



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

Construção de um vetor para expressão heteróloga em *Pichia pastoris*

Vinícius Daniel Ferreira Batista

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Brasília, abril de 2012

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

***Construção de um vetor para expressão heteróloga em
Pichia pastoris***

VINÍCIUS DANIEL FERREIRA BATISTA

*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.*

Orientador: Prof. Fernando Araripe G. Torres

Brasília, abril de 2012

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

Banca Examinadora

Professor Fernando Araripe G. Torres

Universidade de Brasília

Presidente da Banca

Professora Nádia Skorupa Parachin

Universidade Católica de Brasília

Examinadora Externa

Professora Elida Campos

Universidade de Brasília

Examinadora Interna

Professora Lidia Maria Pepe de Moraes

Universidade de Brasília

Membro Suplente

Dedico esta conquista à minha família, em especial aos meus pais
pelo amor, liberdade, apoio e por terem me mostrado o caminho,
repleto de sonhos e esperanças.

Agradecimentos

À Viviane Reis, presente desde a graduação, disposta a ensinar e tirar dúvidas. Um verdadeiro exemplo de pesquisadora, amiga e ser humano. Obrigado Vívís por tamanha competência, que espero um dia alcançar e retribuir.

Ao professor Fernando Araripe, pelas oportunidades, ensinamentos, paciência e tempo despendido para a realização desse trabalho.

A toda minha família, pais, irmãos, primos, tios e avós. Que participaram de todo o meu desenvolvimento e caminhada. Muito mais que laços sanguíneos, temos laços afetivos. Obrigado pelos conselhos, momentos de descontração e por terem me acolhido quando necessário.

À minha namorada Paula, pelo carinho, amor e ajuda. Pelo apoio e confiança incondicionais, por toda a história que passamos e a que virá.

Ao grande amigo Raphael, parceiro de luta. Obrigado por todos os momentos de estudo e por tornar a escrita desse trabalho muito mais agradável.

À amiga Gisele, pela importante participação neste trabalho, com boa vontade em todos os momentos.

A todos os colegas com quem convivi esses anos no laboratório Biomol em especial aos colegas de bancada do Lab. 2: Ana Lívia, Andrelisse, Betúlia, Bruno, Carolina, Fernanda, Prof^a Janice, Juliana, Osmar, Paula, Talita, Theyssa, Thiago.

Aos funcionários da Biomol , Ivonildes (violência), Fátima, Thompson e Fernanda, por tamanha competência e amizade que facilitaram em muito a execução deste trabalho.

À todos os professores que participaram da minha formação, pelos conhecimentos, incentivos e broncas.

À direção do C.E.F. 404 de Samambaia e colegas professores, pela compressão e apoio.

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

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

Ao CNPq e à FAP-DF pelo apoio financeiro.

A Deus pela minha vida e oportunidades que me foram concedidas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégia para construção do vetor integrativo multicópia.	23
Figura 2: Sequência primária e tradução conceptual do amplicon contendo o gene <i>kan^R</i>	32
Figura 3: Análise eletroforética da amplificação do gene <i>kan^R</i> ..	33
Figura 4: Análise eletroforética do perfil de restrição da clonagem do gene <i>kan^R</i> em pBluescript II KS..	34
Figura 5: Desenho esquemático do vetor pPICK α	35
Figura 6: Análise eletroforética da amplificação do gene <i>kan^R</i> a partir de DNA genômico de <i>P. pastoris</i> transformada..	36
Figura 7: Sequência do cassete <i>PGK1::Fator α</i>	37
Figura 8: Análise eletroforética da amplificação do promotor P _{PGK1} e do fator α de acasalamento.....	39
Figura 9: Análise eletroforética do perfil de restrição da clonagem do cassete <i>PGK1::Fator α</i> no vetor pPCV-B..	40
Figura 10: Desenho esquemático do vetor pPICK α PRO.....	41
Figura 11: Análise eletroforética do perfil de restrição da clonagem do gene da pró-quimosina B no vetor pPICK α PRO..	43
Figura 12: Desenho esquemático do vetor pPICKCHIM.....	44
Figura 13: Sequência predita do alelo <i>leu2-d</i> isolado por PCR.	47
Figura 14: Análise eletroforética do perfil de restrição da clonagem do gene <i>leu2-d</i> no vetor pBluescript II KS..	48
Figura 15: Análise Eletroforética do perfil de restrição da clonagem do gene <i>leu2-d</i> no vetor pBluescript II KS.	48

