



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

# **Uso do gene *amdS* (acetamidase) como marca de seleção dominante em *Pichia pastoris***

**Luíza Cesca Piva**

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Coorientadora: Dra. Viviane Castelo Branco Reis

Brasília, 2015

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

## **Uso do gene *amdS* (acetamidase) como marca de seleção dominante em *Pichia pastoris***

**Luíza Cesca Piva**

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres  
Coorientadora: 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, 2015

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 e com apoio financeiro do CNPq.

## **Banca Examinadora**

Professor Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres  
Universidade de Brasília  
Presidente da Banca

Professora Dra. Beatriz Dolabela de Lima  
Universidade de Brasília  
Membro Efetivo

Professora Dra. Nádia Skorupa Parachin  
Universidade de Brasília  
Membro Efetivo

Professora Dra. Janice Lisboa De Marco  
Universidade de Brasília  
Membro Suplente

Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma  
maneira me ajudaram a realizá-lo.  
Em especial à minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela força.

À minha mãe Maria Helena e minha vó Ericka, pelo amor e carinho e por me ensinarem a ser tudo que sou. Ao Guillermo pelos momentos de descontração e aprendizado.

À minha irmã Mariana e ao Rafael, pelo acolhimento e ajuda nessa nova etapa da minha vida.

Ao meu Pai Renir e à Kátia, pelo carinho e cuidado comigo em Brasília.

Ao meu orientador Prof. Fernando, pela oportunidade e por acreditar em meu trabalho, além de todos os ensinamentos.

À minha coorientadora Viviane Reis pelo conhecimento, orientação e por todas as vezes em que me mostrou o caminho a seguir.

À professora Lídia Pepe de Moraes pela ajuda e pelos conselhos sinceros.

A todos os professores da BioMol, que contribuem para o nosso trabalho neste laboratório.

Aos funcionários da BioMol Ivonildes, Fátima, Thompson, Ivone e Márcia. Sem vocês seria muito difícil realizar qualquer projeto.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular, principalmente os companheiros do Lab 2: Myrna, Chris, Maritza, Gisele, Túlio, Vivis, Luanne, Juliana, Marciano, Daniel, Thiago, Ana, Janice, Danuza, Vinícius e Carol.

Ao Raphael, sempre alegrando meus dias e mostrando que a vida fica mais leve ao seu lado. Obrigada pelo amor, carinho e conselhos.

A todos da EBB – UFPR, pela formação pessoal e acadêmica.

Aos amigos de Curitiba e todos aqueles espalhados pelo Brasil e pelo mundo: obrigada pelo apoio, pelos encontros mesmo que difíceis, pela companhia.

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

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

# SUMÁRIO

<b>Lista de figuras</b>	<b>i</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de abreviaturas e símbolos</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMO</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<i>Pichia pastoris</i>	1
Linhagens e marcas de seleção disponíveis	2
Reciclagem de marcas de seleção	3
O sistema Cre-loxP de recombinação	4
O gene <i>amdS</i> como marca de seleção	6
Os genes <i>ADE2</i> e <i>URA5</i> como marcas auxotróficas	7
<b>1 OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
1.1 Objetivo geral	11
1.2 Objetivos Específicos	11
<b>2 ESTRATÉGIA</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1 Materiais	13
3.1.1 Micro-organismos	13
3.1.2 Meios de cultura	13
3.1.3 Tampões e soluções	16
3.1.4 Marcadores moleculares para DNA	19
3.1.5 Kits	19
3.1.6 Enzimas	20
3.1.7 Vetores	20
3.1.8 Oligonucleotídeos ( <i>primers</i> )	22
3.2 Métodos	23
3.2.1 Cultivo de micro-organismos	23
3.2.2 Preparação de células bacterianas competentes	23
3.2.3 Ligação de fragmentos de DNA	23
3.2.4 Transformação bacteriana – choque térmico	24
3.2.5 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)	24
3.2.6 Preparação de DNA plasmidial em grande escala (midi e maxiprep)	25
3.2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
3.2.8 Digestão de DNA com enzimas de restrição	25
3.2.9 Defosforilação de DNA linearizado	25
3.2.10 Análise de DNA por eletroforese	26
3.2.11 Purificação e eluição de fragmentos de DNA	26

3.2.12	Precipitação de DNA	26
3.2.13	Transformação de <i>P. pastoris</i> (vetores integrativos e cassetes de deleção)	27
3.2.14	Transformação de <i>P. pastoris</i> (vetores replicativos)	27
3.2.15	Curva de crescimento em meio líquido	28
3.2.16	Extração de DNA total de levedura	28
3.2.17	Extração de RNA de levedura	28
3.2.18	RT-PCR do RNA de levedura	29
3.2.19	Análise de fluorescência no Typhoon scanner	29
3.2.20	Análises de bioinformática	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
4.1	Teste de crescimento em acetamida	30
4.2	Análise do genoma de <i>P. pastoris</i>	31
4.3	Construção do cassete de deleção para a ORF PAS_chr3_0283	33
4.4	Deleção da ORF PAS_chr3_0283	39
4.5	Síntese do gene <i>amdS</i>	40
4.6	Construção do vetor pAMDS-EGFP	41
4.7	Transformação de <i>P. pastoris</i> X-33 e LA1	45
4.8	Curvas de crescimento	50
4.9	Construção dos cassetes de deleção	52
4.9.1	Cassete de deleção <i>ADE2</i>	52
4.9.2	Cassete de deleção <i>URA5</i>	57
4.10	Deleção do gene <i>ADE2</i>	60
4.11	Reciclagem da marca de seleção	62
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>80</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação da sequência <i>loxP</i> .	5
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da deleção por recombinação com sistema Cre- <i>loxP</i> .	5
<b>Figura 3.</b> Via de biossíntese das purinas.	8
<b>Figura 4.</b> Via de biossíntese das pirimidinas.	9
<b>Figura 5.</b> Estratégia para a utilização da marca de seleção <i>amdS</i> em vetor integrativo e na deleção de genes em <i>P. pastoris</i> .	12
<b>Figura 6.</b> Curvas de crescimento da linhagem X-33 em meio MD e meio MD-Ac.	30
<b>Figura 7.</b> Alinhamento de sequências proteicas da amidase putativa (putativeamidase) encontrada em <i>P. pastoris</i> e da acetamidase de <i>A. nidulans</i> ( <i>amdS</i> ).	31
<b>Figura 8.</b> Análise da expressão da ORF PAS_chr3_0283.	32
<b>Figura 9.</b> Representação dos cassetes de seleção utilizados neste trabalho.	33
<b>Figura 10.</b> Etapas da construção de cassete de deleção contendo sequências homólogas para recombinação.	34
<b>Figura 11.</b> Amplificação de fragmentos <i>upstream</i> ( <i>up</i> ) e <i>downstream</i> ( <i>dw</i> ) que flanqueiam a região da ORF PAS_chr3_0283.	35
<b>Figura 12.</b> Amplificação por PCR do sistema de ligação dos fragmentos <i>up</i> e <i>dw</i> .	35
<b>Figura 13.</b> Clonagem dos fragmentos <i>up</i> e <i>dw</i> no vetor pPCV.	36
<b>Figura 14.</b> Amplificação por PCR do fragmento clonado no vetor pPCV utilizando os primers KpAMS-F1 e KpAMS-R2.	37
<b>Figura 15.</b> Clonagem do cassete zeo <i>loxP</i> entre as sequências homólogas <i>up</i> e <i>dw</i> .	38
<b>Figura 16.</b> PCR do cassete de deleção ORF1 utilizando os <i>primers</i> KpAMS-F1 e KpAMS-R2.	38
<b>Figura 17.</b> PCR de colônia de clones obtidos na transformação com o cassete de deleção ORF PAS_chr3_0283.	39
<b>Figura 18.</b> Sequência sintetizada contendo o gene <i>amdS</i> de <i>A. nidulans</i> .	41
<b>Figura 19.</b> Etapas da construção do plasmídeo pAMDS-EGFP	42
<b>Figura 20.</b> Clonagem do gene <i>amdS</i> no vetor com as sequências <i>loxP</i> .	43
<b>Figura 21.</b> Clonagem do cassete <i>amdSloxP</i> no vetor pPIC-B	44
<b>Figura 22.</b> Clonagem do gene <i>EGFP</i> no vetor de expressão.	45
<b>Figura 23.</b> Placas controle das transformações das linhagens LA1 e X-33.	46

<b>Figura 24.</b> Expressão intracelular do gene <i>EGFP</i> .	47
<b>Figura 25.</b> Expressão intracelular do gene <i>EGFP</i> .	47
<b>Figura 26.</b> PCR de colônia dos clones X-33 <i>AOX1</i> que não apresentaram fluorescência.	48
<b>Figura 27.</b> PCR de colônia dos clones LA1 <i>AOX1</i> e X-33 <i>HIS4</i> que não apresentaram fluorescência.	49
<b>Figura 28.</b> Curva de crescimento das linhagens X-33, LA1 e dos clones de cada transformação em meio MD-Ac.	51
<b>Figura 29.</b> PCR dos fragmentos <i>upstream</i> ( <i>up</i> ) e <i>downstream</i> ( <i>dw</i> ) flanqueando a região codante do gene <i>ADE2</i> .	53
<b>Figura 30.</b> 3 reações de PCR do sistema de ligação <i>updw</i> .	53
<b>Figura 31.</b> Clonagem do fragmento <i>updw</i> no vetor pBluescript II SK+.	54
<b>Figura 32.</b> Clonagem do cassete <i>amdSloxP</i> no vetor contendo as sequências <i>updw</i> .	56
<b>Figura 33.</b> PCR dos fragmentos <i>upstream</i> e <i>downstream</i> flanqueando a região do gene <i>URA5</i> .	57
<b>Figura 34.</b> PCR do sistema de ligação dos fragmentos <i>up</i> e <i>dw</i> .	58
<b>Figura 35.</b> Clonagem do fragmento <i>updw</i> no vetor pBluescript II SK.	58
<b>Figura 36.</b> PCR com <i>primers</i> URA <sub>up</sub> -F e URA <sub>dw</sub> -R do DNA plasmidial dos clones 1 e 6 da clonagem do cassete <i>amdSloxP</i> .	59
<b>Figura 37.</b> PCR de colônia para confirmar deleção do gene <i>ADE2</i> .	60
<b>Figura 38.</b> PCR de colônia para confirmar deleção do gene <i>ADE2</i> .	61
<b>Figura 39.</b> Crescimento das linhagens LA2-A e LA1 em meio sem adenina (A) e com adenina (B).	62
<b>Figura 40.</b> Crescimento em fluoroacetamida dos 9 clones obtidos na transformação com o vetor pYRCre2.	63
<b>Figura 41.</b> Clones 1 a 9 da transformação com o vetor pYRCre2 em meios seletivos.	63
<b>Figura 42.</b> PCR de colônia para confirmar excisão da marca de seleção do <i>locus ADE2</i> .	64
<b>Figura 43.</b> PCR de colônia para confirmar excisão da marca de seleção do <i>locus</i> ORF PAS_chr3_0283.	65
<b>Figura 44.</b> Metabolismo do nitrogênio.	67
<b>Figura 45.</b> Esquema representativo do mecanismo de ruptura gênica.	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Enzimas de restrição utilizadas neste trabalho.	20
<b>Tabela 2.</b> Vetores utilizados neste trabalho.	21
<b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> usados neste trabalho.	22
<b>Tabela 4.</b> Clones escolhidos de cada evento de transformação para a construção da curva de crescimento.	50
<b>Tabela 5.</b> Taxa de crescimento máxima para os clones obtidos na transformação com o vetor pAMDS-EGFP.	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>5-FOA</b>	Ácido 5-fluoroorótico
<b>Amp<sup>R</sup></b>	Gene que confere resistência a ampicilina
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>Da</b>	Dalton
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EtBr</b>	Brometo de etídio
<b>g</b>	Aceleração da gravidade
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
<b>hgm<sup>R</sup></b>	Gene que confere resistência a higromicina B
<b>kb</b>	Quilobase
<b>KEGG</b>	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<b>OD<sub>600</sub></b>	Densidade ótica a 600 nm
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i>
<b>pb</b>	Par de base
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>p/v</b>	Peso por volume
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAse A</b>	Ribonuclease A
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	Reação da transcriptase reversa seguida de PCR
<b>s</b>	Segundo
<b>SAP</b>	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (fosfatase alcalina de camarão)
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TAE</b>	Tampão tris-acetato-EDTA
<b>v</b>	Volume
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>YNB</b>	<i>Yeast nitrogen base</i>
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo
<b>μF</b>	Microfaraday
<b>Ω</b>	Ohm

## RESUMO

A levedura *Pichia pastoris* tem sido bastante explorada na produção de proteínas heterólogas, graças a algumas vantagens apresentadas por esse sistema, tais como: técnicas de manipulação genética disponíveis, crescimento em altas densidades celulares, realização de modificações pós-traducionais e secreção eficiente de proteínas. Contudo, esse sistema ainda possui algumas limitações no que se refere às ferramentas de genética molecular. Por exemplo, para que diversas modificações sejam introduzidas na mesma linhagem, faz-se necessário o uso de múltiplas marcas de seleção ou de estratégias que permitam a sua reutilização. Em *Pichia*, o uso de marcas recicláveis ainda é limitado. Nesse contexto, destaca-se o gene *amdS* (acetamidase) de *Aspergillus nidulans*, que permite a seleção de fungos em meio de cultura contendo acetamida como única fonte de nitrogênio e a contrasseleção em meio contendo a droga fluoroacetamida. Em conjunto com a contrasseleção do gene *amdS*, o sistema Cre-loxP de recombinação sítio-específica pode ser utilizado para facilitar a excisão da marca de seleção. Neste trabalho, o uso da marca *amdS* foi testado em *P. pastoris* e, como prova de conceito, foi feita a deleção do gene *ADE2*, uma carboxilase envolvida na síntese “de novo” de purinas. Primeiramente, uma ORF endógena que codifica para uma amidase putativa foi deletada. Em seguida, foi construído um vetor contendo um cassete com o gene *amdS* flanqueado por sítios *loxP* além do gene repórter *EGFP* para testar a eficiência da marca em *P. pastoris*. A construção *amdS-loxP* foi também utilizada em cassetes de deleção para os genes *ADE2* e *URA5*. Após a deleção do gene *ADE2*, um plasmídeo replicativo contendo o gene da recombinase CreA (pYRCre2) foi utilizado para a excisão da marca, para permitir a reutilização do gene *amdS* em outros eventos de deleção. A integração do vetor contendo o gene *amdS* mostrou que esta nova marca de seleção é aplicável em *P. pastoris* com a vantagem de permitir a contrasseleção de transformantes após o uso do sistema de recombinação Cre-loxP. Esta nova ferramenta traz alternativas na manipulação genética da levedura reduzindo problemas como a necessidade de expressão de diversas marcas dominantes.

## ABSTRACT

The yeast *Pichia pastoris* has been widely explored for the production of heterologous proteins due to certain advantages presented by this system, such as: molecular genetic techniques available, growth at high cell densities, post-translational modifications and efficient protein secretion. However, this system still has some limitations related to the tools used for genetic modifications. For example, in order for many genetic modifications to be done in the same strain, one needs to use multiple selection marks or strategies that allow marker reusing. In *Pichia*, the use of recyclable markers is still limited. The *amdS* gene from *Aspergillus nidulans* stands out in this context because it allows the selection of fungi in medium that contains acetamide as sole nitrogen source, as well as the counterselection in medium that contains the drug fluoroacetamide. Along with the counterselection property of the *amdS* gene, the Cre-loxP site-specific recombination system can be used to help in selection marker excision. In this work, the *amdS* selection mark was tested in *P. pastoris* and, as proof of concept, the *ADE2* gene coding for a carboxylase involved in purine synthesis was deleted. Firstly, an endogenous ORF coding for a putative amidase was deleted. Subsequently, a vector containing a cassette with the *amdS* gene flanked by *loxP* sites and a *EGFP* gene was constructed in order to test the selection marker in *P. pastoris*. The *amdS-loxP* construction was also used in deletion cassettes for *ADE2* and *URA5* genes. After the *ADE2* gene deletion, a replicative plasmid containing the CreA recombinase gene (pYRCre2) was used for marker excision, allowing the use of the *amdS* gene in further gene deletion events. Integration of the vector containing the *amdS* gene showed that this new selection marker is applicable in *P. pastoris* with the advantage of allowing counterselection after using the Cre-loxP recombination system. This new tool brings an alternative for *P. pastoris* genetic manipulation, reducing problems such as the expression of many dominant selection markers simultaneously.

# INTRODUÇÃO

## *Pichia pastoris*

A levedura *Pichia pastoris*, reclassificada sob o gênero *Komagataella* (KURTZMAN, 2005) é reconhecida pela sua capacidade de utilizar metanol como fonte de carbono. O metabolismo metilotrófico é possível graças à produção da enzima peroxissomal álcool oxidase (AOX) que realiza a oxidação inicial do metanol levando à produção de formaldeído e peróxido de hidrogênio. Como AOX possui baixa afinidade por oxigênio, a célula compensa esta limitação pela hiperexpressão desta enzima (OGATA et al., 1969). A enzima AOX é produzida a partir da expressão de dois genes, *AOX1* e *AOX2*, sendo o primeiro responsável pela maior parte da proteína produzida – o promotor do gene *AOX1* é forte e induzido pela presença de metanol, podendo fazer com que a enzima alcance níveis de até 30% do total de proteínas solúveis da célula (KLEI et al., 1991).

O genoma de *P. pastoris* foi sequenciado e sua publicação ocorreu em 2009, juntamente com a identificação de 5313 ORFs (DE SCHUTTER et al., 2009). Grande parte destas sequências tem correspondência com genes descritos em bases de dados, o que muito contribuiu no avanço da genética molecular desta levedura.

O começo da utilização comercial de *P. pastoris* ocorreu na década de 70 (AHMAD et al., 2014; CEREGHINO; CREGG, 2000; VALERO, 2013). Desde então, e com o avanço da tecnologia do DNA recombinante, esta levedura tem sido cada vez mais utilizada como plataforma eucariótica para a produção de proteínas heterólogas. O sistema apresenta diversas vantagens como: uso do promotor forte e regulável *AOX1*, crescimento em altas densidades celulares, alto rendimento na produção de proteínas secretadas e capacidade de realizar modificações pós-traducionais como ajustes proteolíticos, metilações e glicosilações (CEREGHINO; CREGG, 2000; LI et al., 2007; VOGL; HARTNER; GLIEDER, 2013). Esta última característica a torna um organismo com grande potencial de produção de biofármacos e proteínas humanas, sendo que algumas linhagens já foram modificadas para possuírem um padrão de glicosilação semelhante ao humano (VOGL; HARTNER; GLIEDER, 2013).

O metabolismo desta levedura é também fortemente aeróbico, mesmo em grandes concentrações de substrato, o que a favorece como plataforma de produção e a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae* (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012).

O sistema de expressão baseado no uso da levedura *P. pastoris* já produziu proteínas bacterianas, fúngicas, de plantas, animais e humanos. Exemplos de proteínas heterólogas produzidas por *P. pastoris* vão desde enzimas bacterianas até biofármacos e anticorpos monoclonais (AHMAD et al., 2014).

## **LINHAGENS E MARCAS DE SELEÇÃO DISPONÍVEIS**

A construção de linhagens de *P. pastoris* que produzam proteínas de interesse depende da construção e inserção de um vetor de expressão no genoma da levedura, e para detectar os clones transformantes é preciso uma marca de seleção (CEREGHINO; CREGG, 2000). As marcas de seleção dominantes atualmente usadas em *P. pastoris* incluem os genes *Sh ble*, *hph* e *kan* que conferem resistência às drogas zeocina, higromicina B e G418, respectivamente. (LI et al., 2007; THOR et al., 2005). Outros exemplos de marcas dominantes envolvem a capacidade da levedura de utilizar certos compostos em seu metabolismo, como o gene *SUC2* que codifica para a enzima invertase de *S. cerevisiae* permitindo o crescimento da levedura em sacarose; assim como a marca da enzima fosfito desidrogenase, que permite a utilização de fosfito como fonte de fósforo (SREEKRISHNA, TSCHOPPB, 1987; KANDA et al., 2014).

As marcas de seleção dominantes de resistência a drogas geralmente codificam para proteínas que protegem a célula dos efeitos de um antibiótico, por exemplo a fosfotransferase produzida pelo gene *kan* (DELNERI et al., 2000), ou para enzimas que permitam o metabolismo de um novo composto. Dessa forma, essas marcas aumentam a carga de proteínas a serem produzidas pela célula e isso pode sobrecarregar o seu metabolismo. A resistência a antibióticos também apresenta problemas no caso de leveduras naturalmente resistentes, que podem originar falsos positivos nas transformações (KANDA et al., 2014).

Outro tipo de marca de seleção usado em *P. pastoris* são as marcas auxotróficas, como *URA3*, *URA5*, *HIS1*, *HIS2*, *HIS4*, *HIS5*, *HIS6*, *ARG4*, *MET2*, *ADE1* e *ADE2* (LIN et al., 2001; NETT et al., 2005; YANG et al., 2014).

Na utilização deste tipo de marca de seleção, primeiramente é preciso criar uma linhagem auxotrófica por meio da inativação de um gene de via biossintética. Nesse caso, o vetor de transformação a ser utilizado possui uma cópia funcional do gene alterado, assim permitindo o crescimento dos transformantes sem a necessidade de suplementação com a biomolécula produzida pela via metabólica em questão (PRONK, 2002).

Mais recentemente novas marcas de seleção têm sido desenvolvidas para *P. pastoris*, permitindo não apenas a seleção de células que possuem a sequência de interesse, mas também daquelas que a possuem em várias cópias ou até a contrasseleção de células que perderam a marca. Um exemplo de sistema que permite a detecção de integrações múltiplas é a marca de seleção *FLD1*, um gene que codifica para a enzima formaldeído desidrogenase que, quando presente em várias cópias, aumenta progressivamente a resistência da célula ao formaldeído (SUNGA; CREGG, 2004). Já no caso da contrasseleção, um exemplo é o cassete MazF-ZeoR, que usa o gene *Sh ble* de resistência a zeocina como marca de seleção direta e o gene *mazF* como marca de contrasseleção, pois este gene codifica para uma toxina de *Escherichia coli* que causa a morte celular (YANG; JIANG; YANG, 2009). Outros exemplos de marcas que permitem contrasseleção são os genes *URA3* e *URA5*, que permitem a seleção por prototrofia em meio sem uracila, assim como a contrasseleção pela resistência ao ácido 5-fluorótico (5'-FOA) (BOEKE et al., 1984; NETT; GERNGROSS, 2003). Permitem, assim, a seleção tanto de transformantes com a marca de seleção quanto de clones que perderam a marca (ALANI; CAO; KLECKNER, 1987; NETT; GERNGROSS, 2003).

## **RECICLAGEM DE MARCAS DE SELEÇÃO**

Tipicamente, a realização de diversas modificações em uma mesma linhagem requer o uso de uma marca de seleção para cada evento de transformação. No caso do uso de marcas auxotróficas, primeiramente é necessário construir linhagens com as mutações desejadas em vários genes. Este processo é laborioso e complexo, sobretudo no caso de leveduras industriais, podendo ainda ter efeitos nos parâmetros de crescimento (PRONK, 2002; PUIG; RAMON; PEREZ-ORTIN, 1998). Ao mesmo tempo, extensas manipulações com marcas dominantes de seleção também podem ter efeitos indesejados na fisiologia de leveduras devido à

sobrecarga na produção de proteínas, um efeito indesejável principalmente no caso de linhagens usadas para produção de proteínas heterólogas (GOPAL; BROAD; LLOYD, 1989; ZHU et al., 2011). Além disso, a expressão de marcas de resistência em leveduras industriais representa um problema do ponto de vista ambiental, visto que pode haver transferência de transgenes para micro-organismos do meio-ambiente (THOMAS; NIELSEN, 2005).

Para contornar estes problemas pode-se reciclar as marcas de seleção, o que permite realizar mais de um evento de transformação utilizando a mesma marca com a retirada da mesma após cada manipulação. Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para a reciclagem de marcas de seleção em leveduras, entre elas: utilização de repetições diretas para facilitar a excisão por recombinação homóloga, como a sequência *hisG* de *Salmonella* (ALANI; CAO; KLECKNER, 1987; SOLIS-ESCALANTE et al., 2013) ou de sequências do próprio genoma da levedura para que não reste nenhuma sequência exógena ao final da reciclagem (AKADA et al., 2006). Também são muito utilizados sistemas de excisão baseados em recombinases, como o FLP/FRT de *S. cerevisiae* (NÄÄTSAARI et al., 2012; VOGL; HARTNER; GLIEDER, 2013) e o Cre-loxP de bacteriófagos (SAUER, 1987; DELNERI et al., 2000; GUELDERNER et al., 2002).

