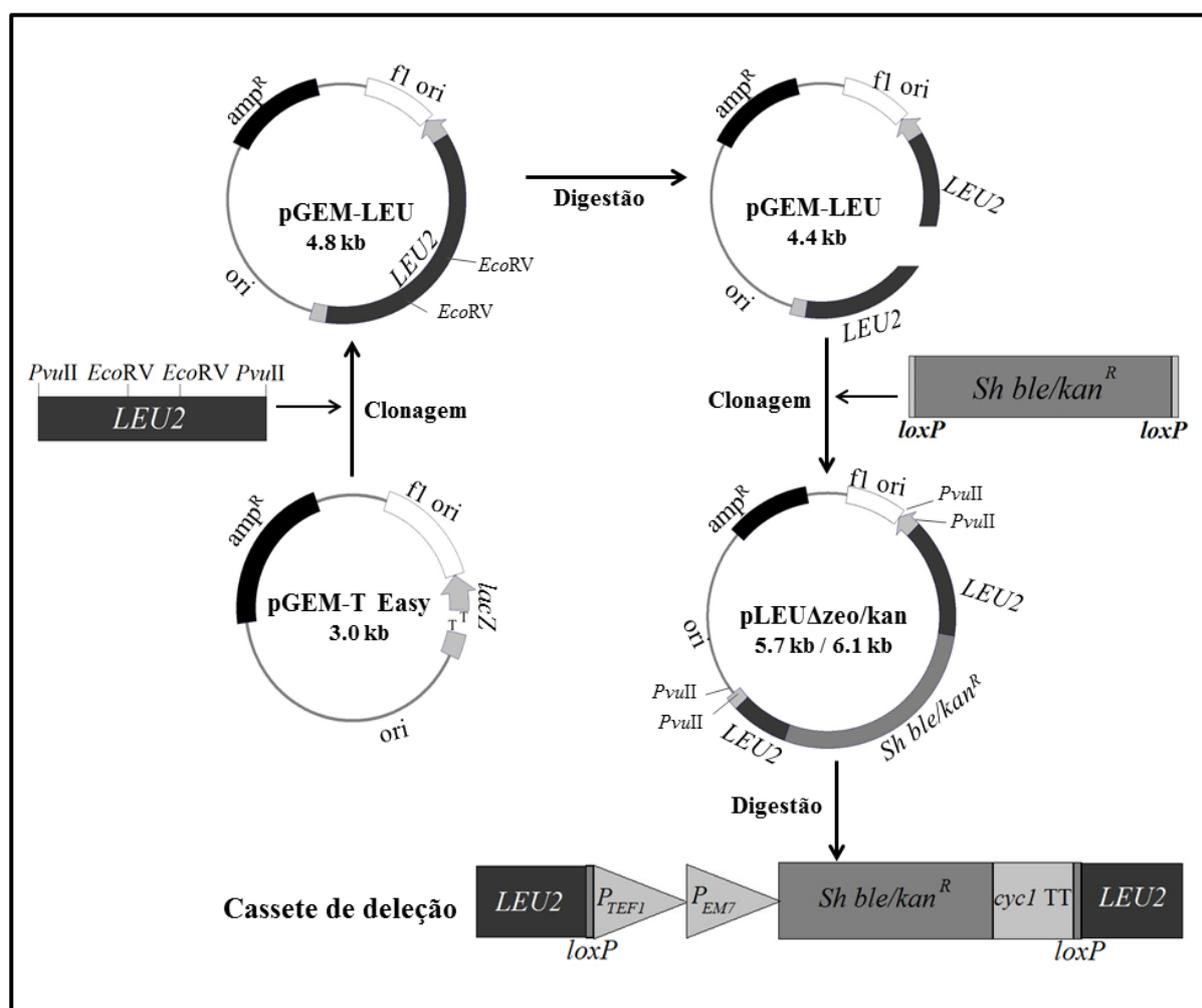


Figura 5. Etapas para a construção do cassete de deleção utilizado na ruptura do gene *LEU2* no genoma de *P. pastoris*.

2.2 Construção de vetor para expressão de CreA

Para retirar a marca de seleção dominante com a qual foi interrompido o gene *LEU2* foi construído um vetor de replicação autônoma contendo o gene que codifica para a recombinase CreA. Essa construção foi feita a partir do vetor pYRCre (REIS et al., 2012) que contem o gene *CreA* sob o controle do promotor *GAL1*. Para que o gene *CreA* pudesse ser expresso em *P. pastoris* o P_{GAL1} foi substituído pelo promotor P_{TEF1} gerando o vetor pYRCre2. A transformação de *P. pastoris leu2::kan* com o pYRCre2 gerou a linhagem *P. pastoris leu2*. A figura 6 apresenta um esquema da reciclagem da marca dominante utilizando a recombinase CreA expressa pelo vetor pYRCre2.

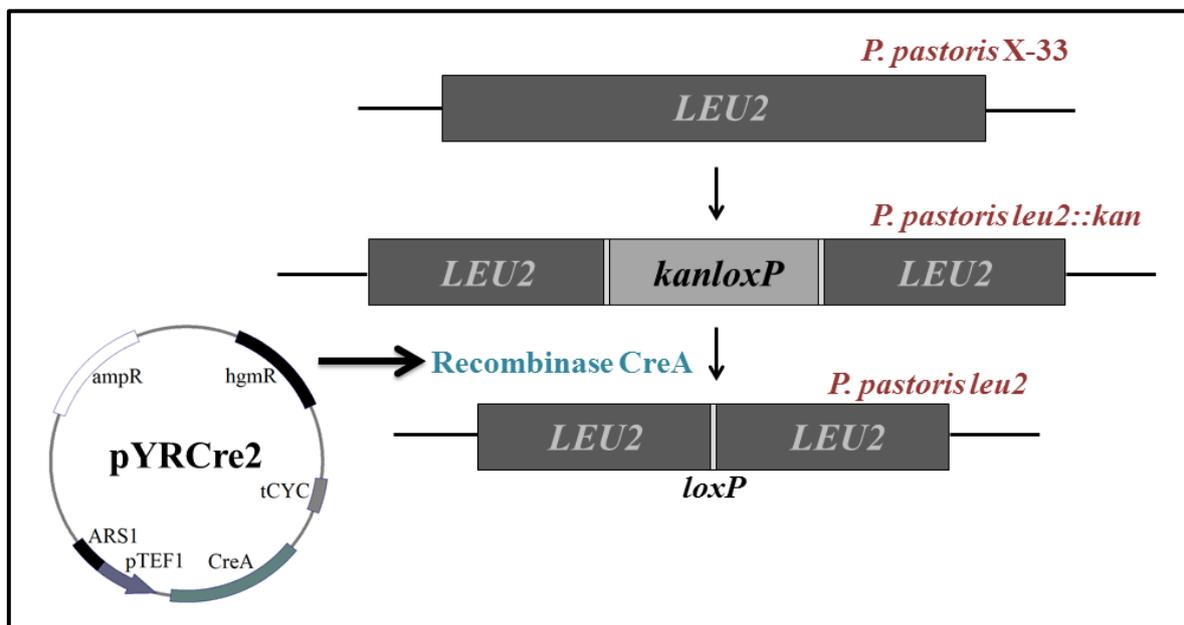


Figura 6. Remoção da marca dominante do genoma de *P. pastoris leu2::kan* utilizando a recombinase CreA expressa pelo vetor pYRCre2.

2.3 Construção de vetor contendo gene *LEU2*

Para testar a linhagem *P. pastoris leu2* como sistema de expressão heteróloga assim como para avaliar a recuperação da prototrofia, foi construído um vetor contendo o gene repórter *eGFP* e o gene *LEU2* como marca de seleção. O gene *HIS4* foi removido do vetor pPIC9-eGFP (vetor pPIC9 da Invitrogen contendo o gene *eGFP*) e substituído pelo gene

LEU2 de *P. pastoris* gerando o vetor pPIC-LEU. Após digestão desse vetor com enzimas de restrição o gene *eGFP* foi removido junto com o sinal de secreção do fator α sendo então clonado o gene *eGFP* para permitir sua expressão intracelular sob controle do promotor *AOX1*. Desta forma a produção de eGFP seria facilmente detectada por microscopia de fluorescência. O vetor obtido foi chamado de pGFP-L2 e foi utilizado para transformar *P. pastoris leu2*. O processo de construção desse vetor está representado na figura 7.

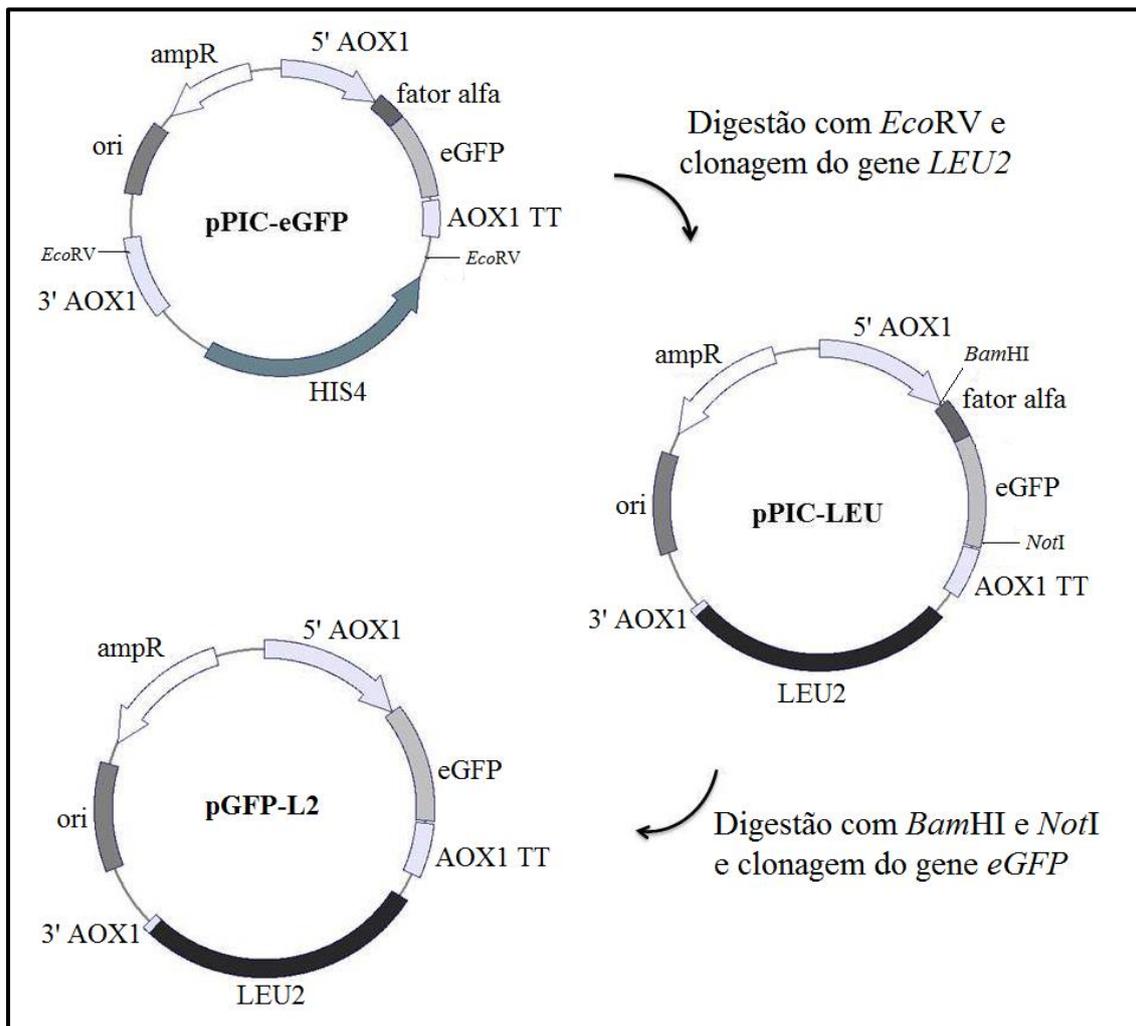


Figura 7. Construção do vetor pGFP-L2 para expressão intracelular de proteína verde fluorescente em *P. pastoris leu2*. Este vetor contém o gene *LEU2* como marca de seleção.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Micro-organismos

Bactérias

- *Escherichia coli* DH5 α (Gibco BRL): *F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k^- , m_k^+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1*
- *Escherichia coli* XL10-gold (Stratagene): *Tet^r Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*

Leveduras

- *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen EUA): *his4::HIS4*
- *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen EUA): *his4*
- *Pichia pastoris* LK (desenvolvida neste trabalho): *leu2::kan^R*
- *Pichia pastoris* M12 (desenvolvida neste trabalho): *leu2*

3.1.2 Meios de cultura

LB

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

Peptona 1% (p/v)

NaCl 1% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2. Para o meio sólido foi adicionado ágar 1,5% (p/v).

LB low-salt

Extrato de levedura 0,5% (p/v)

Peptona 1% (p/v)

NaCl 0,5% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2. Para o meio sólido foi adicionado ágar 1,5% (p/v).

SOB

Triptona 20 g/L

Extrato de levedura 5 g/L

NaCl 0,6 g/L

KCl 0,5 g/L

MgCl₂ 10 mM

MgSO₄ 10 mM

Foram feitas soluções de MgCl₂ e MgSO₄ na concentração de 1 M e filtradas. Depois do meio ser autoclavado foram adicionadas as soluções para a concentração final de 10 mM.

YPD

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

Para o meio sólido foi adicionado ágar 2% (p/v).

YPDS ágar

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

Sorbitol 1 M

Ágar 2 % (p/v)

MD (Meio Mínimo com Dextrose)

YNB com sulfato de amônio 1,34% (p/v)

Biotina 4×10^{-5} % (p/v)

Glicose 2% (p/v)

Ágar 2 % (p/v)

Quando preciso o meio mínimo foi suplementado com leucina nas concentrações finais de 0,02%, 0,04%, 0,05% e 0,08% e com isoleucina na concentração de 0,05%.

BMGY (Meio Complexo Tamponado com Glicerol)

Extrato de levedura 1% (p/v)

Peptona	2% (p/v)
Fosfato de potássio pH 6,0	100 mM
YNB com sulfato de amônio	1,34% (p/v)
Biotina	4×10^{-5} % (p/v)
Glicerol	1% (v/v)

BMMY (Meio Complexo Tamponado com Metanol)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Fosfato de potássio pH 6,0	100 mM
YNB com sulfato de amônio	1,34% (p/v)
Biotina	4×10^{-5} % (p/v)
Metanol	0,5% (v/v)

Para os meios mínimos e os meios complexos tamponados foram feitas soluções estoque de todos os reagentes e misturadas assepticamente ao momento de preparar as placas. As soluções dos aminoácidos com uma concentração de 1% (p/v), a solução de glicose 10X, a solução YP 2X [extrato de levedura 2% (p/v) e peptona 4% (p/v)], a solução de fosfato de potássio 1 M pH 6,0 e a solução de ágar 3% (p/v) foram autoclavadas separadamente. A solução de biotina 500X e a solução YNB com sulfato de amônio 10X foram esterilizadas por filtração.

3.1.3 Tampões e soluções

Soluções estoque para meios de cultura

- Solução YNB (Yeast Nitrogen Base) com sulfato de amônio 10X

Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids (Difco) 3,4% (p/v)

(NH₄)₂SO₄ 10% (p/v)

Esterilizada por filtração.

- Glicose 10X

Glicose 20% (p/v)

- Biotina 500X

Biotina 0,02% (p/v)

Esterilizada por filtração.

Antibióticos

- Ampicilina (1000X)

Ampicilina 100 mg/mL

Dissolvida em água MilliQ e esterilizada por filtração.

- Kanamicina (1000X)

Kanamicina 50 mg/mL

Dissolvida em água MilliQ e esterilizada por filtração.

- Higromicina B (500X)

Higromicina B 50 mg/mL

- Zeocina (4000X para bactéria, 1000X para levedura)

Zeocina 100 mg/mL

- G418 (100X)

G418 50 mg/mL

Dissolvida em água MilliQ e esterilizada por filtração.

Soluções para células bacterianas competentes

- Tampão de transformação I

RbCl	12 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,9 g/L
Acetato de potássio	0,03 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 g/L
Glicerol	150 g/L

Uma solução estoque de acetato de potássio 1 M foi preparada e seu pH ajustado para 7,5 com ácido acético glacial. A solução foi esterilizada por filtração. O pH do tampão de transformação foi ajustado para 5,8 com ácido acético 0,2 M e a solução foi esterilizada por filtração.

- Tampão de transformação II

MOPS	0,02 M
RbCl	1,2 g/L
CaCl ₂	11 g/L
Glicerol	150 g/L

Uma solução estoque de MOPS 1 M foi preparada e seu pH ajustado para 6,8 com NaOH. A solução foi esterilizada por filtração. O pH do tampão de transformação foi ajustado para 6,8 com NaOH e a solução foi esterilizada por filtração.

Soluções para miniprep

- Solução I

Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM

EDTA (pH 8,0) 10 mM

- Solução II

NaOH 0,2 M

SDS 1% (p/v)

Solução preparada no momento de uso.

- Solução III

Acetato de sódio 3 M

Ácido acético 2 M

O pH foi ajustado para 5,0.

Soluções para eletroforese em gel de agarose

- Brometo de Etídio

EtBr 10 mg/mL

- Tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 50X

Tris-Acetato 2 M

EDTA 0,05 M

pH 8,0

3.1.6 Enzimas de restrição

A tabela 2 apresenta as enzimas de restrição usadas neste trabalho indicando o sítio de clivagem, assim como a temperatura de incubação e o tampão recomendado para cada enzima.

Tabela 2. Enzimas de restrição utilizadas.

Enzima	Sítio de clivagem	Tampão	Temperatura de incubação
<i>AvrII</i>	C ⁺ CTAGG	NEB2	37 °C
<i>BamHI</i>	G ⁺ GATCC	NEB3/BSA	37 °C
<i>BglII</i>	A ⁺ GATCT	NEB3	37 °C
<i>EcoRV</i>	GAT ⁺ ATC	NEB3	37 °C
<i>NcoI</i>	C ⁺ CATGG	NEB3	37 °C
<i>NotI</i>	GC ⁺ GGCCGC	NEB3/BSA	37 °C
<i>PvuII</i>	CAG ⁺ CTG	NEB3	37 °C
<i>SacI</i>	GAGCT ⁺ C	NEB1	37 °C
<i>XbaI</i>	T ⁺ CTAGA	NEB2	37 °C

3.1.7 Vetores

A tabela 3 exhibe todos os vetores usados neste trabalho e apresenta uma breve descrição de cada um deles.

Tabela 3. Vetores utilizados.

Vetor	Descrição
pGEM-T Easy (Promega, EUA)	Vetor para clonagem de produtos de PCR.
pGEM-LEU Δ kan	Vetor contendo o cassete de deleção <i>kanloxP</i> flanqueado por regiões do gene <i>LEU2</i> .
pGEM-LEU Δ zeo	Vetor contendo o cassete de deleção <i>zeoloxP</i> flanqueado por regiões do gene <i>LEU2</i> .
pCR-Blunt (Invitrogen, EUA)	Vetor para clonagem de produtos de PCR.
pPICZ α A (Invitrogen, EUA)	Vetor de expressão para <i>P. pastoris</i> contendo o cassete de expressão do gene <i>Sh ble</i> .
pPICK α	Vetor de expressão para <i>P. pastoris</i> construído em nosso laboratório contendo o cassete de expressão do gene <i>kan^R</i> e derivado do vetor comercial pPICZ α A.
pYRCre (REIS et al., 2012)	Vetor para expressão da recombinase CreA sob controle do promotor P _{GALI} .
pYRCre2	Vetor para expressão da recombinase CreA sob controle do promotor P _{TEF1} .
pPIC9-eGFP	Vetor de expressão para <i>P. pastoris</i> construído em nosso laboratório para expressar e secretar proteína verde fluorescente. Este é derivado do vetor comercial pPIC9 (Invitrogen, EUA).
pGFP-L2	Vetor construído neste trabalho para a expressão de eGFP contendo o gene <i>LEU2</i> como marca de seleção.

3.1.8 Oligonucleotídeos (*primers*)

A tabela 4 apresenta os *primers* utilizados neste trabalho com seus respectivos sítios de restrição sublinhados.

Tabela 4. *Primers* utilizados. Os sítios de restrição estão sublinhados

<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	Sítio de restrição
PpLEU2-F1	<u>CAGCTGAAGAGTCCAAGTCCAAG</u>	<i>PvuII</i>
PpLEU2-R2	<u>CAGCTGGTGCCATTGGTGGTACTGT</u>	<i>PvuII</i>
TEF-2F	ATAC <u>CCTAGGCCCCACACACC</u> ATAGCTTCAA	<i>AvrII</i>
TEF-2R	ATAC <u>CCTAGGTTTGT</u> AATTA ³ AAACTTAGATTAGATTG	<i>AvrII</i>
ZeoB1as-F3	<u>CGGATCC</u> CATAACTTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTT ATAGATCTCCACACACCATAGCTTCAA ³ AATG	<i>BamHI</i> e <i>BglII</i>
ZeoB1as-R3	<u>CGGATCC</u> CATAACTTTCGTATAGCATA ³ CATTATACGAAGTT ATAGATCTAGCTTGCAAATTAAGCCTTCGAG	<i>BamHI</i> e <i>BglII</i>
PpLEU2-EXT1	GAGGATAAGCTGGGAGACTATG	-
PpLEU2-EXT2	TCTGTTGCCTAAGACTGAGAGC	-

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cultivo de micro-organismos

Bactérias foram cultivadas a 37 °C e leveduras a 28 °C. Para ambos os casos uma velocidade de agitação de 250 rpm foi usada quando o crescimento foi em meio líquido.

3.2.2 Preparação de células bacterianas competentes

Células de *E. coli* DH5 α e XL10-gold foram semeadas em uma placa de meio LB a partir de um estoque guardado a -80 °C e incubadas a 37 °C durante a noite. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SOB em um frasco Erlenmeyer de 125 mL e incubada a 37 °C sob agitação a 250 rpm por 16 h. Dois mL desse pré-inóculo foram inoculados em 100 mL de meio SOB em um Erlenmeyer de 500 mL e incubados a 37 °C sob agitação a 250 rpm por aproximadamente 1 h até atingir uma OD₆₀₀ de 0,3. A cultura foi resfriada por 15 min em banho de água-gelo e posteriormente as células foram coletadas a 3000 x g por 5 min a 4 °C. O *pellet* foi ressuscitado em 32 mL de tampão de transformação I e incubado no gelo por 15 min. Em seguida as células foram submetidas a nova centrifugação sob as mesmas condições e ressuscitadas em 4 mL de tampão de transformação II. Finalmente foram feitas alíquotas de 100 μ L em tubos de 1,5 mL e armazenadas a -80 °C.

3.2.3 Ligação de fragmentos de DNA

Os sistemas de ligação foram realizados em um volume total de 10 μ L com uma razão molar entre vetor e inserto de 1:3 a 1:10. Para a construção do cassete de deleção foi utilizada a enzima T4 DNA Ligase (USB) com o tampão fornecido pelo fabricante e os sistemas foram incubados a 16 °C por 16 h.

A ligação dos produtos de PCR nos vetores pGEM-T Easy e pCR-Blunt foi realizada utilizando os kits pGEM®-T Easy Vector System (Promega) e Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen) respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Todas as ligações restantes foram realizadas utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega) com o tampão fornecido pelo fabricante. No caso de fragmentos com extremidades coesivas o sistema foi incubado a 4 °C durante 16 h e, no caso de fragmentos com extremidades abruptas, a incubação foi a 16 °C pelo mesmo período de tempo.

3.2.4 Transformação bacteriana por choque térmico

Para cada sistema de ligação foi utilizada uma alíquota de células competentes armazenadas a -80 °C. As células foram descongeladas no gelo e em seguida foram adicionados 10 µL do sistema de ligação. As células foram incubadas no gelo por 30 min e posteriormente foram submetidas a choque térmico a 42 °C por 90 s. Foram adicionados 900 µL de meio LB ao sistema que foi incubado a 37 °C por 1 h. As células foram semeadas em meio LB ágar contendo o antibiótico adequado (50 µg/mL ampicilina, 50 µg/mL kanamicina ou 25 µg/mL zeocina). Quando foi usada zeocina, o meio LB foi preparado com uma menor concentração de NaCl (LB low-salt) para evitar a inibição da droga pelo sal. Quando utilizado o vetor pGEM-T Easy foi adicionado ao meio de cultura X-gal (concentração final 0,004% p/v) como substrato da enzima β-galactosidase. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

3.2.5 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)

Para extrair os plasmídeos das células bacterianas foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook *et al* (2001) com adaptações. Cinco mL de meio LB contendo o antibiótico adequado foram inoculados com uma colônia transformante e incubados a 37 °C por 16-18 h sob agitação. Três mL da cultura foram centrifugados a 10000 x g por 2 min e as células foram coletadas e ressuspensas em 200 µL de solução I. Em seguida foram adicionados 360

μL de solução II recém-preparada, a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente foram adicionados 300 μL de solução III gelada, a mistura homogeneizada e incubada no gelo por 5 min. Após esse tempo a amostra foi centrifugada a 10000 x g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 750 μL de isopropanol. A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 10000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 200 μL de solução I. Em seguida, foram adicionados 110 μL de acetato de amônio 7,5 M e a mistura homogeneizada em vortex seguido de centrifugação a 10000 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 750 μL de etanol 100% gelado. Após centrifugação a 10000 x g por 5 min o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 μL de etanol 70% seguido de uma nova centrifugação a 10000 x g por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol secado em um concentrador a vácuo. O precipitado foi ressuspensionado em 50 μL de água milliQ e RNase A (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubado a 37 °C por 15 min. O DNA foi armazenado a -20 °C até seu uso.