Figura 16: Análise Eletroforética do perfil de restrição da clonagem do gene <i>leu2-d</i> no vetor Yeplac195.....	49
Figura 17: Estratégia para deleção do gene <i>LEU2</i> de <i>P. pastoris</i>	51
Figura 18: Sequência do <i>locus LEU2</i> de <i>P. pastoris</i>	52
Figura 19: Análise eletroforética da amplificação da sequência 5' <i>LEU2</i> e da sequência 3' <i>LEU2</i>	53
Figura 20: Análise eletroforética da amplificação da sequência ZEOloxP.....	54
Figura 21: Análise Eletroforética do perfil de restrição da clonagem do fragmento 5' <i>LEU2</i> no vetor pPCV-B.....	55
Figura 22: Análise Eletroforética do perfil de restrição da clonagem do fragmento 3' <i>LEU2</i> no vetor pPCV-B.....	55
Figura 23: Análise Eletroforética do perfil de restrição da clonagem do cassete ZEOloxP no vetor pPCV-BZeolox.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens mais utilizadas de <i>P. pastoris</i>	2
Tabela 2: Sequência dos <i>primers</i> usados neste trabalho	14

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Pichia pastoris</i>	1
1.2	Promotores de <i>P. pastoris</i>	2
1.3	Marcas de seleção	4
1.4	Vetores de expressão	5
1.5	Integração de multicópias do vetor	6
2	JUSTIFICATIVA	10
3	OBJETIVOS	11
3.1	Objetivo Geral	11
3.2	Objetivos Específicos:	11
4	MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1	Material	12
4.1.1	Microrganismos	12
4.1.2	Vetores	13
4.1.3	<i>Primers</i>	13
4.1.4	Tampões e soluções	14
4.1.5	Marcadores de massa molecular para DNA	18
4.1.6	Meio de cultura	18
4.2	Métodos	22
4.2.1	Desenho Experimental	22
4.2.2	Cultivo de microrganismos	23

4.2.3	Preparação de células bacterianas competentes.....	24
4.2.4	Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	24
4.2.5	Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)	25
4.2.6	Preparação de DNA plasmidial em média escala (midiprep).....	26
4.2.7	Digestão de DNA com enzimas de restrição	26
4.2.8	Precipitação de DNA	26
4.2.9	Análise eletroforética de DNA	26
4.2.10	Sistema de ligação	27
4.2.11	Eluição de fragmentos de DNA.....	27
4.2.12	Purificação e clonagem dos produtos de PCR.....	27
4.2.13	Transformação em <i>P. pastoris</i>	28
4.2.15	Expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i> e teste de atividade	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Construção de vetor com marca dominante <i>kan^R</i>	31
5.2	Construção de vetor com marca auxotrófica <i>leu2-d</i>	46
5.2.1	Clonagem do alelo <i>leu2-d</i>	46
5.2.2	Construção de linhagem auxotrófica para leucina.....	50
6	CONCLUSÃO	58
7	PERPECTIVAS	59

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A	adenina
<i>AOXI</i>	gene que codifica para a álcool oxidase 1
BMGY	meio complexo tamponado com glicerol
C	citossina
cm	centímetro
kDa	quilodalton
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etileno-diamino-tetra-acético
G	guanina
g	grama
<i>g</i>	força gravitacional
GAP	gene que codifica para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h	hora
His	histidina
<i>HIS4</i>	gene que codifica para a histidinol desidrogenase
kb	quilobase

L	litro
LB	Luria-Bertani
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
OD ₆₀₀	densidade celular óptica a 600 nm
pb	par de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
p/v	peso por volume
PS	peptídeo-sinal
rDNA	DNA ribossomal
RNase A	ribonuclease A
rRNA	RNA ribossomal
rpm	rotações por minuto

s	segundo
SDS	dodecil-sulfato de sódio
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
U	unidade
v	volume
V	volts
YNB	yeast nitrogen base
°C	graus Celsius
μF	microfaraday
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
Ω	ohm