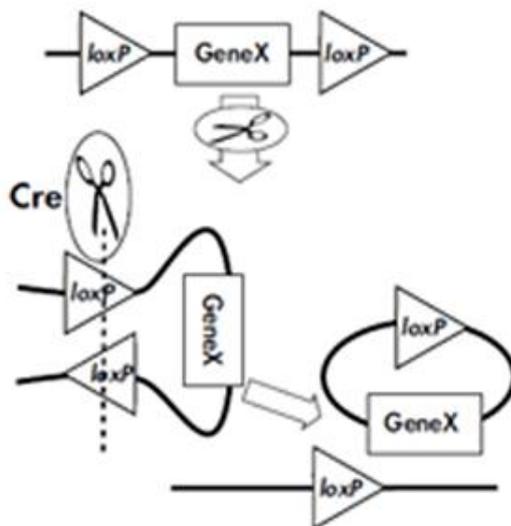
## **O SISTEMA Cre-loxP DE RECOMBINAÇÃO**

O sistema Cre-loxP consiste no uso de uma recombinase sítio-específica de 38 kDa do fago P1 chamada CreA, que pertence à família das integrases. Esta proteína é capaz de reconhecer sítios de 34 pares de bases chamados sítios *loxP*, compostos por duas sequências de 13 pares de bases repetidas inversamente e por uma sequência central única de 8 pares de bases (figura 1) (SAUER, 1877; LEE; SAITO, 1998).



**Figura 1. Representação da sequência *loxP*.** Duas sequências idênticas de 13 pb nas extremidades, repetidas inversamente, separadas por um DNA espaçador de 8 pb.

Uma vez expressa, a recombinase CreA é capaz de promover a recombinação entre sítios *loxP* e realizar inversões, translocações e deleções de sequências presentes entre eles. Seu uso na reciclagem de marcas de seleção envolve sítios *loxP* localizados no mesmo sentido de uma fita de DNA, o que promove a excisão da sequência situada entre eles (SAUER; HENDERSON, 1988). O sentido das sequências *loxP* é definido pela sequência do DNA espaçador. A recombinação é feita a partir da ligação da enzima às sequências inversamente repetidas, aproximando-as e promovendo a recombinação na sequência espaçadora de cada sítio *loxP*. Assim, a recombinase mantém no organismo apenas uma cópia *loxP*, composta por metade de cada sítio previamente existente (figura 2) (NAGY, 2000).



**Figura 2. Representação esquemática da deleção por recombinação com sistema Cre-loxP.** Sequências *loxP* localizadas na mesma orientação sinalizam a excisão por recombinação mediada pela recombinase CreA. Figura extraída de Jackson Laboratory, 2014.

Esta estratégia já foi utilizada extensivamente na manipulação genética de leveduras como *S. cerevisiae*, e também de outros organismos para a reciclagem de marcas de seleção e excisão de sequências. Dependendo do promotor utilizado para a expressão do gene da recombinase, pode-se realizar excisões controladas no caso de leveduras, ou tecido-específicas, no caso de células de mamíferos. (SAUER; HENDERSON, 1988; GUELDERER et al., 2002; WAKI; AKEGAWA, 2004).

## **O GENE *amdS* COMO MARCA DE SELEÇÃO**

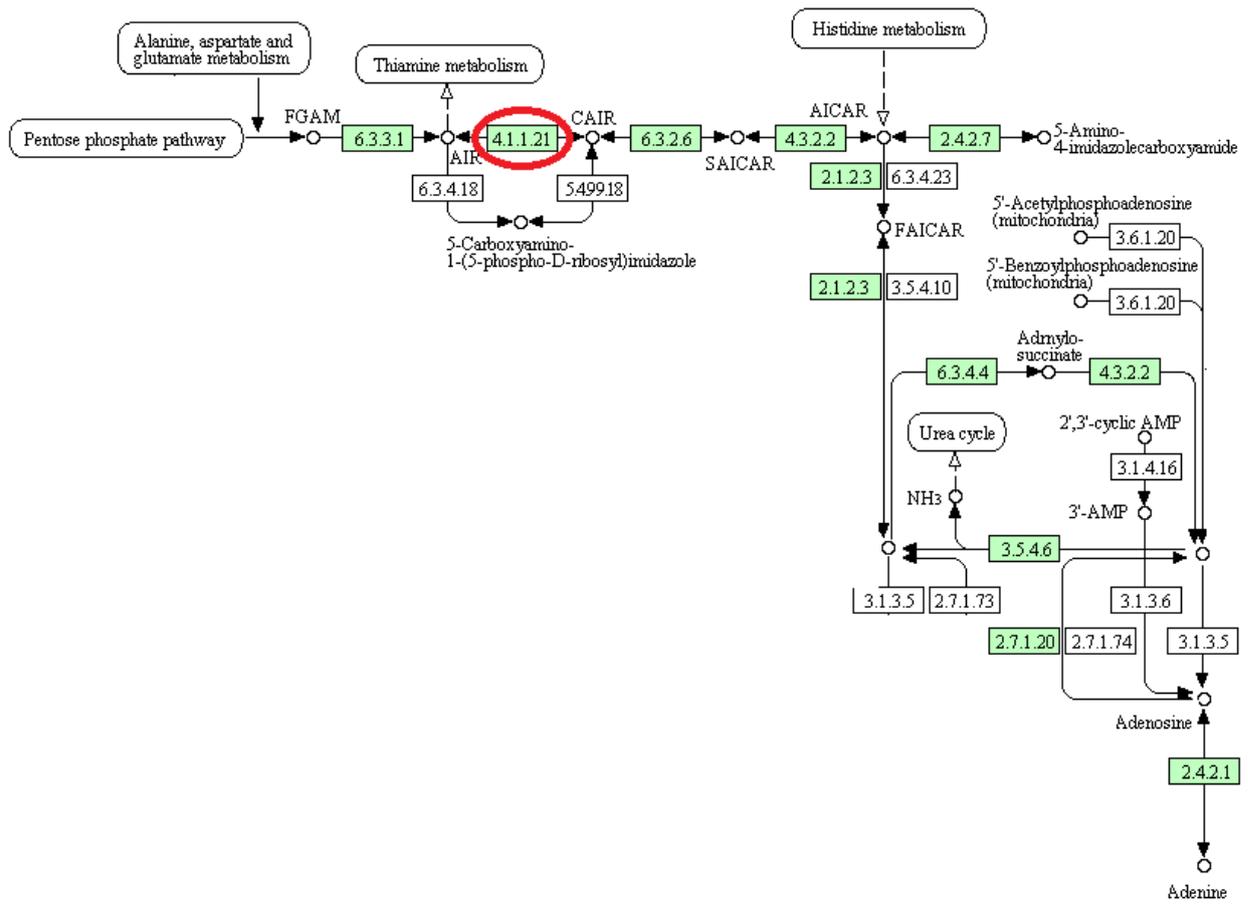
O gene *amdS* do fungo *Aspergillus nidulans* codifica a enzima acetamidase, capaz de catalisar a quebra de amidas de cadeia curta, como a formamida e acetamida, e liberando acetato e amônia. Em organismos que não são naturalmente capazes de utilizar acetamida como fonte de nitrogênio, o gene *amdS* permite a produção de amônia, que é utilizável como fonte deste nutriente. Assim, sua ação como marca de seleção baseia-se na utilização de um meio mínimo com acetamida como única fonte de nitrogênio, permitindo assim, apenas o crescimento das células que possuem essa marca (VAN OUYEN et al., 2006). O gene *amdS* já foi utilizado como marca de seleção em diversos fungos filamentosos e também em leveduras, como *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* (GOMI; KITAMOTO; KUMAGAI, 1992; VAN OUYEN et al., 2006; SOLIS-ESCALANTE et al., 2013), mas ainda não foi usado em *P. pastoris*.

Outra característica importante do gene *amdS* que o torna uma boa alternativa como marca de seleção é que ele permite que seja feita a contrasseleção, ou seja, seleção de células que não expressem o gene. Células que não possuem a marca são selecionadas na presença da droga fluoroacetamida, que provoca a morte celular caso o gene *amdS* seja expresso (VAN OUYEN et al., 2006). A fluoroacetamida é convertida pela acetamidase em fluoroacetato, que interfere no metabolismo da célula substituindo o acetato no ciclo do ácido cítrico. Os derivados de fluoroacetil-CoA bloqueiam a ação da enzima aconitase e interrompem o ciclo do ácido cítrico, ocasionando a morte celular (ALDOUS; ROZEE, 1956). Dessa forma, a fluoroacetamida é tóxica somente na presença da enzima

acetamidase, e permite a seleção de células que não possuem a marca no caso da reciclagem da marca de seleção.

## **OS GENES *ADE2* E *URA5* COMO MARCAS AUXOTRÓFICAS**

O gene *ADE2* codifica a enzima fosforibosil aminoimidazol carboxilase (EC 4.1.1.21), que catalisa a sexta etapa da biossíntese das purinas (GEDVILAITE; SASNAUSKAS, 1994). Seu número de acesso no banco de dados GenBank é FN392321 e está localizado no cromossomo 3 de *P. pastoris*. Este gene é utilizado como marca de seleção auxotrófica em linhagens e vetores disponíveis comercialmente (PichiaPink Expression Kit, Invitrogen, EUA). A deleção do gene *ADE2* é facilmente detectável não apenas porque resulta em uma célula auxotrófica para adenina, mas também causa o acúmulo de 5-fosforibosil 5-aminoimidazol (AIR), um composto avermelhado que leva a colônias com coloração rósea (UGOLINI; BRUSCHI, 1996). Parte da via de síntese das purinas está descrita na figura 3, onde as enzimas em verde estão presentes em *P. pastoris* e a enzima codificada pelo gene *ADE2* está marcada pelo círculo em vermelho.



**Figura 3. Via de biossíntese das purinas.** A enzima 4.1.1.21 representa a fosforibosil aminoimidazol carboxilase. Figura extraída de *KEGG PATHWAY database*.

Linhagens com deleção do gene *ADE2* são usadas na verificação da estabilidade de vetores em conjunto com a deleção do gene *ADE3*, que codifica uma enzima localizada antes da carboxilase codificada pelo gene *ADE2* na via de síntese das purinas. Essa verificação baseia-se na coloração da colônia para sinalizar a presença ou ausência do vetor. Esse tipo de linhagem também permite a análise de número de cópias do DNA exógeno que foram integradas no genoma através da coloração da colônia (UGOLINI; BRUSCHI, 1996; DU; BATTLES; NETT, 2012).

Já o gene *URA5* codifica a enzima orotato fosforibosil transferase (EC 2.4.2.10), que catalisa a formação de fosforibosil difosfato na via *de novo* de síntese das pirimidinas. Este gene encontra-se no cromossomo 3 de *P. pastoris* (número de acesso GenBank: FN392321.1) e também é utilizado como marca de seleção auxotrófica em *P. pastoris* (NETT; GERNGROSS, 2003). A sua deleção causa auxotrofia para uracila e torna a levedura capaz de crescer em meio contendo o análogo de pirimidina ácido 5-fluorótico (5-FOA), um composto normalmente tóxico à



uma seleção rápida de mutantes obtidos por ruptura gênica. A obtenção de mutantes auxotróficos é uma estratégia simples e eficiente para testar o uso dessa nova marca de seleção. Além disso, os mutantes auxotróficos obtidos podem ser usados como células hospedeiras para futuros experimentos de manipulação genética de *P. pastoris*.

# 1 OBJETIVOS

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar a enzima acetamidase, codificada pelo gene *amdS* de *A. nidulans*, como uma marca de seleção dominante em *P. pastoris*.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Verificar o crescimento de *P. pastoris* em meio com acetamida e identificar possíveis ORFs codificadoras de acetamidase;
- 2) Construir cassete de deleção para a sequência identificada e transformar *P. pastoris* X-33;
- 3) Transformar *P. pastoris* com vetor contendo versão sintética do gene *amdS*;
- 4) Construir cassetes de deleção contendo a marca *amdS* e deletar sequencialmente os genes *ADE2* e *URA5* reciclando a marca entre cada transformação.

## 2 ESTRATÉGIA

A estratégia utilizada para testar a eficiência da manipulação genética de *P. pastoris* utilizando a marca *amdS* está descrita na figura 5.

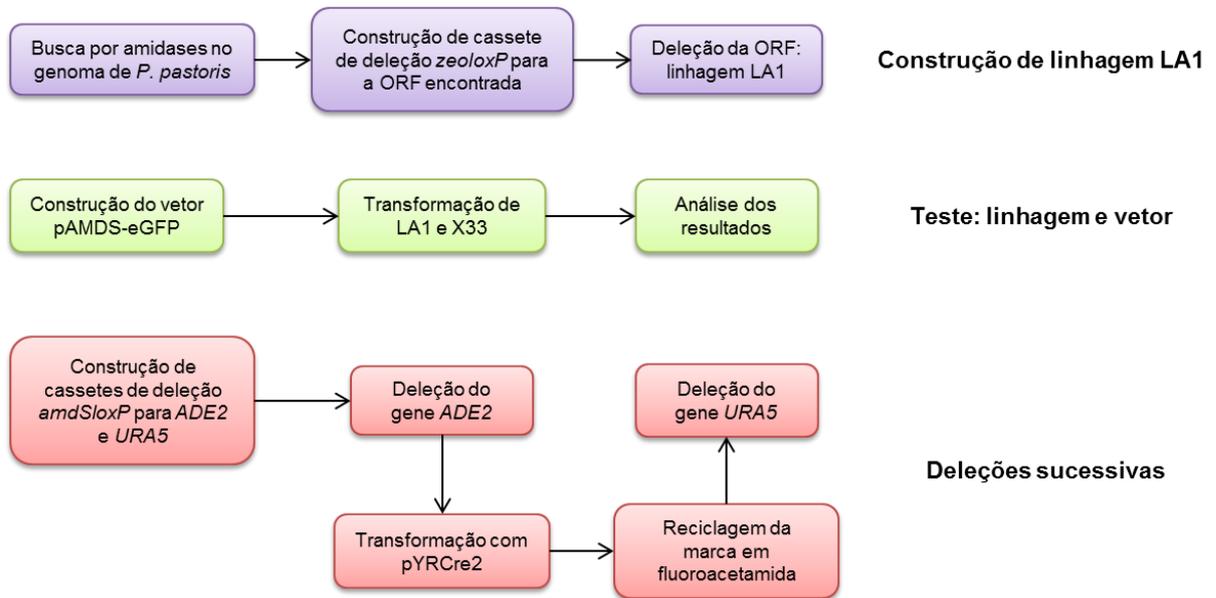


Figura 5. Estratégia para a utilização da marca de seleção *amdS* em vetor integrativo e na deleção de genes em *P. pastoris*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Micro-organismos

###### Bactérias

- *Escherichia coli* XL10-Gold (Stratagene): Tet<sup>r</sup>  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte$  [F' *proAB lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]
- *E. coli* JM110 (Stratagene): *rpsL* (Str<sup>r</sup>) *thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44*  $\Delta(lac-proAB)$  [F' *traD36 proAB lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15]

###### Levedura

- *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen, EUA)

##### 3.1.2 Meios de cultura

- **LB**

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Peptona	1% (p/v)
NaCl	1% (p/v)

pH 7,2. No caso de meio sólido, foi adicionado ágar a 1,5%.

- **LB low-salt**

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Peptona	1% (p/v)
NaCl	0,5% (p/v)

pH 7,2. No caso de meio sólido, foi adicionado ágar a 1,5%.

- **SOB**

Triptona	2 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	0,06 % (p/v)
KCl	0,05 % (p/v)
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM

Os sais MgCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub> foram utilizados a partir de soluções-estoque 1M, previamente filtradas em membrana de 0,22 µm.

- **YPD**

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona	2 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)

No caso de meio sólido, foi adicionado ágar a 1,5% ou 2%.

- **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	0,34 % (p/v)
Sulfato de amônio	10 % (p/v)
Biotina	4x10 <sup>-5</sup> % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Ágar	2 % (p/v)

Quando necessário o meio foi suplementado com adenina na concentração final de 0,002 % (p/v) ou uracila na concentração final de 0,02 % (p/v).

- **MM ágar (Meio Mínimo com Metanol)**

YNB	1,34 % (p/v)
Biotina	4x10 <sup>-5</sup> % (p/v)
Metanol	0,2 % (p/v)
Ágar	2 % (p/v)

- **MD-Ac (Meio Mínimo com Acetamida)**

YNB	1,34 % (p/v)
Biotina	4x10 <sup>-5</sup> % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Acetamida	0,06 % (p/v)
Ágar	2 % (p/v)

Quando necessário, o meio foi suplementado com adenina na concentração final de 0,02 % (p/v).

- **MD-Fac (Meio Mínimo com Fluoroacetamida)**

YNB	0,34 % (p/v)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 % (p/v)
Biotina	4x10 <sup>-5</sup> % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Fluoroacetamida	0,23% (p/v)
Ágar	2% (p/v)

Os reagentes a serem adicionados nos meios mínimos foram preparados em soluções estoque, filtrados em filtro de 0,22 µm e misturados assepticamente ao restante do meio de cultura. A glicose adicionada tanto no meio YPD quanto nos meios mínimos foi esterilizada separadamente, assim como o ágar dos meios mínimos.

### 3.1.3 Tampões e soluções

#### Soluções estoque para meios de cultura

- **Solução YNB 10X**

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

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22µm.

- **Solução YNB 10X com sulfato de amônio**

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids/Ammonium Sulphate (Difco) 3,4 % (p/v)  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% (p/v)

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22µm.

- **Glicose 20X**

Glicose 40 % (p/v)

- **Biotina 500X**

Biotina 0,02 % (p/v)

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **Acetamida 100X**

Acetamida 6 % (p/v)

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **Fluoroacetamida 100X**

Fluoroacetamida 23 % (p/v)

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **Adenina 100X**

Adenina 0,2 % (p/v)

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **Uracila 10X**

Uracila 0,2 % (p/v)

Esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

### **Antibióticos**

- **Ampicilina (1000X)**

Ampicilina 100 mg/mL

Dissolvida em água MilliQ e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

- **Higromicina B (250X)**

Higromicina B (Sigma-Aldrich) 50 mg/mL

- **Zeocina (4000X para bactérias, 1000X para leveduras)**

Zeocina (Life Technologies) 100 mg/mL

### **Soluções para células bacterianas competentes**

- **Tampão de transformação I**

RbCl 12 g/L

MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 9,9 g/L

Acetato de potássio 0,03 M

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,5 g/L

Glicerol 150 g/L

O acetato de potássio foi utilizado a partir de uma solução estoque 1 M (pH 7,5, ajustado com ácido acético glacial) esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm. O pH do tampão de transformação I 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 <sub>2</sub>	11 g/L
Glicerol	150 g/L

MOPS foi utilizado a partir de uma solução estoque 1 M (pH 6,8, ajustado com NaOH) e esterilizada por filtração. O tampão de transformação II teve seu pH ajustado para 6,8 com NaOH e foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

### **Soluções para extração de DNA plasmidial (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 do uso.

- **Solução III**

Acetato de sódio	3M
Ácido acético	2M

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                      0,05M

pH 8,0.

- **Tampão de amostra**

TAE 20X                  50 % (v/v)

Glicerol                  30 % (v/v)

Azul de Bromofenol      0,25 % (p/v)

### 3.1.4 Marcadores moleculares para DNA

- Gene Ruler 1 kb Plus DNA ladder, 75-20.000 pb (Thermo Scientific)

### 3.1.5 Kits

- Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega): purificação de DNA genômico de leveduras.
- SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen): RT-PCR
- Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega): purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose e de produtos de PCR.
- Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega): extração de DNA plasmidial de bactérias.
- Qiagen Plasmid Maxi kit (Qiagen): purificação de plasmídeos em grande escala.

### 3.1.6 Enzimas

As enzimas utilizadas neste trabalho nos procedimentos de PCR, ligação e defosforilação foram as seguintes:

- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)
- T4 DNA ligase (USB)
- Shrimp Alkaline Phosphatase – SAP (USB)

A tabela 1 contém as enzimas de restrição utilizadas nas clonagens e confirmações descritas neste trabalho, assim como os tampões utilizados, seus sítios de restrição e temperaturas de incubação.

**Tabela 1.** Enzimas de restrição utilizadas neste trabalho.

<b>Enzima</b>	<b>Sítio</b>	<b>Tampão (New England Biolabs)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
BamHI	G <sup>↓</sup> GATCC	NEB3/BSA	37
BglII	A <sup>↓</sup> GATCT	NEB3	37
EcoRV	GAT <sup>↓</sup> ATC	NEB3	37
NcoI	C <sup>↓</sup> CATGGG	NEB3	37
SacI	GAGCT <sup>↓</sup> C	NEB1	37
Sall	G <sup>↓</sup> TCGAC	NEB3	37
SmaI	CCC <sup>↓</sup> GGG	NEB4	25
StuI	AGG <sup>↓</sup> CCT	NEB3/BSA	37

### 3.1.7 Vetores

A tabela 2 relaciona os vetores usados neste trabalho e uma breve descrição de cada um.

**Tabela 2.** Vetores utilizados neste trabalho.

<b>Vetor</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
pBluescript II SK+	Vetor para clonagem de produtos de PCR	Stratagene
pPCV	Vetor para clonagem de produtos de PCR	JANNER et al., 2013
pGZL	Vetor contendo o cassete <i>zeoIoxP</i>	REIS et al., 2013
pEGFP-N3	Vetor contendo o gene otimizado da proteína verde fluorescente <i>EGFP</i>	Clontech
pYRCre2	Vetor para expressão da recombinase CreA. Derivado do plasmídeo pYRCre	BETANCUR, 2014
pGAML	Vetor contendo o cassete <i>amdSloxP</i>	Este trabalho
pPIC-B	Vetor derivado do plasmídeo comercial pPIC9 (Invitrogen), no qual o sítio para BglII presente no início da região 5'AOX	Este trabalho
pAMDS	Vetor derivado do pPIC-B, contendo o cassete <i>amdSloxP</i>	Este trabalho
pAMDS-EGFP	Vetor contendo o cassete <i>amdSloxP</i> e o gene <i>EGFP</i>	Este trabalho
pADEAMDS	Derivado do pBluescript II SK+, contém o cassete <i>amdSloxP</i> flanqueado por sequências adjacentes ao gene <i>ADE2</i>	Este trabalho
pURAMDS	Derivado do pBluescript II SK+, contém o cassete <i>amdSloxP</i> flanqueado por sequências adjacentes ao gene <i>URA5</i>	Este trabalho

### 3.1.8 Oligonucleotídeos (*primers*)

A tabela 3 contém os oligonucleotídeos utilizados como *primers* neste trabalho. Os sítios de restrição presentes estão sublinhados.

**Tabela 3.** *Primers* usados neste trabalho.

<b>Primers</b>	<b>Sequência 5'-3'</b>	<b>Sítio de restrição</b>
KpAMS-F1	CTGATCGAATTATCAAATAACGT	
KpAMS-R1	TTCTTTG <u>GATCT</u> CTACCGAATG	BglII
KpAMS-F2	TTT <u>AGATCT</u> GTAAGTCCTTATCAACGCCCAT	BglII
KpAMS-R2	CTGAACTCTCTATACCGACATAT	
KpAMS-F3	T <u>GATCC</u> GGGAAGGTGATTCAATTTATGTG	BamHI
KpAMS-R3	T <u>GATCC</u> GGGTAATTGAAGATTCAGCACA	BamHI
KpAMS-F4	TTGGTCAATTGTTGTATTGAAATCT	
KpAMS-R4	ACAGAACCTTGACAGCCGATC	
Ade2up-F1	<u>GGTCT</u> GTAGAAGGTCTATGGA	SmaI (1/2)
Ade2up-R1	AG <u>AGATCT</u> IGTTTCTACGATTCTTGAAAAGGT	BglII
Ade2dw-F1	AG <u>AGATCT</u> GTTTCGGTAGAAATTTGTCTCCA	BglII
Ade2dw-R1	<u>GGGAC</u> GACGAGAAACATGACGAC	SmaI (1/2)
Ade2F1	TCGTTACGGTCTCTTCCAGCTT	
Ade2R1	GGGCACTGAAGACACAGCAAATTC	
URA5upF	T <u>CCCGGG</u> AGGATTGTTGGGTTACGCTATAT	SmaI
URA5upR	AG <u>AGATCT</u> AGCCAGCTCTGATAAAGAACCA	BglII
URA5dwF	AG <u>AGATCT</u> GCTCAGGTTCCCTTTCATAAAC	BglII
URA5dwR	T <u>CCCGGG</u> CTGAGAGCGCAGTCATCGGA	SmaI
URA5F	CGCTCTTTGCCTCTGCTGATGTTC	
URA5R	ATCTTGAGCCTGAGTGTCTTCA	
qAMS-F	CTGGACACACCGTCACACCTT	
qAMSR	GATGTTTGGAAATGGCAGGCTCTC	

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Cultivo de micro-organismos**

O cultivo de bactérias foi feito a 37 °C e o de leveduras, a 28 °C. No caso de crescimento em meio líquido, a agitação utilizada foi de 200 rpm.

### **3.2.2 Preparação de células bacterianas competentes**

*E. coli* XL10-Gold foi semeada em placa de meio LB ágar a partir de estoque armazenado a -80 °C e incubada a 37 °C por 16h. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio SOB em frasco Erlenmeyer de 125 mL e incubada a 37 °C por 16h, com agitação de 200 rpm. Um mililitro desse pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio SOB fresco, incubando a 37 °C até atingir uma OD<sub>600</sub> de 0,3.

Após atingir a OD<sub>600</sub> desejada, a cultura foi então resfriada por 15 min em banho de gelo e as células foram centrifugadas a 3000 x *g* por 5 min a 4 °C. O sedimento de células foi ressuspensionado em 32 mL de tampão de transformação I e incubado no gelo por mais 15 minutos. Foi feita uma nova centrifugação, nas mesmas condições, e as células foram ressuspensionadas em 4 mL de tampão de transformação II. O conteúdo foi dividido em alíquotas de 100 µL e armazenado a -80 °C.