3.2.6 Preparação de DNA plasmidial em grande escala (maxiprep)

Para a obtenção dos plasmídeos em maior quantidade foi utilizado o kit Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen) seguindo as orientações do fabricante.

3.2.7 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões de DNA foram realizadas segundo as instruções do fabricante das enzimas. A quantidade de enzima foi ajustada à quantidade de DNA a ser digerido considerando que o volume da enzima não devia ser maior do que 10% do volume total de reação. A tabela 2 apresenta os tampões e temperaturas recomendadas para cada enzima. Todas as reações foram incubadas por 2 horas.

3.2.8 Análise eletroforética de DNA

Para analisar fragmentos de DNA foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose adaptada de Sambrook *et al* (2001). O gel preparado na concentração de 1% (p/v) de agarose em tampão TAE 1X continha brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à corrente elétrica para permitir a migração e separação dos fragmentos de DNA. A visualização das bandas de DNA foi feita com a exposição do gel à luz ultravioleta.

3.2.9 Purificação e eluição de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA eluídos de gel de agarose foram purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA) seguindo as orientações especificadas pelo fabricante.

3.2.10 Precipitação de DNA

Para retirar sais e enzimas após digestão do DNA este foi precipitado adicionando acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol 100% gelado. Após incubação a -20 °C por 16 h, o sistema foi centrifugado a 10000 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 500 µL etanol 70% por centrifugação a 10000 x *g* por 2 min. O sobrenadante foi descartado e uma vez seco o precipitado, este foi ressuscitado em 10 µL de água milliQ.

3.2.11 Transformação de *Pichia pastoris* (vetores integrativos)

A levedura foi transformada por eletroporação segundo o protocolo descrito no EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen, EUA) com algumas modificações. Uma colônia fresca de levedura foi inoculada em 5 mL de YPD. Após 24 h de crescimento a 28 °C sob

agitação de 250 rpm, 100 mL de YPD foram inoculados com o volume necessário do pré-inóculo para atingir uma $OD_{600} = 1,3$ seguindo-se crescimento sob as mesmas condições. As células foram coletadas e lavadas 3 vezes com água estéril gelada (100 mL na primeira lavagem e 50 mL nas outras duas) e uma vez com sorbitol 1 M gelado centrifugando-se a $1500 \times g$ por 5 min a $4^\circ C$. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 300 μL de sorbitol 1 M gelado e 80 μL dessas células competentes foram misturadas com 5-10 μg de DNA linearizado. Foram adicionados 320 μL de sorbitol 1 M gelado e a mistura foi transferida a uma cubeta de eletroporação de 2 mm (Bio-Rad) e incubadas no gelo por 5 min antes de aplicar um pulso elétrico sob as seguintes condições: 1500 V, 400 Ω , e 25 μF . Imediatamente após o pulso, 1 mL de sorbitol 1 M gelado foi adicionado e as células foram incubadas a $30^\circ C$ sem agitação durante 2 h antes de serem semeadas no meio adequado para seleção de transformantes.

No caso da linhagem M12 foi preciso incubar o pré-inóculo só durante 12 h e posteriormente 500 μL dele foram usados para inocular mais 5 mL de meio. Após 8 h de incubação, o volume necessário dessa nova cultura foi inoculado em 100 mL de meio YPD para atingir uma $OD_{600} = 1,3$ após 16 h de crescimento.

3.2.12 Transformação de *Pichia pastoris* (vetores autorreplicativos)

Células eletro-competentes de *P. pastoris* foram preparadas para transformação com plasmídeos de replicação autônoma de acordo com as instruções apresentadas no manual do vetor pPICHOLI (MoBiTec). Um volume de 10 mL de YPD foi inoculado com uma colônia fresca seguindo-se incubação a $30^\circ C/250$ rpm por 16 h. Posteriormente, 500 mL de YPD foram inoculados com o volume necessário do pré-inóculo para atingir uma $OD_{600} = 1,3-1,5$ e incubados a $30^\circ C/250$ rpm. A cultura foi coletada por centrifugação a $2000 \times g$ por 10 min a $4^\circ C$. As células foram ressuspensas em 100 mL de YPD contendo 20 mL de HEPES 1M (pH 8,0) e 2,5 mL de DTT 1M e incubadas a $30^\circ C$ por 15 min sem agitação. Após esse tempo foi adicionada água estéril gelada até um volume final de 500 mL seguindo-se centrifugação a $2000 \times g$ por 10 min a $4^\circ C$. Em seguida, as células foram lavadas com 250 mL de água estéril gelada e submetidas a uma nova centrifugação sob as mesmas condições. As células foram

lavadas mais uma vez com 20 mL de sorbitol 1 M gelado e ressuspendidas em 500 μ L de sorbitol 1 M gelado. Um volume de 40 μ L das células eletro-competentes foi misturado com 5 μ L de DNA (100 ng) e o sistema transferido para uma cubeta de 2 mm. Foi usado o Gene-Pulser (Bio-Rad) para dar o pulso com os seguintes parâmetros: 1500 V, 400 Ω , 25 μ F. Após o pulso foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M gelado, e a mistura transferida para um tubo de 1,5 mL seguindo-se incubação a 30°C sem agitação pelo menos durante 30 min. Finalmente, as células foram semeadas em meio contendo o antibiótico adequado.

3.2.13 Avaliação do crescimento em meio líquido

Uma colônia nova da levedura foi inoculada em 5 mL de YPD e incubada por 16 h a 28 °C/250 rpm. Um volume de 100 mL de YPD foi inoculado com o volume necessário do pré-inóculo para começar a cultura com uma $OD_{600} = 0,1$. A cada certo tempo foram coletadas amostras de 1 mL as quais foram diluídas para determinação da OD_{600} em espectrofotômetro.

3.2.14 Extração de DNA total de levedura

O DNA genômico de leveduras foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) seguindo as orientações do fabricante.

3.2.15 Análise de fluorescência no Typhoon scanner

Para detectar rapidamente clones expressando *eGFP* intracelularmente foi feita uma análise da fluorescência emitida pelas células crescidas em meio sólido. A placa foi analisada utilizando o Typhoon scanner (GE) sob as seguintes condições: Filtro de emissão: 526 fluoresceína, Cy2, AlexaFluor 488; PMT: 600; Laser: verde (532); Sensibilidade: normal; Tamanho do pixel: 200 μ m; Painel focal: +3 mm.

3.2.16 Indução e expressão de proteínas recombinantes

Uma colônia nova da levedura foi inoculada em 5 mL de meio BMGY e incubada a 28 °C por 16 h. O volume apropriado dessa cultura foi coletado por centrifugação sendo ressuspensionado em 20 mL de meio BMMY para começar a indução com uma OD₆₀₀ de 0,3. A nova cultura foi incubada a 28 °C e a cada 24 h foi adicionado metanol numa concentração final de 0,5% (v/v). Após 48 h de indução, as células foram observadas no microscópio de fluorescência para avaliar a expressão da proteína heteróloga.

3.2.17 Microscopia de fluorescência

Cerca de 10 µL de cada cultura foram adicionados numa lâmina e a fluorescência emitida por células expressando *eGFP* foi detectada utilizando o microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axio Observer Z1 equipado com uma objetiva 63x NA 1,4. As imagens foram capturadas com a câmera AxioCam MRm (Zeiss) e coletadas com o programa Zen2011 software (Zeiss).

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem do gene *LEU2*

O gene *LEU2* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *P. pastoris* GS115 utilizando os *primers* PpLeu-F1 e PpLeu-R2 que se anelam nas regiões 5'-UTR e 3'-UTR, respectivamente. Esses *primers* adicionam sítios para a enzima de restrição *PvuII* nas suas extremidades. A figura 8 apresenta a sequência do fragmento de 1774 pb que foi alvo de amplificação por PCR. Na figura 9 (poço 3) pode-se observar uma banda de aproximadamente 1,8 kb obtida por PCR que é consistente com o tamanho esperado.

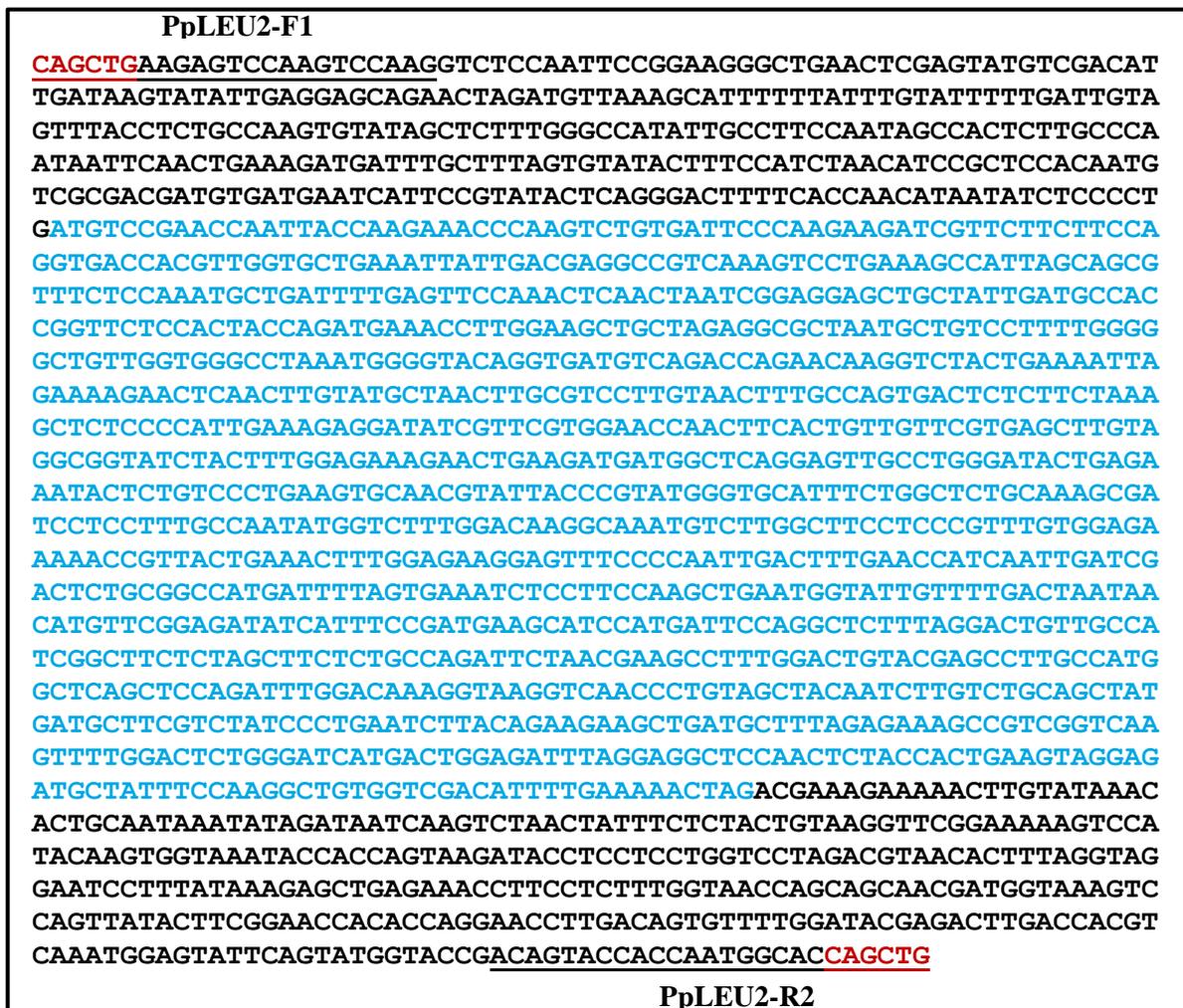


Figura 8. Sequência do fragmento amplificado com os *primers* PpLeu-F1 e PpLeu-R2. Em azul: região codante do gene *LEU2*; em vermelho, sítios para *PvuII*; sublinhado, regiões de anelamento dos *primers* PpLEU2-F1 e PpLEU2-R2.

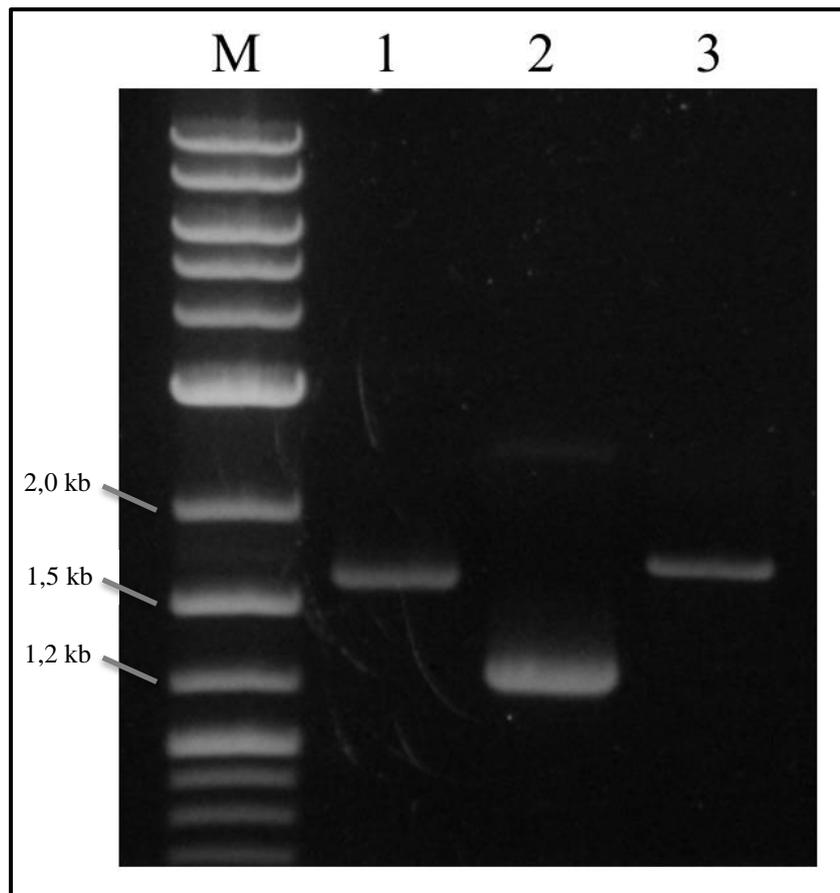


Figura 9. Amplificação por PCR dos cassetes *kanloxP* e *zeoloxP* e do gene *LEU2* de *P. pastoris*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: marcador 2-log (New England Biolabs), 1: *kanloxP* (~1,7 kb), 2: *zeoloxP* (~1,3 kb), 3: gene *LEU2* (~1,8 kb).

O gene *LEU2* amplificado foi ligado ao vetor comercial pGEM-T Easy (Promega). O sistema de ligação foi utilizado para transformar *E. coli* DH5 α . Após seleção em meio LB contendo ampicilina foi feita extração plasmidial de 6 clones transformantes e o DNA foi digerido com *PvuII* para confirmar a inserção do gene *LEU2* no vetor. Como o vetor pGEM-T Easy tem dois sítios de clivagem para *PvuII*, se o inserto tivesse sido ligado, a digestão com essa enzima devia liberar dois fragmentos pequenos de 173 pb e 286 pb, além do fragmento de 1774 pb correspondente ao gene *LEU2* e um fragmento de 2556 pb correspondente ao resto do pGEM-T Easy. Como observado na figura 10, os clones 2, 3, 4 e 6 apresentaram bandas de aproximadamente 1,8 kb e 2,6 kb indicando que tinham inserto. Como esperado, os fragmentos menores não foram observados devido à baixa concentração deles. O clone 4 foi

selecionado para fazer extração plasmidial em grande escala e o vetor obtido foi chamado de pGEM-LEU.

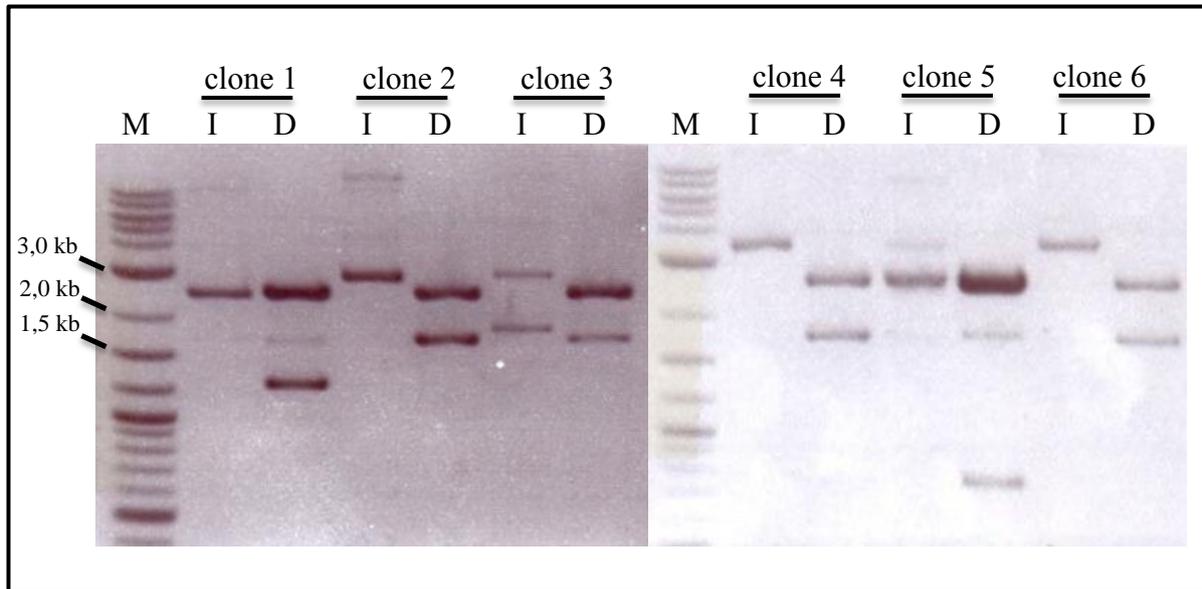


Figura 10. Clonagem do gene *LEU2* no vetor pGEM-T Easy. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o DNA plasmidial intacto (I) e digerido com *PvuII* (D) para 6 clones transformantes. M: marcador 2-log (New England Biolabs).

4.2 Construção do cassete de deleção

Com o fim de interromper o gene *LEU2* no genoma de *P. pastoris* foram construídos dois cassetes de deleção: um contendo o gene *kan^R* (resistência a kanamicina/G418) e outro contendo o gene *Sh ble* (resistência a zeocina). Os fragmentos *kanloxP* e *zeoloxP* foram obtidos ao amplificar por PCR os cassetes de expressão do gene *kan^R* a partir do vetor pPICK α e do gene *Sh ble* a partir do vetor pPICZ α A. A amplificação foi feita utilizando os *primers* ZeoBlas-F3 e ZeoBlas-R3 que adicionam sítios *loxP* nas extremidades do cassete de expressão. Ambos os cassetes contêm os promotores P_{TEF1} e P_{EM7} para controlar a transcrição do gene (*kan^R* ou *Sh ble*) em levedura e bactéria, respectivamente, assim como a sequência terminadora da transcrição do gene *CYC1*. A figura 11 apresenta a sequência do fragmento de 1708 pb que seria amplificado a partir do vetor pPICK α e a figura 12 mostra a sequência do fragmento de 1267 pb amplificada a partir do vetor pPICZ α A.

ZeoBlas-F3

CGGATCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAGATCTCCCACACACCA
TAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGC
ATCGCCGTACCACCTCAAACACCCCAAGCACAGCATACTAAATTTTCCCTCTTTCTTC
CTCTAGGGTGTGCGTTAATTACCCGTACTAAAGGTTTGGAAAAGAAAAAGAGACCGCC
TCGTTTCTTTTTCTTCGTCGAAAAAGGCAATAAAAATTTTATCACGTTTCTTTTTCT
TGAAATTTTTTTTTTTAGTTTTTTTCTCTTTTCAGTGACCTCCATTGATATTTAAGTTA
ATAAACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTTCTATTACAACCTT
TTTTTACTTCTTGTTCAATTAGAAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGGTGTT
GACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACT
AAACCATGGGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATTCCAA
CATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGT
GCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATG
GCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGAC
GGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGG
TTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTG
ATTGAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTTCTGCGCCGGTTGCATTCGAT
TCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTGTCGCTCGCTCAGGCGCAA
TCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCT
GGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTC
AGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTGGACGAGGGGAAATTA
ATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCA
TCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCAATACAGAAACGGCTTTTTCAA
ATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATGTCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAG
TTTTTCTAACACGTCCGACGGCGGCCACGGTCCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCC
TTTTCTTTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCC
CCACATCCGCTCTAACCAGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTAT
TTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAAGCTTATTTATATTTCAAATTTTTCTT
TTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGA
AGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTAGATCTATAACTTCGTATAAT
GTATGCTATACGAAGTTATGGATCCG

ZeoBlas-R3

Figura 11. Sequência do fragmento amplificado com os *primers* ZeoBlas-F3 e ZeoBlas-R3 a partir do vetor pPICKα. Em azul, região codante do gene *kan^R*; em vermelho, sítios *loxP*; sublinhado, regiões de anelamento dos *primers* ZeoBlas-F3 e ZeoBlas-R3.

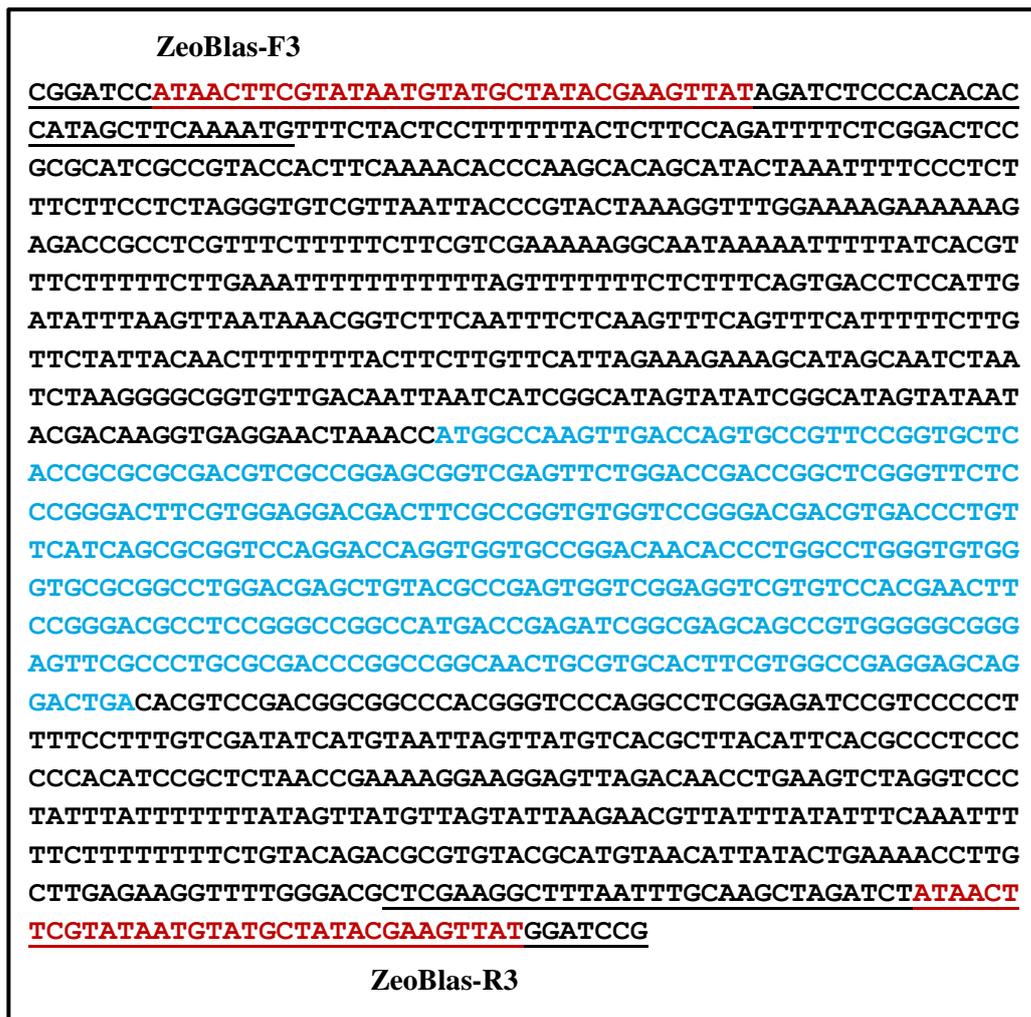


Figura 12. Sequência do fragmento amplificado com os *primers* ZeoBlas-F3 e ZeoBlas-R3 a partir do vetor pPICZαA. Em azul, região codante do gene *Sh ble*; em vermelho, sítios *loxP*; sublinhado, regiões de anelamento dos *primers* ZeoBlas-F3 e ZeoBlas-R3.