RESUMO

O sistema de expressão *Pichia pastoris* tem sido utilizado com sucesso na produção de uma grande variedade de proteínas heterólogas. Esta levedura reúne características como fácil manipulação molecular, crescimento celular rápido, capacidade de realizar modificações pós-traducionais e secreção eficiente de proteínas, além de atingir altas densidades celulares com grande produção da proteína heteróloga. O objetivo deste estudo foi construir um vetor de expressão em *P. pastoris* para produção de proteína heteróloga, reunindo elementos genéticos que possibilitem a seleção de transformantes com multicópias integradas, buscando aumentar o nível de expressão. Nesse sentido, foi utilizado o vetor comercial pPICZ α A (Invitrogen) que teve seu gene de resistência *Sh ble* substituído pelo gene *kan^R*, derivado do transposon Tn 903, alterando a resistência ao antibiótico zeocina para o antibiótico G418. Elevadas concentrações deste antibiótico podem ser utilizadas para a seleção de clones com alto número de cópias integradas. Após troca da marca de seleção, foram clonados no vetor um promotor do gene constitutivo glicolítico *PGK1* (P_{PGK1}) de *P. pastoris*, um sinal de secreção fator α de acasalamento de *Saccharomyces cerevisiae* - com códons otimizados para *P. pastoris* - e um novo sítio múltiplo de clonagem. Para analisar a capacidade de produzir uma proteína heteróloga, o gene da pró-quimosina B de *Bos taurus* foi clonado no vetor e mostrou-se capaz de coagular leite no teste de atividade. Novos elementos genéticos podem ser clonados no vetor a fim de aumentar a frequência de integração genômica, como uma porção repetitiva do DNA de *P. pastoris* - que servirá como alvo da integração - e o gene defeutivo *leu2-d* de *S. cerevisiae* para uso de marca auxotrófica.

ABSTRACT

The *Pichia pastoris* expression system has been successfully used in the production of a wide variety of heterologous proteins. This yeast combines characteristics such as easy molecular handling, rapid cell growth, capacity to carry out post-translational modifications and efficient secretion. In addition, it can achieve high cell densities with high production of the heterologous protein. The aim of this study was to create a new *P. pastoris* vector using genetic elements that allow the selection of multicopy transformants aiming to increase heterologous expression. We used the commercial vector pPICZ α A (Invitrogen) as a platform to replace the native *Sh ble* gene by *kan^R*, derived from transposon Tn5, and, thus, changing antibiotic resistance from zeocin to G418. High concentrations of the former antibiotic can be used to select clones with high number of integrated copies. Next, we cloned the promoter of the constitutive glycolytic gene *PGK1* (P_{PGK1}) from *P. pastoris*, the α mating factor signal sequence of *Saccharomyces cerevisiae* - with codons optimized for *P. pastoris* - and a new multiple cloning site. To analyze the ability to produce a heterologous protein, the bovine chymosin B was cloned and successfully secreted as judged by milk coagulating test. Furthermore, we began the construction of a new vector based on the auxotrophic *leu-2d* marker from *S. cerevisiae* which should enable the selection of multiple events of integration in the genome of a *LEU2*-null strain of *P. pastoris*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica, isto é, capaz de crescer em metanol como única fonte de carbono. É largamente utilizada para produção de proteínas heterólogas devido a algumas características importantes como: crescimento em altas densidades celulares (>130 g/L de peso seco), existência de um promotor forte e altamente controlado pela presença de metanol, genética molecular semelhante a *Saccharomyces cerevisiae*, capacidade de realizar modificações pós-traducionais como glicosilação e fosforilação, além de produção da proteína recombinante na forma solúvel (CREGG *et al*, 2000; DALY & HEARN, 2005).

Existem diversas linhagens de *P. pastoris* o que permite escolher um fenótipo adequado para cada aplicação (**Tabela 1**). A linhagem SMD1168, por exemplo, é deficiente para as proteases carboxipeptidase Y e protease B1. Estas características são particularmente importantes, pois proteases são responsáveis, em alguns casos, pela degradação das proteínas heterólogas. As linhagens KM71, GS115 e a própria SMD1168 são mutantes para o gene histidina desidrogenase (*HIS4*), gerando o fenótipo His⁻, o que propicia o uso de vetores contendo este gene para transformação e seleção de clones por complementação auxotrófica em meio sem histidina. Algumas linhagens, como SMD1165, SMD1168 e GS115, apresentam a capacidade de utilizar metanol como a linhagem selvagem X-33, fenótipo este chamado de Mut⁺. Já a linhagem MC100-3 não possui os genes que codificam para as enzimas álcool oxidase 1 (*AOX1*) e álcool oxidase 2 (*AOX2*) em suas formas funcionais o que resulta em um fenótipo conhecido com Mut⁻ (DALY & HEARN, 2005).