### **3.2.3 Ligação de fragmentos de DNA**

Os sistemas de ligação foram feitos em volume total de 10 µL com uma proporção molar de vetor:inserto de 1:3 a 1:10. Quando foram ligados dois fragmentos de PCR, as molaridades eram iguais. As ligações usaram a enzima T4 DNA Ligase (USB) com o tampão fornecido com o fabricante, e a incubação foi feita a 16 °C (no caso de extremidades abruptas) ou a 4 °C (no caso de extremidades coesivas) por 16 horas.

### **3.2.4 Transformação bacteriana – choque térmico**

Uma alíquota de células competentes foi retirada do armazenamento a -80 °C e descongelada em gelo. Foram adicionados 10 µL do sistema de ligação às células e foi feita a incubação em gelo por 30 minutos. O choque térmico foi feito a 42 °C por 90 segundos, seguido de 2 minutos em gelo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB e o sistema foi incubado a 37 °C por 1 hora.

As células transformadas foram semeadas em meio LB ágar contendo antibiótico (100 µg/mL ampicilina ou 25 µg/mL zeocina). No caso da utilização de zeocina, a concentração de NaCl foi reduzida à metade (0,5% p/v) para evitar a inibição do efeito da droga pelo sal. Quando foram usados vetores de clonagem, o meio foi suplementado com X-gal na concentração final de 0,004% e IPTG na concentração final de 0,1 mM.

### **3.2.5 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)**

A extração de DNA plasmidial de *E. coli* foi feita de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK et al. (2001), com adaptações. Uma colônia isolada da placa de transformantes foi inoculada em 5 mL de meio LB com o antibiótico adequado e este inóculo foi inculado a 37 °C por 16 h sob agitação. As células de 3 mL de cultura foram coletadas por centrifugação a 10000 x *g* por 2 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 200 µL de solução I. Foram adicionados 360 µL de solução II (recém-preparada) para provocar a lise das células, e a amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 300 µL de solução III gelada e a mistura foi incubada por 5 minutos em gelo. A amostra foi centrifugada a 10000 x *g* por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, centrifugando novamente caso o sobrenadante não estivesse límpido. O sobrenadante foi adicionado a 750 µL de isopropanol, homogeneizado por inversão e centrifugado a 10000 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 200 µL de solução I.

Foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e a amostra foi homogeneizada em agitador do tipo vórtice. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10000 x *g* por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e precipitado através da adição de 750 µL de etanol 100% gelado. Seguiu-se uma

centrifugação a 10000 x *g* por 5 minutos, o descarte do sobrenadante e uma lavagem com 500 µL de etanol 70% gelado. Foi feita uma última centrifugação a 10000 x *g* por 2 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado foi então seco em um concentrador a vácuo. O precipitado foi então ressuspendido em 50 µL de água milliQ contendo RNase A (20 µg/mL) e incubado a 37 °C por 15 minutos. O DNA foi armazenado a -20 °C.

### **3.2.6 Preparação de DNA plasmidial em grande escala (midi e maxiprep)**

Para a extração de plasmídeos bacterianos em grande escala foi utilizado o kit Qiagen Plasmid Midi and Maxi (Qiagen) e as orientações do fabricante foram seguidas.

### **3.2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Todas as reações de PCR foram feitas com a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

### **3.2.8 Digestão de DNA com enzimas de restrição**

Todas as digestões de DNA foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante das enzimas. De acordo com a quantidade de DNA a ser digerido, a quantidade de enzima foi calculada, não ultrapassando um volume maior que 10% do volume total da reação. Todas as reações foram incubadas por 2 horas na temperatura adequada para cada enzima.

### **3.2.9 Defosforilação de DNA linearizado**

Quando foi feita a digestão de vetores com apenas uma enzima de restrição (linearização), foi também efetuada a defosforilação das extremidades do DNA para evitar a religação do plasmídeo. De acordo com as instruções do fabricante da enzima fosfatase alcalina (USB), a reação foi feita utilizando o tampão SAP Buffer 1X e 1 µL de enzima em um volume total de no máximo 20 µL. A reação foi incubada

a 37 °C por 30 minutos e em seguida a enzima foi inativada por incubação a 65 °C por 5 minutos.

### **3.2.10 Análise de DNA por eletroforese**

A análise de DNA por eletroforese foi feita de acordo com SAMBROOK et al. (2001), com adaptações. O gel foi feito utilizando tampão TAE 1X com uma concentração de 1% de agarose e 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a uma diferença de potencial para provocar a migração e separação dos fragmentos de DNA. Como o brometo de etídio foi utilizado como corante, a visualização foi feita com a exposição do gel à luz ultravioleta.

### **3.2.11 Purificação e eluição de fragmentos de DNA**

A purificação de DNA proveniente de reações de PCR, assim como de bandas provenientes de géis de agarose, foi feita com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

### **3.2.12 Precipitação de DNA**

Após a digestão do DNA com enzimas de restrição, para retirar sais e enzimas as amostras foram precipitadas adicionando acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol 100% gelado. Foi realizada uma incubação a -20 °C por 16 h, e então as amostras foram centrifugadas a 10000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado novamente a 10000 x *g* por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco em um concentrador a vácuo e ressuspendido em volume adequado de água milliQ.

### **3.2.13 Transformação de *P. pastoris* (vetores integrativos e cassetes de deleção)**

A transformação de *P. pastoris* com vetores integrativos e a integração de cassetes de deleção foi feita de acordo com o protocolo fornecido pelo kit EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen), com algumas modificações.

Um pré-inóculo de 10 mL foi feito a partir de uma colônia isolada de levedura em meio YPD. Após 24 horas de crescimento a 28 °C e 200 rpm, este pré-inóculo foi utilizado para inocular 100 mL de YPD em um frasco Erlenmeyer de 1000 mL. Este inóculo foi crescido nas mesmas condições até que a OD<sub>600</sub> atingisse um valor entre 1,3 e 1,5. As células foram então mantidas em gelo até o final do procedimento. Foi feita uma centrifugação do inóculo a 2000 x *g* por 5 minutos para coletar as células, seguida de duas lavagens com água destilada estéril refrigerada: a primeira com 100 mL e a segunda com 50 mL. Em seguida, foi feita uma lavagem com 4 mL de sorbitol 1M gelado estéril e uma última centrifugação nas mesmas condições. As células coletadas foram ressuspensas com 200 µL de sorbitol 1M e 80 µL destas células competentes foram misturadas a 10 µg de DNA linearizado. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 2mm e incubada em gelo por 5 minutos.

A eletroporação foi feita com o Gene-Pulser (Bio-Rad) com um pulso elétrico de 1500 V, 400 Ω e 25 µF. Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M gelado na cubeta e no caso de marca de seleção de resistência a antibiótico, as células foram incubadas a 30 °C sem agitação durante 2 horas antes de serem semeadas em meio seletivo. Quando foi utilizada a marca acetamidase, as células foram semeadas imediatamente após a eletroporação.

### **3.2.14 Transformação de *P. pastoris* (vetores replicativos)**

A transformação da levedura com vetor autorreplicativo foi feita de acordo com o protocolo fornecido pelo vetor pPICHOLI (MoBiTec). O pré-inóculo de 10 mL foi feito da mesma maneira que na transformação de plasmídeos integrativos. Este pré-inóculo foi utilizado para inocular 500 mL de meio YPD, incubado a 28 °C e 200 rpm até que a OD<sub>600</sub> atingisse 1,3-1,5. Os 500 mL de cultura foram coletados por centrifugação a 2000 *g* por 10 minutos a 4 °C e as células foram ressuspensas em

100 mL de YPD com 20 mL de tampão HEPES 1M (pH 8,0) e 2,5 mL de DTT 1 M, incubando a 28 °C por 15 minutos sem agitação. Em seguida foi adicionada água gelada estéril até um volume final de 500 mL. Foi feita uma centrifugação a 2000 x g por 10 minutos, as células foram lavadas com 250 mL de água e centrifugadas novamente. Foi feita uma lavagem com 20 mL de sorbitol 1 M gelado e ao final o precipitado foi ressuspenso em 500 µL de sorbitol 1M gelado. Um volume de 40 µL de células competentes foi misturado com 100 ng de DNA e transferido para uma cubeta de eletroporação de 2 mm.

O pulso foi feito seguindo os parâmetros: 1500 V, 400 Ω, 25 µF. Imediatamente foi adicionado 1 mL de sorbitol gelado à cubeta e a mistura foi transferida para um tubo de 1,5 mL que foi incubado a 28 °C por 30 min. As células foram então semeadas em meio seletivo.

### **3.2.15 Curva de crescimento em meio líquido**

Primeiramente foram feitos pré-inóculos em 500 µL de meio YPD líquido em placa *deep-well*, crescidos por 24 h a 200 rpm e 28 °C. A análise de crescimento de levedura foi então realizada com o espectrofotômetro Eon High Performance Microplate Spectrophotometer (Biotek) em placas de 96 poços, utilizando 200 µL de meio MD-Ac ou MD e incubando a 30 °C sob uma agitação de 300 rpm por 72h, coletando dados de OD<sub>600</sub> a cada 30 minutos.

### **3.2.16 Extração de DNA total de levedura**

A extração de DNA total de *P. pastoris* foi feita utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com as orientações do fabricante.

### **3.2.17 Extração de RNA de levedura**

A extração de RNA foi feita com o kit SV Total RNA isolation (Promega), de acordo com as orientações do fabricante.

### 3.2.18 RT-PCR do RNA de levedura

A reação de RT-PCR para produção de cDNA de *P. pastoris* foi feita utilizando o kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Promega) para síntese da primeira fita de cDNA seguido de uma reação de PCR convencional utilizando a Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific).

### 3.2.19 Análise de fluorescência no Typhoon scanner

A expressão de *EGFP* foi detectada rapidamente utilizando a análise de fluorescência dos clones em meio sólido. Placas contendo os clones assim como controles negativos foram analisados em Typhoon Scanner (GE) de acordo com os seguintes parâmetros: filtro de emissão: 526 fluoresceína, Cy2, AlexaFluor 488; PMT: 600; Laser: verde (532); sensibilidade: normal; tamanho do pixel: 200 µm; painel focal: +3 mm.

### 3.2.20 Análises de bioinformática

As análises de bioinformática do genoma de *P. pastoris* foram feitas inicialmente utilizando o software BLASTp ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)), usando como sequência *query* a enzima acetamidase de *A. nidulans* (Gene ID: 2868318). O software comparou e alinhou sequências de proteínas anotadas de *P. pastoris* com a sequência da enzima conhecida.

Depois de obtida a sequência da proteína putativa para amidase de *P. pastoris*, foi feito um alinhamento comparando-a à enzima acetamidase de *A. nidulans* no software ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2)).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 TESTE DE CRESCIMENTO EM ACETAMIDA

Primeiramente, foi feita uma análise do crescimento de *P. pastoris* em meio líquido MD-Ac, que contém acetamida como única fonte de nitrogênio. Para que o gene *amdS* pudesse ser usado como marca de seleção, a linhagem de *P. pastoris* X-33 não deveria ser naturalmente capaz de crescer neste meio. Para tanto, foram feitas curvas de crescimento da linhagem X-33 em meio mínimo contendo como fontes de nitrogênio sulfato de amônio (meio MD) ou acetamida (meio MD-Ac) para comparação do comportamento da levedura nos dois meios de cultura. As curvas de crescimento com a medição da densidade celular ( $OD_{600}$ ) a cada 30 minutos foram feitas por 72 horas. O resultado é mostrado na figura 6.

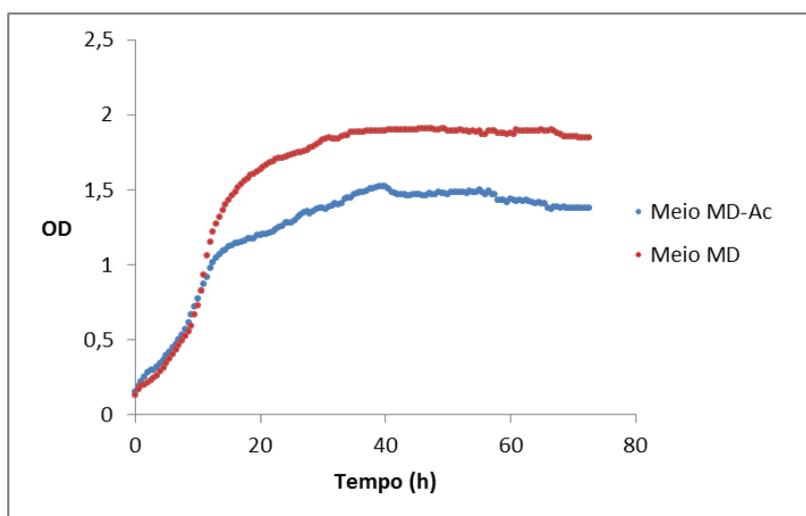


Figura 6. Curvas de crescimento da linhagem X-33 em meio MD e meio MD-Ac.

Pode-se observar que a linhagem X-33 apresentou crescimento em meio com acetamida como fonte de nitrogênio e atingiu valores de  $OD_{600}$  acima de 1, o que indica um crescimento mais lento que no meio mínimo com sulfato de amônio mas ainda significativo. Todavia, esse fenótipo poderia interferir na seleção de clones transformantes que contivessem o gene da acetamidase.

Após esta análise, foi feita uma busca no genoma da linhagem X-33 para genes potencialmente codificadores de amidase. Caso *P. pastoris* X-33 possuísse

uma enzima capaz de hidrolisar a acetamida em acetato e amônia, o crescimento em acetamida observado na figura 6 poderia ser justificado.

## 4.2 ANÁLISE DO GENOMA DE *P. pastoris*

De posse da sequência da enzima acetamidase de *A. nidulans*, disponível no GenBank (Gene ID: 2868318), foi feita uma comparação com as ORFs anotadas no genoma de *P. pastoris*. Utilizando o software BLASTp, que alinha sequências de aminoácidos, foi encontrada uma amidase putativa dentre as proteínas anotadas de *P. pastoris* com uma cobertura de 98%, 43% de identidade e um e-value de  $3^{-146}$ . No alinhamento utilizando o software ClustalW2, foi obtido um score de 42,88. Na figura 7, é mostrado o alinhamento das sequências de proteínas utilizando o software ClustalW2.

```

putativeamidase      MPTCIETTANWESISEQKRNNDIISAIPEDWILKNI PSSEKEPNAKLYLDKVLPEAEQSI 60
amdS                  MF-----QSWEELAADKRARLAKTIPDENKVTLP AEDSVDFPK-KSGILSEAE LKI 52
**                   .**.:. : ** : .:***: * :.:*:.: . : . :*.*** .*

putativeamidase      TSLDTIELRDKIANGELSSYEVCFAFCHRAALAHQIVNCCIEIFFDKALERAKELDEILK 120
amdS                  TEASAADLVS KLAAGELTSEVETLAFCKRAAIAQQLTNC AHEFFPDAALAQARELDEYYA 112
*. .: :* .:* * **:* * ** :***:***:***:***. *:* * ** :*:****

putativeamidase      ATGKFPVGRHLHGVPISLKDQVNLEGFDS IGYAALVGVKPKRADDVSL LAKILYNEGAVFYV 180
amdS                  KHKRPVGPLHGLPISLKDQLRVKGYETS MGYISWLNKYDEGD--SVLTTMLRKAGAVFYV 170
:*** **:****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***

putativeamidase      KTAVPTAMMCVETYSNINGYTTNSNRRNLSSGGSSGGEGSLIGCQGSV LGI GTDIGGSIR 240
amdS                  KTSVPQTLMVCETVNNIIGRTVNPKNWSCGGSSGGEGAIVGIRGGVI VGTDIGGSIR 230
**:* ::* ** * ** * * .:***: * .*****:***: *:*:***:*****

putativeamidase      IPSALNGIYGLRPSHGRIPLYMKVFN SYLGOEVMPSVIGPMSVSLKGLK LFTQVVLDSKFP 300
amdS                  VPAAFNLYGLRPSHGRLPYAKMANSE GOETVHVSVVGPIHHSVEDLRLFTKSVLGOEFP 290
:*.:* :*****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***

putativeamidase      LWDPKSMPIPW---YDQITDQYSNKKL CFGVWKNKLVMPHPVLR AVECVAALKKAG 357
amdS                  KYDSKVIEMPWRQESDIIASKIKNGGLNIGYYNFDGNVLPHPPI LRGVETVAALAKAG 350
:*. * :*:*** * *:.: * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

putativeamidase      HQVVEWDFPCRKSLVDIGLEVL SADR YKEIEENCAKTGELF EALRNL CVDSGSKQPIEV 417
amdS                  HTVTPWTPYKHDFGHDLI SHIYAADGSADV MRDISASGEPAIPNI KDLLNPN--IKAVNM 408
* * . * * .: * * :. : ** :. : ** :. : ** :. : ** :. : ** :. : ** :. : **

putativeamidase      NAWWDISERKYALQQT YSEYWNNTVNSTGTGRPV DGIAPWCSA SYENDNSYKTPFNYT 477
amdS                  NELWDTHLQWNYQMEYLEK WREAEKAG--KELDAIIA PITPTAAVRHDQFR--YYGYA 464
* ** :*: * * * * :. : * :. : * :. : * :. : * :. : * :. : * :. : * :. : *

putativeamidase      VPFNVLDFFSVVVPVLRSDKSIDL KDES YVPVDEIDNTVQEY YDAEKFDNMPVSVQVVG R 537
amdS                  SVINLLDFTS VVVPVT FADKNI DKKNES FKA VSELDALVQ EYDPEAYHGAPVAVQVIG R 524
:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***

putativeamidase      RWEDEKALFMAEVLSESL S--SNP- 559
amdS                  RLSEERTLAI AEEVGKLLGNVVT E- 548
* .:***: * ** :. : * . *

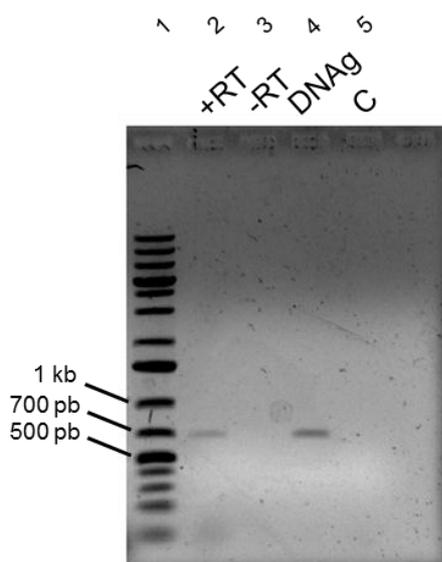
```

Figura 7. Alinhamento de sequências proteicas da amidase putativa (putativeamidase) encontrada em *P. pastoris* e da acetamidase de *A. nidulans* (amdS). Alinhamento obtido pelo

software ClustalW2, resíduos de aminoácidos idênticos estão destacados e indicados por um asterisco. Dois pontos (:) identificam resíduos de propriedades muito similares, enquanto os pontos (.) indicam resíduos pouco semelhantes.

Obtida a sequência da proteína da amidase putativa, a sequência de DNA correspondente à ORF PAS\_chr3\_0283 foi então obtida através do número de acesso XP\_002492502.1 no banco de dados GenBank.

Em seguida, foi feita uma reação de RT-PCR a partir do mRNA de *P. pastoris* para verificar se esta ORF era expressa na linhagem X-33. Primeiramente, foi feita a extração do RNA total de *P. pastoris* X-33. Em seguida foi obtido o cDNA através do kit SuperScript III First-Strand Synthesis System utilizando como *primer* 3' um oligonucleotídeo rico em timina para amplificar sequências de mRNA que possuam cauda poli-A. A partir deste material, foi feita uma PCR convencional utilizando os *primers* KpAMS-F4 e KpAMS-R4 que amplificariam a região de 700 pb da ORF no cDNA. Como controles, foi feita uma PCR usando como molde o RNA de *P. pastoris* sem tratamento com transcriptase reversa (controle negativo) e o DNA genômico da linhagem X-33 (controle positivo). O resultado é apresentado na figura 8.



**Figura 8. Análise da expressão da ORF PAS\_chr3\_0283.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1: Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; 2: cDNA; 3: RNA; 4: DNA genômico; 5: controle negativo da PCR.

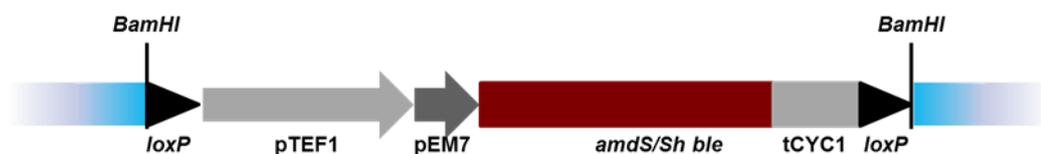
O experimento de RT-PCR resultou em uma banda de aproximadamente 700 pb (figura 7, poço 2), o que é compatível com o tamanho esperado caso a ORF

PAS\_chr3\_0283 fosse transcrita. A reação utilizando RNA como molde para a PCR não produziu resultado (figura 8, poço 3), o que demonstra que a reação de RT-PCR não estava contaminada com DNA genômico (figura 8, poço 4).

A evidência de que a ORF PAS\_chr3\_0283 é expressa sugere que *P. pastoris* pode ser capaz de metabolizar acetamida, o que impediria o uso do gene heterólogo *amdS* como marca de seleção neste organismo. Foi preciso, então, construir uma linhagem com a ORF em questão deletada.

### 4.3 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE DELEÇÃO PARA A ORF PAS\_CHR3\_0283

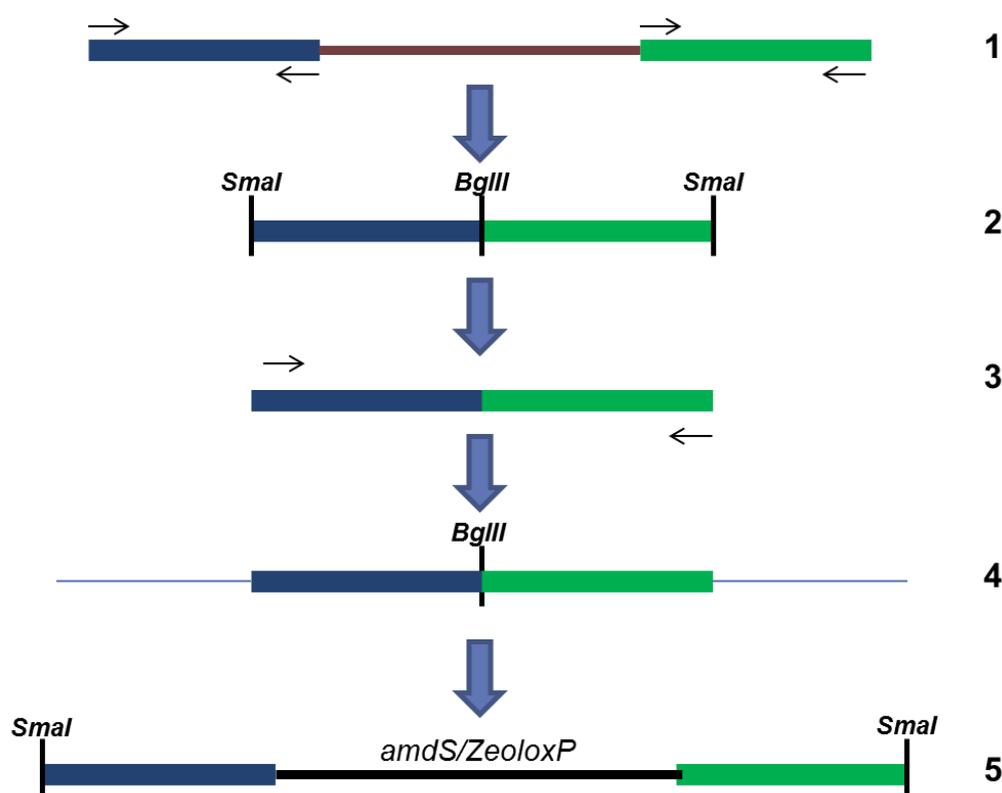
Todos os cassetes de deleção utilizados neste trabalho foram construídos utilizando a mesma estratégia geral. Os cassetes possuem, além do gene de resistência em questão, o promotor sintético EM7 para a expressão da marca de seleção em *E. coli*, o promotor *TEF1* e terminador *CYC1* para a expressão em *P. pastoris*, e sequências *loxP* para promover a excisão do cassete após a deleção. Além disso, os cassetes também possuem sequências homólogas às regiões *upstream* e *downstream* da sequência a ser deletada (figura 9).



**Figura 9. Representação dos cassetes de seleção utilizados neste trabalho.** As marcas de seleção *amdS* ou *Sh ble* foram clonadas entre os promotores pEM7, pTEF1 e o terminador *CYC1* sendo flanqueadas por sequências *loxP*. As sequências homólogas para recombinação com o genoma da levedura localizam-se nas extremidades 5' e 3' dos cassetes.