Na figura 9 podem ser observadas bandas de aproximadamente 1,7 kb (poço 1) e 1,3 kb (poço 2) que confirmam a amplificação dos fragmentos *kanloxP* e *zeoloxP*, respectivamente. Posteriormente, ambos os fragmentos foram ligados no vetor pGEM-LEU digerido com *EcoRV*. Essa digestão remove um fragmento interno de 375 pb do gene *LEU2* como observado na figura 13 (poço 2).

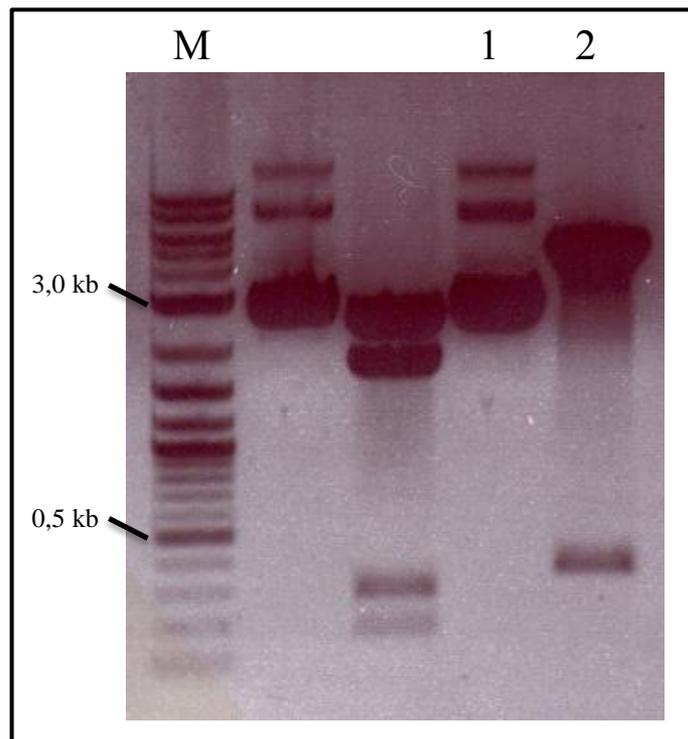


Figura 13. Linearização do vetor pGEM-LEU. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando os fragmentos liberados pela digestão do vetor pGEM-LEU com *EcoRV*. M: marcador 2-log (New England Biolabs), 1: pGEM-LEU intacto, 2: pGEM-LEU digerido com *EcoRV*.

O outro fragmento de 4414 pb gerado pela digestão do pGEM-LEU com *EcoRV* foi eluído do gel de agarose para ser ligado com os cassetes de deleção. Ambos os sistemas de ligação foram utilizados para transformar *E. coli* DH5 α . A seleção foi feita em meio LB com kanamicina para o sistema pGEM-LEU/*kanloxP* e em meio LB low salt com zeocina para o sistema pGEM-LEU/*zeoloxP*. De cada sistema foram selecionados 4 clones para fazer extração plasmidial e o DNA foi digerido com *PvuII* e com *EcoRV* para confirmar a clonagem. Se o cassete *kanloxP* tivesse sido ligado, a digestão com *PvuII* devia liberar um fragmento de 3107 pb correspondente ao cassete de deleção, um fragmento de 2556 pb correspondente ao vetor pGEM-T Easy e mais dois fragmentos pequenos de 286 pb e 173 pb; a digestão com *EcoRV* devia linearizar o vetor gerando um fragmento de 6122 pb. Se o cassete *zeoloxP* tivesse sido ligado, a digestão com *PvuII* devia liberar um fragmento de 2666 pb correspondente ao cassete de deleção, um fragmento de 2556 pb correspondente ao vetor pGEM-T Easy e mais dois fragmentos pequenos de 286 pb e 173 pb; a digestão com *EcoRV*

devia linearizar o vetor gerando um fragmento de 5681 pb. Como observado na figura 14 os clones 3 e 4 transformados com o sistema pGEM-LEU/*kanloxP* apresentaram bandas dos tamanhos esperados indicando que tinham o vetor com inserto. No caso do sistema pGEM-LEU/*zeoloxP* todos os clones apresentaram bandas dos tamanhos esperados.

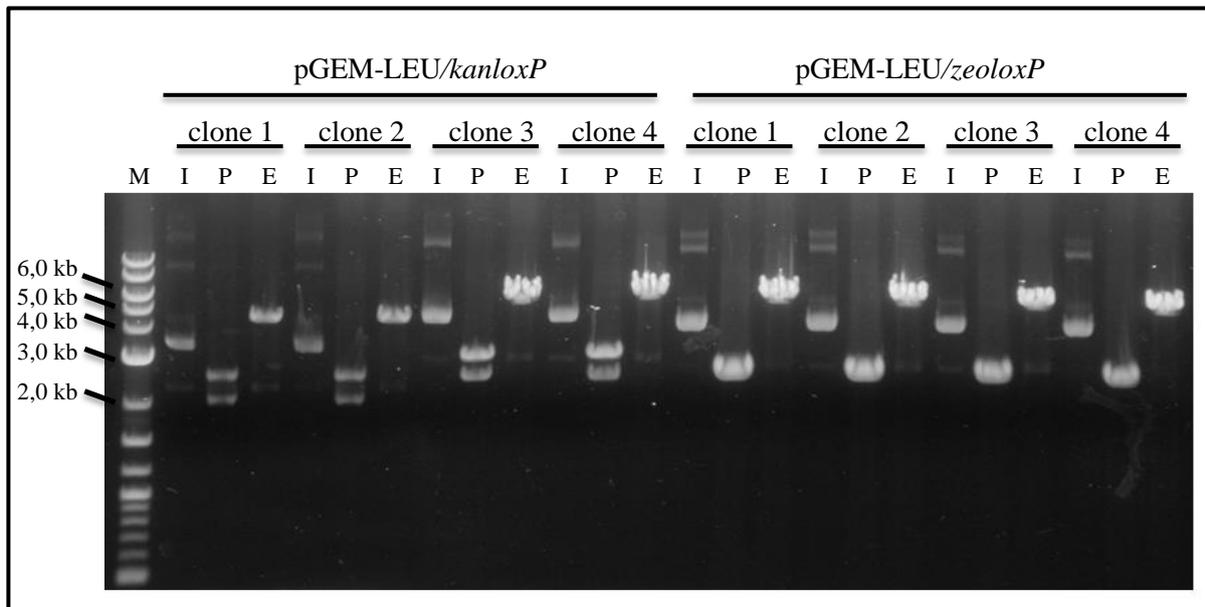


Figura 14. Clonagem dos cassetes *kanloxP* e *zeoloxP* no vetor pGEM-LEU. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o DNA plasmidial intacto (I) e digerido com *PvuII* (P) ou *EcoRV* (E) para 4 clones transformantes de cada sistema. M: marcador 2-log (New England Biolabs).

O clone 3 do sistema pGEM-LEU/*kanloxP* e o clone 1 do sistema pGEM-LEU/*zeoloxP* foram selecionados para fazer extração plasmidial em larga escala e os plasmídeos obtidos foram chamados de pLEU Δ kan e pLEU Δ zeo, respectivamente. A digestão de ambos os vetores com *PvuII* liberou os cassetes de deleção com os quais foi transformada *P. pastoris* X-33.

4.3 Determinação das concentrações de G418 e higromicina B

Foi realizado um teste para determinar as concentrações de G418 e higromicina B que seriam usadas durante as etapas de seleção de colônias transformantes de *P. pastoris*. Para isto foram semeadas diluições seriadas de células (10^3 - 10^8 células/mL) em meio YPD contendo diferentes concentrações da droga a avaliar. Para G418 foram avaliadas as seguintes concentrações: 300 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para higromicina B as concentrações avaliadas foram: 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Como controle foram semeadas as mesmas concentrações celulares em meio YPD sem a droga. O teste não foi feito para zeocina devido a que já está bem determinada a concentração necessária desta droga no meio de cultura (Invitrogen).

Como pode ser observado na figura 15, com uma concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ de G418 ainda há formação de colônias quando a concentração celular inoculada é de 10^8 células/mL. Já com 500 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico não houve crescimento celular, por tanto neste trabalho foi usada essa concentração para G418.

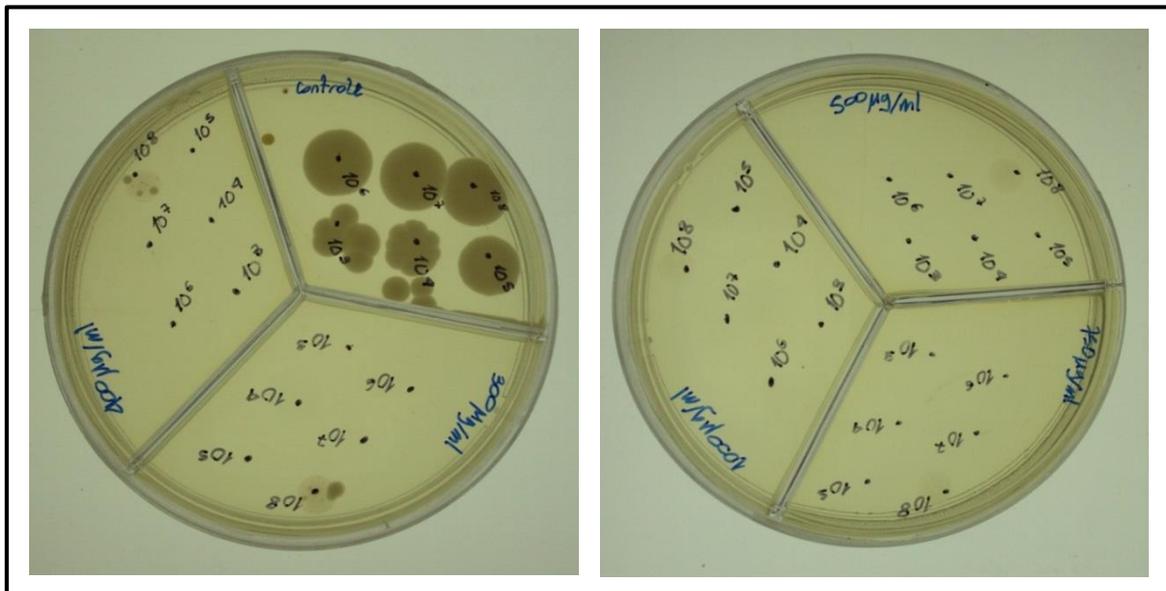


Figura 15. Determinação da concentração adequada da droga G418. Concentrações avaliadas: 300 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

No caso da higromicina B, como observado na figura 16, uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ é suficiente para inibir o crescimento de *P. pastoris* X-33 e essa concentração foi a utilizada neste trabalho nas etapas de seleção.

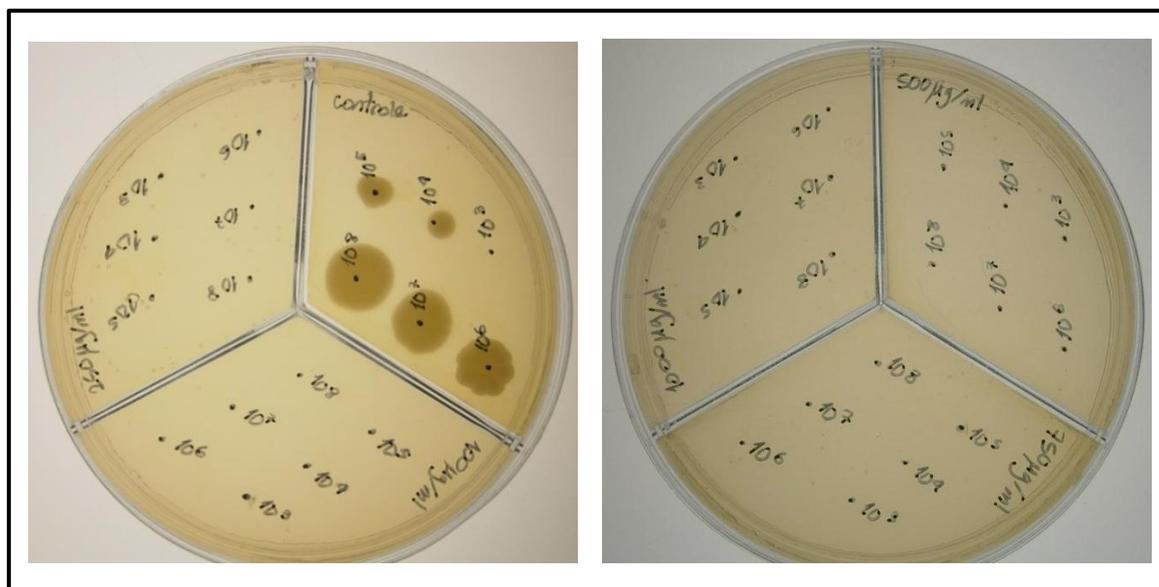


Figura 16. Determinação da concentração adequada da droga higromicina B. Concentrações avaliadas: 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

4.4 Transformação de *Pichia pastoris* X-33

A linhagem *P. pastoris* X-33, que apresenta fenótipo selvagem, foi transformada por eletroporação com os cassetes LEU Δ kan e LEU Δ zeo. Os clones transformantes foram selecionados em meio YPDS contendo os antibióticos G418 (500 $\mu\text{g/mL}$) ou zeocina (100 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Doze clones transformados com LEU Δ kan e 36 clones transformados com LEU Δ zeo foram selecionados e semeados em meio YPD com G418 ou zeocina, segundo o caso, para obter clones isolados como observado na figura 17. Também foi semeada a levedura sem transformar para ser usada como controle. Tanto no meio com G418 quanto no meio com zeocina todos os clones cresceram, enquanto que não houve crescimento do controle. Isto indica que a levedura nativa é inibida por ambas as drogas e que o fato de que todos os clones selecionados cresceram nesses meios pode ser atribuído à integração do cassete de deleção que confere a resistência às drogas.

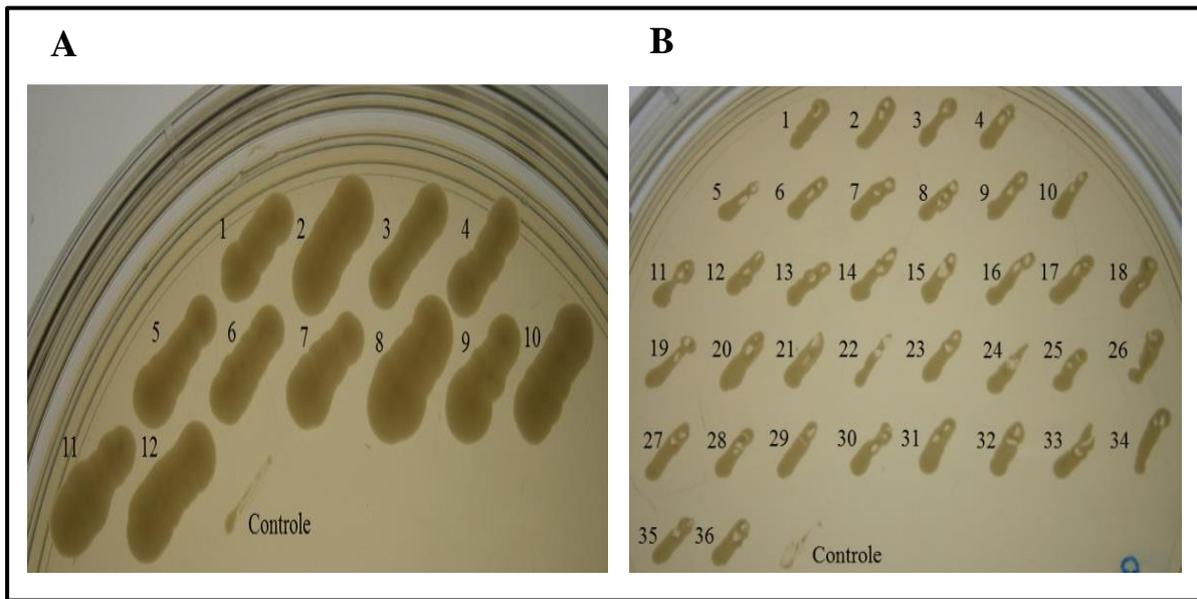


Figura 17. Resultado da transformação de *P. pastoris* X-33 com os cassetes de deleção LEU Δ kan e LEU Δ zeo. A. Clones transformados com LEU Δ kan crescidos em meio YPD com G418, **B.** Clones transformados com LEU Δ zeo crescidos em meio YPD com zeocina, controle: *P. pastoris* X-33 sem transformar.

4.5 Seleção de clones Leu⁻

Após a seleção no meio com antibiótico, os clones transformantes foram semeados em placas contendo meio mínimo com ou sem leucina (figuras 18 e 19). Era esperado que não houvesse crescimento no meio sem leucina devido à interrupção do gene *LEU2* pelo cassette de deleção o que impossibilitaria a síntese do aminoácido. Porém, para ambos os sistemas, houve clones que cresceram em meio sem leucina indicando que o cassette de deleção foi integrado em algum outro *locus* que não fosse *LEU2*. Os clones que não cresceram no meio sem suplementação de leucina correspondem aos clones Leu⁻ e foram recuperados a partir do meio com leucina onde todos os clones cresceram.

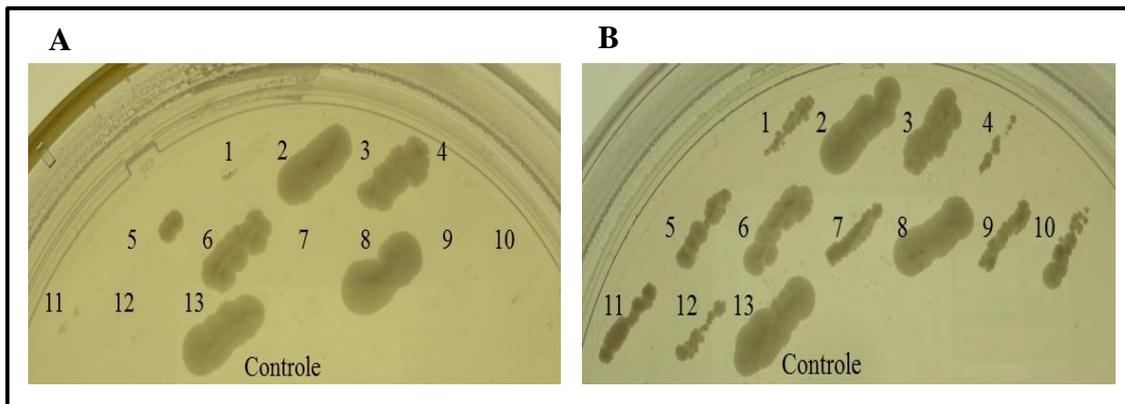


Figura 18. Seleção de clones *Leu⁻* após transformação com o cassete *LEUΔkan*. A. crescimento em meio mínimo, B. crescimento em meio mínimo suplementado com leucina 0,05%.

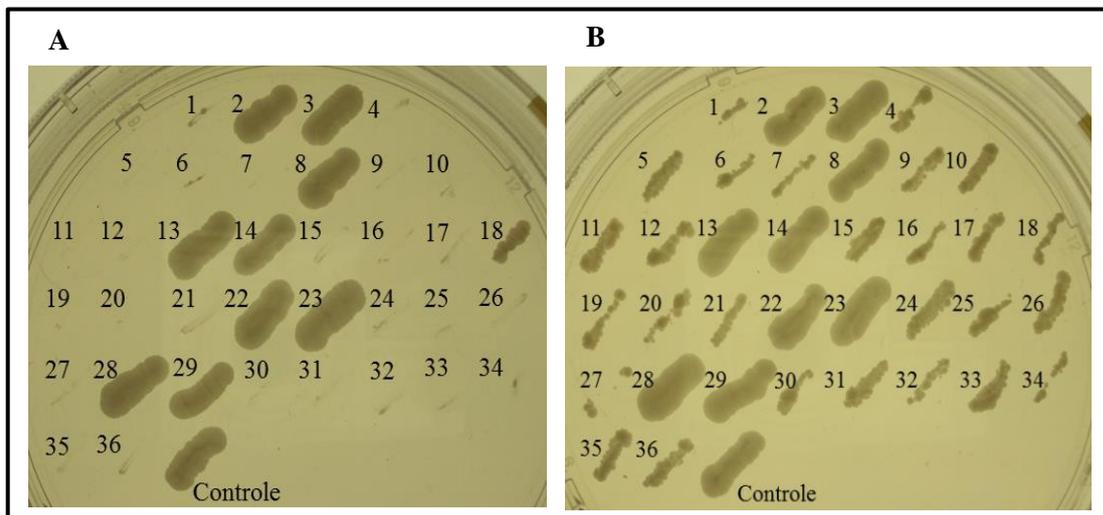


Figura 19. Seleção de clones *Leu⁻* após transformação com o cassete *LEUΔzeo*. A. crescimento em meio mínimo, B. crescimento em meio mínimo suplementado com leucina 0,05%.

Ao comparar o crescimento dos clones transformantes em meio mínimo suplementado com leucina foi observado que os clones *Leu⁻* cresciam mais devagar do que aqueles que não sofreram ruptura do gene *LEU2*, enquanto que em meio YPD o crescimento foi igual para todos. A princípio pensou-se que este comportamento estivesse ligado a uma deficiência em isoleucina já que a enzima codificada pelo gene *LEU2* também está envolvida na via de síntese de isoleucina. Com a finalidade de confirmar esta hipótese, os clones transformantes foram semeados em meio mínimo suplementado com leucina e isoleucina. Como pode ser

observado na figura 20, a adição de isoleucina ao meio mínimo não melhorou o crescimento dos clones Leu^- .

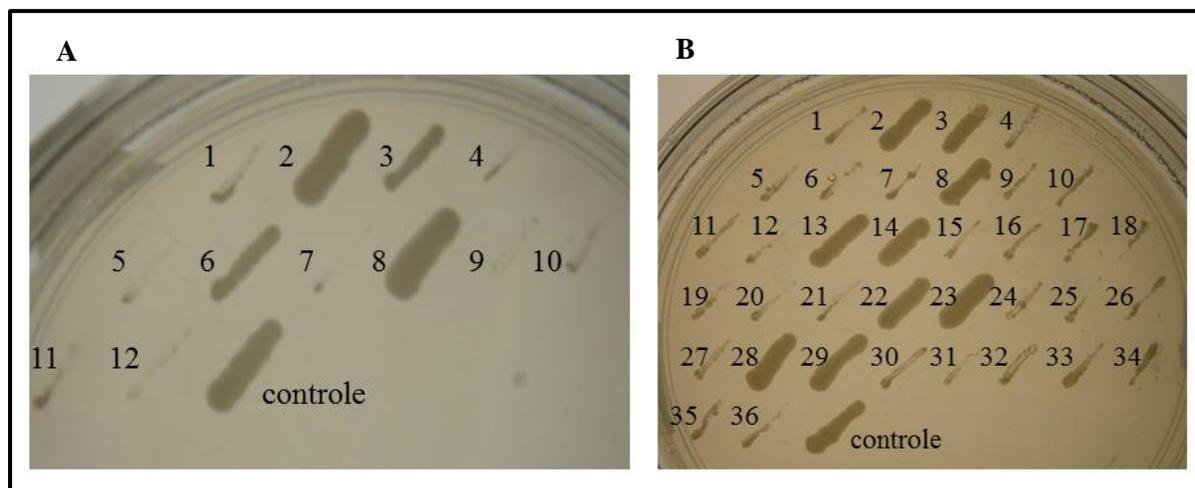


Figura 20. Crescimento dos clones transformantes em meio mínimo suplementado com leucina 0,05% e isoleucina 0,05%. A. Clones transformados com o cassete $LEU\Delta kan$, **B.** Clones transformados com o cassete $LEU\Delta zeo$.