Tabela 1: Linhagens mais utilizadas de *P. pastoris*.

Linhagem	Genótipo	Fenótipo
X-33	selvagem	selvagem
GS115	<i>his4</i>	Mut ⁺ , His ⁻
KM71	<i>his4, aox1::ARG4 arg4</i>	Mut ^s , His ⁻
SMD1165	<i>his4, prb1</i>	Mut ⁺ , His ⁻ , protease deficiente
SMD1168	<i>His4, pep4</i>	Mut ⁺ , His ⁻ , pep4 ⁻
MC100-3	<i>arg4 his4 aox1::ARG4 aox2::his4</i>	Mut ⁻ , His ⁻

1.2 Promotores de *P. pastoris*

P. pastoris possui vários promotores disponíveis, tanto constitutivos como induzíveis: P_{AOX1}, P_{AOX2}, P_{FLD1}, P_{DAS}, P_{PEX8}, P_{YPT1}, P_{GAP}, P_{TEF1}, P_{PGK1}, P_{ICL1} (HARTNER *et al*, 2008). Apesar da grande disponibilidade de promotores, os principais sistemas de expressão de *P. pastoris* são baseados no promotor P_{AOX1} do gene *AOX1* que codifica a enzima álcool oxidase 1 (AHN *et al*, 2007). Esta enzima catalisa o primeiro passo da via de oxidação de metanol na qual este álcool é convertido a formaldeído. O uso do promotor P_{AOX1} é amplamente difundido para a expressão de proteínas heterólogas por ser altamente regulado e induzido por metanol (CREGG *et al*, 2000).

A regulação do promotor P_{AOX1} ocorre tanto pela presença de metanol como pela ausência de outra fonte de carbono como glicose, glicerol ou etanol. A transcrição de sua proteína é fortemente reprimida na presença de glicose e, em menor grau, na presença de glicerol ou etanol. Na ausência de fontes de carbono ocorre uma leve desrepressão da transcrição. Já na presença de metanol, ocorre uma forte indução da transcrição. O controle sobre a indução do P_{AOX1} permite a produção regulada de proteínas heterólogas, mesmo que

sejam tóxicas para a célula. O controle da expressão aliado à sua força são os principais motivos de tamanha notoriedade deste promotor (HARTNER *et al*, 2008).

A utilização do promotor P_{AOX1} para expressão de proteínas heterólogas apresenta também algumas desvantagens ou restrições relacionadas ao uso do metanol como: toxicidade em determinadas concentrações; difícil monitoramento e controle da concentração de metanol em fermentações de pequeno porte devido à sua rápida evaporação; necessidade de troca das fontes de carbono durante a fermentação entre a etapa de crescimento (glicerol) e a de indução (metanol); é inadequado para produção de certos alimentos, pois este geralmente é derivado de fontes petroquímicas; risco gerado pelo armazenamento de grandes quantidades de metanol em indústrias produtoras de proteínas heterólogas. (PATRICK *et al*, 2005; AHN *et al*, 2007).

Promotores constitutivos representam uma alternativa para o promotor P_{AOX1} quando a proteína não é tóxica. Por exemplo, o promotor do gene codificador da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (P_{GAP}) é fortemente ativo na presença de glicose. O P_{GAP} possui a vantagem de poder ser usado na ausência de metanol (utilizado como indutor), além de não necessitar de troca da fonte de carbono, o que barateia o custo e torna o processo menos trabalhoso (CEREGHINO & CREGG, 2000). Outro promotor constitutivo de *P. pastoris* é aquele que controla a expressão do fator 1- α de alongação da tradução (P_{TEF1}), com força comparável ao P_{GAP} em alguns sistemas de expressão. Este promotor mantém o mesmo nível de expressão, tanto em um ambiente com alta, quanto em um ambiente com baixa concentração da fonte de carbono (AHN *et al*, 2007).

Estudos realizados por Almeida *et al* (2005) demonstraram que o promotor constitutivo do gene da 3-fosfoglicerato quinase (P_{PGK1}) proporcionou elevada expressão quando utilizado para dirigir a expressão da α -amilase de *Bacillus subtilis* em três distintas fontes de carbono. O nível mais elevado de expressão ocorreu em meio de cultura contendo

glicose como fonte de carbono, seguido glicerol e metanol. Este promotor é uma alternativa na expressão de proteínas heterólogas que não possuam toxicidade para a célula.