As etapas para a construção dos cassetes estão descritas na figura 10. Primeiramente, foram feitas PCRs para a amplificação de regiões nas porções 5' *upstream* e 3' *downstream* do *locus*-alvo para permitir a recombinação dos cassetes com as sequências homólogas no genoma. Em seguida, os dois amplicons obtidos foram digeridos em uma de suas extremidades com a mesma enzima de restrição, seguindo-se uma reação de ligação e uma nova PCR com um par de *primers* que permitisse a obtenção de um fragmento contendo a sequência *upstream*

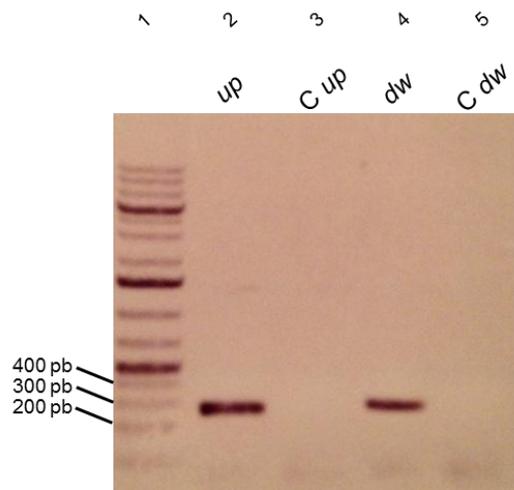
e a sequência *downstream*. Este fragmento foi então clonado e entre as duas sequências fusionadas foi clonado o cassete contendo a marca de seleção.



**Figura 10. Etapas da construção de cassete de deleção contendo sequências homólogas para recombinação. (1)** PCR de sequências *upstream* (*up*) e *downstream* (*dw*) da região do genoma a ser deletada. **(2)** Digestão dos fragmentos amplificados e ligação orientada pela digestão; **(3)** PCR do sistema de ligação dos fragmentos *up* e *dw*. **(4)** Clonagem do fragmento *updw* amplificado. **(5)** Clonagem da marca de seleção entre as sequências de homologia.

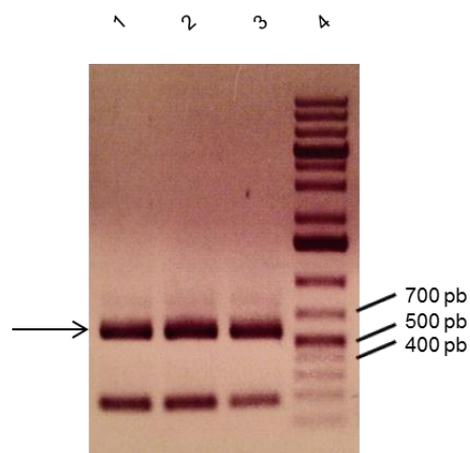
Para efetuar a deleção da ORF PAS\_chr3\_0283, foi construído um cassete de deleção utilizando a marca de seleção *Sh ble* obtida a partir do plasmídeo pGZL. Este vetor é derivado do plasmídeo comercial pGEM®-T (Promega) e contém o gene *Sh ble* com sequências reguladoras e sítios *loxP*.

Para a adição de sequências homólogas ao genoma da levedura, foram feitas reações de PCR que permitiram a amplificação de fragmentos de 270 pb (*upstream*) e 280 pb (*downstream*), que flanqueiam a ORF. Para as PCRs foram utilizados os *primers* KpAMS-F1 e KpAMS-R1, que produziram o fragmento de 270 pb (figura 11, poço 2) assim como o par KpAMS-F2 e KpAMS-R2, que amplificaram o fragmento de 280 pb (figura 11, poço 4). A figura 11 apresenta o resultado destas reações de amplificação.



**Figura 11. Amplificação de fragmentos *upstream* (*up*) e *downstream* (*dw*) que flanqueiam a região da ORF PAS\_chr3\_0283.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **1:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; **2:** PCR com *primers* KpAMS-F1 e KpAMS-R1 (*upstream*); **4:** PCR com *primers* KpAMS-F2 e KpAMS-R2 (*downstream*); **3 e 5:** controles negativos da PCR.

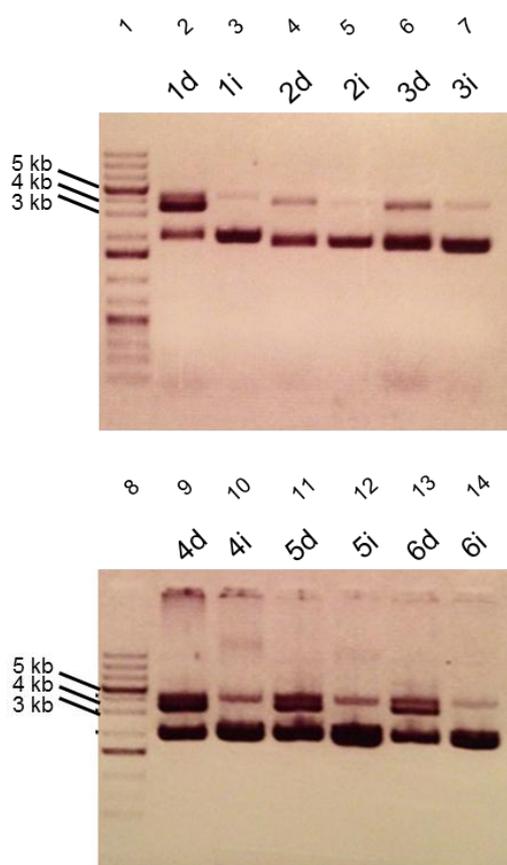
Após a amplificação de cada fragmento, estes foram incubados com a enzima de restrição BglII, que digere na extremidade em que os *primers* KpAMS-R1 e KpAMS-F2 adicionaram o sítio de restrição, assim orientando os fragmentos no evento de ligação que se seguiu. Os fragmentos foram ligados e a reação de ligação foi utilizada como molde para uma próxima etapa de amplificação, utilizando os *primers* KpAMS-F1 e KpAMS-R2 para amplificar os fragmentos unidos pela ligação. Foram feitas 3 reações para obter maior quantidade de material (figura 12, poços 1 a 3). O resultado desta amplificação é mostrado na figura 12.



**Figura 12. Amplificação por PCR do sistema de ligação dos fragmentos *up* e *dw*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **1 a 3:** Amplicons obtidos com os *primers*

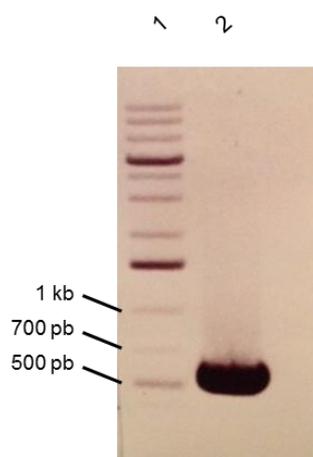
KpAMS-F1 e KpAMS-R2 onde a banda desejada de ~550 pb é mostrada com uma seta. **4:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus.

Como a reação de PCR gerou produtos inespecíficos, a banda de aproximadamente 550 pb correspondente ao produto da ligação dos fragmentos *up* e *dw* foi eluída e purificada para posterior clonagem no plasmídeo pPCV linearizado com a enzima EcoRV. Foi feita a extração de DNA plasmidial de 6 clones transformantes. O DNA obtido na extração foi digerido com a enzima BglII, cujo sítio de restrição encontra-se apenas no inserto. Assim, se o inserto fosse clonado com sucesso, o plasmídeo seria linearizado apresentando um tamanho de aproximadamente 3,5 kb após a digestão. Como observado na figura 13, a digestão dos plasmídeos foi parcial. Todavia, é possível ver que a digestão dos clones 1, 4, 5 e 6 produziu uma banda consistente com a linearização do vetor.



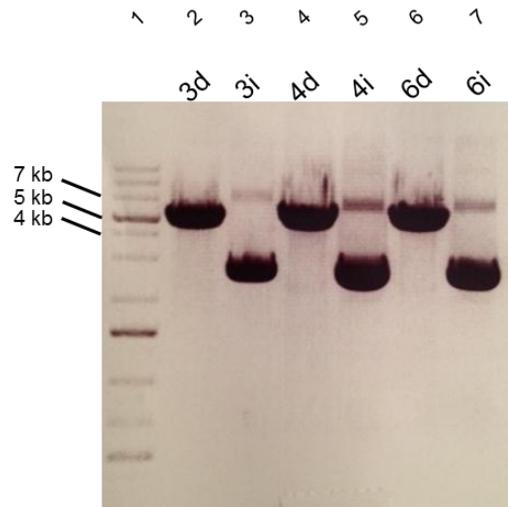
**Figura 13. Clonagem dos fragmentos *up* e *dw* no vetor pPCV.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio apresentando o DNA plasmidial intacto (i) e digerido com BglII (d) de 6 clones transformantes. **2-7:** clones 1 a 3; **9-14:** clones 4 a 6; **1 e 8:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus.

Para confirmar a clonagem, foi feita uma PCR com os *primers* KpAMS-F1 e KpAMS-R2 utilizando como template o DNA plasmídial extraído do clone 5. O resultado é mostrado na figura 14. O fragmento obtido, de aproximadamente 500 pb, confirma a clonagem do inserto.



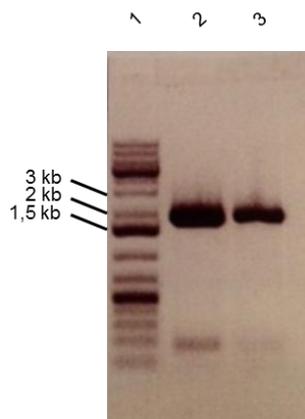
**Figura 14. Amplificação por PCR do fragmento clonado no vetor pPCV utilizando os primers KpAMS-F1 e KpAMS-R2.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1: Marcador Gene Ruler 1 kb Plus. 2: PCR do clone 5 com os *primers* KpAMS-F1 e KpAMS-R2.

A etapa que se seguiu após a clonagem das sequências *up* e *dw* foi a inserção da marca de seleção entre as duas sequências para a construção do cassete de deleção. O plasmídeo pGZL foi digerido com BamHI para a liberação do cassete *zeoIoxP* e o fragmento de 1,4 kb foi purificado. Este foi então ligado ao vetor obtido (clone 5) linearizado com BglII. Após a transformação em *E. coli* XL10-Gold, as células foram semeadas em meio LB ágar com ampicilina. Foram selecionados 8 clones para a extração de DNA plasmídial. Estes foram crescidos em meio LB com zeocina para testar a presença do inserto com a marca de seleção, e apenas 3 cresceram – clones 3, 4 e 6. O DNA plasmídial destes três clones foi digerido com NcoI, uma enzima que cliva apenas no inserto, portanto, caso o mesmo estivesse presente o vetor seria linearizado gerando uma banda de ~4,9 kb (figura 15).



**Figura 15. Clonagem do cassete zeoloxP entre as sequências homólogas *up* e *dw*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **1:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; **2-7:** DNA plasmidial dos clones 3, 4 e 6 digerido com NcoI (d) e intacto (i).

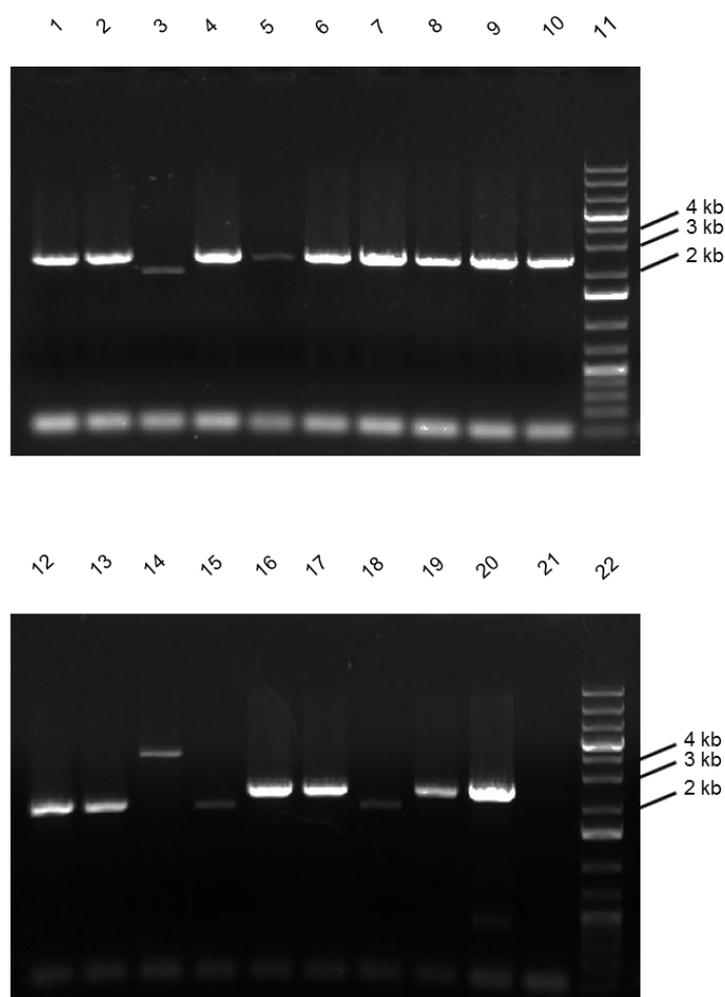
Pode-se observar que os três clones continham a sequência de interesse, pois o vetor foi linearizado apresentando um tamanho esperado de 4,9 kb. Uma vez escolhido o clone a ser utilizado (clone 4), foram feitas 6 reações de PCR com os *primers* KpAMS-F1 e KpAMS-R2 para amplificar o cassete de deleção de 1,8 kb contendo a marca de seleção e as sequências homólogas para a recombinação. Foram analisadas 2 reações em gel de agarose (Figura 16, poços 2 e 3). Estas PCRs foram feitas para se obter material suficiente para a transformação de *P. pastoris*. As reações foram concentradas e precipitadas para então serem utilizadas na transformação de *P. pastoris* X-33 por eletroporação.



**Figura 16. PCR do cassete de deleção ORF1 utilizando os *primers* KpAMS-F1 e KpAMS-R2.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **1:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; **2 e 3:** PCR com *primers* KpAMS-F1 e KpAMS-R2 apresentando a banda de ~1,8 kb correspondente ao cassete de deleção.

#### 4.4 DELEÇÃO DA ORF PAS\_CHR3\_0283

Uma vez obtido o cassete de deleção com a marca *Sh ble*, foi efetuada a transformação de *P. pastoris* X-33, sendo que as células foram semeadas em meio contendo zeocina. Após 3 dias de incubação, 50 clones foram isolados em placas com meio YPD ágar. Um total de 17 clones foi analisado por PCR de colônia utilizando os *primers* de confirmação KpAMS-F3 e KpAMS-R3, que se anelam em sequências externas à região deletada. O DNA da levedura nativa forneceria um fragmento amplificado de 2,5 kb enquanto a levedura com uma deleção na ORF PAS\_chr3\_0283 forneceria um fragmento de 2,1 kb. O resultado está mostrado na figura 17.



**Figura 17. PCR de colônia de clones obtidos na transformação com o cassete de deleção ORF PAS\_chr3\_0283.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **1-10:** Clones 1 a 10; **12-18:** clones 11 a 17; **19:** PCR de colônia da linhagem X-33, **20:** PCR DNA genômico de X-33; **21:** controle negativo da PCR. **11 e 22:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus.

Pode-se observar que os clones 3, 11, 12, 14 e 17 forneceram o resultado esperado consistente com a deleção da ORF PAS\_chr3\_0283 deletada (poços 3, 12, 13, 15 e 18, figura 17). O clone 3 foi então estocado e a linhagem resultante foi denominada LA1.

#### **4.5 SÍNTESE DO GENE *amdS***

Após a criação da linhagem LA1, seguiu-se a obtenção do gene *amdS* para teste como marca de seleção. Como o gene *amdS* de *A. nidulans* apresenta 3 íntrons, decidimos pela síntese química do mesmo sem estas regiões. A sequência sintética foi baseada na sequência disponível no GenBank, sendo que o gene foi sintetizado pela empresa Epoch Life Science (Texas, EUA) com códons otimizados para expressão dupla em *P. pastoris* e *A. nidulans*. Sítios de restrição dentro da região codante do gene foram removidos e apenas sítios das enzimas NcoI e StuI foram mantidos para permitir a futura clonagem do gene. A adição do sítio de NcoI na posição +1 do gene implicou na mutação do segundo resíduo de aminoácido de prolina para alanina. O gene foi fornecido pela empresa clonado no vetor pBluescript II SK+ e a sequência final da região sintetizada encontra-se na figura 18.

GGTACCGTTAACAGAAGATGATATTGAAGGAGCATTGTTGGGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAACAC  
ATCAATGCTATTTGGTTTAGTCGTCCAGGCGGATCACAAAATTTGTGTCGTTTGACAAGATGGTTCATT  
TAGGCAACTGGTCAGATCAGCCACTTGTAAGCAGTAGCGGCGGCGCTCGAAGTGTGACTCTTATTAGCA  
GACAGGAACGAGGACATTATTATCATCTGCTGCTTGGTGCACGATAAATTGTGCGTTTGTCAAGCAAGGT  
AAGTGAACGACCCGGTCATACCTTCTTAAGTTTCGCCCTTCCCTCCCTTTATTTTCAGATTCAATCTGACTTA  
CCTATTCTACCGAAGCATCCCATGGCACAGTCCTGGGAAGAGTTGGCCGCTGATAAGCGTGCACGTTTG  
GCTAAGACCATTCCAGATGAGTGGAAAGGTTCAAACCTCTGCCTGCTGAAGATTCTGTTCATCGACTTCCCAA  
AGAAATCTGGTATTTTGTCCGAAGCAGAATTGAAGATTACCGAGGCTTCCGCAGCCGACCTGGTTTCTAA  
ACTTGGCCGCTGGAGAGCTGACTTCTGTGCAAGTTACTTTGGCTTTCTGTAAACGTGCTGCAATTGCTCAG  
CAACTTACTAAGTGTGCTCACGAGTTCTTCCAGACGCTGCATTGGCTCAGGCTCGTGAACCTTGACGAAT  
ATTACGCTAAACACAAACGTCCAGTCCGACCATTGCACGGATTGCCAATTTCTTTGAAGGATCAATTGCG  
TGTCAAGGGTTATGAAACTTCTATGGGTTACATTTCTTTGGCTTAACAAGTACGACGAAGGAGATTCTGTT  
CTGACAACCATGTTGCGTAAGGCAGGTGCCGCTTTTATGTGAAGACTTCTGTCCCTCAAACCCTGATGG  
TTTGGCAAACCGTTAACAACATTATCGGTGCTACCGTCAATCCTCGTAACAAGAACTGGTCTTGGCGGAGG  
TTCTTCCGGTGGAGAGGGTGCCATCGTCCGTATTCTGTTGGTGGTGTGATCGGAGTGGGTACAGATATTGGA  
GGATCTATCCGTGTTCCAGCAGCATTCAATTTTCTTTACGGATTGCGTCCATCCCACGGTCCGTTTGCCAT  
ACGCTAAAATGGCAAATTCTATGGAGGGACAAGAACTGTCCATTCCGTGGTTGGACCTATCACTCACTC  
TGTTGAAGATTTGCGTTTGTTTACCAAATCCGTTCTGGGTGAGGAACCTTGAAAATACGACTCTAAAGTT  
ATCCCTATGCCTTGGCGTCAGTCCGAGTCCGACATCATCGCATCCAAAATTAAGAACGGTGGTTTGAATA  
TTGGATACTACAATTTTGTATGGAAATGTTTTGCCTCACCCACCAATTTCTGCGTGGTGTGCAAACTACCGT  
CGCCGCTTGGCAAAGGCTGGACACACCGTCCACCTTGGACTCCTTACAAGCATGATTTTGGTCCAGAC  
CTGATTTCCACATCTACGCCGCCGACGGTTCCGCAGATGTTATGCGTGACATTTCCGCATCTGGAGAGC  
CTGCCATTCAAACATCAAAGACTTGTGTAATCCTAATATTAAGGCTGTGAATATGAACGAGTTGTGGGA  
TACACATCTTCAGAAGTGAATTACCAAATGGAGTACTTGGAGAAGTGGCGTGAAGCTGAAGAGAAGGCT  
GGAAAGGAACCTTGACGCCATCATCGCCCTATTACTCCAACCTGCCGCTGTTGTCATGATCAATTCCGTT  
ACTACGGTTACGCTTCCGTTATCAACTTGTGGATTTACATCCGTTGTTGTCCCTGTGACATTCGCTGA  
TAAGAACATTGACAAGAAGAATGAATCTTTCAAGGCCGTCTCCGAACTGGACGCTTTGGTGCAGAAGAG  
TACGATCCTGAAGCCTACCACGGTGTCCAGTCCGCTGTCCAAGTCATCGGTGCTGCTTTGTCCGAAGAGC  
GTACCTTGGCCATTGCTGAAGAAGTTGGTAAACTGTTGGGTAATGTCGTGACTCCATAGCACGTCGGACG  
GCGGCCACGGGTCCAGGCCTAGATCTCTCGAG

**Figura 18. Sequência sintetizada contendo o gene *amdS* de *A. nidulans*.** A sequência em azul representa a região codante do gene sintético *amdS*, em preto o promotor *trpC* de *A. nidulans* e em verde o terminador *CYC1* de *S. cerevisiae*. Sítios de restrição utilizados estão sublinhados; o sítio para *NcoI* faz parte do códon de iniciação enquanto o sítio para *StuI* está na região terminadora da transcrição.

Os sítios de restrição *NcoI* e *StuI* foram utilizados para clonar o gene dentro do cassete *zeoIoxP* no vetor pGAML substituindo o gene *Sh ble*.

#### 4.6 CONSTRUÇÃO DO VETOR pAMDS-EGFP

Para testar a eficiência da marca *amdS* em *P. pastoris*, foi construído o vetor de expressão pAMDS-EGFP contendo o gene *amdS* de *A. nidulans* e o gene repórter *EGFP*, que foi usado para monitorar a eficiência da integração. A construção foi feita a partir do plasmídeo pPIC-B construído em nosso laboratório.

Trata-se do plasmídeo pPIC9 (Invitrogen) com apenas um sítio de *Bgl*III, ao contrário do plasmídeo comercial que possui 2 sítios para essa enzima. As etapas da construção do vetor estão mostradas esquematicamente na figura 19.

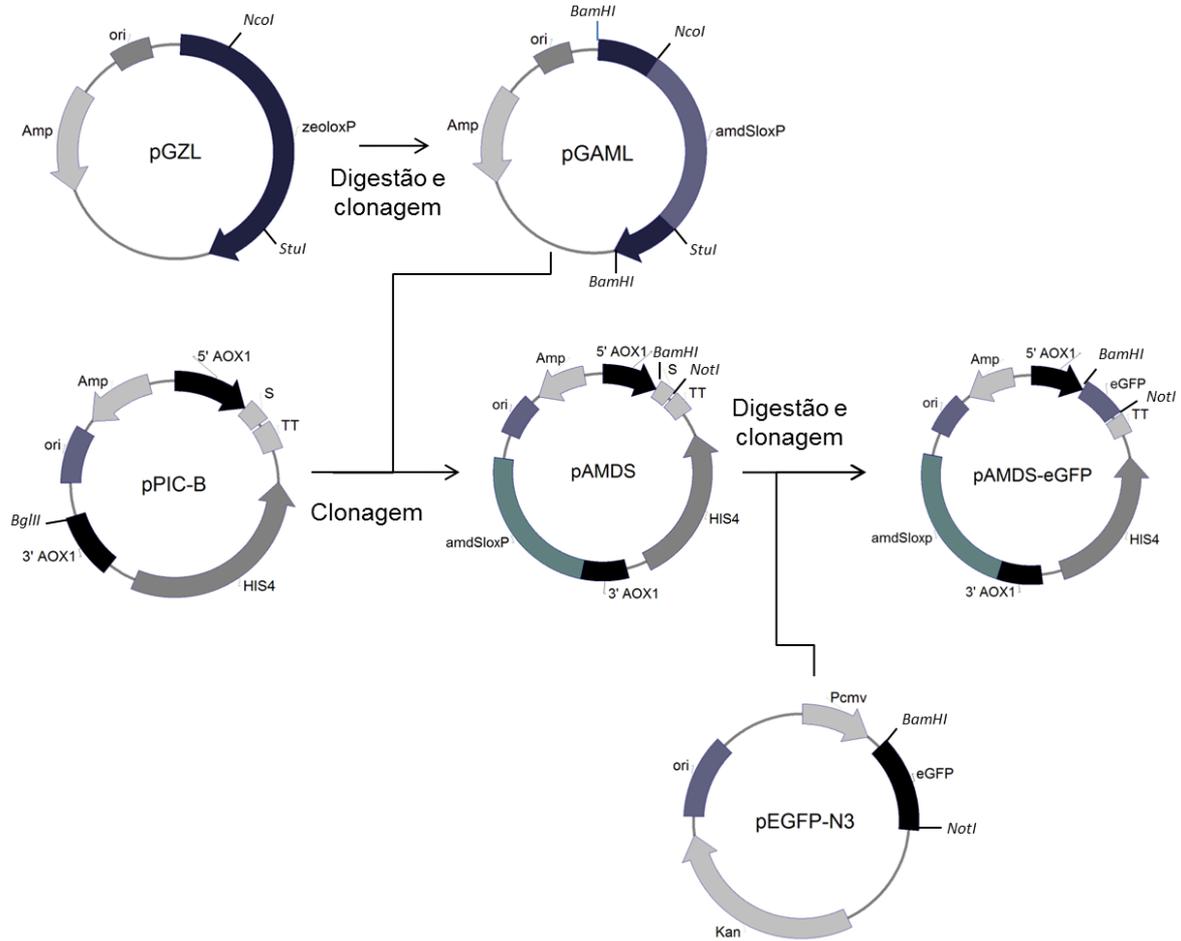
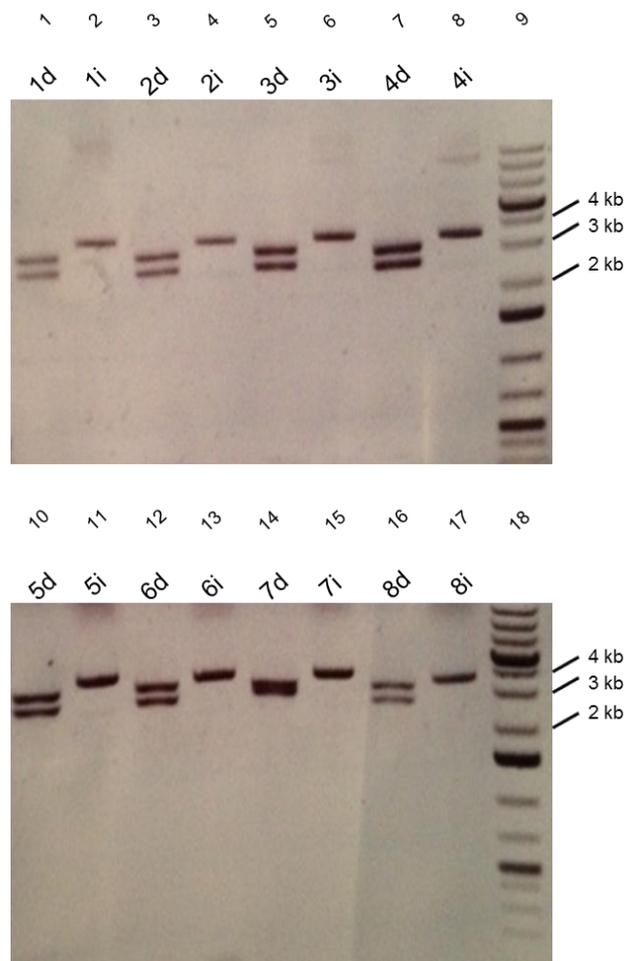


Figura 19. Etapas da construção do plasmídeo pAMDS-EGFP.