Em *Saccharomyces cerevisiae* o transporte de leucina para dentro da célula é mediado por três sistemas: GAP (permease geral de aminoácidos), S1 (permease de alta afinidade) e S2 (permease de baixa afinidade) (SCHREVE e GARRETT, 1997). A atividade da permease geral GAP é completamente inibida pela presença de íon amônio no meio de cultura (GRENSON et al., 1970). As proteínas S1 e S2 podem funcionar na presença desse íon embora suas atividades decresçam consideravelmente (KOTLIAR et al., 1994). Diante desta informação trabalhamos com a hipótese de que *P. pastoris* poderia ter um mecanismo semelhante para transportar leucina e que o lento crescimento dos clones Leu^- era devido à inibição da atividade das permeases pelo íon amônio proveniente do sulfato de amônio presente no meio mínimo. Para confirmar esta hipótese, o clone Leu^- selecionado foi crescido em meio mínimo sem sulfato de amônio, e contendo como única fonte de nitrogênio o aminoácido leucina. Na figura 21 observa-se o crescimento desse clone comparado com a levedura nativa.

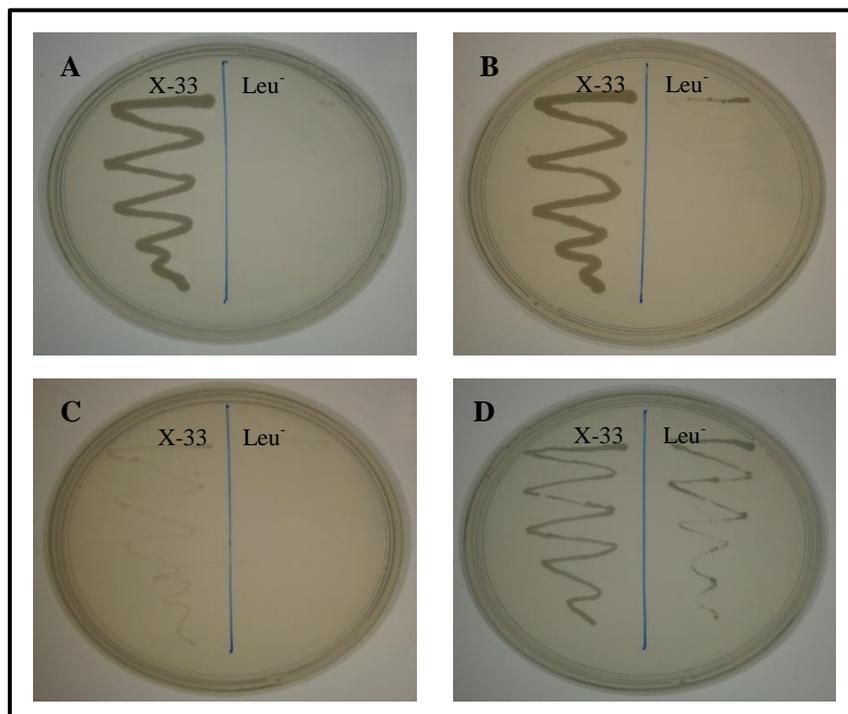


Figura 21. Crescimento de *P. pastoris* X-33 e do clone Leu^- em meio mínimo. A. com sulfato de amônio, B. com sulfato de amônio e leucina 0,02%, C. sem sulfato de amônio, D. sem sulfato de amônio e com leucina 0,02%.

Em meio mínimo com sulfato de amônio, tanto com ou sem leucina, a levedura nativa cresceu normalmente enquanto que o clone Leu^- só apresentou um discreto crescimento em meio suplementado com leucina. Como esperado, em meio mínimo sem sulfato de amônio, ambas as linhagens são incapazes de crescer, pois não há fonte de nitrogênio. Já quando este meio é suplementado com leucina o crescimento do clone Leu^- é similar ao da levedura nativa. Embora as taxas de crescimento não tenham sido estimadas nas diversas condições analisadas, estes resultados confirmam a ideia de que a presença do íon amônio inibe o transporte de leucina para dentro da célula impedindo o crescimento normal da levedura auxotrófica.

4.6 Confirmação da deleção do gene *LEU2*

Para cada sistema (*kanloxP* e *zeoloxP*) foi selecionado um clone Leu^- e o DNA total foi extraído. A interrupção do gene *LEU2* nos clones selecionados foi confirmada por PCR usando três combinações de *primers*: PpLEU2-EXT1 e PpLEU2-EXT2, que se anelam em

regiões externas ao gene *LEU2* no genoma de *Pichia*; PpLEU2-EXT1 e ZeoBlas-R3, que se anelam na região 5' externa ao gene *LEU2* e no cassete de deleção, respectivamente; e ZeoBlas-F3 e PpLEU2-EXT2, que se anelam no cassete de deleção e na região 3' externa ao gene *LEU2*, respectivamente. A figura 22 apresenta um esquema dos sítios de anelamento dos *primers* e os tamanhos dos fragmentos que seriam amplificados. Se os cassetes *kanloxP* e *zeoloxP* tivessem sido integrados era esperado amplificar um fragmento de ~3,3 kb e um de ~2,9 kb, respectivamente, quando fosse usada a primeira combinação de *primers*. Se não houvesse interrupção, o fragmento amplificado seria de ~2,0 kb. Com a segunda combinação de *primers* os tamanhos esperados eram ~2,6 kb e ~2,1 kb se os cassetes *kanloxP* e *zeoloxP* tivessem sido integrados, respectivamente, e não deveria haver amplificação se não houvesse interrupção. Com a terceira combinação de *primers* os tamanhos esperados eram ~2,4 kb e ~2,0 kb se os cassetes *kanloxP* e *zeoloxP* tivessem sido integrados, e não deveria haver amplificação se não houvesse deleção.

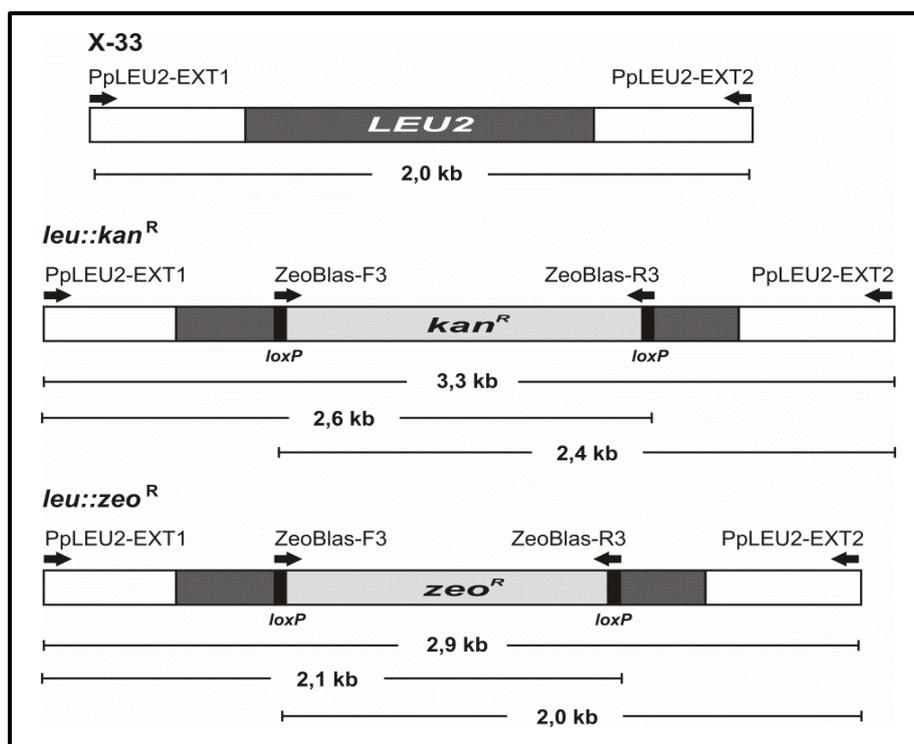


Figura 22. Sítios de anelamento dos *primers* utilizados para confirmar deleção do gene *LEU2* e tamanhos dos fragmentos que seriam amplificados.

O gel de agarose da figura 23 mostra todas as bandas dos tamanhos esperados para o clone transformado com o cassete *kanloxP* confirmando a deleção do gene *LEU2* nesse clone. Para o clone transformado com o cassete *zeoloxP* foi observada uma banda do tamanho esperado com a primeira combinação de *primers*, porém, com os outros dois pares de *primers* não houve amplificação. Para o controle, que foi a levedura sem transformar, foi amplificado um fragmento de ~2,0 kb com a primeira combinação de *primers* e com as outras duas combinações não foi observada amplificação. Como nosso objetivo era interromper o gene *LEU2*, não investigamos as razões que levaram ao resultado negativo da PCR com o cassete *zeoloxP*, e continuamos o trabalho com o clone transformado com o cassete *kanloxP* que foi denominado *P. pastoris* LK.

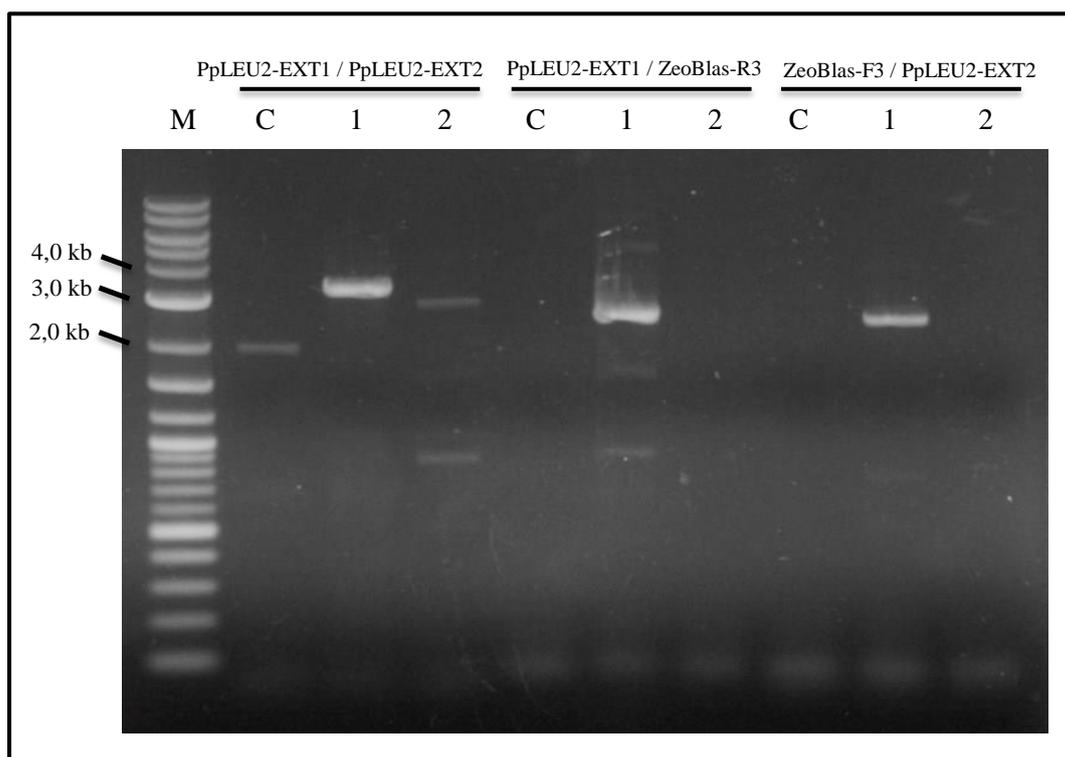


Figura 23. PCR para confirmar deleção do gene *LEU2*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: marcador 2-log (New England Biolabs), C: *P. pastoris* X-33, 1: clone transformado com *kanloxP*, 2: clone transformado com *zeoloxP*.

4.7 Construção de vetor para expressão da recombinase CreA

O vetor pYRCre (REIS et al., 2012), previamente desenvolvido no nosso grupo de pesquisa, contém o gene que codifica para a enzima recombinase CreA sob a regulação do promotor induzível P_{GALI} de *S. cerevisiae* (figura 24). Como em *P. pastoris* não há metabolismo para galactose era preciso substituir esse promotor por outro que fosse funcional nessa levedura, neste caso o promotor constitutivo P_{TEFI} . Para conseguir isto o P_{GALI} foi removido do vetor digerindo-o com a enzima de restrição *Xba*I. A banda de aproximadamente 6,0 kb observada na figura 25 (poço 1) corresponde ao fragmento do vetor pYRCre sem o P_{GALI} .

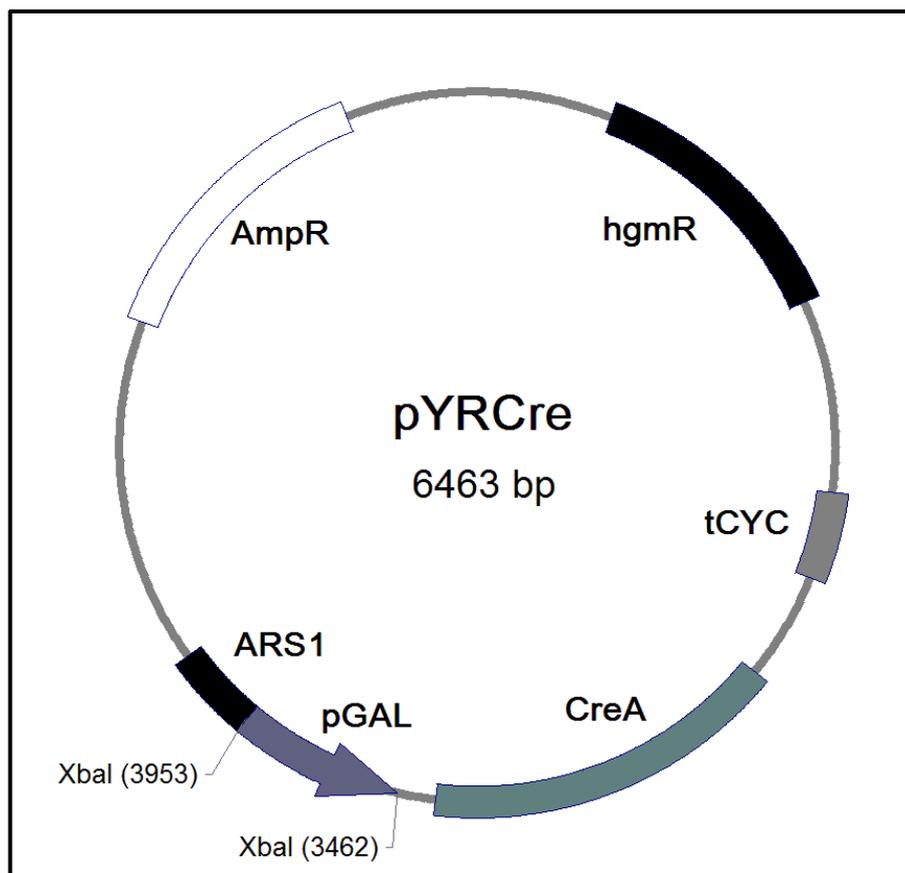


Figura 24. Mapa físico do vetor pYRCre. Vetor para a expressão da recombinase CreA sob o controle do promotor P_{GALI} .

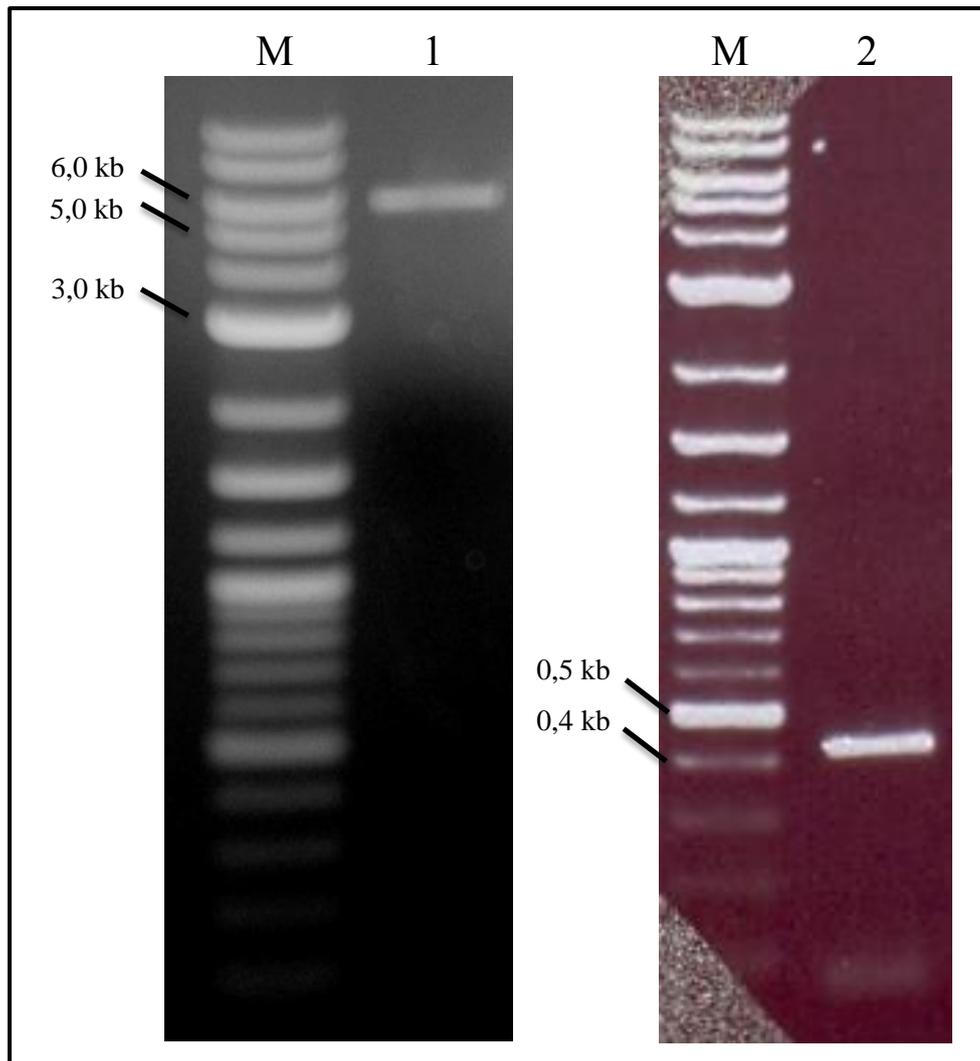


Figura 25. Remoção do P_{GALI} no pYRCre e amplificação por PCR do P_{TEF1} . Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: marcador 2-log (New England Biolabs), 1: pYRCre linearizado após digestão com *Xba*I (~6,0 kb), 2: P_{TEF1} (~450 pb).

O P_{TEF1} foi amplificado a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae* com os *primers* TEF-2F e TEF-2R os quais adicionam, nas extremidades, sítios para a enzima *Avr*II. Esta enzima gera extremidades coesivas compatíveis com as extremidades geradas pela enzima *Xba*I. A figura 25 (poço 2) mostra uma banda de aproximadamente 450 pb correspondente ao P_{TEF1} amplificado por PCR. Esse fragmento foi clonado no vetor comercial pCR-Blunt

(Invitrogen) e a digestão desse plasmídeo com a enzima de restrição *AvrII* liberou o P_{TEFI} como observado na figura 26. A outra banda observada, de aproximadamente 3,5 kb, corresponde ao vetor pCR-Blunt.

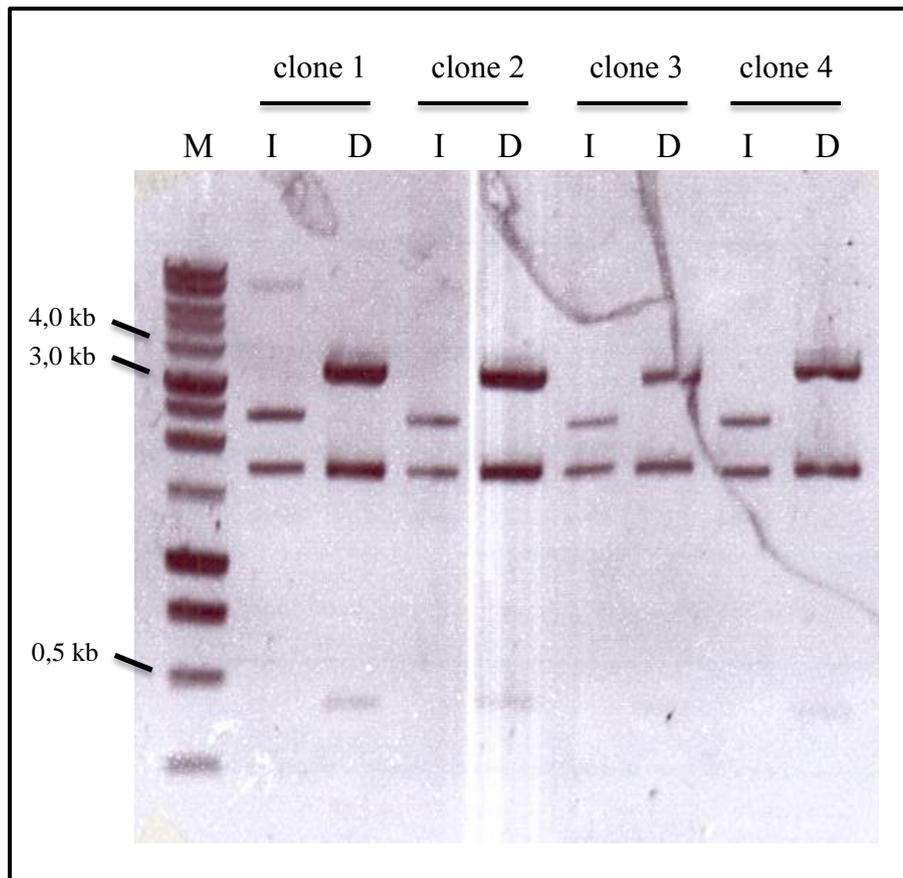


Figura 26. Clonagem do P_{TEFI} no pCR-Blunt. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o DNA plasmidial intacto (I) e digerido com *AvrII* (D) para 4 clones transformantes. M: marcador 2-log (New England Biolabs).

Posteriormente, o P_{TEFI} foi ligado no pYRCre e células de *E. coli* XL10-gold foram transformadas com o sistema de ligação. Foram selecionados 9 clones transformantes em meio LB contendo ampicilina e seu DNA plasmidial foi extraído (figura 27).

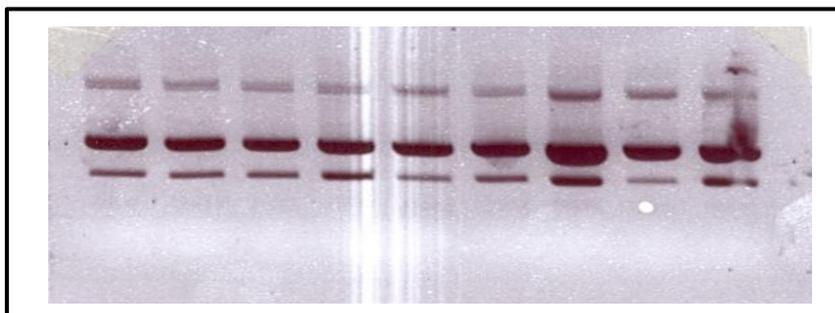


Figura 27. Clonagem do P_{TEFI} no pYRCre (miniprep). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o DNA plasmidial intacto de 9 clones transformantes.

Como o DNA plasmidial de todos os clones apresentou o mesmo perfil foi selecionado um deles para fazer análises de restrição e confirmar a clonagem. O DNA foi digerido com a enzima *Hind*III que devia liberar um fragmento de aproximadamente 700 pb caso o promotor tivesse sido ligado no vetor. Se o vetor estivesse religado era esperada uma banda de aproximadamente 300 pb, além da banda de 5,7 kb correspondente ao resto do vetor. O resultado observado na figura 28 confirma a clonagem, mas não permite saber a orientação do promotor no vetor.

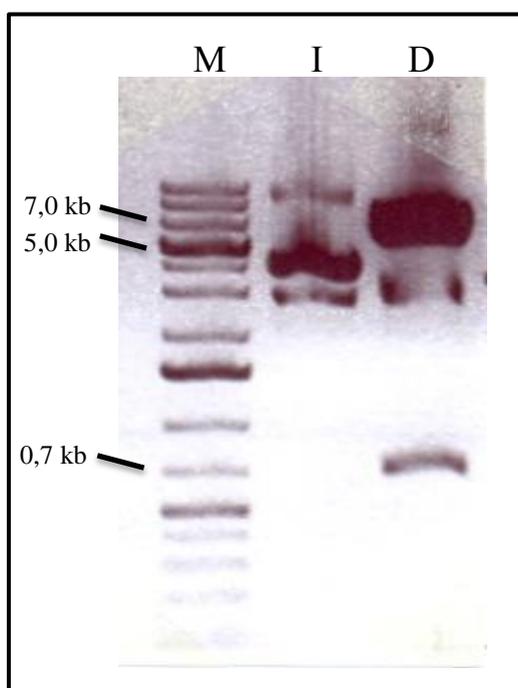


Figura 28. Clonagem do P_{TEFI} no pYRCre (digestão). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o DNA plasmidial intacto (I) e digerido com *Hind*III (D). M: marcador 1kb O'Gene Ruler.