1.3 Marcas de seleção

A manipulação de *P. pastoris* envolve técnicas de genética molecular bem desenvolvidas. A seleção de transformantes é feita tanto pelo uso de marcas auxotróficas como marcas dominantes, todavia, existe um número limitado de marcas de seleção disponíveis para os vetores de *P. pastoris* (CEREGHINO & CREGG, 2000). Plasmídeos contendo marca de seleção auxotrófica devem conter um alelo do tipo selvagem, permitindo assim o restabelecimento de determinada via biossintética após transformação. Alguns exemplos de genes utilizados como marca auxotrófica em *P. pastoris* são: *HIS4* (histidinol desidrogenase), *ADE2* (PR-aminoimidazolsuccino-carboxamida sintase), *ARG4* (argininosuccinato liase) e *URA3* (orotidine-5'-fosfato decarboxilase). Quando vetores que contenham marcas auxotróficas são usados, deve-se escolher uma linhagem com fenótipo apropriado, por exemplo, a linhagem SMD1168 deve ser transformada com plasmídeo que contenha o alelo *HIS4* para restabelecer o fenótipo His⁺ (CEREGHINO *et al*, 2001).

Marcas de seleção dominantes geralmente estão relacionadas a genes que conferem resistência a determinadas drogas. Os genes mais comumente utilizados como marcas dominantes em leveduras são: *Sh ble*, blasticidina S e *kan^R* que conferem resistência às drogas zeocina, blasticidina e kanamicina/G418, respectivamente. (PATRICK *et al*, 2005; PAPAKONSTANTINO *et al*, 2009).

1.4 Vetores de expressão

Um típico vetor de expressão para *P. pastoris* deve possuir a capacidade de se propagar tanto em *E. coli* (utilizada na construção do cassete de expressão) como em *P. pastoris*. Dentre as características presentes nestes vetores destacam-se: marcas de seleção funcionais tanto para *E. coli* como para *P. pastoris*, uma origem de replicação bacteriana, um promotor que dirija a expressão da proteína heteróloga, um terminador que proporcione uma eficiente terminação da transcrição, um sítio múltiplo de clonagem para inserção do gene e um sinal de secreção para a proteína heteróloga (CEREGHINO & CREGG, 2000).

Um dos vetores mais utilizados para manipulação genética de *P. pastoris* é o pPIC9 (Invitrogen®), que apresenta o gene *HIS4* utilizado como marca de seleção de transformantes. Este vetor também contém gene de resistência a ampicilina (para seleção em *E. coli*) além do promotor induzível P_{AOX1}. A partir do vetor pPIC9 foi desenvolvido o vetor pPIC9K (Invitrogen®), adicionando-se o gene que confere resistência a kanamicina (em procariotos) ou ao seu análogo G418 (em eucariotos). A adição desta nova marca de seleção permite que os transformantes prototróficos His⁺ sejam selecionados também em meio contendo G418. Essa marca permite a seleção em diferentes níveis de concentração da droga o que permite selecionar transformantes que possuam múltiplas cópias do vetor, o que pode favorecer a obtenção de altos níveis de expressão (DALY & HEARN, 2005).

Os vetores pPIC9 e pPIC9K possuem tamanhos de 8,0 e 9,3 kb, respectivamente. Vetores com esse tamanho ou maiores apresentam alguns problemas como dificuldade nos passos de clonagem *in vitro* (SEARS *et al*, 1998) e diminuição na estabilidade de sequências integradas (ROMANOS *et al*, 1992).

A fim de aumentar a eficiência de transformação foram desenvolvidos vetores de menor tamanho. Para tal, foram feitas algumas mudanças como: substituição do gene de

resistência a G418 pelo gene *Sh ble* cujo produto confere resistência a zeocina; retirada da região 3' do gene *AOX1*, e retirada do gene *HIS4*, tendo em vista que sua utilização não propicia a seleção de multicópias integradas. O conjunto destas mudanças gerou vetores que possuem tamanhos entre 3,3 e 3,6 kb. Um exemplo desta série é o vetor pPICZ α (Invitrogen®) (DALY & HEARN, 2005).