Primeiramente, o cassete *zeoloxP* do plasmídeo pGZL foi excisado pela digestão com *Bam*HI, sendo então clonado no plasmídeo pBluescript II SK+. Isso foi feito para facilitar etapas futuras de clonagem evitando sítios de restrição que existem no plasmídeo pGZL. Em seguida, o vetor resultante foi transformado em células *E. coli* JM110 (*dcm*) pois a enzima *Stu*I é sensível à metilação *dcm*. Finalmente, o gene *Sh ble* foi retirado do cassete de seleção pela digestão com as enzimas *Stu*I e *Nco*I.

O gene sintético *amdS* foi isolado de seu plasmídeo de origem por digestão com as enzimas *Stu*I e *Nco*I e clonado no plasmídeo do qual foi retirado o gene *Sh ble*, dando origem ao vetor pGAML. Dessa forma, foi obtido o cassete flanqueado

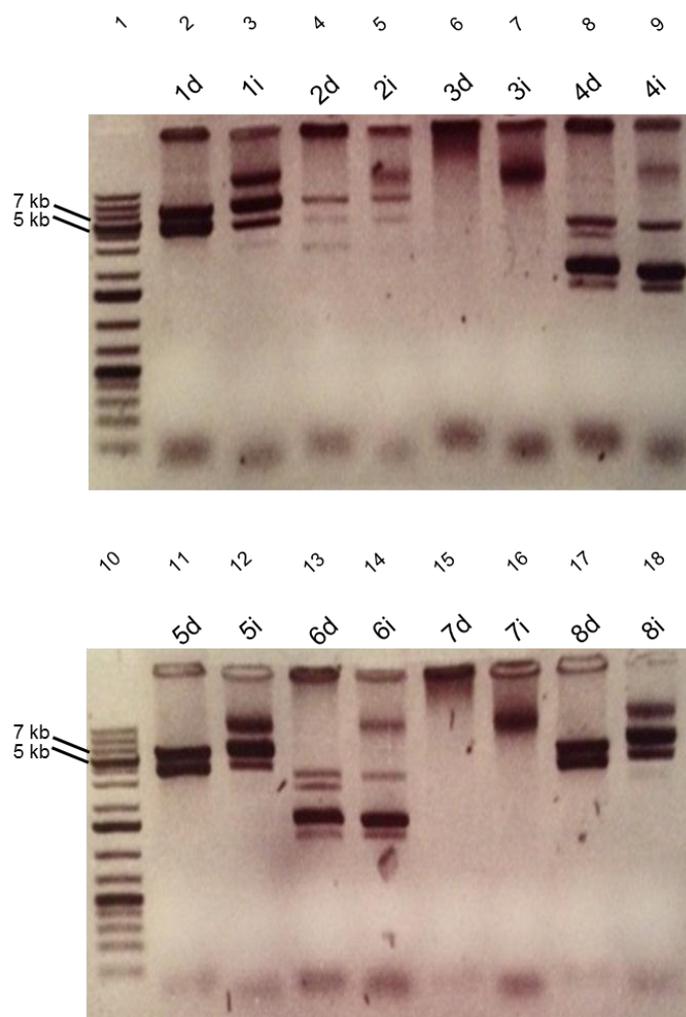
por sequências *loxP* e composto pelo gene *amdS*, os promotores *TEF1* e EM7 e o terminador *CYC1*. Para confirmar a clonagem do gene *amdS* entre as sequências reguladoras, foram escolhidos oito clones para extração de DNA plasmidial e foi feita a digestão dos mesmos com BamHI, enzima que liberaria fragmentos de 3 kb e 2,7 kb caso o inserto estivesse presente, e 3 kb e 1 kb, caso contrário. Como pode ser visto na figura 20, todos os clones escolhidos possuíam o inserto, portanto foi escolhido o clone 5 para prosseguir na construção do vetor de levedura.



**Figura 20. Clonagem do gene *amdS* no vetor com as sequências *loxP*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. DNA plasmidial dos clones 1 a 8, digerido com BamHI (d) e intacto (i). **1-8:** clones 1 a 4; **10-17:** clones 5 a 8; **9 e 18:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus.

Uma vez construído o cassete *amdSloxP*, o próximo passo foi transferi-lo para o vetor de expressão de *P. pastoris* pPIC-B. O vetor pPIC-B foi linearizado com a enzima BglIII, enquanto o vetor pGAML foi digerido com BamHI, liberando o cassete de seleção *amdSloxP*. Após ligação do fragmento ao vetor linearizado e

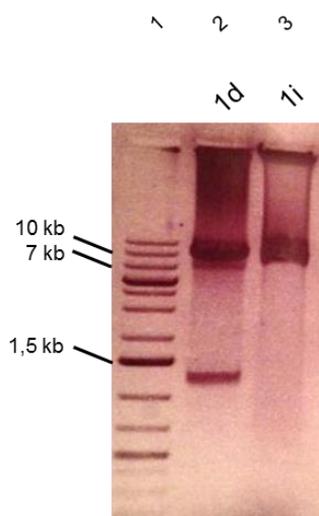
transformação em *E. coli* XL10-Gold, 8 clones foram selecionados para extração de DNA plasmidial e análise de restrição com *Nco*I. A digestão com esta enzima produziria fragmentos de 2,5 e 8,2 kb, caso o inserto estivesse em uma orientação (no mesmo sentido da fita que a marca de seleção *HIS4*), e fragmentos de 4,3 e 6,4 kb, caso o inserto estivesse na orientação contrária (sentido contrário ao do gene *HIS4*). Na figura 21, pode-se observar que os clones 1, 5 e 8 (poços 2, 11 e 17) forneceram fragmentos de aproximadamente 4,3 e 6,4 kb após digestão, o que é compatível com a presença do inserto na orientação contrária do gene *HIS4*.



**Figura 21. Clonagem do cassete *amdSloxP* no vetor pPIC-B.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. DNA plasmidial dos clones 1 a 8, digerido com *Nco*I (d) e intacto (i). **1 e 10:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; **2-9:** clones 1 a 4; **11-18:** clones 5 a 8.

O clone 5 foi escolhido por apresentar mais claramente bandas de 4,3 e 6,4 kb (figura 21, poço 11) e este vetor foi chamado pAMDS. A próxima etapa foi a

remoção do sinal de secreção (fator  $\alpha$ ) do vetor e a clonagem do gene *EGFP* para expressão intracelular sob o controle do promotor *AOX1*. O vetor pAMDS foi digerido com as enzimas BamHI e NotI para retirar a sequência do fator  $\alpha$ . Paralelamente, o gene *EGFP* foi obtido pela digestão do vetor pEGFP-N3 com as mesmas enzimas. Ambos os fragmentos, tanto o vetor pAMDS sem peptídeo sinal quanto o gene *EGFP*, foram purificados e ligados. Após transformação de *E. coli* XL10-Gold, foram feitas 8 extrações de DNA plasmidial. Todos os plasmídeos purificados foram digeridos com as enzimas NotI e PmeI para a identificação de fragmentos de 1,3 e 10 kb, caso a transformação fosse bem sucedida. Como o resultado no gel de agarose foi inconclusivo, o clone 1 foi novamente digerido, desta vez utilizando mais material, e a clonagem foi confirmada (figura 22). Este clone foi chamado pAMDS-EGFP.



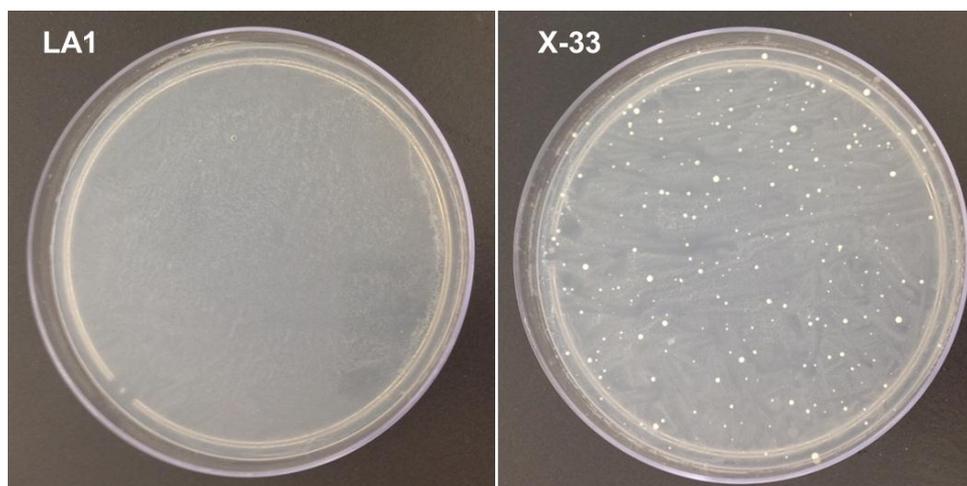
**Figura 22. Clonagem do gene *EGFP* no vetor de expressão.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. DNA plasmidial do clone 1 digerido com NotI e PmeI (d) e intacto (i). **1:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; **2:** clone 1 digerido; **3:** clone 1 intacto.

#### 4.7 TRANSFORMAÇÃO DE *P. pastoris* X-33 E LA1

O vetor pAMDS-EGFP é um vetor integrativo, portanto necessita ser linearizado para promover a melhor recombinação e integração ao genoma. Foram feitas duas digestões diferentes: a primeira com a enzima Sall, que lineariza o vetor dentro do gene *HIS4* e promove a integração neste *locus*; a segunda com a enzima SacI, que lineariza o vetor dentro do promotor *AOX1*. No total, foram feitas 4

transformações, pois foram feitas duas digestões para cada uma das duas linhagens (X-33 e LA1).

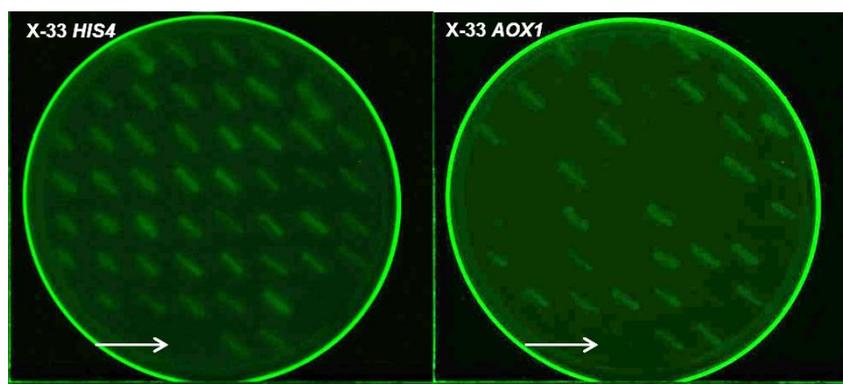
As linhagens foram transformadas por eletroporação e semeadas em meio MD-Ac. As placas do controle negativo (células de levedura sem DNA transformante) exibiram diferenças entre as duas linhagens (figura 23).



**Figura 23. Placas controle das transformações das linhagens LA1 e X-33.** Linhagem LA1 não apresentou colônias; linhagem X-33 apresentou colônias mesmo sem ter recebido o vetor com a marca de seleção. Meio MD-Ac.

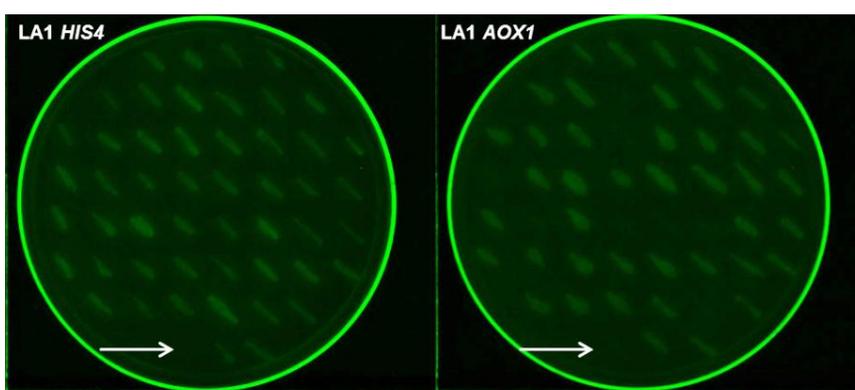
Ambas as placas foram inoculadas com a mesma quantidade de células e incubadas por 4 dias. A linhagem X-33 deu origem a colônias com diferentes tamanhos capazes de crescer em acetamida como fonte de nitrogênio. O mesmo não aconteceu na linhagem LA1, que não apresentou nenhuma colônia.

Com relação às placas dos sistemas que continham vetor, foram escolhidos 50 clones para análise em cada transformação, sendo 200 clones ao total. A primeira análise foi a detecção de proteína verde fluorescente, verificada em Typhoon scanner (GE). Placas de meio MM ágar contendo os 50 clones mais um controle negativo (linhagem antes da transformação) foram escaneadas a fim de analisar a expressão do gene *EGFP* controlado pelo promotor *AOX1*. Na figura 24, são mostradas as placas contendo os 100 clones derivados da linhagem X-33 em meio MM. Pode-se observar que, no caso de integração no *locus HIS4*, um clone não apresentou sinal de fluorescência (clone 43), e com a integração no *locus AOX1*, 20 dos 50 clones não emitiram fluorescência em níveis detectáveis pelo aparelho.



**Figura 24. Expressão intracelular do gene *EGFP*.** Clones provenientes da transformação da linhagem X-33 semeados em meio MM e analisados em Typhoon Scanner. As setas indicam a linhagem controle (X-33).

A figura 25 mostra as placas com clones provenientes da transformação da linhagem LA1, com integração do vetor nos *loci HIS4* e *AOX1*.



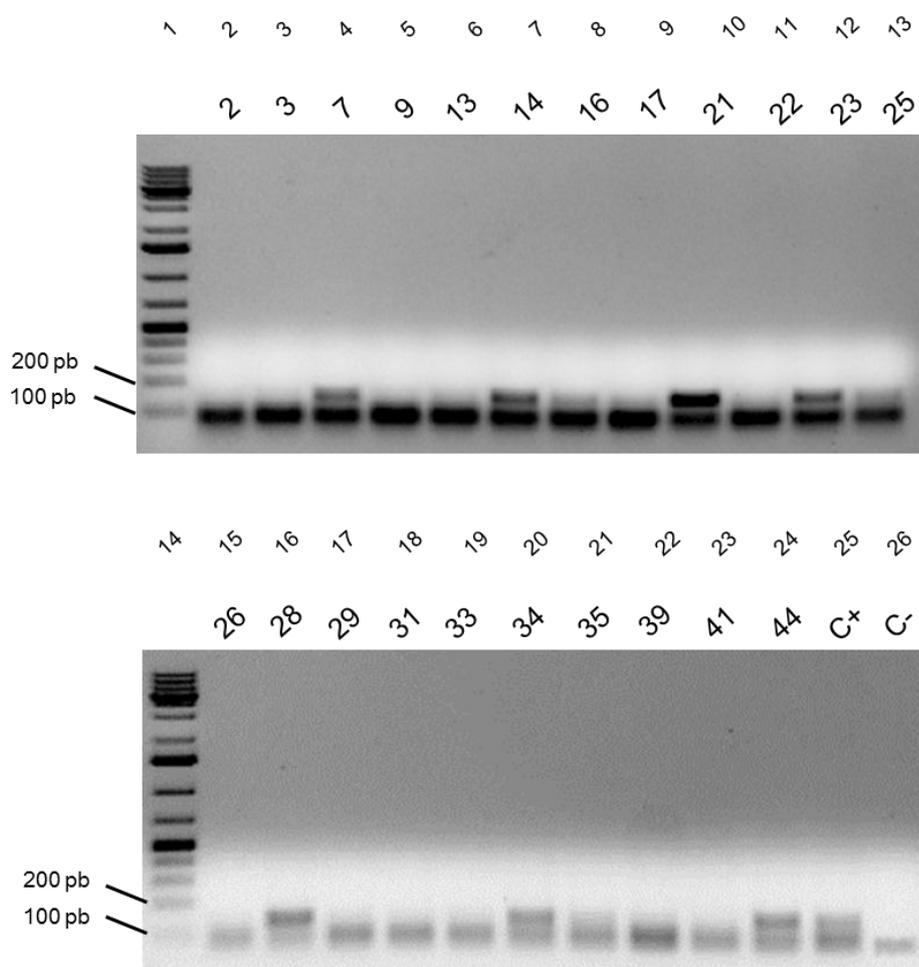
**Figura 25. Expressão intracelular do gene *EGFP*.** Clones provenientes da transformação da linhagem LA1 semeados em meio MM e analisados em Typhoon Scanner. As setas indicam a linhagem controle (LA1).

Com relação à linhagem LA1, quando a integração foi direcionada ao *locus HIS4*, todos os clones apresentaram fluorescência; já no caso da integração no *locus AOX1*, não foi evidenciada a emissão de fluorescência em níveis detectáveis em 8 clones.

Para analisar se a ausência de fluorescência fora devido a falsos clones positivos que não possuíam o DNA exógeno ou se fora causada por outros fatores que afetam a expressão do gene repórter, foram feitas PCRs de colônia. Estas reações foram realizadas para detectar a presença da marca de seleção nos clones

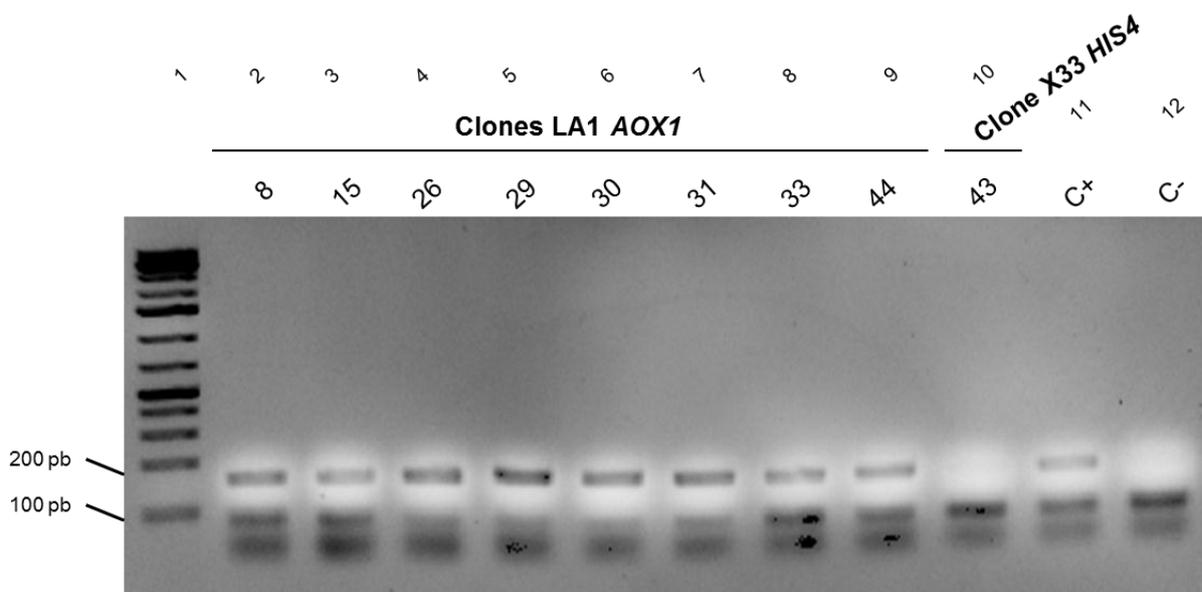
que não emitiram fluorescência detectável, utilizando os *primers* qAMS-F e qAMS-R que amplificam um fragmento de 150 pb dentro do gene *amdS*. Assim, um resultado positivo nesta PCR significaria que a marca de seleção e o vetor pAMDS-EGFP foram eficientemente integrados ao genoma.

Na figura 26 estão representados os resultados de PCR de colônia para todos os clones da linhagem X-33 com integração direcionada ao *locus AOX1* que não apresentaram fluorescência. Pode-se observar que somente os clones de número 7, 14, 21, 23, 28, 34 e 44 (figura 26, poços 4, 7, 10, 12, 16, 20 e 24) apresentaram a banda correspondente aos 150 pb da marca de seleção.



**Figura 26. PCR de colônia dos clones X-33 AOX1 que não apresentaram fluorescência.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **1 e 14:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; **2-13 e 15-24:** clones sem fluorescência; **25:** controle positivo (clone fluorescente); **26:** controle negativo.

Já na figura 27 estão representados os resultados para os clones derivados da linhagem LA1 com integração direcionada ao *locus AOX1* que não apresentaram sinais de fluorescência, assim como o único clone proveniente da linhagem X-33 com integração no *locus HIS4* que não apresentou fluorescência.



**Figura 27. PCR de colônia dos clones LA1 AOX1 e X-33 HIS4 que não apresentaram fluorescência.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1: Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; 2-10: clones sem fluorescência; 11: controle positivo (clone fluorescente); 12: controle negativo.

O resultado mostra que todos os clones da transformação utilizando a linhagem LA1, mesmo aqueles que não emitiram fluorescência, possuíam a marca *amdS* (poços 2 a 9, figura 27), enquanto que na linhagem X-33, com integração direcionada para o *locus HIS4*, houve um clone falso positivo (poço 10, figura 27).

No total, para a linhagem X-33, 26% dos clones isolados a partir da integração no *locus AOX1* não apresentavam a marca de seleção, enquanto que 2% dos clones isolados a partir da integração *HIS4* eram falsos positivos. Na transformação da linhagem LA1, todos os clones isolados possuíam a marca de seleção.

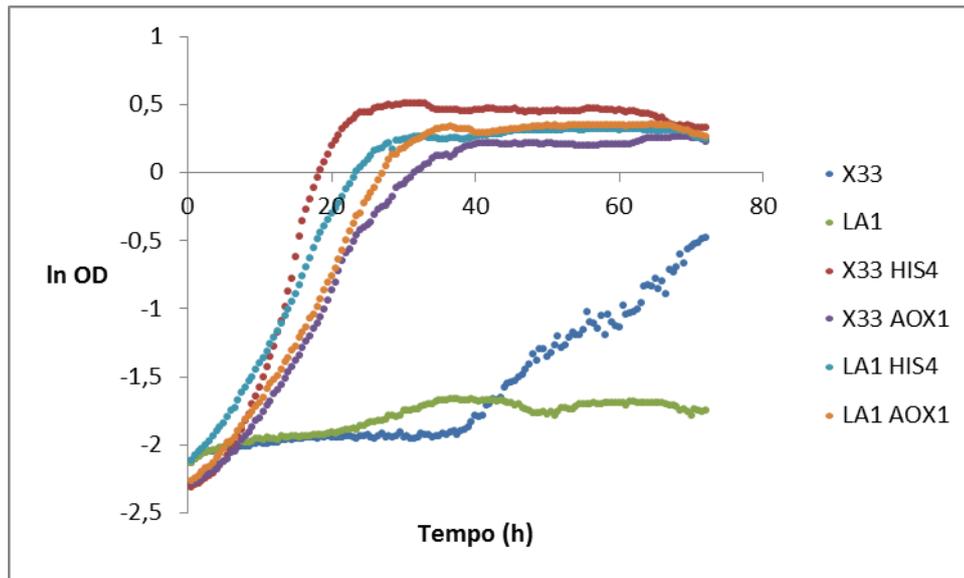
## 4.8 CURVAS DE CRESCIMENTO

Depois de selecionar e armazenar clones transformantes para caracterização posterior, foram feitas curvas de crescimento para comparar as linhagens X-33, LA1 e os clones que continham a marca de seleção em meio MD-Ac. Foram selecionados 3 clones de cada evento de transformação para a construção de curvas de crescimento e comparação das linhagens em meio MD-Ac. As linhagens escolhidas estão relacionadas na tabela 4.