Com a finalidade de determinar a orientação do P_{TEF1} , o DNA plasmidial de todos os clones foi submetido a PCR com os pares de *primers* Ampint5/TEF-2F e Ampint5/TEF-2R. O *primer* Ampint5 se anela no gene que confere resistência a ampicilina como observado na figura 29. Um fragmento de aproximadamente 5,0 kb seria amplificado com a primeira combinação de *primers* se o promotor tivesse entrado no sentido anti-horário, ou com o segundo par de *primers* se a orientação fosse no sentido horário. Para permitir o controle do gene *CreA* o promotor devia estar no sentido anti-horário, desta forma que foi selecionado o clone 8 o qual apresentou amplificação de um fragmento do tamanho esperando quando usado o par de *primers* Ampint5/TEF-2F (figura 30).

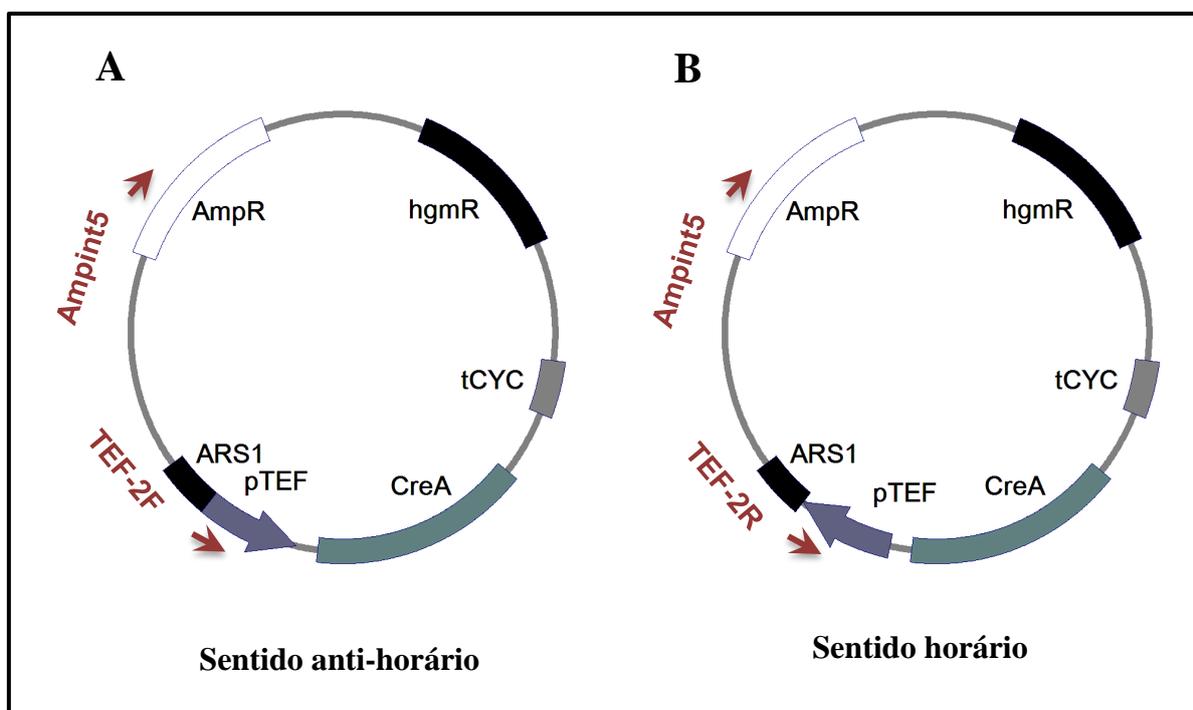


Figura 29. Sítios de anelamento dos *primers* para amplificar um fragmento de ~5,0 kb com o fim de determinar a orientação do P_{TEF1} no pYRCre. **A.** Se o promotor estivesse no sentido anti-horário a amplificação seria com os *primers* Ampint5/TEF-2F, **B.** Se estivesse no sentido horário seria com os *primers* Ampint5/TEF-2R.

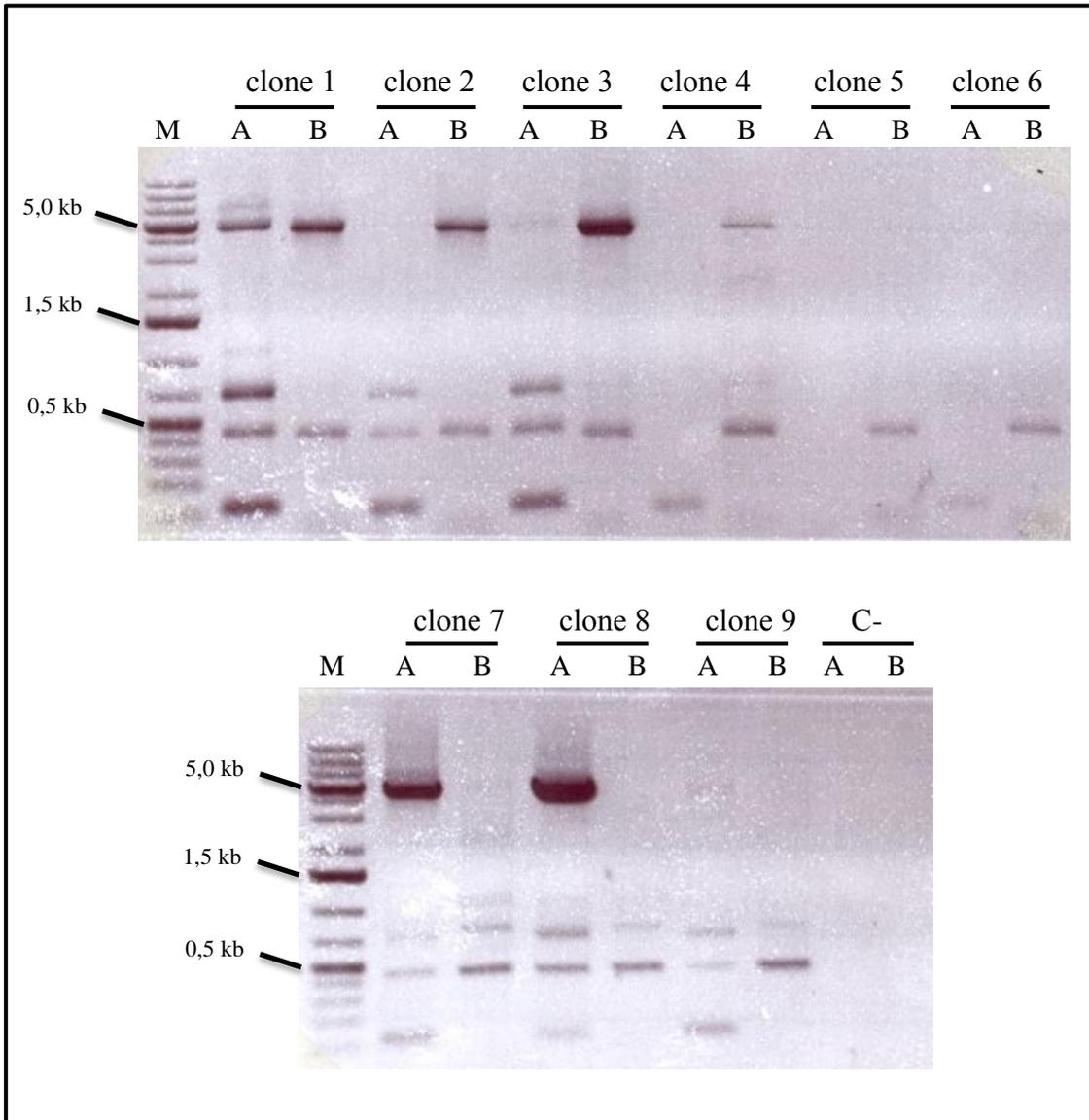


Figura 30. PCR para determinar orientação do P_{TEF1} no pYRCre. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A: *primers* Ampint5/TEF-2F, B: *primers* Ampint5/TEF-2R, M: marcador 1kb O'Gene Ruler. C-: controle negativo da PCR, reação sem *template*.

O DNA plasmidial do clone selecionado foi submetido a PCR para fazer uma última confirmação da clonagem na orientação desejada. Foram usados os pares de *primers* Ampint3/TEF-2F e Ampint3/TEF-2R. A figura 31 mostra os sítios de anelamento desses *primers*. Se o promotor realmente estivesse no sentido anti-horário era esperado a

amplificação de um fragmento de aproximadamente 2,3 kb usando-se a combinação de *primers* Ampint3/TEF-2R, enquanto que com o outro par de *primers* não deveria haver amplificação.

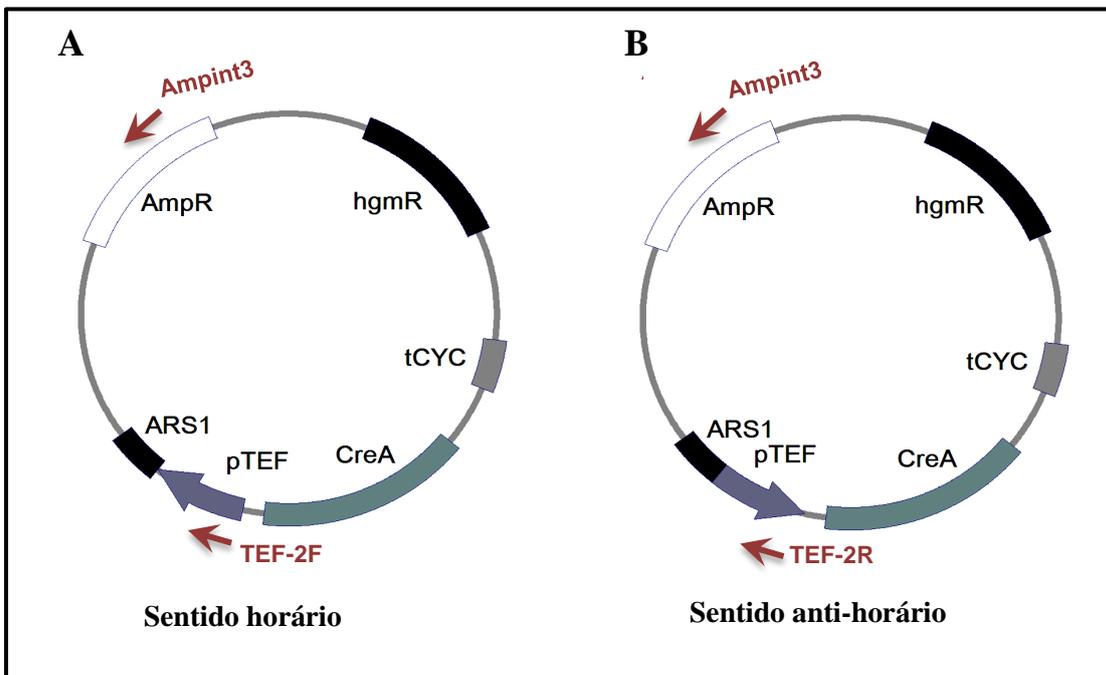


Figura 31. Sítios de anelamento dos *primers* para amplificar um fragmento de ~2,3 kb com o fim de determinar orientação do P_{TEF1} no pYRCre. **A.** Se o promotor estivesse no sentido horário a amplificação seria com os *primers* Ampint3/TEF-2F. **B.** Se estivesse no sentido anti-horário seria com os *primers* Ampint3/TEF-2R.

O resultado observado na figura 32 confirma a orientação do promotor no sentido anti-horário. O vetor obtido contendo o gene *CreA* sob o controle do P_{TEF1} foi chamado de pYRCre2 (figura 33).

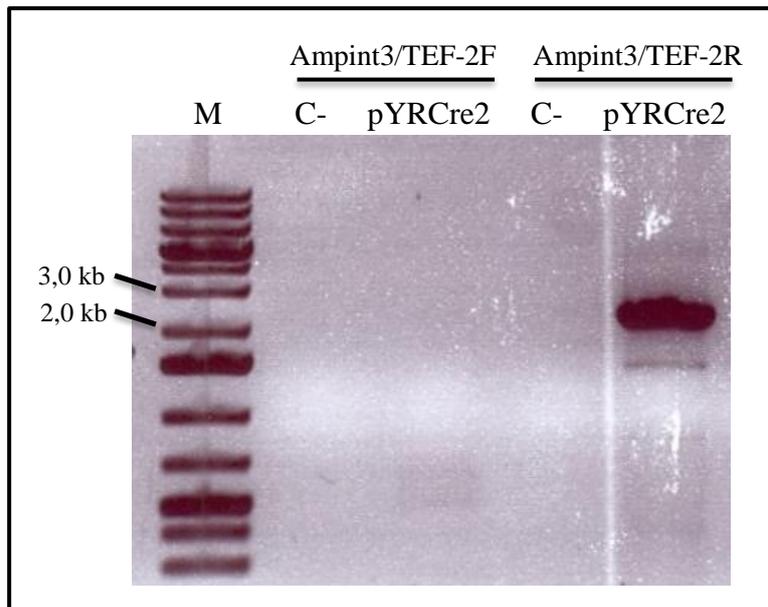


Figura 32. PCR para confirmar orientação do P_{TEF1} no sentido anti-horário no vetor pYRCre2. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: marcador 1kb O'Gene Ruler. C-: controle negativo da PCR, reação sem *template*.

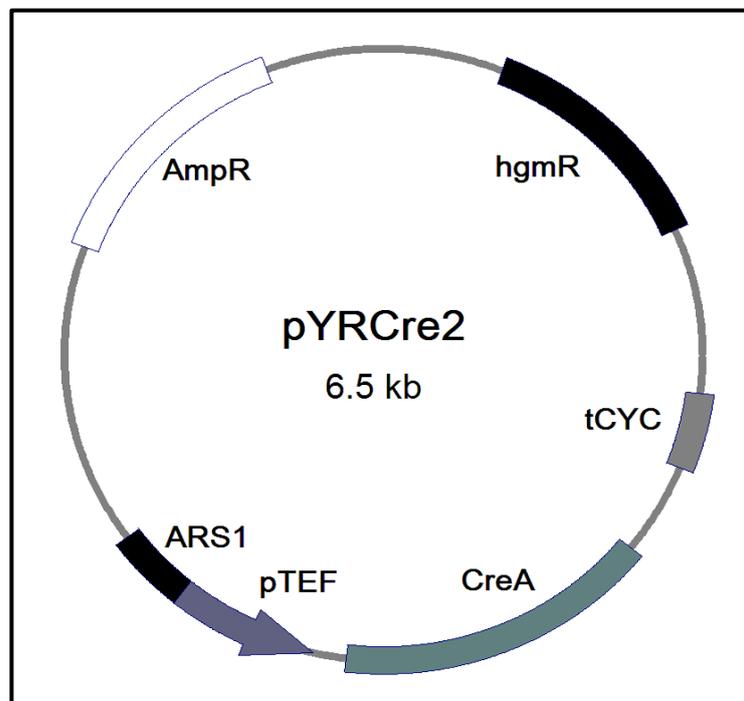


Figura 33. Mapa físico do vetor pYRCre2. Vetor para a expressão da recombinase CreA sob o controle do promotor P_{TEF1} .

4.8 Transformação de *Pichia pastoris* LK e reciclagem da marca *kan^R*

A levedura auxotrófica foi transformada com o vetor pYRCre2 para expressar a recombinase CreA e permitir assim a reciclagem da marca de seleção dominante *kan^R*. Após transformação as células foram semeadas em meio YPDS contendo higromicina e incubadas a 28 °C durante 3 dias para permitir a expressão da recombinase. Como pYRCre2 é um plasmídeo de replicação autônoma sem estabilidade mitótica, sua perda ocorre espontaneamente, ou seja, uma colônia pode ser formada por uma mistura de células contendo o vetor e células “curadas”. Dessa forma, cinco clones transformantes foram selecionados e transferidos para uma placa com médio YPD com o fim de isolar colônias homogêneas. Posteriormente, 20 colônias isoladas foram selecionadas (figura 34A) e semeadas em YPD contendo 500 µg/mL de G418 (figura 34B) ou 150 µg/mL de higromicina (figura 34C) para confirmar a excisão do gene *kan^R* e a perda do pYRCre2, respectivamente. Na placa com G418, não houve crescimento para nenhum clone, confirmando a remoção da marca *kan^R*. Na placa com higromicina, foi observado crescimento para alguns clones. Um dos clones que perdeu o vetor pYRCre2, e que, portanto, não cresceu em meio contendo higromicina, foi selecionado, e a linhagem foi chamada de *P. pastoris* M12.

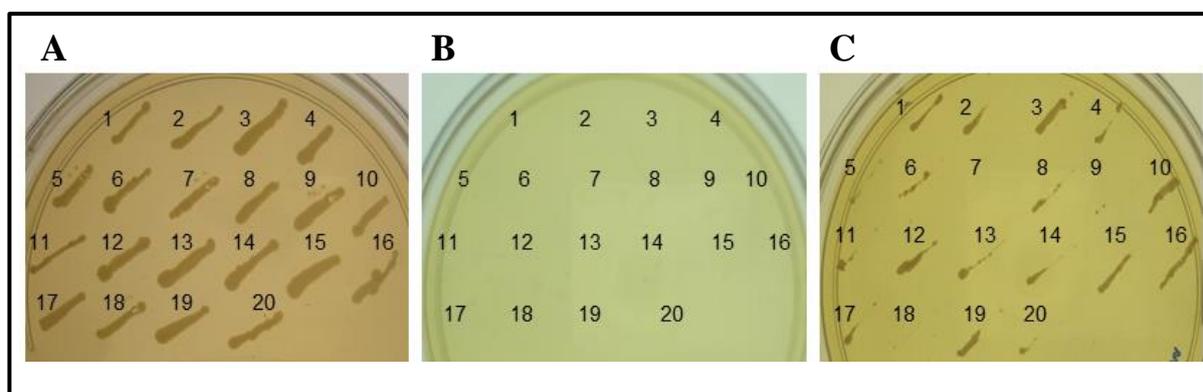


Figura 34. Transformação com o vetor pYRCre2. A. Clones transformantes crescidos em YPD, **B.** Quando semeados em YPD contendo G418 os clones transformantes não apresentaram crescimento devido à remoção da marca *kan^R*, **C.** Os clones que perderam o vetor pYRCre2 não cresceram em YPD contendo higromicina B.

A figura 35 apresenta o comportamento das duas linhagens auxotróficas (LK e M12) em meio YPD contendo os antibióticos G418 ou higromicina B comparado com a linhagem nativa X-33. Como esperado, apenas *P. pastoris* LK apresenta resistência a G418, e nenhuma das três linhagens tem a capacidade de crescer em meio contendo higromicina B.

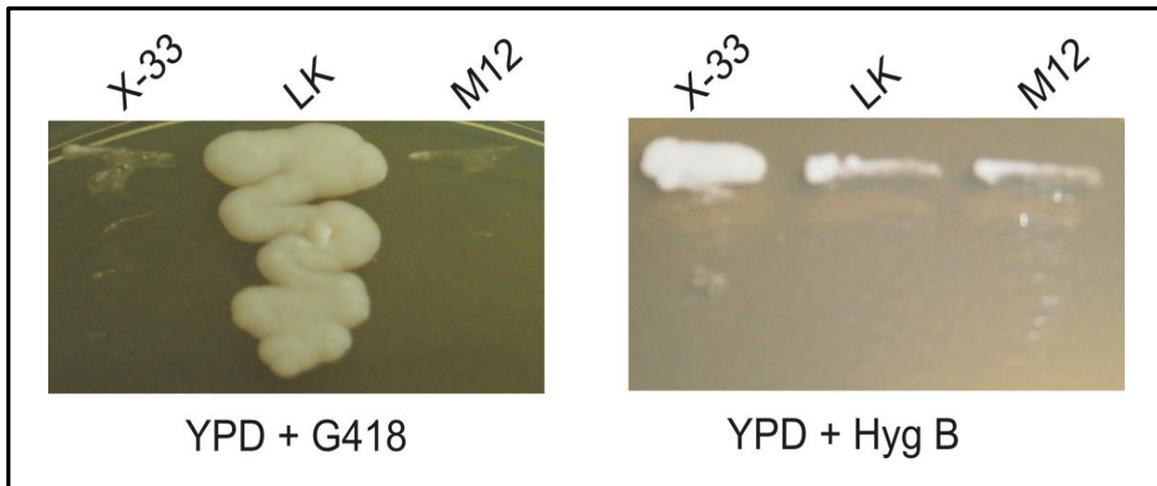


Figura 35. Confirmação da remoção da marca de seleção dominante. Crescimento das diferentes linhagens em meio contendo antibiótico. X-33: linhagem nativa, LK: linhagem *leu2* interrompida com cassete *kan^R*, M12: linhagem *leu2* obtida após remoção da marca dominante.

Para confirmar a remoção da marca dominante do genoma da levedura foi feita uma PCR com 2 combinações de *primers*: PpLEU-EXT1/ PpLEU-EXT2 e ZeoBlas-F3/PpLEU-EXT2. A linhagem nativa X-33 e a linhagem M12 deveriam apresentar produtos de amplificação somente com a primeira combinação de *primers* sendo que o tamanho do fragmento amplificado em M12 deveria ser menor devido à deleção do gene *LEU2*. A linhagem LK deveria apresentar amplificação com ambos os pares de *primers* devido à presença do gene *kan^R* no seu genoma. O gel da figura 36 mostra as bandas dos tamanhos esperados para todas as linhagens ratificando a perda da marca dominante na linhagem M12.

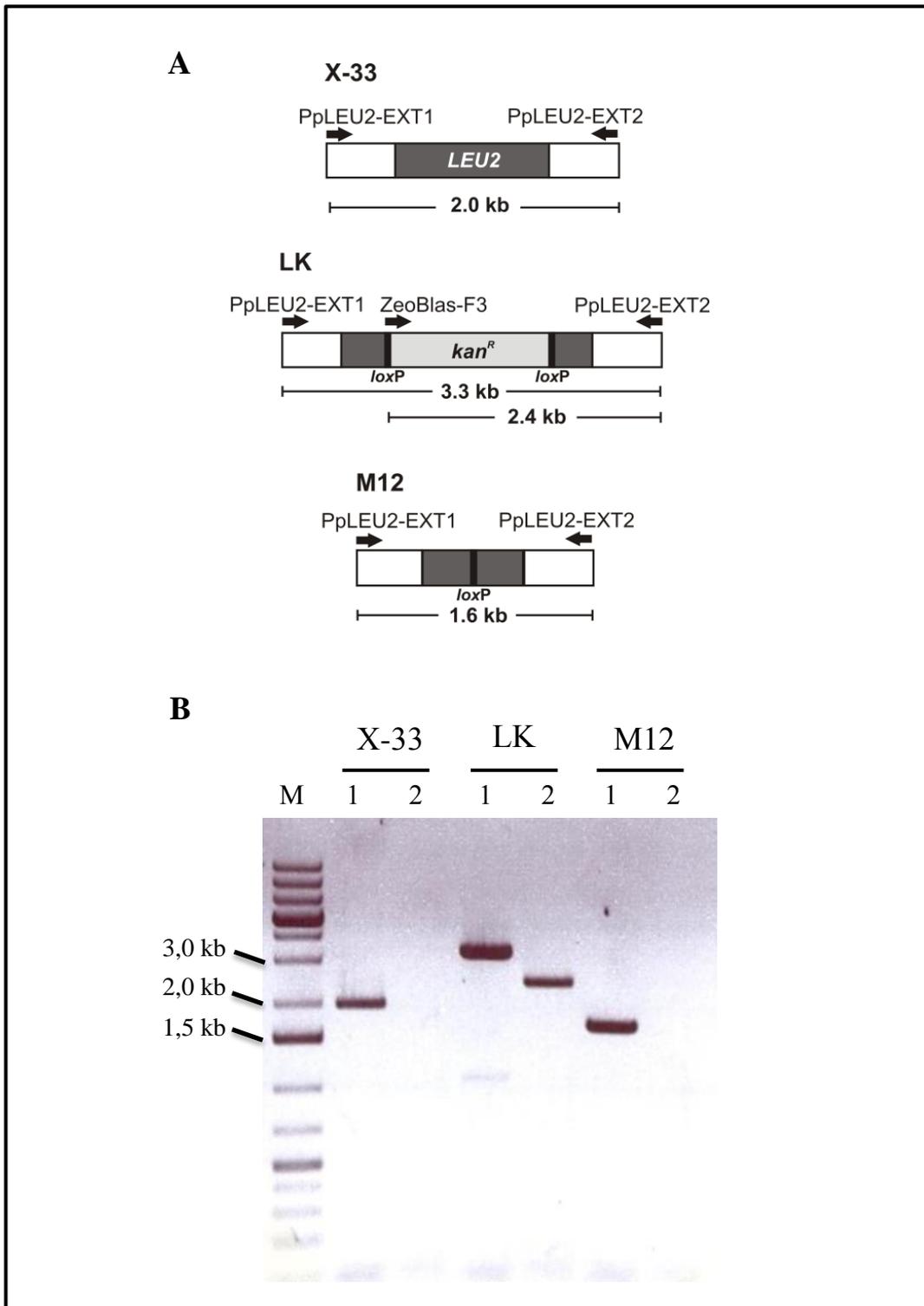


Figura 36. PCR para confirmar a remoção da marca de seleção dominante. A. Sítios de anelamento dos *primers* utilizados e tamanhos dos fragmentos que seriam amplificados, **B.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M: marcador 1kb O'Gene Ruler, 1: PpLEU2-EXT1/PpLEU2-EXT2, 2: ZeoBlas-F3/PpLEU2-EXT2.