Os vetores da série pPICZ α (Invitrogen®) possuem alguns elementos que favorecem a expressão heteróloga de proteínas como: sequência do promotor *AOX1*, induzível por metanol; sequência com múltiplos sítios de clonagem para inserção do gene de interesse; sinal de secreção do fator α de acasalamento de *S. cerevisiae* que direciona a secreção da proteína recombinante; marca de resistência a zeocina (*Sh ble*) sob o comando dos promotores *TEF1* e *EM7* – para levedura e bactéria, respectivamente – permitindo a seleção de transformantes multicópia em *P. pastoris*; origem de replicação para propagação do plasmídeo em *E. coli*; região terminadora da transcrição do gene *AOX1*, que permite um processamento eficiente do mRNA para aumento de sua estabilidade; e peptídeo C-terminal que contém epítopo para o anticorpo anti-*myc* e uma cauda His_{6x}. Estes últimos elementos podem ser utilizados para detecção e/ou purificação da proteína recombinante, desde que estejam na mesma fase de leitura do gene heterólogo.

1.5 Integração de multicópias do vetor

A transformação genética de *P. pastoris* ocorre por integração no genoma por recombinação homóloga (CEREGHINO & CREGG, 2000). O número de cópias integradas dos vetores de expressão afeta a produtividade da proteína, podendo ser um dos pontos determinantes da produção. Um alto número de cópias do gene heterólogo pode levar a um

aumento na produção da proteína heteróloga, o que desperta o interesse na geração de transformantes com multicópias integradas no genoma da levedura (ROMANOS, 1995).

Dentre as estratégias utilizadas para produção de clones contendo multicópias integradas encontram-se, uso de técnicas de transformação com esferoplastos, a construção de múltiplos dos cassetes de expressão *in vitro*, a seleção de transformantes em altas concentrações de antibiótico, a amplificação pós-transformacional do vetor, a integração direcionada para *loci* de DNA repetitivo, como o rDNA, a utilização de marcas auxotróficas com genes defectivos, além da seleção com substâncias inibidoras de determinada via metabólica, como o 3-amino-1,2,4 triazol (3-AT).

A transformação via esferoplastos gera transformantes com número de cópias variáveis sendo pequena a proporção de clones com alto número, o que requer a busca de muitos clones para identificar transformantes que possuam alto número de cópias integradas (CLARE *et al*, 1991).

A transformação com múltiplos envolve a clonagem de várias cópias do cassete de expressão no mesmo vetor. Todavia, o tamanho desses vetores é aumentado pelas várias cópias do cassete de expressão, tornando-os geneticamente instáveis (DALY & HEARN, 2005). Além disso, a construção desse tipo de vetor é trabalhosa e seus resultados são limitados, mesmo que sejam feitas várias transformações do cassete de expressão utilizando diferentes marcadores de seleção (MARX *et al*, 2009).

Transformantes que apresentam integração de multicópias podem ser encontrados a partir de seleção em altas concentrações de antibióticos, pois a resistência a altas concentrações de antibiótico pode estar relacionada a um alto número de cópias do gene de resistência. Com isso colônias resistentes a altos níveis da droga tendem a possuir um maior número de cópias do vetor integrado. Este método é eficaz, mas é trabalhoso e menos de 5%

das colônias resistentes a altas quantidades da droga possui alto número de cópias do vetor integrado. Essa quantidade se reduz a 1-2% para colônias que apresentam mais de 10 vetores integrados. A grande maioria das colônias apresenta essa resistência por razões ainda desconhecidas (ROMANOS *et al*, 1998).

SUNGA *et al* (2008) descreveram uma maneira para aumentar o número de cópias do vetor em *P. pastoris* após a transformação. Esse método é conhecido como *Post-Translational Vector Amplification* (PTVA) e consiste em selecionar, inicialmente, transformantes em baixas concentrações de antibiótico como, por exemplo, zeocina ou G418. Colônias isoladas são, então, semeadas em placas com maiores concentrações de antibiótico. Este gradiente permite a seleção de transformantes que sofreram amplificação do número de cópias do vetor. O método PTVA gera uma grande quantidade de transformantes com multicópias integradas do vetor. A proporção de transformantes que possui 10 ou mais cópias do vetor integrado é de 6%.