**Tabela 4.** Clones escolhidos de cada evento de transformação para a construção da curva de crescimento.

<b>Locus de integração</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Clones</b>
<i>HIS4</i>	X-33	22, 23 e 32
<i>AOX1</i>	X-33	20, 23 e 30
<i>HIS4</i>	LA1	22, 23 e 32
<i>AOX1</i>	LA1	22, 24 e 32

As análises foram feitas em triplicata, de todos os clones escolhidos e das linhagens X-33 e LA1, totalizando 42 experimentos. Os dados obtidos para os clones de uma mesma transformação foram reunidos e a figura 28 mostra as curvas de crescimento com valores de  $\ln OD_{600}$  versus tempo, em horas.



**Figura 28. Curva de crescimento das linhagens X-33, LA1 e dos clones de cada transformação em meio MD-Ac.** Todas as culturas começaram com uma  $OD_{600}$  de 0,1.

O crescimento das linhagens foi comparado por meio do cálculo da taxa de crescimento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ,  $\text{h}^{-1}$ ) para cada amostra. Esta taxa é determinada pela inclinação da reta formada pelo gráfico  $\ln OD \times \text{tempo}$  na fase exponencial. O crescimento dos clones em meio seletivo foi maior que nas linhagens sem transformação, como esperado. A linhagem X-33 apresentou taxa específica de crescimento máxima de  $0,05 \text{ h}^{-1}$ , com começo do crescimento após 40 horas de cultivo, enquanto a linhagem LA1 não apresentou praticamente nenhum crescimento. A tabela 5 mostra os resultados de taxa específica de crescimento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para cada grupo de clones.

**Tabela 5. Taxa de crescimento máxima para os clones obtidos na transformação com o vetor pAMDS-EGFP.**

<b>Clones</b>	<b><math>\mu_{\text{máx}}</math>, <math>\text{h}^{-1}</math></b>
X-33 HIS4	0,210
X-33 AOX1	0,085
LA1 HIS4	0,109
LA1 AOX1	0,110

Estes resultados mostram que os clones que haviam tido integração do vetor pAMDS-EGFP no *locus HIS4* tiveram uma taxa de crescimento máxima maior que

os clones obtidos pela integração do vetor no *locus AOX1*. Dentre todos os clones analisados, a linhagem X-33 transformada com integração no *locus HIS4* teve a maior taxa de crescimento em relação aos restantes ( $0,21 \text{ h}^{-1}$ ).

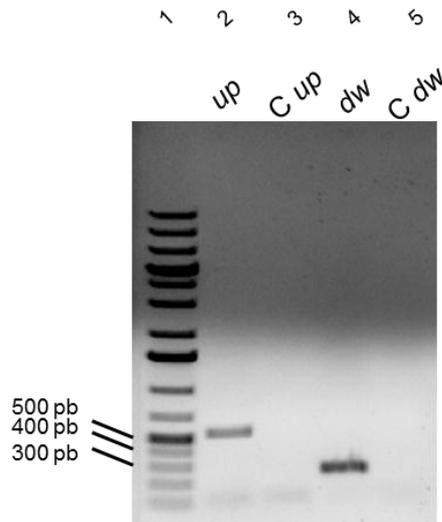
Estes resultados confirmam que a linhagem X-33 apresenta crescimento, ainda que baixo, em meio seletivo MD-Ac. Juntamente com os resultados de fluorescência e PCR de colônia, foi confirmado que a construção da linhagem LA1 solucionou os problemas de falsos positivos encontrados na transformação de X-33.

## 4.9 CONSTRUÇÃO DOS CASSETES DE DELEÇÃO

Foi definido que seria utilizada a linhagem LA1 para as deleções sucessivas com a marca de seleção *amdS* para evitar os problemas de falsos positivos observados com a linhagem X-33. Primeiramente, foi construído o cassete de deleção *ADE2* e o gene foi deletado; depois, foi construído o cassete de deleção *URA5*. Ambos foram construídos da mesma maneira, portanto serão descritos juntamente nesta seção.

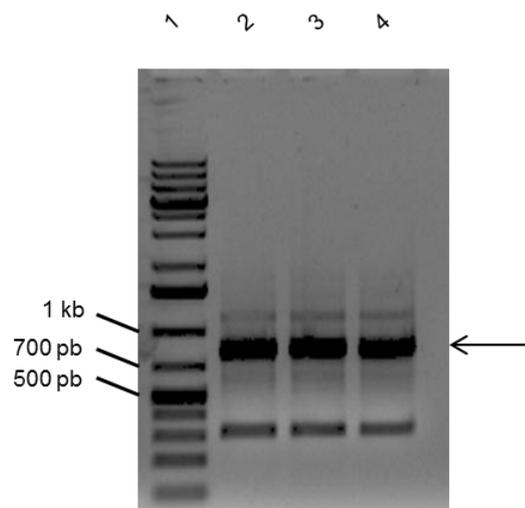
### 4.9.1 Cassete de deleção *ADE2*

Com os *primers* Ade2up-F1 e Ade2up-R1, foi amplificada uma sequência de 547 pb situada imediatamente *upstream* da região codante do gene *ADE2* (figura 29, poço 2); enquanto que, com os *primers* Ade2dw-F1 e Ade2dw-R1, foi amplificada uma sequência de 250 pb imediatamente *downstream* da região codante (figura 29, poço 4). O resultado das amplificações encontra-se na figura 29.



**Figura 29. PCR dos fragmentos *upstream* (*up*) e *downstream* (*dw*) flanqueando a região codante do gene *ADE2*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **1:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus. **2:** fragmento *up*, *primers* Ade2up-F1 e Ade2up-R1; **4:** fragmento *dw*, *primers* Ade2dw-F1 e Ade2dw-R1; **3 e 5:** controles negativos.

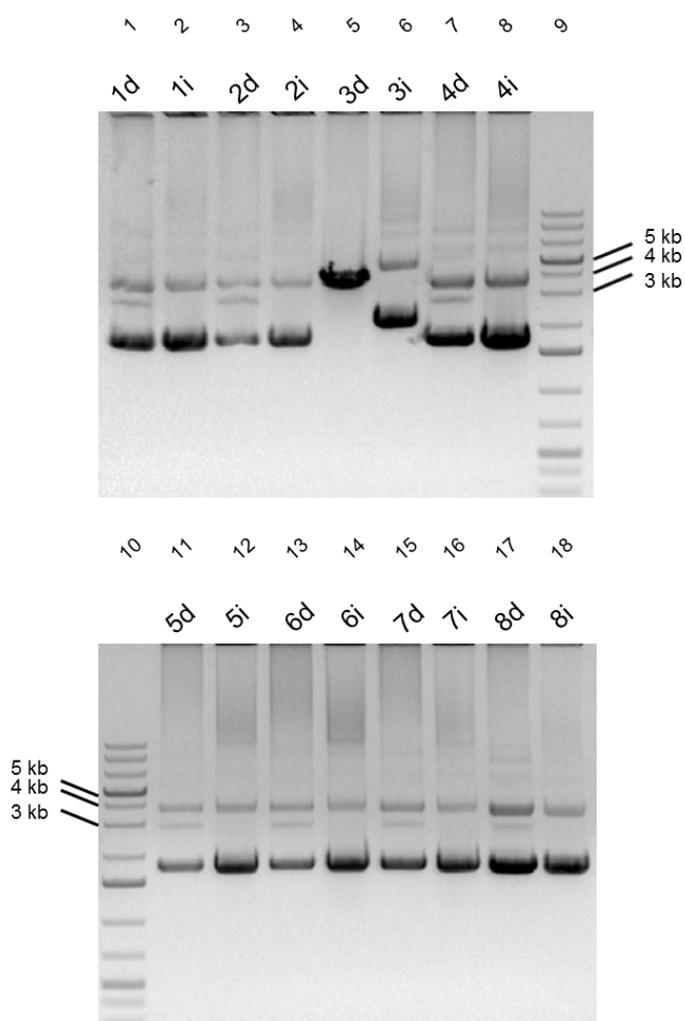
Depois de amplificados, ambos os fragmentos foram digeridos com a enzima *Bgl*III e ligados. Um microlitro do sistema de ligação foi utilizado em uma nova PCR utilizando os *primers* Ade2up-F1 e Ade2dw-R1, para amplificar os dois fragmentos ligados e transformá-los em um só (*updw*). Foram feitas 3 reações de PCR para obter mais material e o resultado desta amplificação está mostrado na figura 30.



**Figura 30. 3 reações de PCR do sistema de ligação *updw*.** *Primers* Ade2up-F1 e Ade2dw-R1. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **1:** Marcador Gene Ruler 1 Kb Plus; **2-4:** fragmento *updw* de 800 pb indicado pela seta e produtos de amplificação inespecífica.

Como o resultado desta reação de PCR foi inespecífico, a banda de aproximadamente 800 pb foi eluída e purificada para prosseguir com a construção do cassete de deleção.

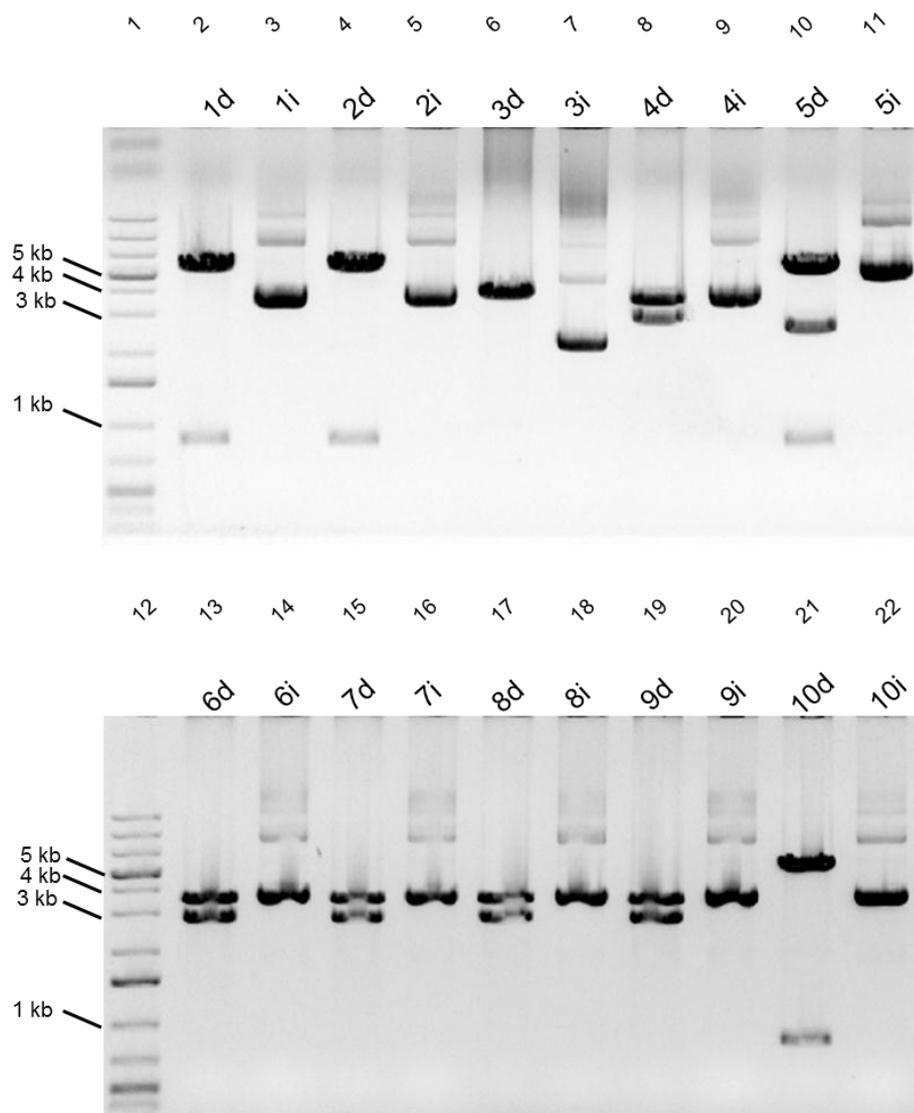
Em seguida, o fragmento *updw* foi ligado ao vetor pBluescript II SK+ numa proporção molar de 10:1 e transformado em *E. coli* XL10-Gold. Foram feitas 8 extrações de DNA plasmidial e o material foi digerido com a enzima BglIII. Caso o inserto tivesse sido clonado eficientemente, a digestão forneceria um fragmento linearizado de aproximadamente 3,8 kb. Caso a clonagem não fosse bem-sucedida, a digestão não aconteceria porque o vetor não possui sítios para a enzima. De acordo com a figura 31, o clone 3 apresentou o padrão de digestão desejado (poço 5).



**Figura 31. Clonagem do fragmento *updw* no vetor pBluescript II SK+.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. DNA plasmidial dos clones 1 a 8, digerido com BglIII (d) e intacto (i). **1 e 10:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; **2-9:** clones 1 a 4; **11-18:** clones 5 a 8.

Prosseguindo com o clone 3, o vetor contendo o fragmento *updw* foi novamente digerido com BglIII para receber o inserto contendo a marca de seleção. O cassete de seleção *amdSloxP* já havia sido construído para o vetor pAMDS-EGFP, portanto, foi apenas excisado do plasmídeo pGAML pela digestão com BamHI e ligado ao vetor contendo as sequências *up* e *dw*. A transformação foi feita em *E. coli* XL10-Gold e foram feitas 10 extrações de DNA plasmidial. O DNA foi digerido com a enzima EcoRV, cujos sítios se encontram no inserto e também no vetor. Desta forma, foi possível saber a orientação da marca de seleção em relação às sequências homólogas de *P. pastoris*.

No caso de uma clonagem bem-sucedida, existiriam duas possibilidades: a digestão forneceria fragmentos de 2,8 kb e 3,4 kb caso as sequências *up* e *dw* estivessem no mesmo sentido da marca de seleção ou, então, os fragmentos obtidos seriam de 850 pb e 5,4 kb, caso a orientação das sequências fosse contrária. Na prática, ambas as orientações são funcionais, pois todas as sequências regulatórias necessárias à marca de seleção foram clonadas em conjunto, e a orientação de sua integração no genoma de *P. pastoris* não altera o efeito de deleção e seleção. Na figura 32, pode-se perceber que foram obtidas as duas orientações: os clones 4, 6, 7, 8 e 9 (poços 8, 13, 15, 17 e 19) possuem a marca de seleção e as sequências homólogas no mesmo sentido, enquanto os clones 1, 2, 5 e 10 (poços 2, 4, 10 e 21) possuem as sequências em outro sentido.

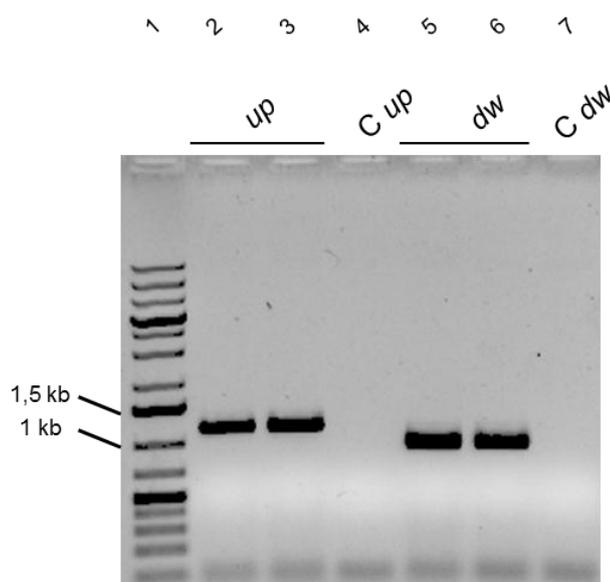


**Figura 32. Clonagem do cassete *amdSloxP* no vetor contendo as sequências *updw*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. DNA plasmidial dos clones 1 a 10, digerido com *EcoRV* (d) e intacto (i). **1 e 12:** Marcador Gene Ruler 1 kb Plus. **2-11:** clones 1 a 5; **13-22:** clones 6 a 10.

O clone 10 foi escolhido e o vetor resultante foi chamado de pADEAMDS. Foi realizada uma extração de DNA plasmidial em média escala (midiprep) para transformação de *P. pastoris* LA1 sendo que o DNA purificado foi digerido com *SmaI*, uma enzima que separa do vetor o cassete de deleção *ADE2* contendo a marca *amdSloxP* e as sequências homólogas para recombinação.

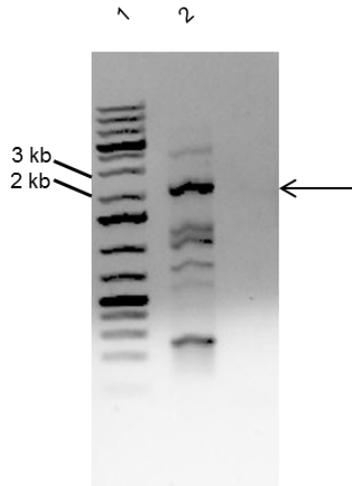
#### 4.9.2 Cassete de deleção *URA5*

Com os *primers* URA5up-F e URA5up-R, foi amplificada uma sequência de 1,2 kb situada *upstream* do gene (poços 2 e 3); enquanto que com os primers URA5dw-F e URA5dw-R foi feita a amplificação da sequência *downstream* de aproximadamente 1 kb (poços 5 e 6). Foram feitas 2 reações de PCR para cada fragmento e o resultado é mostrado na figura 33.



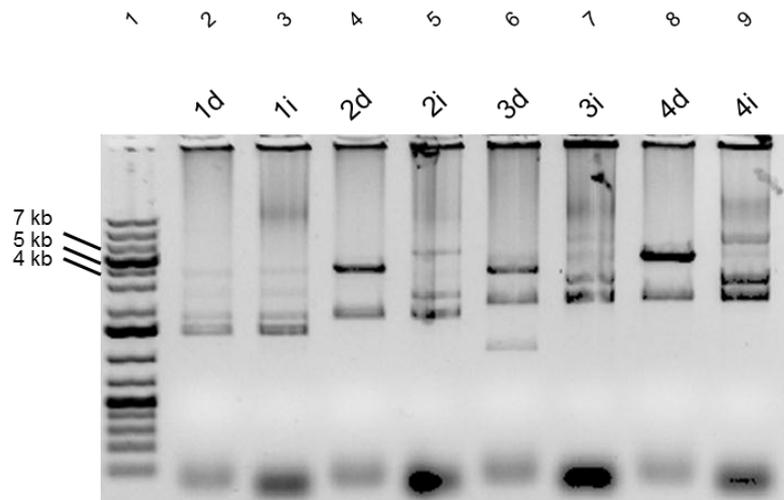
**Figura 33. PCR dos fragmentos *upstream* e *downstream* flanqueando a região do gene *URA5*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1: Marcador Gene Ruler 1 kb Plus.; 2 e 3: fragmento *upstream*, *primers* URA5up-F e URA5up-R; 5 e 6: fragmento *downstream*, *primers* URA5dw-F e URA5dw-R; 4 e 7: controles negativos.

Após as amplificações, os fragmentos foram digeridos com BglII e ligados. O sistema de ligação foi utilizado como molde para a próxima reação de PCR na qual foram usados os *primers* URA5up-F e URA5dw-R. Foram feitas 3 reações de PCR para obter material suficiente e a banda de 2,1 kb foi eluída e purificada a partir do gel de agarose (figura 34).



**Figura 34. PCR do sistema de ligação dos fragmentos *up* e *dw*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1: Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; 2: PCR com *primers* URA5up-F e URA5dw-R. Banda de 2,1 kb (indicada por uma seta) e produtos inespecíficos.

O fragmento *updw* do cassete *URA5* foi então ligado ao vetor pBluescript II SK+ linearizado com *Sma*I e defosforilado. Após transformação em células *E. coli* XL10-Gold, foram feitas 4 extrações de DNA plasmidial e o material foi digerido com *Bgl*III. Caso a transformação fosse bem-sucedida, a digestão forneceria um fragmento linearizado de 5,1 kb. O resultado é apresentado na figura 35.

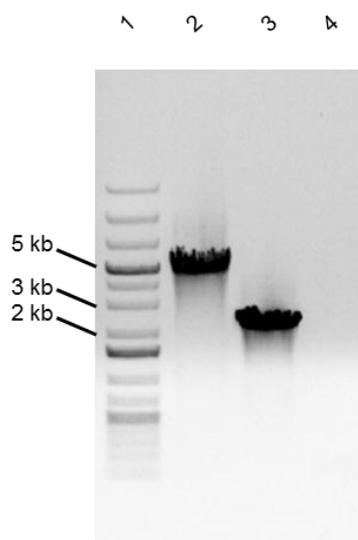


**Figura 35. Clonagem do fragmento *updw* no vetor pBluescript II SK.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. DNA plasmidial dos clones 1 a 4 digeridos com *Bgl*III (d) e intacto (i). 1: Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; 2-9: clones 1 a 4.

A digestão feita pela enzima foi parcial. O clone 4 apresentou uma banda de aproximadamente 5,2 kb quando digerido (figura 35, poço 8), e foi escolhido para uma nova digestão com BglIII por 16 h. O material foi analisado em gel de agarose e a digestão foi novamente parcial, então a banda de 5,2 kb foi eluída e purificada do gel para ser utilizada como vetor na próxima etapa de clonagem.

O fragmento de 5,2 kb contendo o plasmídeo pBluescript II SK+ e as sequências *up* e *dw* da região do gene *URA5* foi ligado ao cassete *amdSloxP* que havia sido digerido com a enzima BamHI. Após ligação e transformação, foram feitas 12 extrações de DNA plasmidial para análise dos clones. O material foi digerido com a enzima BamHI para verificar se a clonagem foi bem-sucedida, porém a digestão não funcionou.

Foi então feita uma reação de PCR para analisar o tamanho do fragmento a ser amplificado pelos *primers* URAup-F e URAdw-R. Foram escolhidos os clones 1 e 6 para serem utilizados como molde e, se a marca *amdSloxP* tivesse sido clonada entre as sequências homólogas, o fragmento amplificado teria 4,9 kb. Caso a clonagem não tivesse acontecido, o fragmento teria 2,1 kb correspondentes apenas às sequências homólogas. O resultado é mostrado na figura 36.



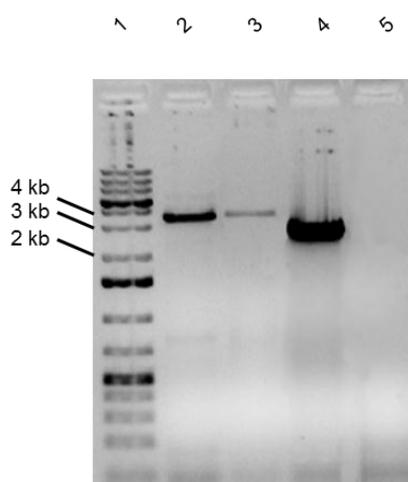
**Figura 36.** PCR com *primers* URAup-F e URAdw-R do DNA plasmidial dos clones 1 e 6 da clonagem do cassete *amdSloxP*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1: Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; 2: PCR clone 1; 3: PCR clone 6; 4: controle negativo.

O clone 1 apresentou o fragmento amplificado no tamanho esperado (poço 2), portanto foi escolhido para uma extração de DNA plasmidial de grande escala

(midiprep). Vinte microgramas do material obtido foram então digeridos com a enzima *Sma*I, que excisou o cassete de deleção; o material foi precipitado e ressuspenso em 10 µL de água MilliQ para a transformação de *P. pastoris*.

#### 4.10 DELEÇÃO DO GENE *ADE2*

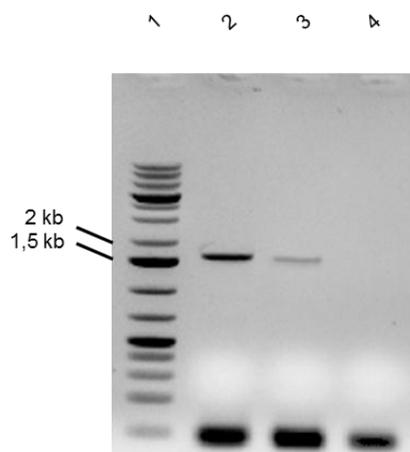
Células da linhagem LA1 transformadas com o cassete de deleção *ADE2* foram semeadas em placas de meio MD-Ac suplementadas com adenina, visto que os clones procurados seriam auxotróficos para adenina. As placas foram mantidas a 28 °C por 7 dias, pois o crescimento de mutantes *ade2* é mais lento que o de células prototróficas. Após esse período de crescimento, foram obtidas cerca de 200 a 300 colônias por placa, e apenas duas colônias apresentaram coloração avermelhada. Os 2 clones avermelhados da placa de transformantes foram isolados e caracterizados por meio de reações de PCR de colônia. Primeiramente, foram usados os *primers* de confirmação Ade2F1 e Ade2R1, que se anelam externamente às sequências recombinadas pelo cassete de deleção, sendo possível analisar o tamanho do fragmento amplificado e verificar se a marca de seleção substituiu ou não o gene *ADE2*. Se a marca de seleção tivesse se integrado corretamente, o fragmento amplificado teria 3,5 kb; caso o gene *ADE2* estivesse intacto, o fragmento seria de 2,7 kb (figura 37).