4.9 Avaliação da recuperação da prototrofia

A figura 37 apresenta o comportamento das duas linhagens auxotróficas (LK e M12) em relação à assimilação de leucina comparado com o da linhagem nativa X-33.

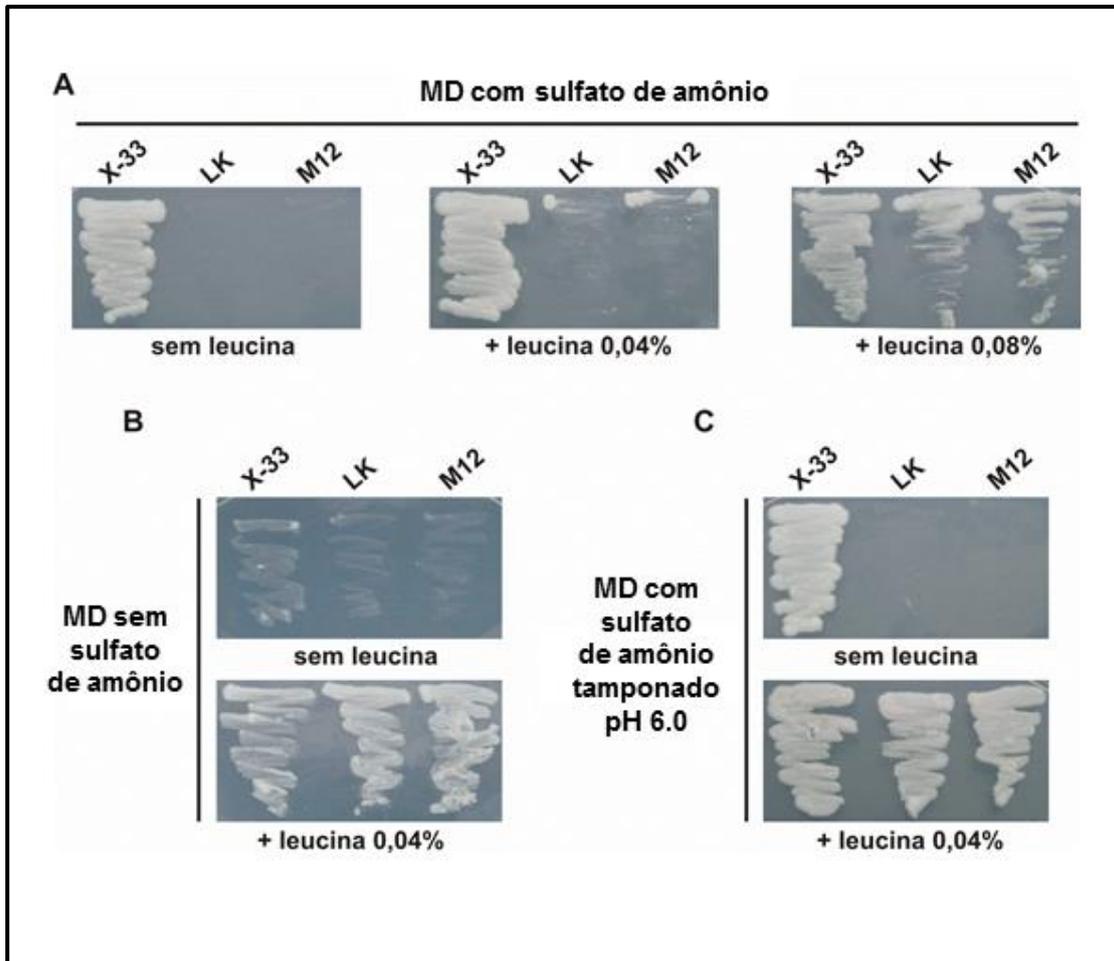


Figura 37. Comportamento das linhagens auxotróficas em relação à assimilação de leucina. As linhagens LK e M12 foram crescidas em diferentes meios para avaliar a assimilação de leucina. **A.** MD sem leucina ou suplementado com leucina em diferentes concentrações, **B.** MD sem sulfato de amônio contendo ou não leucina, **C.** MD tamponado (pH 6,0) contendo ou não leucina. X-33: linhagem nativa, LK: linhagem *leu2* interrompida com cassete *kan^R*, M12: linhagem *leu2* obtida após remoção da marca dominante.

Como esperado, ambas as linhagens auxotróficas não foram capazes de crescer em meio mínimo sem leucina. Para recuperar a prototrofia foi adicionado o aminoácido ao meio MD numa concentração de 0,04%, mas ambas as linhagens apresentaram pouco crescimento

nessas condições. Com uma concentração maior de leucina (0,08%) o crescimento de todas as linhagens foi comparável (figura 37A). Para verificar o efeito inibitório do sulfato de amônio no transporte de leucina, a fonte de nitrogênio no meio MD foi substituída por leucina numa concentração de 0,04%. Sob essas condições todas as linhagens cresceram em níveis semelhantes (figura 37B). Quando o meio MD suplementado com 0,04% de leucina foi tamponado para manter o pH no valor de 6,0, o crescimento das linhagens LK e M12 melhorou bastante chegando a ser quase igual ao de X-33 (figura 37C).

4.10 Construção de vetor pGFP-L2

Já tendo a linhagem auxotrófica a seguinte etapa era avaliar o uso do gene *LEU2* como marca de seleção. Para isso foi construído um vetor de expressão contendo o gene que codifica uma versão melhorada da proteína verde fluorescente (eGFP) como repórter. A construção foi feita a partir do vetor pPIC9-eGFP (pPIC9 contendo o gene *eGFP*) previamente construído por nosso grupo de pesquisa (figura 38).

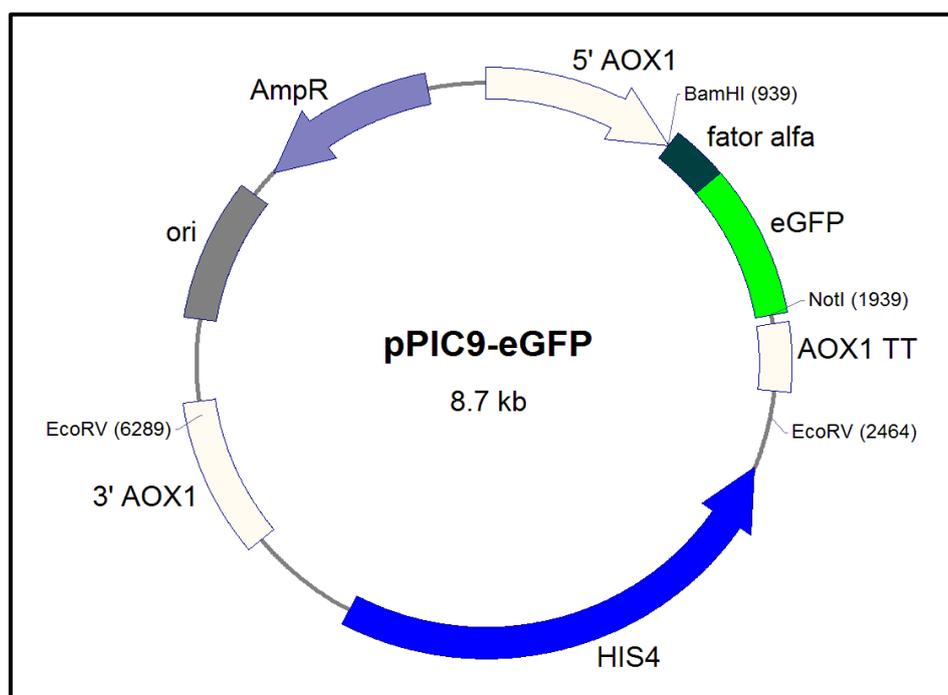


Figura 38. Mapa físico do vetor pPIC9-eGFP. Vetor pPIC9 contendo o gene para a expressão de eGFP.

O vetor pPIC9-eGFP foi digerido com *EcoRV* para remover um fragmento de aproximadamente 3,8 kb correspondente ao gene *HIS4* e substituí-lo pelo gene *LEU2*. A banda de aproximadamente 4,9 kb observada na figura 39 corresponde ao resto do vetor o qual foi purificado do gel de agarose.

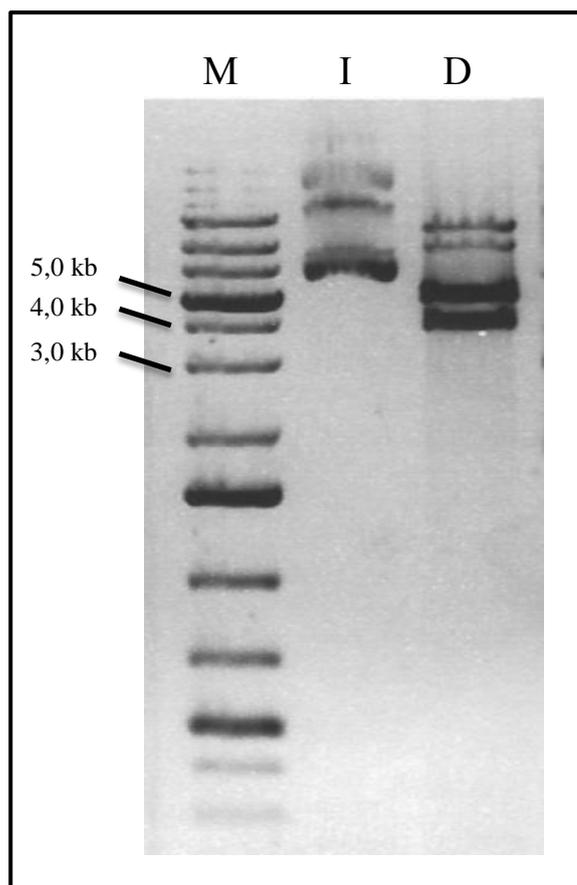


Figura 39. Remoção do gene *HIS4* do vetor pPIC9-eGFP. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o DNA plasmidial intacto (I) e digerido com *EcoRV* (D). M: marcador 1kb O'Gene Ruler.

O gene *LEU2* foi liberado do vetor pGEM-LEU ao digerir com *PvuII* e o fragmento obtido foi clonado no pPIC9-eGFP previamente digerido com *EcoRV*. Células de *E. coli* XL10-gold foram transformadas com o sistema de ligação e a seleção de transformantes foi feita em meio LB contendo ampicilina. Oito clones transformantes foram selecionados e seu

DNA plasmidial foi extraído. Todos os clones apresentaram o mesmo perfil eletroforético de DNA plasmidial. Consequentemente, o DNA plasmidial de um clone selecionado foi digerido com *EcoRV* para confirmar a clonagem. A digestão deveria liberar dois fragmentos de aproximadamente 400 pb e 6,3 kb caso o gene *LEU2* tivesse sido ligado no vetor. Se o vetor estivesse religado era esperada uma banda de aproximadamente 5 kb. O resultado observado na figura 40 confirma a clonagem e o vetor resultante foi chamado de pPIC-LEU.

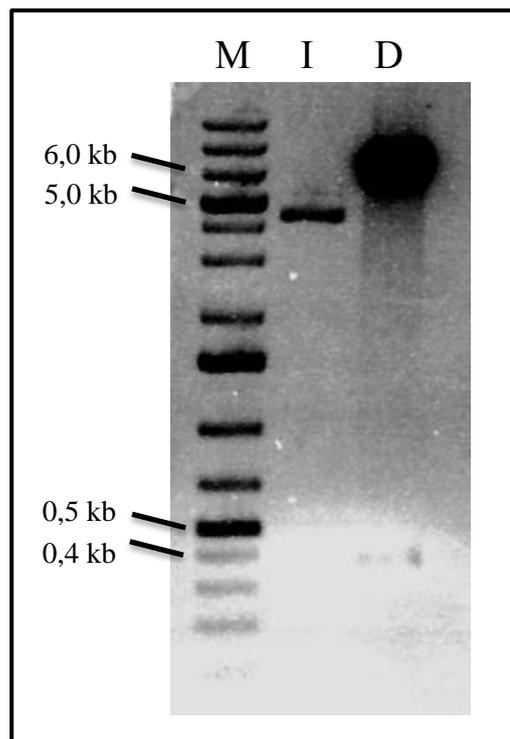


Figura 40. Clonagem do gene *LEU2* no pPIC9-eGFP. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o DNA plasmidial intacto (I) e digerido com *EcoRV* (D). M: marcador 1kb O'Gene Ruler.

Com o fim de expressar o gene repórter intracelularmente, era preciso remover o fator alfa do pPIC-LEU. A digestão desse vetor com *BamHI* e *NotI* tirou um fragmento de aproximadamente 1 kb correspondente ao fator alfa junto com o gene *eGFP* como observado na figura 41 (poço 4). O fragmento restante de aproximadamente 5,7 kb foi purificado do gel de agarose e ligado com o gene *eGFP* obtido pela digestão do vetor pGFP-N3 (Clontech) com *BamHI* e *NotI*. Na figura 41 (poço 2) observa-se a banda de aproximadamente 740 pb

correspondente ao gene *GFP* liberado do pGFP-N3. Células de *E. coli* XL10-gold foram transformadas com o sistema de ligação e a seleção de transformantes foi feita em meio LB contendo ampicilina. Quatro clones transformantes foram selecionados e seu DNA plasmidial foi extraído. Para verificar a clonagem, o DNA foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Not*I as quais deviam liberar o gene *GFP*. Como observado na figura 42, só o clone 4 apresentou a banda esperada de aproximadamente 740 pb confirmando a presença do inserto. O vetor obtido foi chamado de pGFP-L2.

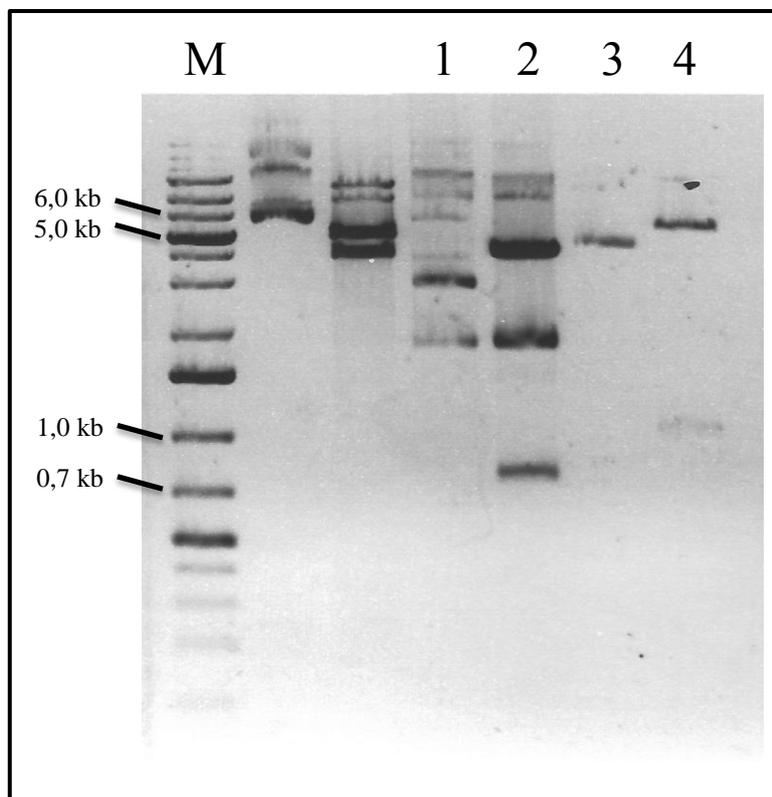


Figura 41. Obtenção do gene *eGFP* e remoção do peptídeo sinal do fator alfa do vetor pPIC-LEU. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1: pGFP-N3 intacto, 2: pGFP-N3 digerido com *Bam*HI e *Not*I, 3: pPIC-LEU intacto, 4: pPIC-LEU digerido com *Bam*HI e *Not*I. M: marcador 1kb O'Gene Ruler.

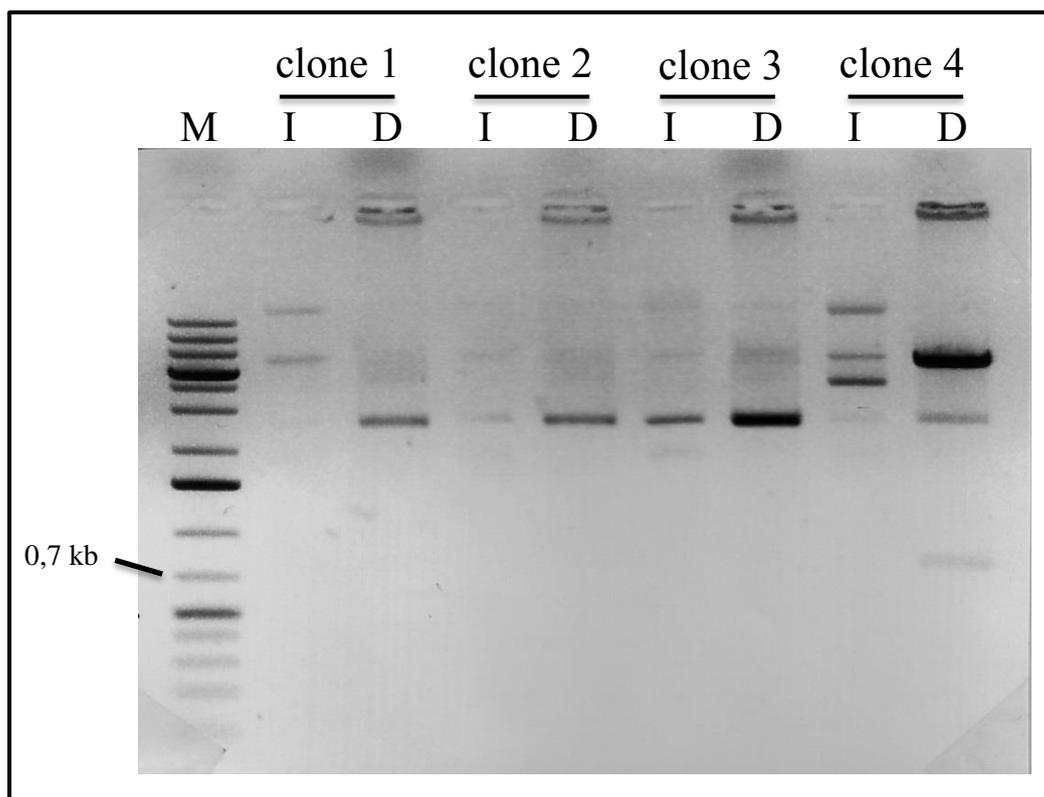


Figura 42. Clonagem do gene *eGFP* no pPIC-LEU. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o DNA plasmidial intacto (I) e digerido com *Bam*HI e *Not*I (D). M: marcador 1kb O'Gene Ruler.

Para determinar a orientação do gene *LEU2* no pGFP-L2 o vetor foi digerido com a enzima de restrição *Nco*I. Se o gene tivesse entrado no sentido horário eram esperadas bandas de aproximadamente 2,4 kb e 3,9 kb. Se o gene estivesse no sentido anti-horário as bandas esperadas eram de aproximadamente 1,8 kb e 4,6 kb. O resultado observado no gel da figura 43 permite verificar que o gene *LEU2* encontra-se no sentido horário. O mapa do vetor final (pGFP-L2) é apresentado na figura 44. Antes de transformar *P. pastoris* M12 com o pGFP-L2, o vetor foi digerido com *Sac*I para promover integração no *locus* do promotor *AOX1*.

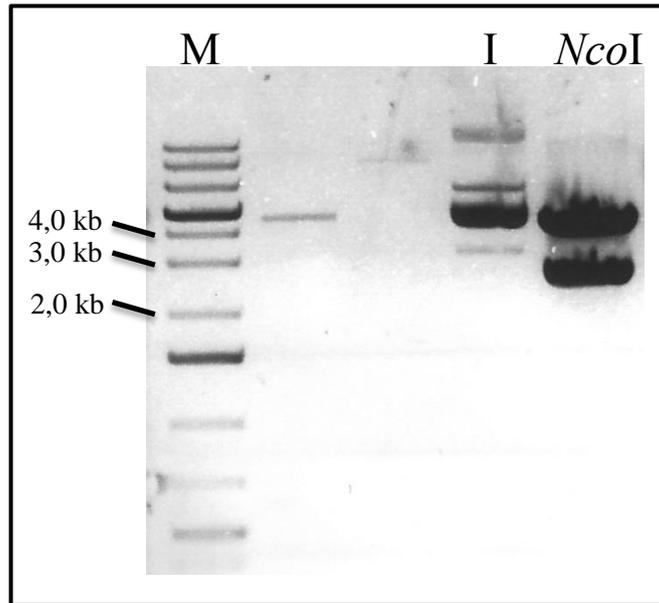


Figura 43. Orientação do gene *LEU2* no vetor pGFP-L2. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo apresentando o DNA plasmidial intacto (I) e digerido com *NcoI*. Se o gene estivesse no sentido horário eram esperadas bandas de ~2,4 kb e ~3,9 kb. Se estivesse no sentido anti-horário os tamanhos esperados eram ~1,8 kb e ~4,6 kb. M: marcador 1kb O'Gene Ruler.

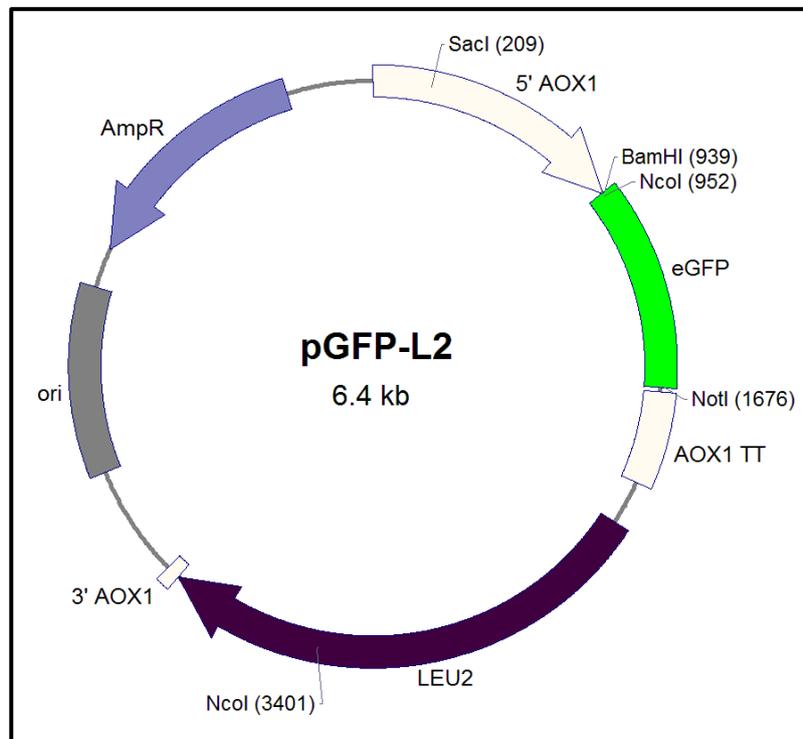


Figura 44. Mapa físico do vetor pGFP-L2. Vetor para expressão intracelular do gene *eGFP* em *P. pastoris* contendo o gene *LEU2* como marca de seleção.

4.11 Transformação de *P. pastoris* M12 com o vetor pGFP-L2

Para estabelecer as condições ideais para a transformação da linhagem auxotrófica foi feita uma curva de crescimento das linhagens M12 e X-33 em meio YPD. Ambas as culturas começaram com uma OD_{600} de 0,1 sendo então incubadas durante 72 h a 28° C. A figura 45 apresenta o gráfico do logaritmo da OD versus o tempo para as duas linhagens. Esperávamos que a taxa de crescimento da linhagem auxotrófica fosse menor que a da linhagem nativa, porém, durante as 72 h de incubação, o comportamento de ambas as linhagens foi quase idêntico. Com esse resultado decidimos usar a cultura de 72 h de crescimento para inocular 100 mL de meio YPD a fim de realizar a transformação. Todavia, após 16 h de incubação desse novo inóculo não houve nenhum indício de crescimento. A hipótese que propusemos para explicar esta observação é que o crescimento de *P. pastoris* M12 em meio YPD é igual ao da linhagem nativa (mesmo tempo de duplicação), mas, após atingir a fase estacionária, a linhagem auxotrófica começaria a morrer mais rapidamente. Para testar esta hipótese seria necessário testar a viabilidade celular por contagem de CFU ou por visualização de células vivas com corantes específicos. Finalmente, foi possível realizar a transformação quando usado um pré-inóculo fresco (como indicado na seção 3.2.11 de Materiais e Métodos) que assegurou que as células permanecessem na fase exponencial antes de serem transferidas ao meio novo.

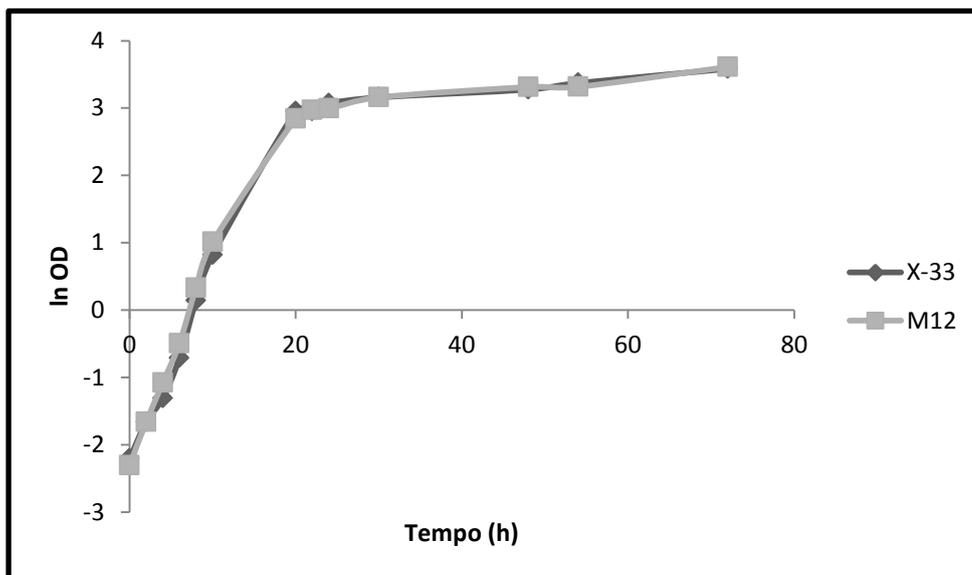


Figura 45. Curva de crescimento das linhagens M12 e X-33 em meio YPD. Ambas as culturas começaram com uma OD_{600} de 0,1.

P. pastoris M12 foi transformada com o vetor pGFP-L2 e como controle a levedura foi submetida ao protocolo de transformação sem adição de DNA. Um dos aspectos mais importantes a considerar era que a levedura mutante pudesse recuperar a prototrofia quando fosse transformada com um vetor contendo o gene *LEU2*. Após transformação com pGFP-L2 a levedura conseguiu crescer em meio mínimo sem suplementação de leucina, enquanto que não foi observado crescimento na placa onde foi semeado o controle (figura 46).

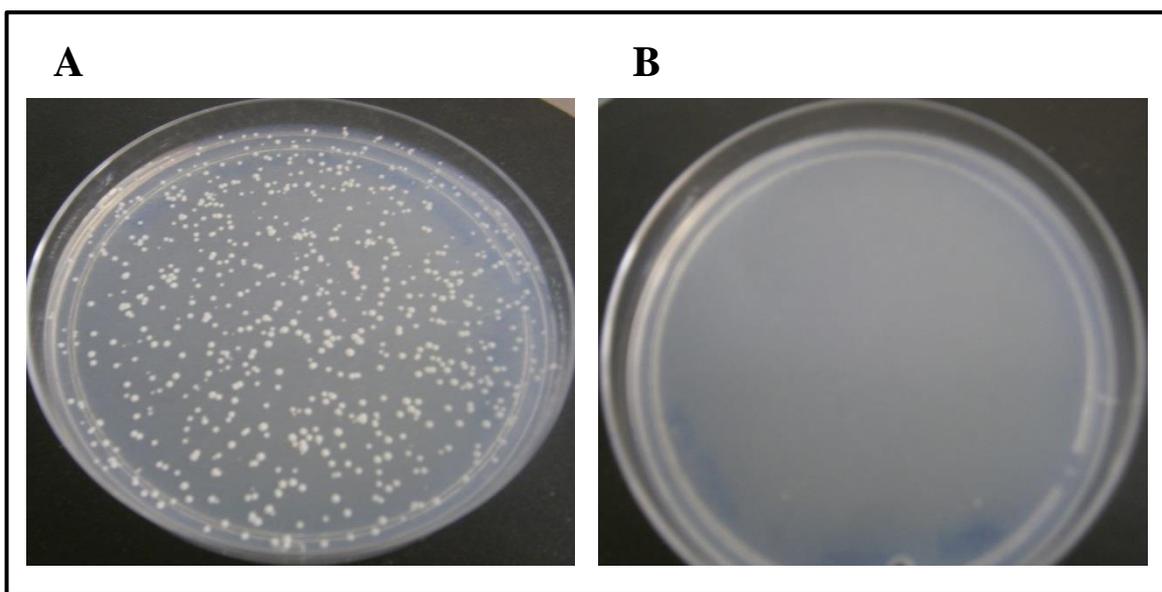


Figura 46. Transformação com o vetor pGFP-L2. Crescimento em meio mínimo de *P. pastoris* M12 após transformação com pGFP-L2 (A) ou sem DNA (B).

Um total de 50 clones transformantes foram selecionados e semeados em meio mínimo (MD) e meio mínimo com metanol (MM) para avaliar sua fluorescência no Typhoon scanner. Como controle foi usada a levedura nativa X-33. Na placa com meio MM foi adicionado metanol na concentração final de 0,5%. Como a própria célula emite fluorescência era preciso garantir que o tamanho das colônias fosse igual em ambas as placas para evitar que um excesso de biomassa interferisse na análise. Para isto a placa com meio MD foi incubada a 28 °C durante 30 h enquanto que a placa com meio MM foi incubada durante 90 h uma vez que o tempo de duplicação de *P. pastoris* em meio com metanol é três vezes maior do que em meio com glicose. Após a incubação as placas foram escaneadas utilizando o Typhoon scanner. A figura 47 apresenta o resultado emitido pelo Typhoon antes (A) e depois

de remover o *background* (B). As setas indicam o controle. Após subtrair a fluorescência própria das células e do meio de cultura foi possível ver que só os clones transformantes emitem fluorescência quando crescidos em meio com metanol devido à indução do P_{AOX} e consequente expressão da proteína verde fluorescente.

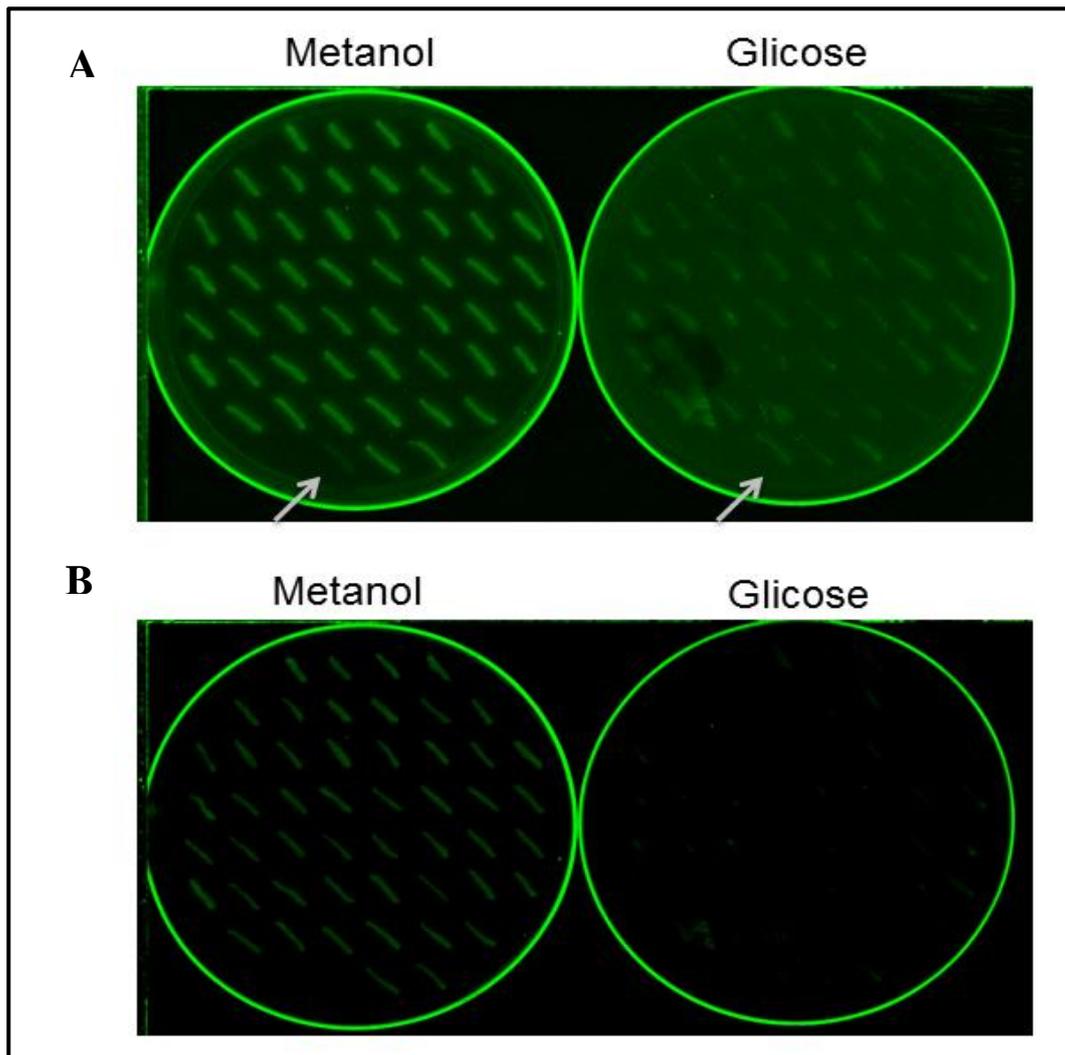


Figura 47. Expressão intracelular de eGFP. 50 clones de *P. pastoris* M12 transformada com pGFP-L2 foram semeados em meio mínimo com metanol ou glicose e as placas foram analisadas no Typhoon scanner. As setas indicam o controle (*P. pastoris* X-33). **A.** Resultado emitido pelo Typhoon, **B.** Resultado após remoção do *background*.

Aleatoriamente foi escolhido um dos clones transformantes para ser estudado mais detalhadamente por microscopia de fluorescência. Como controle do experimento foi utilizada a linhagem M12 sem transformar. Após 16 h de crescimento em meio com glicerol e 48 h em meio com metanol as células foram visualizadas no microscópio de fase invertida utilizando as técnicas de contraste por interferência diferencial (DIC) ou de fluorescência (FM). Em meio com glicerol não foi observada fluorescência sob nenhuma das duas condições (DIC ou FM) nas células transformadas ou sem transformar. Já em meio contendo metanol as células transformadas com o vetor pGFP-L2 emitem fluorescência apenas quando visualizadas sob FM, confirmando a expressão intracelular de proteína verde fluorescente (figura 48).

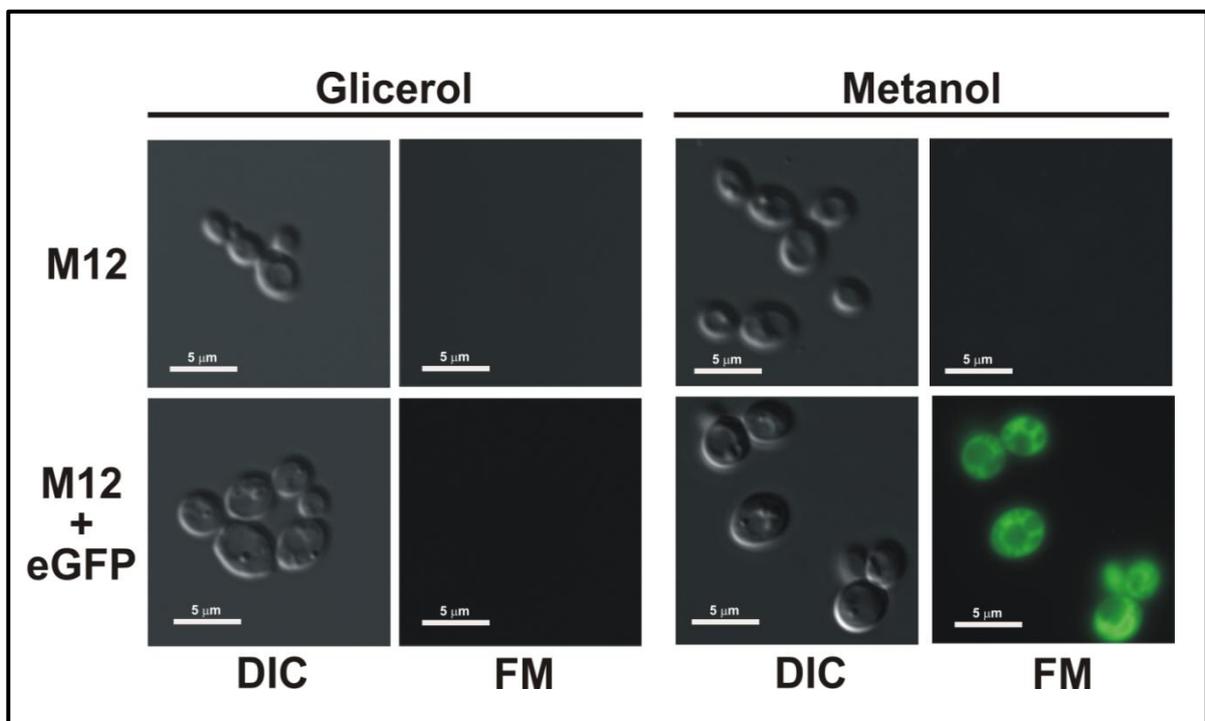


Figura 48. Expressão intracelular de eGFP. A expressão intracelular de proteína verde fluorescente foi visualizada por microscopia de fase invertida. Células da levedura sem transformar (M12) e transformada com pGFP-L2 (M12 + eGFP) foram observadas sob contraste por interferência diferencial (DIC) ou microscopia de fluorescência (FM) após crescimento em meio contendo glicerol ou metanol.

5 DISCUSSÃO

A produção de proteínas recombinantes usando a levedura *P. pastoris* como sistema de expressão é considerada, de um modo geral elevada, porém existem limitações quando o objetivo é produzir várias proteínas simultaneamente como no caso da produção de proteínas hetero-oligoméricas. Esta limitação decorre do baixo número de marcas de seleção que atualmente encontram-se disponíveis para esta levedura o que limita os estudos de engenharia metabólica e introdução de vias metabólicas inteiras.

A manipulação de *P. pastoris* no nível molecular é possível devido ao sistema de transformação que permite a integração de DNA exógeno no genoma da levedura por recombinação homóloga (LIN CEREGHINO et al., 2001). Esta característica da levedura permite a ruptura de genes inserindo sequências de DNA flanqueadas por regiões homólogas às do gene que se deseja interromper para promover a recombinação nesse *locus* no genoma. Desta forma têm sido interrompidos vários genes de *P. pastoris*: o gene *URA5* que codifica a enzima orotato fosforribosiltransferase (NETT e GERNGROSS, 2003), os genes *ARG1*, *ARG2*, *ARG3*, *HIS1*, *HIS2*, *HIS5* e *HIS6* envolvidos na biossíntese de arginina e histidina (NETT et al., 2005), o gene *CBS*, que codifica a enzima cistationina β -sintase (HE et al., 2006), dentre outros. Geralmente, a ruptura é feita usando-se um gene que confere resistência a antibióticos para facilitar a seleção dos clones transformantes e, posteriormente, essa marca de seleção dominante pode ser reciclada.

Mutações pontuais (transições, transversões e mudanças da fase de leitura) podem gerar clones auxotróficos, porém, estes clones são susceptíveis a reversões da mutação, por exemplo, supressão intragênica o que pode restaurar a prototrofia com alta frequência (VON BORSTEL et al., 1998). Esta instabilidade limita a aplicação de mutantes espontâneos na expressão de proteínas heterólogas. Por outro lado, a ruptura gênica permite causar defeitos metabólicos específicos no organismo gerando uma linhagem estável (WHITTAKER e WHITTAKER, 2005).

Embora a lista de genes de vias biossintéticas mutagenizados ou deletados em *P. pastoris* seja grande, vários deles pertencem à mesma via metabólica o que reflete no limitado

número de linhagens auxotróficas de *P. pastoris* (tabela 5). Com este trabalho buscamos o desenvolvimento de uma nova linhagem auxotrófica deficiente na biossíntese de leucina pela ruptura do gene *LEU2*.

Tabela 5. Genes de vias biossintéticas mutagenizados ou deletados em *P. pastoris*.

Gene mutado/deletado	Nutriente requerido pela linhagem	Referência
<i>ade1</i>	Adenina	(LIN CEREGHINO et al., 2001)
<i>ade2</i>	Adenina	(DU et al., 2012)
<i>arg1</i>	Arginina	(NETT et al., 2005)
<i>arg2</i>	Arginina	(NETT et al., 2005)
<i>arg3</i>	Arginina	(NETT et al., 2005)
<i>arg4</i>	Arginina	(LIN CEREGHINO et al., 2001)
<i>aro1</i>	Fenilalanina, tirosina e triptofano	(WHITTAKER e WHITTAKER, 2005)
<i>aro7</i>	Fenilalanina, tirosina e triptofano	(WHITTAKER e WHITTAKER, 2005)
<i>cys4</i>	Cisteína	(LI et al., 2001)
<i>his1</i>	Histidina	(NETT et al., 2005)
<i>his2</i>	Histidina	(NETT et al., 2005)
<i>his4</i>	Histidina	(CREGG et al., 1985)
<i>his5</i>	Histidina	(NETT et al., 2005)
<i>his6</i>	Histidina	(NETT et al., 2005)
<i>lys2</i>	Lisina	AUSTIN et al., 2011)
<i>met2</i>	Metionina	(THOR et al., 2005)
<i>tyr1</i>	Tirosina	(WHITTAKER e WHITTAKER, 2005)
<i>ura3</i>	Uracila	(LIN CEREGHINO et al., 2001)
<i>ura5</i>	Uracila	(NETT e GERNGROSS, 2003)

LEU2 é uma das marcas auxotróficas mais usadas em vetores de expressão para *Saccharomyces cerevisiae* (CELIK e CALIK, 2012). Este gene codifica a enzima β -isopropilmalato desidrogenase que catalisa a terceira etapa na biossíntese de leucina e até agora não tinha sido investigada como uma marca de seleção em *P. pastoris*.

O alvo para a ruptura gênica foi *P. pastoris* X-33 e sua escolha reside no genótipo selvagem que esta possui. Esta característica facilita o estudo dos efeitos que a mutação poderia causar na célula e, dessa forma, seria possível avaliar a factibilidade de se usar o gene *LEU2* como marca de seleção.

A ruptura do gene *LEU2* foi feita utilizando dois cassetes de deleção, *LEUΔkan*, que contem a marca *kan^R*, e *LEUΔzeo*, que contem a marca *Sh ble*. Nos dois cassetes as marcas dominantes são flanqueadas por regiões *loxP* para permitir sua reciclagem. Após transformação com ambos os cassetes de deleção apenas uma porcentagem dos clones analisados apresentou fenótipo *Leu⁻* (59% no caso do *LEUΔkan*, e 72% no caso do *LEUΔzeo*) e a análise por PCR feita para alguns clones mostrou que isto foi o resultado da recombinação homóloga no *locus LEU2*. Os clones restantes provavelmente integraram o cassete em algum outro lugar no genoma da levedura. Este resultado não é totalmente inesperado porque, além da recombinação homóloga, a integração em *P. pastoris* pode estar baseada no reparo por união de extremidades não-homólogas. Esta é a principal via presente em fungos filamentosos e organismos eucariotos para reparar o DNA genômico (NÄÄTSAARI et al., 2012). Estudos anteriores mostraram que o comprimento, o tipo e a estrutura das regiões homólogas flanqueadoras pode favorecer o reparo por união de extremidades não-homólogas sobre a integração sítio-específica (MELLITZER et al., 2012). A frequência da substituição gênica contra a integração não homóloga depende fortemente do tamanho das sequências homólogas nas extremidades do cassete de deleção. Em *P. pastoris* esta frequência é <0,1% quando as sequências homólogas são menores que 500 pb (CREGG e RUSSELL, 1998). As sequências *LEU2* presentes nos cassetes de deleção tinham um tamanho de aproximadamente 700 pb, sendo esperado uma alta frequência de integração homóloga. Apesar de a integração não ter sido específica para todos os clones, foi possível obter vários clones que apresentaram fenótipo *Leu⁻* com ambos os cassetes. Um desses clones contendo o cassete *LEUΔkan* foi escolhido e a linhagem auxotrófica foi chamada de LK.

Para a utilização de *P. pastoris* como sistema de expressão na produção de proteínas heterólogas com fins industriais não é desejável o uso de marcas que conferem resistência a drogas. Isto é devido a duas razões. Primeiro, é que a seleção com esse tipo de marcas requer adicionar ao meio de cultura esses compostos que, além de tóxicos, são caros o que eleva o

preço de produção (HENSING et al., 1995). Segundo, é o risco de os micro-organismos geneticamente modificados serem liberados acidentalmente ao ambiente durante sua manipulação em processos em grande escala, podendo acontecer uma transferência horizontal de genes como ocorre em baixa frequência desde plantas transgênicas para bactérias do solo (DRÖGE et al., 1998). Desta maneira poderiam ser gerados micro-organismos patogênicos resistentes a antibióticos. Além do mais, a presença de antibióticos no meio pode afetar a função celular inclusive nas linhagens resistentes (PRONK, 2002).

A remoção da marca dominante *kan*^R foi feita usando o sistema *Cre/loxP*. Para a expressão do gene que codifica para a recombinase CreA em *P. pastoris* foi utilizado um vetor replicativo (pYRCre2) que devido à sua baixa estabilidade mitótica é facilmente perdido após crescimento das células em meio não seletivo (DA SILVA e BAILEY, 1991). A expressão do gene *CreA* no pYRCre2 é controlada pelo *P_{TEF1}*, um promotor constitutivo que proporciona uma boa alternativa ao amplamente usado *P_{GAP}* (POTVIN et al., 2012). Após remoção da marca, foi confirmada a perda de resistência à droga na linhagem resultante M12 (figura 35).

Ao observar o lento crescimento dos clones *Leu*⁻ em meio mínimo suplementado com leucina a primeira explicação que tivemos foi a de que a deleção do gene *LEU2* tivesse alterado também a síntese de isoleucina já que a enzima β -isopropilmalato desidrogenase está envolvida na rota metabólica deste aminoácido catalisando a conversão de D-eritro-3-metilmalato a 2-oxobutanoato, precursor da isoleucina (figura 49). Porém, o 2-oxobutanoato pode ser sintetizado também a partir de treonina, portanto, a deleção da β -isopropilmalato desidrogenase não necessariamente ia alterar a síntese de isoleucina. Efetivamente, ao suplementar o meio mínimo com leucina e isoleucina, os clones *Leu*⁻ continuaram apresentando um lento crescimento sugerindo que este comportamento não estava relacionado com uma deficiência em isoleucina como considerado inicialmente.