**Figura 37. PCR de colônia para confirmar deleção do gene *ADE2*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1: Marcador Gene Ruler 1 Kb Plus; 2: PCR com *primers* de confirmação Ade2F1 e Ade2R1 do clone 1; 3: PCR clone 2; 4: PCR linhagem LA1; 5: controle negativo.

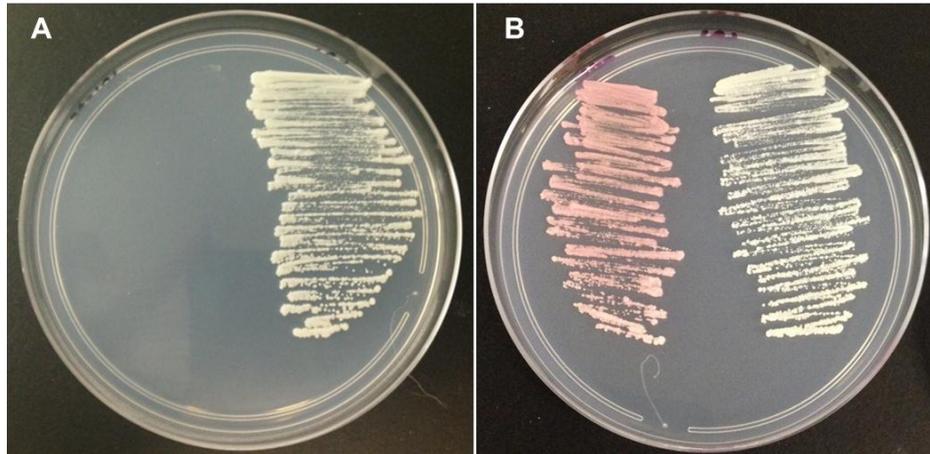
Pode-se observar na figura 37 (poços 2 e 3) que ambos os clones selecionados apresentaram o tamanho de amplificação desejado para a deleção do gene *ADE2*.

A segunda reação utilizou o par de *primers* qAMS-F e Ade2F1, pois a orientação do cassete com a marca de seleção com relação às sequências do genoma de *P. pastoris* era conhecida. Assim, caso a marca estivesse localizada no lugar do gene *ADE2*, o primer externo de confirmação (Ade2F1) faria par com o primer interno da marca (qAMS-F) e resultaria num fragmento amplificado de 1,6 kb (figura 38).



**Figura 38. PCR de colônia para confirmar deleção do gene *ADE2*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1: Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; 2: PCR com *primers* qAMS-F e ADE2F1 do clone 1; 3: PCR do clone 2; 4: controle negativo.

Pode-se observar que a integração do cassete de seleção nos clones 1 e 2 foi bem-sucedida, e houve a deleção do gene *ADE2*. O clone 1 foi escolhido para prosseguir com os experimentos e a linhagem foi denominada LA2-A, pois possuía o gene *amdS*. Na figura 39 é mostrado o aspecto das colônias derivadas das linhagens LA2-A e LA1 em meio MD sem e com adenina. A linhagem LA2-A é incapaz de crescer em meio sem adenina devido à auxotrofia do gene *ADE2*, e também apresenta coloração avermelhada devido ao acúmulo do composto 5-fosforibosil 5-aminoimidazol.



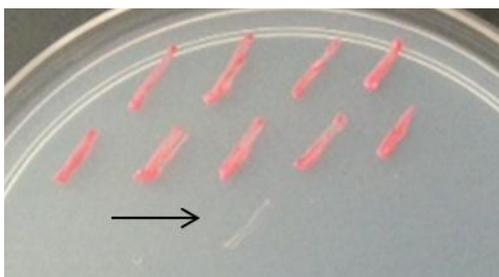
**Figura 39. Crescimento das linhagens LA2-A e LA1 em meio sem adenina (A) e com adenina (B).** Linhagens LA2-A e LA1 semeadas em placas de meio MD (A) e MD + adenina (B). Linhagem LA2-A não é capaz de crescer sem o fornecimento de adenina, confirmando a auxotrofia.

Após a confirmação do fenótipo da linhagem LA2-A, esta foi armazenada e utilizada na reciclagem da marca de seleção.

#### **4.11 RECICLAGEM DA MARCA DE SELEÇÃO**

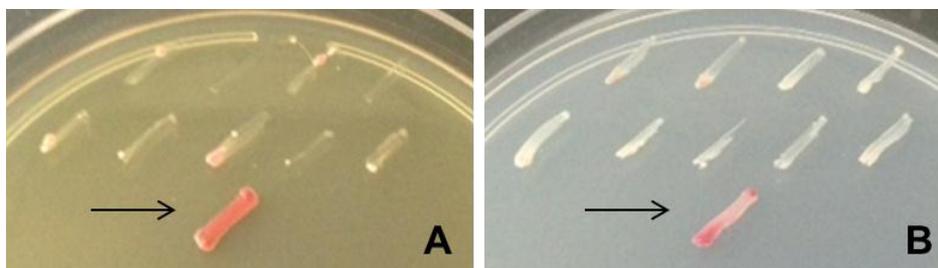
A linhagem LA2-A apresenta duas marcas de seleção: o gene *Sh ble*, que foi utilizado na deleção da ORF PAS\_chr3\_0283, e o gene *amdS*, utilizado na deleção do gene *ADE2*. Ambos os cassetes de deleção são flanqueados por sequências *loxP* de recombinação, portanto foi utilizada uma estratégia envolvendo o sistema Cre-*loxP* para a excisão das marcas. Primeiramente, foi feita a transformação da levedura com o plasmídeo replicativo pYRCre2 (BETANCUR, 2014). Este plasmídeo possui o gene da recombinase CreA controlado pelo promotor constitutivo de *S. cerevisiae TEF1*. Assim, a expressão da recombinase foi feita a partir do momento da transformação.

Na transformação da linhagem LA2-A, as células foram semeadas em meio YPD com higromicina B e os 9 clones transformantes obtidos foram semeados em meio MD-Fac suplementado com adenina para confirmar a perda do gene *amdS* com o crescimento em fluoroacetamida. Foi observado o crescimento dos 9 clones em fluoroacetamida em comparação com a linhagem LA2-A, que serviu como controle, o que indica que a presença da recombinase levou à excisão da marca de seleção *amdS* (figura 40).



**Figura 40. Crescimento em fluoroacetamida dos 9 clones obtidos na transformação com o vetor pYRCre2.** Meio MD-Fac suplementado com adenina. A seta indica a linhagem controle (LA2-A).

Depois deste resultado, todos os clones, juntamente com a linhagem controle, foram semeados em meio YPD com zeocina e em meio MD-Ac. Isto foi feito para avaliar a excisão das marcas de seleção *Sh ble* e *amdS*, pois se esta fosse bem-sucedida os clones não deveriam mais ser capazes de crescer nos meios seletivos. A figura 41 mostra as placas de meios seletivos, em que os clones provenientes da transformação com o plasmídeo pYRCre apresentaram pouco ou nenhum crescimento nestas condições quando comparados à linhagem LA2-A.

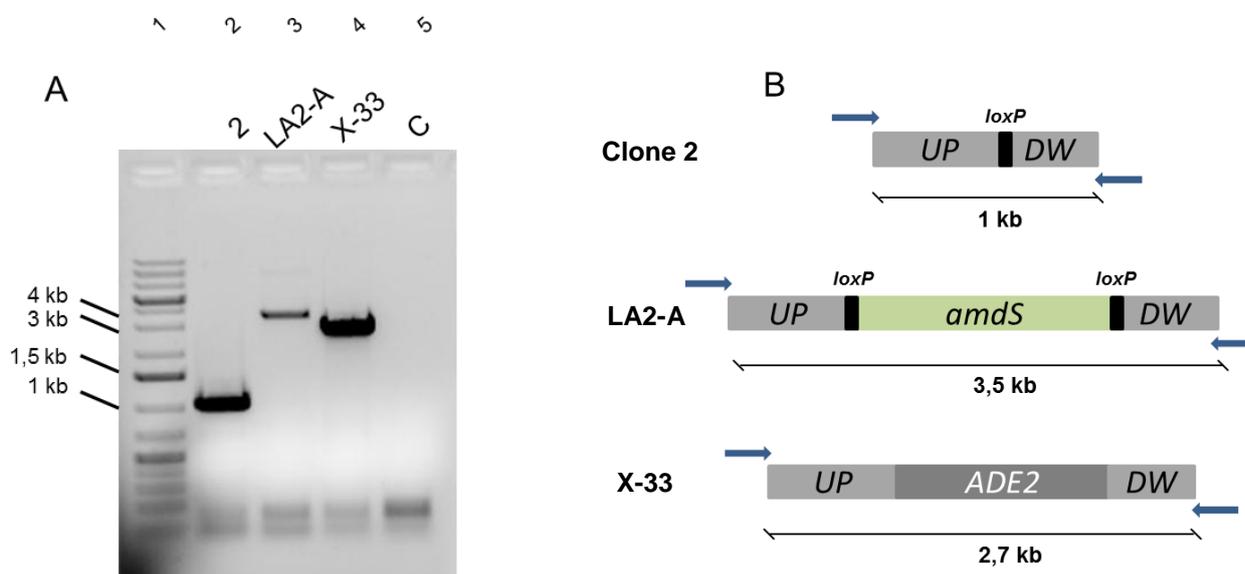


**Figura 41. Clones 1 a 9 da transformação com o vetor pYRCre2 em meios seletivos.** Meio YPD com zeocina (A) e meio MD-Ac (B). As setas indicam a linhagem controle (LA2-A).

Como o plasmídeo replicativo pYRCre é instável uma vez que as células são semeadas em meio sem antibiótico, foi feita também uma análise em meio YPD com higromicina B. A partir da placa de meio MD-Fac, os clones foram semeados em meio com o antibiótico. Não houve crescimento de nenhum clone, indicando que estes haviam perdido o plasmídeo e já não eram capazes de crescer em meio com higromicina B.

Foi escolhido o clone 2 para análise por PCR de colônia utilizando os *primers* de confirmação tanto para o gene *ADE2* quanto para a ORF PAS\_chr3\_0283. A figura 42 mostra o resultado de PCR de colônia utilizando os *primers* Ade2F1 e

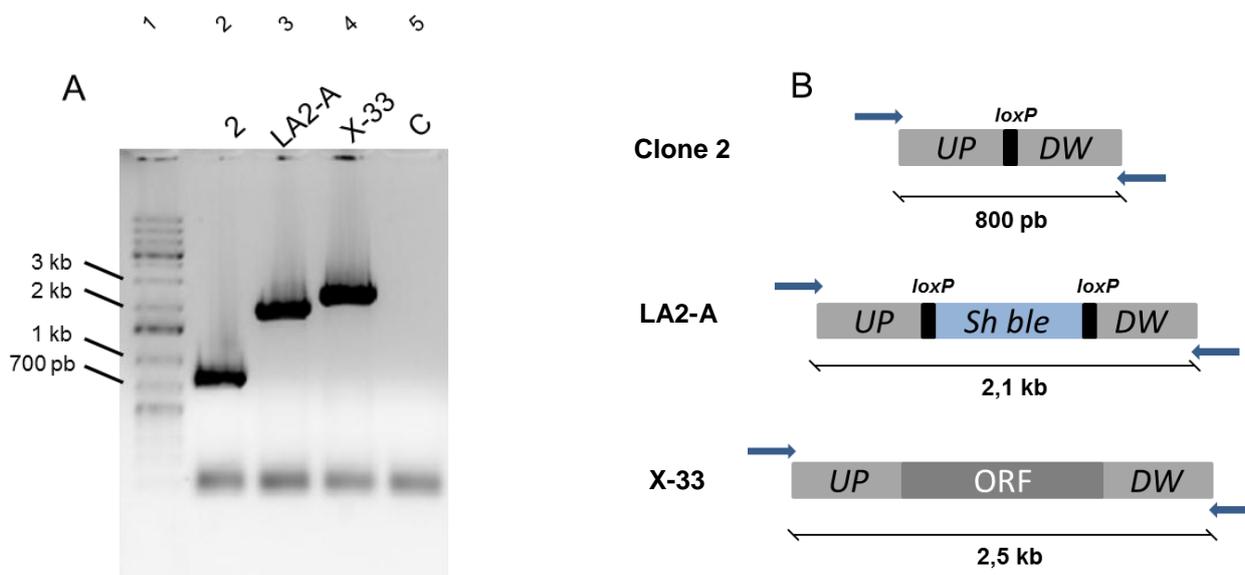
Ade2R1, utilizando como moldes o clone 2 (poço 2), a linhagem LA2-A (poço 3) e a linhagem X-33 (poço 4).



**Figura 42. PCR de colônia para confirmar excisão da marca de seleção do locus ADE2.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **A)** 1: Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; 2: PCR com primers Ade2F1 e Ade2R1 do clone 2 (banda de 1 kb); 3: PCR da linhagem LA2-A (banda de 3,5 kb); 4: PCR da linhagem X-33 (2,7 kb); 5: controle negativo. **B)** Representação esquemática da posição de anelamento dos primers Ade2F1 e Ade2R1 e tamanho esperado dos amplicons.

A amplificação a partir do clone 2 (poço 2) mostra uma banda de aproximadamente 1 kb, compatível com o tamanho da amplificação no caso da excisão da marca pela Cre recombinase. A linhagem LA2-A (poço 3) forneceu um fragmento amplificado de 3,5 kb, pois a sequência do cassete *amdSloxP* encontrava-se entre os *primers* de confirmação. Já a linhagem X-33 (poço 4), antes de qualquer transformação, forneceu uma banda de 2,7 kb, que corresponde ao gene *ADE2* intacto.

Na PCR de colônia com os *primers* de confirmação KpAMS-F3 e KpAMS-R3 (figura 43), o resultado mostrou a excisão do cassete *zeoloxP* do clone 2 por meio de uma banda de aproximadamente 800 pb (poço 2). Quando foi utilizada a linhagem LA2-A como molde para a PCR, o fragmento obtido foi de 2,1 kb (poço 3); já quando foi utilizada a linhagem X-33, o tamanho original do fragmento amplificado foi de 2,5 kb (poço 4).



**Figura 43. PCR de colônia para confirmar excisão da marca de seleção do locus ORF PAS\_chr3\_0283.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **A)** 1: Marcador Gene Ruler 1 kb Plus; 2: PCR com *primers* KpAMS-F3 e KpAMS-R3 do clone 2 (banda de 800 pb); 3: PCR da linhagem LA2-A (banda de 2,1 kb); 4: PCR da linhagem X-33 (banda de 2,5 kb); 5: controle negativo. **B)** Representação esquemática da posição de anelamento dos primers KpAMS-F3 e KpAMS-R3 e tamanho esperado dos amplicons.

Depois destes resultados, o clone 2 foi escolhido para armazenagem, e a linhagem final obtida foi chamada de LA2.

## 5 DISCUSSÃO

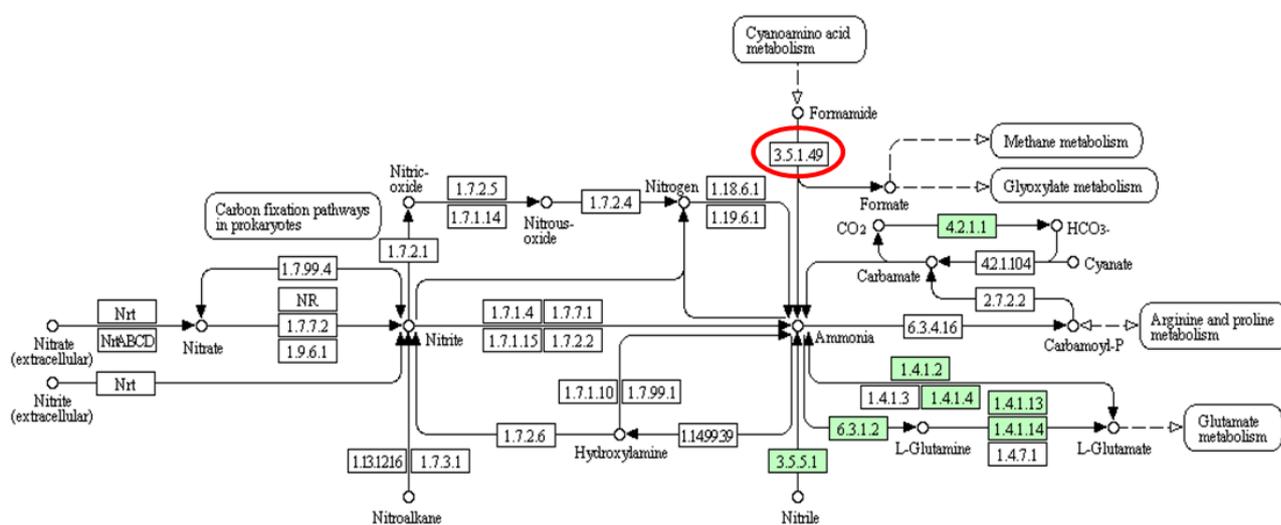
A utilização de *P. pastoris* como plataforma de produção de proteínas heterólogas pode envolver a construção de sistemas complexos para a adequada expressão de genes de interesse, requerendo um conjunto de ferramentas para a manipulação genética da levedura. Além dos kits de expressão disponibilizados comercialmente pela empresa Invitrogen, têm sido criadas diversas estratégias para simplificar a manipulação genética de *P. pastoris*. Destacam-se nesse contexto o desenvolvimento de linhagens propensas a realizar a recombinação homóloga mais eficientemente, a construção de promotores sintéticos, o uso de novas marcas de seleção e de estratégias de reciclagem de sequências (NETT; GERNGROSS, 2003; HARTNER et al., 2008; YANG; JIANG; YANG, 2009; NÄÄTSAARI et al., 2012).

Dentro deste conjunto de ferramentas, o estudo de novas marcas de seleção fornece alternativas para o trabalho de manipulação genética. *P. pastoris*, assim como as leveduras *K. lactis* e *Yarrowia lipolytica*, tem recebido muita atenção na área de produção de proteínas heterólogas mas ainda possui uma menor quantidade de marcas de seleção utilizáveis quando comparada com *S. cerevisiae* (KIM; YOO; KANG, 2015). Esta levedura teve seu genoma sequenciado em 1996, quando foi o primeiro genoma completo de um organismo eucarioto a ser sequenciado (GOFIEAU et al., 1996). Sua fisiologia é bastante conhecida, ao contrário de *P. pastoris*, que embora tenha tido o genoma sequenciado em 2009, muitos de seus genes ainda não foram anotados e suas vias metabólicas não foram completamente estudadas (DE SCHUTTER et al., 2009). Marcas de seleção como as marcas de auxotrofia do triptofano (gene *TRP1*) e da lisina (genes *LYS2* e *LYS5*) não existem em *P. pastoris*, e a reciclagem de marcas de seleção normalmente depende de grandes sequências para a recombinação ou de recombinases heterólogas (CHATTOO et al., 1979; TOYN et al., 2000; KIM; YOO; KANG, 2015).

O gene *amdS* é uma marca de seleção dominante que não envolve o uso de antibiótico, pois é baseada na utilização de fontes de nitrogênio pela levedura (SOLIS-ESCALANTE et al., 2013). Além disso, a possibilidade de reciclagem desta marca de seleção é importante no caso da utilização de uma mesma linhagem em diversos eventos de recombinação, assim como no uso industrial da levedura. Em *S. cerevisiae* e diversos fungos filamentosos como *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus*

*niger*, esta marca já foi utilizada inclusive com sua propriedade de contrasseleção. Na levedura *K. lactis*, o gene *amdS* forneceu integrações do DNA heterólogo em múltiplas cópias na maior parte dos clones obtidos, numa taxa maior que quando usada a marca de resistência a G418 (READ et al., 2007).

De acordo com o mapa metabólico disponível no banco de dados *KEGG PATHWAY Database*, o metabolismo de nitrogênio de *P. pastoris* não envolve uma enzima com atividade de amidase, capaz de catalisar a hidrólise de amidas de cadeia curta como a formamida ou acetamida. Na figura 44, pode-se observar o metabolismo de nitrogênio com as enzimas conhecidas de *P. pastoris* em verde e a amidase assinalada em vermelho.



**Figura 44. Metabolismo do nitrogênio.** A enzima 3.5.1.49 representa a amidase. Figura extraída de *KEGG pathway database*.

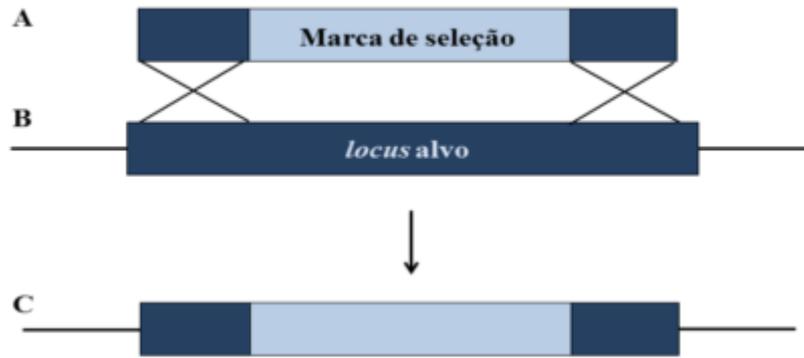
Entretanto, quando foi feita a análise do genoma da levedura por meio de alinhamento em banco de dados utilizando a ferramenta BLASTp, foi possível encontrar uma sequência putativa de proteína que pertence à família das amidases (número de acesso: XP\_002492502.1). A potencial atividade de amidase desta proteína poderia interferir na utilização do gene *amdS* como marca de seleção, pois é necessário que a levedura nativa não seja capaz de utilizar acetamida como fonte de nitrogênio para que a seleção ocorra. Uma outra evidência de que a ORF PAS\_chr3\_0283 poderia codificar para uma acetamidase foi o fato dela ser transcricionalmente ativa em meio complexo (figura 8). No entanto, não é possível

afirmar que a amidase putativa é constitutivamente expressa porque não foram utilizados outros meios de cultura para o cultivo da levedura e extração de RNA. Também não tínhamos evidência de que o transcrito era traduzido pois não dispúnhamos de anticorpos contra a proteína codificada. A amidase putativa encontrada em *P. pastoris*, a acetamidase de *A. nidulans* e amidases de outros fungos filamentosos e até de bactérias possuem regiões conservadas envolvendo os aminoácidos presentes no sítio catalítico das enzimas. Essas regiões também estão presentes em proteínas da família das aspartil proteases, o que indica relações evolutivas entre estas duas enzimas (KOBAYASHI et al., 1997).

Embora tenha sido demonstrado pela primeira vez nesse trabalho que *P. pastoris* possui uma enzima capaz de metabolizar acetamida, esta atividade deve ser fraca ou instável já que o crescimento em placa de controle negativo foi caracterizado por colônias de tamanhos variáveis e que surgiram esporadicamente (figura 23). Em seu conjunto, os resultados obtidos sugeriram que a atividade acetamidásica endógena de *P. pastoris* poderia interferir no uso da marca *amdS* nesse organismo.

Era necessário, então, eliminar a atividade da proteína codificada pela ORF PAS\_chr3\_0283, e para isso decidimos deletar esta ORF por meio de uma técnica que envolve a construção de um cassete de deleção contendo uma marca de seleção flanqueada por regiões 5' e 3' homólogas ao sítio-alvo. O cassete de deleção foi intencionalmente desenhado para ser modular, ou seja, as marcas de seleção poderiam ser substituídas. De fato, neste trabalho o primeiro cassete de deleção construído possuía o gene *Sh ble* como marca de seleção enquanto que os demais possuíam o gene *amdS* (figura 9).

A deleção da ORF PAS\_chr3\_0283, assim como a do gene *ADE2*, foi feita por meio de eventos de dupla recombinação que substituíram toda a sequência codante. Este tipo de recombinação, chamado ruptura gênica, utiliza sequências homólogas ao genoma da levedura e evita problemas associados à reversão gênica pois toda a região codante é eliminada, gerando um mutante *null* (SCHERER; DAVIS, 1979). O mecanismo de deleção é mostrado na figura 45.



**Figura 45. Esquema representativo do mecanismo de ruptura gênica.** A: Cassete de deleção; B: *locus* alvo a ser deletado ou interrompido; C: genoma da levedura após o evento de recombinação homóloga. Figura extraída de BETANCUR, 2014.

A ORF PAS\_chr3\_0283 foi deletada com sucesso (figura 17) e a obtenção de vários clones mutantes sugere que essa ORF não é um gene essencial para a célula nas condições testadas de seleção, embora não possamos descartar algum outro efeito fisiológico decorrente desta modificação genética.