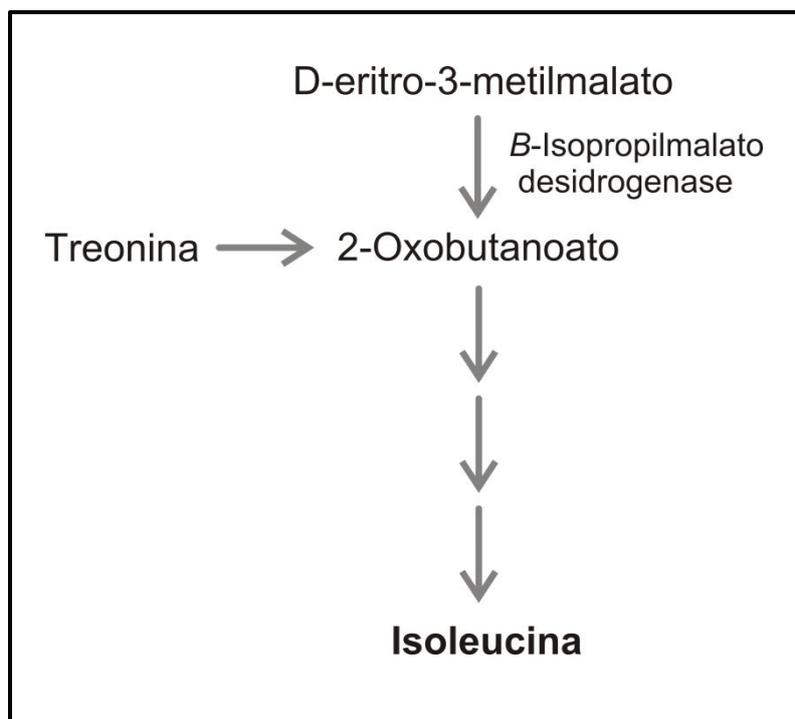


Figura 49. Um resumo da via de biossíntese de isoleucina.

Em *S. cerevisiae* o excesso de leucina no meio diminui um pouco a taxa de crescimento da linhagem nativa e a adição de isoleucina ou valina restabelece o crescimento normal indicando que a leucina modula a atividade ou a expressão de enzimas nas vias biossintéticas dos outros dois aminoácidos de cadeia ramificada (NIEDERBERGER et al., 1981). Provavelmente, em *P. pastoris* exista um mecanismo regulatório similar, contudo, no caso da linhagem auxotrófica a leucina adicionada no meio é utilizada para suprir a carência nutricional deste aminoácido, não chegando a afetar as vias de síntese dos outros aminoácidos.

A captação de leucina por ambas as linhagens auxotróficas (LK e M12) foi avaliada semeando-se as leveduras em meio mínimo YNB suplementado com o aminoácido na concentração de 0,04%. Embora tenha sido observado em *S. cerevisiae* que a simples adição de aminoácidos não é suficiente para recuperar totalmente a prototrofia (PRONK, 2002), a diferença observada do crescimento dos clones em placa com 0,04% leucina foi significativa

(figura 37A). A prototrofia pode ser apenas parcialmente restabelecida com a suplementação com excesso de leucina (0,08%) (figura 37A).

Consideramos, pois, que o sulfato de amônio presente no meio MD estivesse afetando a captação de leucina, já que quando este sal foi substituído por leucina na concentração de 0,04% como única fonte de nitrogênio, ambas as linhagens auxotróficas cresceram similarmente à linhagem nativa X-33 (figura 37B). Este resultado está de acordo com um estudo prévio onde células de *S. cerevisiae* crescidas em meio mínimo apresentaram um incremento na taxa de captação de leucina quando usado o aminoácido como única fonte de nitrogênio (BUSSEY e UMBARGER, 1970).

Já é sabido que a presença de íons NH_4^+ no meio de cultura pode reprimir várias enzimas e permeases envolvidas na utilização de fontes de nitrogênio secundárias na levedura (WIAME et al., 1985). Leucina é transportada por pelo menos três sistemas em *S. cerevisiae*: GAP (permease geral de aminoácidos), S1 (permease de alta afinidade) e S2 (permease de baixa afinidade) (SCHREVE e GARRETT, 1997). Em meio contendo NH_4^+ a atividade da GAP é inibida (GRENSON et al., 1970; JAUNIAUX e GRENSON, 1990) e a das proteínas S1 e S2 é reduzida fortemente (KOTLIAR et al., 1994). Além disso, duas permeases redundantes de baixa afinidade para leucina (codificadas pelos genes *AGP2* e *AGP3*) são superexpressas quando as outras permeases estão inibidas (SCHREVE e GARRETT, 2004). A observação de que a prototrofia só pode ser recuperada quando uma alta concentração de leucina foi usada pode ser explicada pelo fato de que na presença de NH_4^+ a captação de leucina é mediada principalmente por essas permeases de baixa afinidade, daí a necessidade de uma grande quantidade de substrato para saturar a enzima e dessa forma aumentar sua velocidade de reação. Ao analisarmos o genoma de *P. pastoris* pudemos identificar alguns genes que codificam proteínas com diferentes identidades com a permease GAP de *S. cerevisiae* e que poderiam ser alvos de inibição pelo íon amônio: PP7435_Chr1-0324 (63% identidade), PAS_Chr1-1_0030 (63% identidade), PAS_Chr1-4_0479 (58% identidade), PP7435-Chr1-1281 (58% identidade), PP7435-Chr1-0515 (52% identidade) e PAS_Chr1-1_0203 (52% identidade).

O efeito do íon NH_4^+ na atividade das permeases para leucina pode estar relacionado com o pH intracelular, como já foi observado em *S. cerevisiae*. Um estudo prévio mostrou que uma linhagem *leu2* de *S. cerevisiae* era mais sensível às condições ácidas internas e que sua transformação com um plasmídeo contendo o gene *LEU2* incrementou seu crescimento em presença de ácido acético. O gene *LEU2* eliminou os requerimentos de leucina na linhagem auxotrófica sugerindo que a captação do aminoácido estava sendo inibida pelo estresse ácido intracelular (HUESO et al., 2012). Nesse mesmo trabalho a superexpressão do gene *BAP2* que codifica a permease S1 e a supersuplementação do meio com leucina na presença de ácido acético melhoraram o crescimento da linhagem auxotrófica. Isto demonstrou mais uma vez que as limitações no crescimento da linhagem *leu2* em meio ácido eram devidas à inibição do transporte de leucina pelo baixo pH intracelular.

O NH_4^+ é um ácido conjugado fraco que é desprotonado dentro da célula depois de ser incorporado com ajuda de transportadores específicos. Como resultado, o gradiente de prótons é dissipado causando acidificação do citosol (PLANT et al., 1999). Esta acidificação poderia estar interferindo na captação de leucina devido ao fato de que, em leveduras, os aminoácidos e outros nutrientes são assimilados por um mecanismo simporte com prótons (HORÁK, 1997). Para avaliar esse efeito, o meio MD foi tamponado para manter o pH no valor de 6,0. Como pode ser observado na figura 37C tanto as linhagens auxotróficas quanto a nativa apresentaram crescimento quase idêntico indicando que realmente a diminuição do pH interno é o que impede a captação de leucina. Estes dados mostram que os fenótipos observados em *P. pastoris leu2* são similares aos de células de *S. cerevisiae* portando a mesma mutação auxotrófica.

A recuperação da prototrofia de uma linhagem auxotrófica pode ser por suplementação do meio com o nutriente apropriado ou por complementação do gene defeutivo com um alelo funcional, contudo, os efeitos de ambos os métodos podem ser diferentes. Por exemplo, a suplementação nutricional e a complementação genética de uma linhagem *leu2* de *S. cerevisiae* produziram taxas de crescimento específico diferentes. Aliás, um crescimento semelhante ao da linhagem nativa foi observado quando a linhagem auxotrófica foi transformada com um alelo funcional do gene *LEU2*. Isto pode ser devido a que a

suplementação nutricional exige a entrada do composto na célula e esse processo pode afetar a taxa específica de crescimento (PRONK, 2002).

O uso de linhagens auxotróficas está baseado na suposição de que a introdução de um alelo funcional do gene mutado/deletado vai levar a uma situação fisiológica idêntica à da célula nativa. Porém, se o gene é introduzido em alto número de cópias a superprodução da proteína pode afetar o crescimento. Quando a linhagem auxotrófica é complementada pela introdução de uma cópia do gene não são esperados efeitos prejudiciais no crescimento (PRONK, 2002).

No presente trabalho confirmamos que *P. pastoris* M12 pode ser transformada satisfatoriamente com um vetor de expressão contendo o gene *LEU2* como marca de seleção. Nesse caso, o mais provável é que a recuperação da prototrofia fosse o resultado da integração no *locus AOX1* já que o vetor foi linearizado na sua região 5'AOX1 o que favorece a recombinação homóloga nesse *locus*. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de que o vetor tinha sido integrado no *locus leu2* ou em algum outro lugar no genoma como foi observado com os cassetes de deleção *LEUΔkan* e *LEUΔzeo*. No entanto, o tamanho das regiões 5' e 3' presentes na marca *LEU2* utilizada neste estudo são suficientes para garantir a presença do promotor e da sequência terminadora da transcrição. Isto permite a recuperação da prototrofia sem importar o local de integração da marca.

Uma vantagem de se usar vetores contendo como marca de seleção um gene de *P. pastoris* em vez de um gene de *S. cerevisiae* é que o vetor pode ser direcionado para ser integrado no genoma da levedura no *locus* do gene usado como marcador. Por exemplo, vetores contendo o gene *ARG4* de *S. cerevisiae* podem ser usados em *P. pastoris*, porém, estes não podem ser integrados no *locus ARG4* provavelmente porque a homologia entre ambos os genes não é suficiente para uma eficiente recombinação homóloga (LIN CEREGHINO et al., 2001).

Nas linhagens auxotróficas a necessidade da célula pelo nutriente específico pode incrementar levando a mudanças fisiológicas e alterando o crescimento celular (ÇAKAR et al., 1999). No caso das linhagens *arg4* e *his4* de *P. pastoris*, as células crescem com a mesma

taxa da linhagem nativa em qualquer meio suplementado com o aminoácido correspondente. Enquanto que as linhagens *ade1* e *ura3* crescem significativamente mais lento que a linhagem nativa, inclusive no meio contendo grande excesso de adenina ou uracila. Aliás, a transformação destas duas linhagens com vetores contendo os genes *ADE1* ou *URA3* restabeleceu o crescimento normal sugerindo que o lento crescimento era devido a uma inabilidade da levedura para transportar o nutriente eficientemente (LIN CEREGHINO et al., 2001). No caso das linhagens *aro1*, *aro7* e *tyr1* de *P. pastoris*, nenhuma delas é capaz de crescer em meio complexo (YPD), mesmo quando o meio é suplementado com os aminoácidos aromáticos (WHITTAKER e WHITTAKER, 2005). Apesar do lento crescimento apresentado por *P. pastoris* M12 em meio mínimo, quando crescida em meio complexo (YPD) seu comportamento é praticamente igual ao da linhagem nativa.

Para testar o sistema de expressão para *P. pastoris* baseado no gene *LEU2* procuramos expressar o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) um dos mais utilizados genes repórter disponíveis atualmente. GFP é uma proteína que tem a propriedade de fluorescer espontaneamente. A GFP é isolada de organismos marinhos luminescentes como a água-viva *Aequorea victoria* e a alga *Renilla reniformis*. Estes organismos produzem as proteínas primárias aequorina e luciferase respectivamente e a GFP converte a quimioluminescência azul delas em luz verde fluorescente (CUBITT et al., 1995; PHILLIPS, 1997).

A GFP de *A. victoria* está composta por 238 resíduos de aminoácidos. Seu pico de absorvância é a 395 nm com um pico menor a 475 nm. O tempo de vida do estado excitado é de 3,25 ns e a máxima emissão é detectada a 508 nm (CUBITT et al., 1995). A figura 50A apresenta os espectros de excitação e emissão da GFP nativa.

Uma característica importante da GFP é que a proteína autocatalisa a formação do seu próprio cromóforo, portanto pode ser expressa em diferentes organismos na sua forma fluorescente sem necessidade de se adicionar substratos exógenos ou cofatores. A expressão de GFP em *E. coli* e *C. elegans* mostrou que o cromóforo pode ser formado na ausência de outros produtos de *A. victoria* (CHALFIE et al., 1994). Devido ao fato de que a detecção de GFP requer apenas de irradiação com UV ou luz azul, esta proteína é amplamente usada como

repórter intracelular para monitorizar expressão gênica e localização de proteínas em células vivas sem as limitações de outros métodos que dependem da disponibilidade de um substrato.

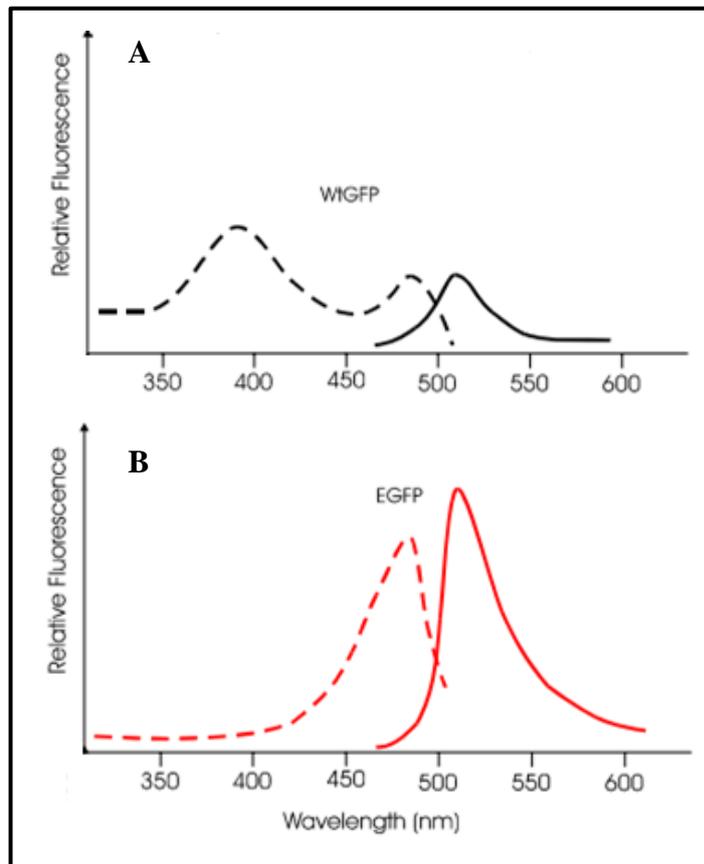


Figura 50. Espectros de excitação e emissão da GFP. A. Proteína nativa **B.** Versão melhorada da proteína. O espectro de excitação está representado em linha tracejada e o de emissão em linha contínua. Adaptado da nota técnica: *Excitation and Emission of Green Fluorescent Proteins* (BioTek).

Existe uma variante do gene *GFP* chamada GFPmut1 (CORMACK et al., 1996) que foi utilizada nesse trabalho e que possui uma substituição dos aminoácidos Phe-64 por Leu e Ser-65 por Thr e na região codante contém mais de 190 mutações silenciosas que correspondem a códons preferencias em humanos. Esta variante (eGFP) representa, pois, uma versão melhorada da proteína que apresenta uma fluorescência mais intensa e uma maior expressão em células de mamíferos. As mutações feitas nesta variante da proteína deslocaram seu pico máximo de excitação a 375 nm para 488 nm como pode ser observado na figura 50B.

Este novo pico de absorvância facilita a monitorização da proteína usando conjuntos de filtros padrões de excitação-emissão para isotiocianato de fluoresceína (FITC) e permite a excitação com laser de argônio para a detecção de GFP por citometria de fluxo.

A expressão intracelular do gene *eGFP* em *P. pastoris* M12 mostrou a viabilidade de se usar esta linhagem junto com vetores contendo a marca *LEU2* como uma plataforma para a produção de proteínas heterólogas. É importante notar que a leitora de fluorescência Typhoon utilizada neste trabalho não possui laser azul sendo que a excitação da eGFP não foi feita no comprimento de onda ideal e consequentemente sua detecção foi fraca. Mesmo assim, este experimento proporciona uma boa alternativa para diferenciar clones expressando o gene daqueles que não o expressam e selecionar só aqueles de interesse para uma análise mais detalhada como a microscopia de fluorescência.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Apesar de que a integração dos cassetes de deleção não tenha sido 100% específica, foi possível obter clones Leu^- com ambos os cassetes e foi demonstrada a eficácia da estratégia utilizada na ruptura do gene *LEU2*. Além disso, foi confirmado que o uso do sistema Cre/loxP é uma abordagem adequada para a reciclagem de marcas em *P. pastoris*.

A ruptura do gene *LEU2* causou mudanças fisiológicas na levedura, porém, isto não impede seu crescimento normal em meio complexo. Ao parecer, *P. pastoris* possui um sistema de captação de leucina similar ao de *S. cerevisiae* o qual é sensível à diminuição do pH intracelular. Devido a isto, a taxa de crescimento da linhagem M12 se vê reduzida em meio mínimo suplementado com leucina e contendo NH_4^+ . O crescimento normal da linhagem auxotrófica é restabelecido controlando o pH.

Este trabalho confirmou que *P. pastoris* M12 pode ser transformada satisfatoriamente com um vetor de expressão contendo o gene *LEU2* como marca de seleção o qual restaura o gene *leu2* e permite a recuperação da prototrofia. Assim mesmo, a expressão do gene *eGFP* em M12 corroborou a factibilidade de se usar vetores contendo a marca *LEU2* como uma plataforma para a expressão heteróloga em *P. pastoris*.

Nosso seguinte objetivo é utilizar esta linhagem como hospedeira para vetores contendo o gene defectivo *leu2-d*, cassete de expressão do gene *LEU2* com o promotor truncado que possui baixo nível de expressão necessitando estar em alto número de cópias para suprir a carência nutricional (SERVIENË; MELVYDAS, 2001). Deste modo seria possível identificar transformantes com múltiplas cópias integradas, expressando em maior quantidade o gene de interesse.

Também esperamos desenvolver linhagens de *P. pastoris* contendo mais de um gene deletado, especificamente, uma linhagem *his4 leu2*.

7 REFERÊNCIAS

- AUSTIN, R.J. et al. A SILAC compatible strain of *Pichia pastoris* for expression of isotopically labeled protein standards and quantitative proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 11, p. 5251-5259, 2011.
- BUSSEY, H.; UMBARGER, H. E. Biosynthesis of the branched-chain amino acids in yeast: a leucine-binding component and regulation of leucine uptake. **Journal of Bacteriology**, v. 103, n. 2, p. 277-285, 1970.
- CELIK, E.; CALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1108-1118, 2012.
- CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.
- CORMACK, B. P.; VALDIVIA, R. H.; FALKOW, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**, v. 173, p. 33-38, 1996.
- CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. v. 5, n. 12, 1985.
- CREGG, J. M. et al. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, 2000.
- CREGG, J.; RUSSELL, K. Transformation. **Methods in Molecular Biology**, v. 103, p. 27-39, 1998.
- CUBITT, A. et al. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **TIBS**, p. 448-455, 1995.
- DA SILVA, N. A.; BAILEY, J. E. Influence of plasmid origin and promoter strength in fermentations of recombinant yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 4, p. 318-324, 1991.
- DAMASCENO, L. M.; HUANG, C.-J.; BATT, C. A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 31-39, 2012.
- DRÖGE, M.; PÜHLER, A.; SELBITSCHKA, W. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. **Journal of Biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 75-90, 1998.
- DU, M.; BATTLES, M. B.; NETT, J. H. A color-based stable multi-copy integrant selection system for *Pichia pastoris* using the attenuated *ADE1* and *ADE2* genes as auxotrophic markers. **Bioengineered Bugs**, v. 3, n. 1, p. 32-37, 2012.
- GRENSON, M.; HOU, C.; CRABEEL, M. Multiplicity of the amino acid permeases. **Journal of Bacteriology**, v. 103, n. 3, p. 770-777, 1970.

GÜLDENER, U. et al. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 13, p. 2519-2524, 1996.

HAMILTON, D. L.; ABREMSKI, K. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system: Cre-mediated synapsis of two lox sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 178, n. 2, p. 481-486, 1984.

HE, J. et al. A synergistic effect on the production of S-adenosyl-L-methionine in *Pichia pastoris* by knocking in of S-adenosyl-L-methionine synthase and knocking out of cystathionine-beta synthase. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 519-527, 2006.

HENSING, M. C. et al. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, n. 3, p. 261-279, 1995.

HEYLAND, J. et al. Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 357-368, 2010.

HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1331, n. 1, p. 41-79, 1997.

HUESO, G. et al. A novel role for protein kinase Gcn2 in yeast tolerance to intracellular acid stress. **Biochemical journal**, v. 441, n. 1, p. 255-264, 2012.

INVITROGEN. EasySelect *Pichia* Expression Kit. In: Carlsbad, CA: [s.n]. .

JAUNIAUX, J.; GRENSON, M. *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. **European Journal of Biochemistry**, v. 190, n. 1, p. 39-44, 1990.

KOTLIAR, N. et al. L-leucine transport systems in *Saccharomyces cerevisiae* participation of *GAP1*, *S1* and *S2* transport systems. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 40, n. 6, p. 833-842, 1994.

LAPLAZA, J. M. et al. *Sh ble* and Cre adapted for functional genomics and metabolic engineering of *Pichia stipitis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 6, p. 741-747, 2006.

LI, D.-Y. et al. PCR based cloning and sequence analysis of the *Pichia pastoris* cystathionine b-synthase gene. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 33, p. 600-606, 2001.

LI, H. et al. Characterization of recombinant *Zea mays* transglutaminase expressed in *Pichia pastoris* and its impact on full and non-fat yoghurts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p. n/a-n/a, 2013.

LI, P. et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 2, p. 105-124, 2007.

- LIN CEREGHINO, G. P. et al. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 263, p. 159-169, 2001.
- LIN CEREGHINO, G. P. et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 329-332, 2002.
- MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005.
- MELLITZER, A. et al. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 61-71, 2012.
- NAGY, A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. **Genesis**, v. 26, n. 2, p. 99-109, 2000.
- NETT, J. H. et al. Cloning and disruption of the *Pichia pastoris* *ARG1*, *ARG2*, *ARG3*, *HIS1*, *HIS2*, *HIS5*, *HIS6* genes and their use as auxotrophic markers. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 295-304, 2005.
- NETT, J. H.; GERNGROSS, T. U. Cloning and disruption of the PpURA5 gene and construction of a set of integration vectors for the stable genetic modification of *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 20, n. 15, p. 1279-1290, 2003.
- NIEDERBERGER, P.; MIOZZARI, G.; HÜTTER, R. Biological role of the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 1, n. 7, p. 584-593, 1981.
- NOSEDA, D. G. et al. Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under *AOX1* promoter. **Protein Expression and Purification**, v. 92, n. 2, p. 235-244, 2013.
- NÄÄTSAARI, L. et al. Deletion of the *Pichia pastoris* *KU70* homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39720, 2012.
- OGATA, K.; NISHIKAWA, H.; OHSUGI, M. A yeast capable of utilizing methanol. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 10, p. 1519-1520, 1969.
- PAN, R. et al. Sequential deletion of *Pichia pastoris* genes by a self-excisable cassette. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 3, p. 292-298, 2011.
- PHILLIPS, G. N. Structure and dynamics of green fluorescent protein. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 6, p. 821-827, 1997.
- PLANT, P. J. et al. Alternative mechanisms of vacuolar acidification in H⁺-ATPase-deficient yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 52, p. 37270-37279, 1999.
- POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91-105, 2012.

- PRONK, J. T. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2095-2100, 2002.
- REIS, V. C. B. et al. Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 11, p. 1673-1683, 2012.
- SCHREVE, J.; GARRETT, J. M. The Branched-Chain Amino Acid Permease Gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *BAP2*, Encodes the High-Affinity Leucine Permease (S1). **Yeast**, v. 13, p. 435-439, 1997.
- SCHREVE, J. L.; GARRETT, J. M. Yeast Agp2p and Agp3p function as amino acid permeases in poor nutrient conditions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 3, p. 745-751, 2004.
- SERVIENĚ, E.; MELVYDAS, V. Effect of the defective leucine gene *leu2-d*, on the properties of recombinant plasmid in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biologija**, v. 4, p. 30-33, 2001.
- STEENSMA, H.; TER LINDE, J. Plasmids with the Cre-recombinase and the dominant nat marker, suitable for use in prototrophic strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, v. 18, n. 5, p. 469-472, 2001.
- THOR, D. et al. Cloning and characterization of the *Pichia pastoris* *MET2* gene as a selectable marker. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 10, p. 935-942, 2005.
- VON BORSTEL, R. C. et al. Topical reversion at the *HIS1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. A tale of three mutants. **Genetics**, v. 148, n. 4, p. 1647-1654, 1998.
- WERTEN, M. W. T. et al. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 15, n. 11, p. 1087-1096, 1999.
- WHITTAKER, M. M.; WHITTAKER, J. W. Construction and characterization of *Pichia pastoris* strains for labeling aromatic amino acids in recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 2, p. 266-274, 2005.
- WIAME, J.; GRENSON, M.; ARST, H. J. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. **Advances in Microbial Physiology**, v. 26, p. 1-88, 1985.
- ÇAKAR, Z. P.; SAUER, U.; BAILEY, J. Metabolic engineering of yeast: the perils of auxotrophic hosts. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 7, p. 611-616, 1999.