Para testar o gene *amdS* como marca de seleção em *P. pastoris*, a transformação das linhagens X-33 e LA1 com o vetor pAMDS-EGFP forneceu resultados diferentes entre as linhagens e até mesmo entre os diferentes *locus* de integração. A placa controle da transformação (sem DNA) não apresentou nenhuma colônia (figura 23), ao contrário da linhagem X-33 que apresentou colônias isoladas. Assim, foi confirmado que o crescimento da linhagem X-33 em meio com acetamida como fonte de nitrogênio era devido à atividade da amidase putativa encontrada. Os resultados de fluorescência de GFP dos clones isolados foram confirmados por PCR de colônia porque a não detecção do produto do gene repórter não necessariamente representa a ausência deste gene.

Na transformação da linhagem X-33, o maior número de falsos positivos foi observado quando utilizado o *locus AOX1* de integração, enquanto com o *locus HIS4* foi observado apenas um clone falso positivo. Sabe-se que a frequência da integração de sequências por recombinação homóloga em *P. pastoris* depende do *locus* utilizado para dirigir a integração; no caso, o *locus HIS4* mostrou-se mais acessível para a recombinação, o que corresponde a dados apresentados na literatura (NÄÄTSAARI et al., 2012). Estes resultados também podem ser devidos ao tamanho das sequências usadas para recombinação, porque o gene *HIS4* possui mais de 2,5 kb e é maior que o promotor *AOX1*, que possui aproximadamente 1 kb.

Além da integração mais eficiente no *locus HIS4*, os clones que possuíam o vetor integrado neste locus tiveram uma maior taxa específica de crescimento em meio seletivo se comparados aos clones que receberam a integração no *locus AOX1*, e a expressão do gene EGFP também foi mais eficiente visto que nenhum clone verdadeiro que continha o vetor integrado deixou de expressar o gene da proteína fluorescente em níveis detectáveis. Considerando que a taxa de crescimento dos clones pode ser em alguma medida proporcional à taxa de expressão da enzima acetamidase, a menor expressão tanto desta enzima quanto da proteína fluorescente pode ter sido impedida por diversos fatores não relacionados à sequência integrada, como o enovelamento da cromatina, acetilação de histonas ou recombinações não-homólogas (LOVE et al., 2010; RANDO; WINSTON, 2012).

A presença de falsos positivos em transformações de levedura é observada quando são usadas algumas marcas de seleção e pode ter diversas origens. No caso de marcas auxotróficas, este problema pode ser causado pela reversão das mutações de genes de vias biossintéticas para o fenótipo selvagem, o que ocorre principalmente quando são feitas mutações pontuais para inativação do gene. Neste caso, a deleção completa do gene pode corrigir o problema (SHAO; ZHAO; ZHAO, 2009). Já no uso de marcas de seleção dominantes, algumas linhagens de levedura podem ser naturalmente resistentes ao composto utilizado para a seleção, um problema semelhante ao que aconteceu neste trabalho com a linhagem *P. pastoris* X-33 (OGATA et al., 1993; CEBOLLERO; GONZALEZ, 2004).

Após a construção da linhagem LA1 e confirmação da eficiência da marca de seleção nesta linhagem com a transformação com o vetor pAMDS-EGFP, o gene *amdS* foi então utilizado na deleção de outros genes por ruptura gênica. O cassete de seleção construído anteriormente (figura 9) teve o gene *Sh ble* substituído pelo *amdS* e a construção resultante foi flanqueada por sequências homólogas às regiões *upstream* e *downstream* dos genes *ADE2* e *URA5*. As sequências homólogas tiveram como objetivo orientar a integração dupla dos cassetes de deleção a fim de substituir completamente a região codante destes genes. A escolha dos genes *ADE2* e *URA5* se deveu à facilidade de detecção desses mutantes: a deleção do gene *ADE2* gera colônias avermelhadas enquanto que mutantes *ura5* são facilmente selecionados em placas contendo a droga 5-FOA. Além disso, ambas as deleções fornecem linhagens auxotróficas e a linhagem resultante com a dupla

mutação (*ade*, *ura5*) deverá ser usada futuramente como plataforma para estudos de biologia sintética em *P. pastoris*.

A transformação da linhagem LA1 com o cassete de deleção do gene *ADE2* gerou 200-300 colônias isoladas por placa, enquanto na placa controle não havia colônias, como esperado. Como a deleção deste gene pode ser detectada pela coloração das células, na busca por colônias avermelhadas foram encontradas apenas duas colônias com essa característica, que poderiam ser o resultado de ruptura gênica no *locus ADE2* ou apenas de mutações espontâneas deste gene. Para confirmar essas hipóteses, foram feitas PCRs de colônia e identificação fenotípica da auxotrofia, que confirmaram a deleção do gene *ADE2* (figuras 37, 38 e 39). O baixo número de colônias avermelhadas em comparação com a quantidade de clones obtidos mostra que nem sempre a integração do DNA exógeno ocorre no local de recombinação homóloga. Os outros clones poderiam ter tido a integração da marca de seleção, pois foram capazes de crescer em meio MD-Ac, mas ela não ocorreu no *locus* de interesse e a deleção do gene *ADE2* não ocorreu.

Em *P. pastoris* e outras leveduras como *Hansenula polymorpha* e *Y. lipolytica*, ao contrário de *S. cerevisiae*, a recombinação homóloga não é tão eficiente devido à presença de seu mecanismo de recombinação não-homóloga (*non-homologous end joining* - NHEJ). Como este mecanismo representa uma dificuldade na manipulação genética de leveduras, recentemente têm sido criadas linhagens com deleções nos genes que codificam para proteínas envolvidas no complexo de recombinação não-homóloga, como os genes *KU70* e *KU80* (NÄÄTSAARI et al., 2012; KIM; YOO; KANG, 2015). Estas deleções reduziram a parcela de eventos de recombinação não-homóloga no total de integrações de DNA exógeno, conseqüentemente aumentando as chances de se obter um clone transformante com a integração no *locus* desejado. A frequência de eventos de recombinação homóloga em *P. pastoris* em comparação com todos os eventos de integração pode variar de acordo com o tamanho da sequência utilizada para a recombinação e com a região de integração (NÄÄTSAARI et al., 2012; VOGL; HARTNER; GLIEDER, 2013). No caso do gene *ADE2*, foram utilizadas sequências homólogas de aproximadamente 550 e 250 pb para promover a recombinação.

Após a deleção do gene *ADE2*, a linhagem LA2-A foi então transformada com o plasmídeo replicativo pYRCre2 para promover a excisão da marca de seleção. Como o promotor do gene da recombinase CreA neste vetor é constitutivo, a

expressão da recombinase se deu imediatamente após a transformação. O plasmídeo replicativo utiliza como origem de replicação a sequência PARS1 de *P. pastoris* que, embora seja a sequência de replicação autônoma mais utilizada nesta levedura, não confere uma boa estabilidade mitótica ao vetor (LIACHKO; DUNHAM, 2014; LIACHKO et al., 2014). Assim, enquanto os clones foram mantidos em meio com higromicina B, houve a expressão do gene da recombinase, e assim que foram semeados em meio MD-Fac, o vetor pYRCre2 foi perdido. A excisão de marcas de seleção utilizando a recombinase Cre já é bem definida, tendo sido utilizada em mamíferos, plantas, bactérias e leveduras, entre outros organismos ( HENDERSON, 1988, DELNERI et al., 2000; LAMBERT; BONGERS; KLEEREBEZEM, 2007; SAUER).

A passagem dos clones pelo meio com fluoroacetamida teve como objetivo a confirmação da excisão da marca *amdS* pela transformação com o plasmídeo replicativo. Em *S. cerevisiae*, pequenas sequências repetidas flanqueando a marca de seleção são suficientes para a sinalização da recombinação homóloga e retirada da marca de seleção, e as células que perderam a marca são selecionadas em meio contendo fluoroacetamida (SOLIS-ESCALANTE et al., 2013). Como *P. pastoris* não possui um sistema de recombinação tão adequado para essa aplicação e precisa de grandes sequências para promover a recombinação, foi escolhido o sistema Cre-loxP para a retirada da marca de seleção.

Para a deleção do gene *URA5*, foram utilizadas sequências *upstream* e *downstream* de 1,2 e 1 kb na a construção do cassete de deleção, pois são recomendadas sequências mais longas para a promoção da recombinação homóloga neste *locus*. (NETT; GERNGROSS, 2003). O cassete para deleção do gene *URA5* foi construído mas, após transformação da linhagem LA2, nenhum clone obtido foi capaz de crescer em meio com 5-FOA. Outros clones transformantes estão sendo analisados neste momento.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise das linhagens de *P. pastoris* X-33 e LA1 mostrou que a deleção da ORF PAS\_chr3\_0283 levou à criação de uma linhagem (LA1) adequada fisiologicamente para a utilização da marca *amdS*, eliminando os transformantes falsos positivos. Desta forma, esse trabalho mostrou pela primeira vez que a ORF PAS\_chr3\_0283 está de alguma forma envolvida no metabolismo de acetamidase.

Os resultados obtidos na transformação de *P. pastoris* LA1 com o vetor pAMDS-EGFP mostraram que a marca de seleção *amdS* é aplicável nesta levedura. As células transformadas tornaram-se capazes de crescer em meio mínimo contendo acetamida como única fonte de nitrogênio tanto na utilização do vetor integrativo quanto no uso do cassete de deleção.

Foi mostrado que ao se deletar genes em *P. pastoris* é necessária a análise de um grande número de clones, pois a recombinação homóloga não é tão eficiente quanto em *S. cerevisiae*. É desejável, pois, a construção de linhagens mais adequadas para manipulação genética por meio de mutações (como a deleção do gene *KU70*) que levem à redução dos níveis de recombinação não-homóloga. Assim, a futura deleção de genes e construção de linhagens auxotróficas será facilitada.

Embora a deleção do gene *ADE2* tenha sido realizada com sucesso, a deleção de *URA5* será feita futuramente, para a obtenção de uma linhagem auxotrófica *ade2 ura5*. Esta linhagem será utilizada em projetos de biologia sintética de *P. pastoris* em nosso laboratório.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M. HIRZ, M.; PICHLES, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301-17, 2014.

AKADA, R. KITAGAWA, T.; KANEKO, S.; TOYONAGA, D.; ITO, S.; KAKIHARA, Y. PCR-mediated seamless gene deletion and marker recycling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 399–405, 2006.

ALANI, E.; CAO, L.; KLECKNER, N. A Method for Gene Disruption That Allows Repeated Use of URA3 Selection in the Construction of Multiply Disrupted Yeast Strains. **Genetics**, v. 116, p. 541–45, 1987.

ALDOUS, J. G.; ROZEE, K. R. The Effect of pH on the Toxicity of Fluoroacetic Acid. **Biochemistry Journal**, v. 62, n. 4, p. 605–10, 1956.

BETANCUR, M. O. **Desenvolvimento de linhagem auxotrófica de *Pichia pastoris* para o metabolismo de leucina**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2014.

BOEKE, J. D.; LACROUTE, F.; FINK, G. R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5' -phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 197, p. 345–46, 1984.

CEBOLLERO, E.; GONZALEZ, R. Comparison of Two Alternative Dominant Selectable Markers for Wine Yeast Transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7018–23, 2004.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 2000.

CHATTOO, B. B.; SHERMAN, F.; AZUBALIS, D. A.; FJELLSTEDT, T. A.; MEHNERT, D.; OGUR, M. Selection of lys2 mutants of the yeast *saccharomyces cerevisiae* by the utilization of  $\alpha$ -amino adipate. **Genetics**, v. 93, p. 51–65, 1979.

DE SCHUTTER, K. LIN, Y.; TIELS, P.; VAN HECKE, A.; GLINKA, S.; WEBER-LEHMANN, J.; ROUZÉ, P.; VAN DE PEER, Y.; CALLEWAERT, N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 561–6, 2009.

DELNERI, D. TOMLIN, G. C.; WIXON, J. L.; HUTTER, A.; SEFTON, M.; LOUIS, E. J.; OLIVER, S. G. Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the cre-loxP system. **Gene**, v. 252, n. 1-2, p. 127–35, 2000.

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. 32–7, 2012.

GEDVILAITE, A.; SASNAUSKAS, K. Control of the expression of the *ADE2* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 25, p. 475–479, 1994.

GOFIEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 5287, Genome Issue, p. 563–67, 1996.

GOMI, K.; KITAMOTO, K.; KUMAGAI, C. Transformation of the Industrial Strain of *Aspergillus oryzae* with the homologous *amdS* Gene as a Dominant Selectable Marker. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, n. 6, p. 389–91, 1992.

GOPAL, C. V.; BROAD, D.; LLOYD, D. Bioenergetic consequences of protein overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 160–65, 1989.

GUELDENER, U. HEINISCH, J.; KOEHLER, G. J.; VOSS, D.; HEGEMANN, J. H. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, 2002.

HARTNER, F. S. RUTH, C.; LANGENEGGER, D.; JOHNSON, S. N.; HYKA, P.; LIN-CEREGHINO, G. P.; LIN-CEREGHINO, J.; KOVAR, K.; CREGG, J. M.; GLIEDER, A. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 12, 2008.

KANDA, K. ISHIDA, T.; HIROTA, R.; ONO, S.; MOTOMURA, K.; IKEDA, T.; KITAMURA, K.; KURODA, A. Application of a phosphite dehydrogenase gene as a novel dominant selection marker for yeasts. **Journal of Biotechnology**, v. 182-183, p. 68–73, 2014.

KIM, H.; YOO, S. J.; KANG, H. A. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. **FEMS Yeast Research**, v. 15, p. 1–16, 2015.

KOBAYASHI, M. FUJIWARA, Y.; GODA, M.; KOMEDA, H.; SHIMIZU, S. Identification of active sites in amidase: Evolutionary relationship between amide-bond and peptide bond-cleaving enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 11986–91, 1997.

KURTZMAN, C. P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 973–6, 2005.

LAMBERT, J. M.; BONGERS, R. S.; KLEEREBEZEM, M. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 1126–35, 2007.

LEE, G.; SAITO, I. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. **Gene**, v. 216, p. 55–65, 1998.

LI, P. ANUMANTHAN, A.; GAO, X.; ILANGOVAN, K.; SUZARA, V. V.; DÜZGÜNEŞ, N.; RENUGOPALAKRISHNAN, V. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 2, p. 105–24, 2007.

LIACHKO, I. YOUNGBLOOD, R.; TSUI, K.; BUBB, K. L.; QUEITSCH, C.; RAGHURAMAN, M. K.; NISLOW, C.; BREWER, B. J.; DUNHAM, M. J. GC-rich DNA elements enable replication origin activity in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **PLoS genetics**, v. 10, n. 3, 2014.

LIACHKO, I.; DUNHAM, M. J. An autonomously replicating sequence for use in a wide range of budding yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 2, p. 364–67, 2014.

LIN, G. P.; LIN, J.; JAY, A.; JOHNSON, M. A.; LIM, M.; GLEESON, M. A. G.; CREGG, J. M. New selectable marker / auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 263, p. 159–169, 2001.

LOVE, K. R.; PANAGIOTOU, V.; JIANG, B.; STADHEIN, T. A.; LOVE, C. Integrated single-cell analysis shows *Pichia pastoris* secretes protein stochastically. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 2, p. 319–25, 2010.

NÄÄTSAARI, L. MISTLBERGER, B.; RUTH, C.; HAJEK, T.; HARTNER, F. S.; GLIEDER, A. Deletion of the *Pichia pastoris* *KU70* homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. **PloS one**, v. 7, n. 6, 2012.

NAGY, A. Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. **Genesis**, v. 109, p. 99–109, 2000.

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. 1279–90, 2003.

OGATA, T.; OKUMURA, Y.; TADENUMA, M.; TAMURA, G. Improving transformation method for industrial yeasts: Construction of ADH1-APT2 gene and using electroporation. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 285–94, 1993.

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. v. 68, n. 5, p. 2095–2100, 2002.

PUIG, S.; RAMON, D.; PEREZ-ORTIN, J. E. Optimized Method To Obtain Stable Food-Safe Recombinant Wine Yeast Strains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 1689–93, 1998.

RANDO, O. J.; WINSTON, F. Chromatin and transcription in yeast. **Genetics**, v. 190, n. 2, p. 351–87, 2012.

READ, J. D.; COLUSSI, P.; GANATRA, M.; TARON, C. H. Acetamide selection of *Kluyveromyces lactis* cells transformed with an integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5088–96, 2007.

REIS, V. C. B.; NICOLA, A. M.; NETO, O.; BATISTA, V. D. F.; MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 11, p. 1673–83, 2012.

ROTHSTEIN, R. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: Integrative DNA transformation in Yeast. **Methods in Enzymology**, v. 194, p. 281–301, 1991.

SAUER, B. Functional Expression of the cre-lox Site-Specific Recombination System in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 6, p. 2087–2096, 1987.

SAUER, B.; HENDERSON, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 85, p. 5166–70, 1988.

SCHERER, S.; DAVIS, R. W. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 10, p. 4951–55, 1979.

SHAO, Z.; ZHAO, H.; ZHAO, H. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 2, 2009.

SOLIS-ESCALANTE, D.; KUIJPERS, N. G.; BONGAERTS, N.; BOLAT, I.; BOSMAN, L.; PRONK, J. T.; DARAN, J.; DARAN-LAPUJADE, P. amdSYM, a new dominant recyclable marker cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 1, p. 126–39, fev. 2013.

SREEKRISHNA, TSCHOPPB, J. F.; Invertase gene (*SUC2*) of *Saccharomyces cerevisiae* as a dominant marker for transformation of *Pichia pastoris*. v. 59, p. 115–25, 1987.

SUNGA, A. J.; CREGG, J. M. The *Pichia pastoris* formaldehyde dehydrogenase gene (*FLD1*) as a marker for selection of multicopy expression strains of *P. pastoris*. **Gene**, v. 330, p. 39–47, 2004.

THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 711–21, 2005.

THOR, D.; XIONG, S.; ORAZEM, C. C.; KWAN, A.; CREGG, J. M.; LIN-CEREGHINO, J.; LIN-CEREGHINO, G. P. Cloning and characterization of the *Pichia pastoris* *MET2* gene as a selectable marker. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 10, p. 935–42, 2005.

TOYN, J. H.; GUNYUZLU, P. L.; WHITE, W. H.; THOMPSON, L. A.; HOLLIS, G. F. A counterselection for the tryptophan pathway in yeast: 5-fluoroanthranilic acid resistance. **Yeast**, v. 16, p. 553–60, 2000.

UGOLINI, S.; BRUSCHI, C. V. The red/white colony color assay in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: epistatic growth advantage of white *ade8-18, ade2* cells over red *ade2* cells. **Current Genetics**, v. 30, n. 6, p. 485–92, 1996.

VAN OUYEN, A. J. J. DEKKER, P.; HUANG, M.; OLSTHOORN, M. M.; JACOBS, D.; COLUSSI, P.; TARON, C. H. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 3, p. 381–92, 2006.

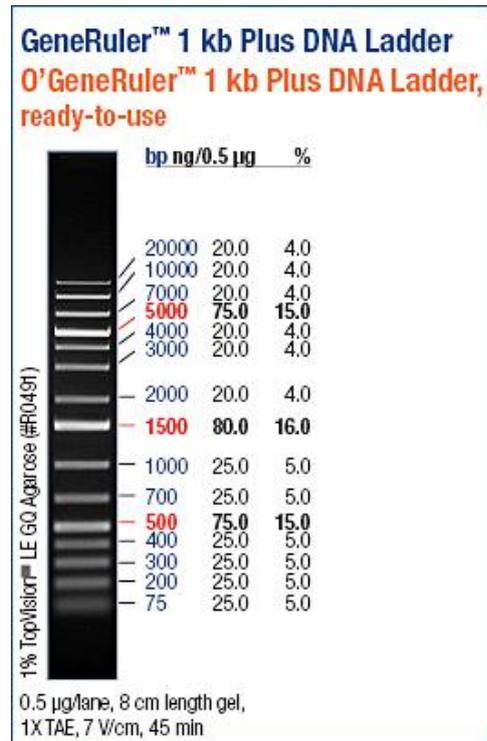
VOGL, T.; HARTNER, F. S.; GLIEDER, A. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 1–8, 2013.

WAKI, T. I.; AKEGAWA, K. T. A Set of loxP Marker Cassettes for Cre-mediated Multiple Gene Disruption in *Schizosaccharomyces pombe*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 3, p. 545–50, 2004.

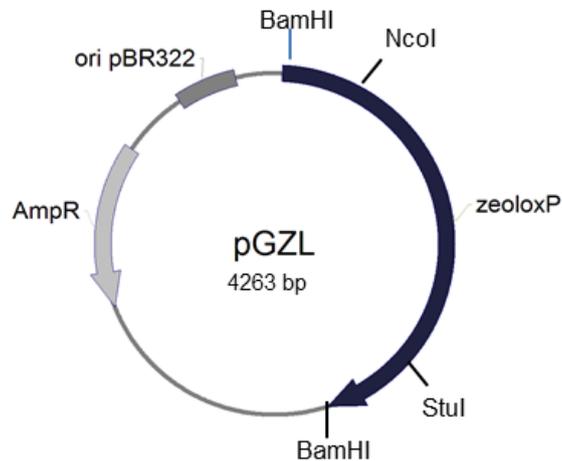
YANG, J.; JIANG, W.; YANG, S. *mazF* as a counter-selectable marker for unmarked genetic modification of *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 4, p. 600–9, 2009.

ZHU, T. GUO, M.; ZHUANG, Y.; CHU, J.; ZHANG, S. Understanding the effect of foreign gene dosage on the physiology of *Pichia pastoris* by transcriptional analysis of key genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 1127–35, fev. 2011.

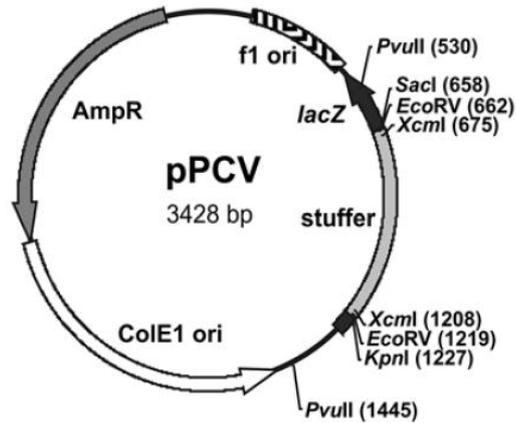
## 8 ANEXOS



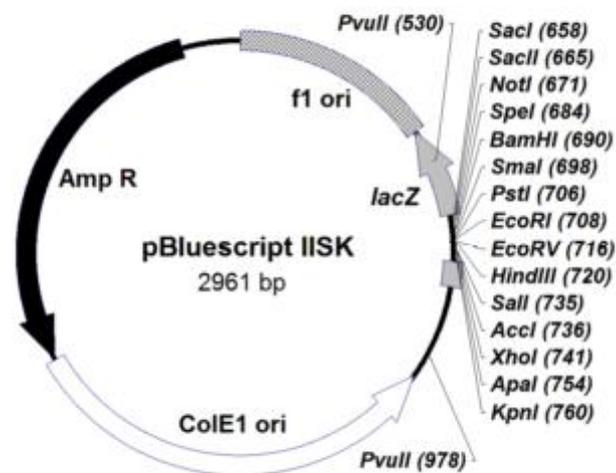
**Anexo 1. Marcador Gene Ruler 1 Kb Plus (Thermo Scientific).** Padrão de tamanho dos fragmentos.



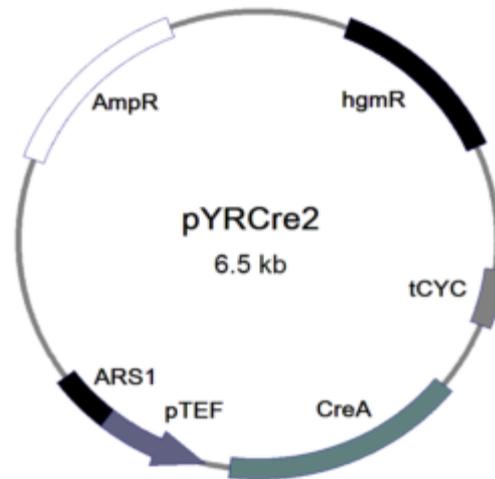
**Anexo 2. Mapa físico do vetor pGZL.** Este vetor é derivado do plasmídeo comercial pGEM®-T e possui o gene *Sh ble*, promotores *TEF1* e *EM7* e terminador *CYC1*, além das sequências de resistência a ampicilina e origem de replicação de *E. coli* (pBR322) (REIS et al., 2012).



**Anexo 3. Mapa físico do vetor de clonagem pPCV.** O vetor possui a origem de replicação ColE1ori, resistência a ampicilina (AmpR), gene repórter *lacZ* e sítios de clonagem nas extremidades de um DNA espaçador. Figura extraída de JANNER et al., 2012.



**Anexo 4. Mapa físico do vetor de clonagem pBluescript II SK+ (Stratagene).** Este vetor possui origem de replicação (ColE1ori), marca de resistência a ampicilina (Amp<sup>R</sup>), gene repórter *lacZ* e sítios de clonagem múltiplos.



**Anexo 5. Mapa físico do vetor pYRCre2.** O vetor possui o gene da recombinase CreA sob controle do promotor *TEF1* e terminador *CYC1*, assim como as marcas de resistência a higromicina B ( $hgm^R$ ) e ampicilina ( $Amp^R$ ). Possui também uma origem de replicação de *P. pastoris*, ARS1 Figura extraída de BETANCUR, 2014.