As sequências rDNA presentes no genoma podem ser utilizadas nas estratégias de integração de multicópias de *P. pastoris* pois encontram-se em grande número de cópias permitindo, assim, maior um maior número de eventos de integração. MARX *et al* (2009) descreveram a utilização dessas sequências, juntamente com o método PTVA. O cassete de expressão teve como alvo o espaço intergênico não-transcrito (do inglês NTS) presente entre as repetições *in tandem* da sequência que codifica os rRNA 28S, 5.8S e 18S. A sequência NTS foi escolhida para que, mesmo com um grande número de cópias integradas no DNA, nenhum gene fosse comprometido. A sequência NTS foi inserida no vetor, de forma que este tenha como alvo de integração o *locus* do rDNA. Após transformação, seleções em níveis crescentes de antibiótico foram realizadas, levando a um aumento no número de cópias do vetor com conseqüente aumento da produção da proteína heteróloga.

Marcas auxotróficas também podem ser utilizadas para produção de transformantes com alto número de cópias integradas. O método utiliza alelos defectivos, que possuem baixos níveis de expressão e por isso necessitam estar em grande número de cópias para que supram determinada carência nutricional. Um exemplo de gene defectivo é o gene *leu2-d* □ alelo do gene *LEU2* de *S. cerevisiae* □ que codifica para β-isopropilmalato desidrogenase (β-IPM), responsável por catalisar a terceira etapa da via de biossíntese do aminoácido leucina. O alelo *leu2-d* possui uma timina na posição 863 ao invés de uma citosina e uma deleção na região 5' que reduz o promotor a apenas 29 pb. Por causa dessa deleção, o alelo *leu2-d* só pode proporcionar o aparecimento de transformantes prototróficos quando em alto número de cópias, como ocorre quando se usa um plasmídeo epissomal (YE_p) (ERHART & HOLLENBERG, 1983).

Outro método de seleção de transformantes com multicópias integradas é baseado no uso da droga 3-AT, um inibidor da enzima codificada pelo gene *HIS3* (imidazol glicerol P-desidratase) que participa da via de biossíntese de histidina. Altas concentrações de 3-AT exigem um grande número de cópias do gene *HIS3* para seleção de transformantes de *P. pastoris* por complementação auxotrófica em meio sem histidina. Esse método pode permitir o isolamento de transformantes multicópia em apenas uma única etapa de seleção (MENÉNDEZ *et al*, 2000).

2 JUSTIFICATIVA

Nosso Grupo de Pesquisa utiliza há vários anos a levedura *P. pastoris* como plataforma para expressão de várias proteínas de interesse biotecnológico. Atualmente, os vetores de expressão mais utilizados em *Pichia* são patenteados pela empresa Invitrogen, o que implica no pagamento de licença de uso comercial a essa empresa em caso de comercialização das proteínas recombinantes produzidas a partir desse sistema. Esse fato motivou nosso Grupo a desenvolver novos vetores de expressão para *P. pastoris* com características inovadoras que permitissem aumentar os níveis de expressão da proteína heteróloga e reduzir os custos nas etapas de pesquisa e desenvolvimento.

Baseados nas semelhanças da genética molecular de *S. cerevisiae* e *P. pastoris* buscamos incorporar nos novos vetores algumas características genéticas que, quando combinadas, poderão levar a um incremento da produção de proteínas heterólogas. Dentre as características desejadas, destacamos o uso de uma marca de seleção dominante (*kan^R*) que confere resistência ao antibiótico G418. Como aspecto inovador do projeto, buscou-se também o uso de uma marca auxotrófica (*leu2-d*) que tem como vantagem adicional o fato de reduzir os custos dos meios de cultura para a produção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver vetores para a seleção de eventos de integração multicópia em *P. pastoris*.

3.2 Objetivos Específicos:

- a) Clonar no vetor gene *kan^R* que confere resistência a kanamicina/G418.
- b) Clonar no vetor o promotor constitutivo P_{PGK1} em substituição ao P_{AOX1}.
- c) Clonar no vetor uma sequência de secreção do fator α com códons otimizados para *P. pastoris*.
- d) Clonar no vetor o gene da pró-quimosina B de *B. taurus* e testar sua atividade.
- e) Construir cassette de deleção para o gene *LEU2* de *P. pastoris* e criar linhagem *leu2*.
- f) Clonar o alelo defectivo *leu2-d* de *S. cerevisiae*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Microrganismos

- *Escherichia coli*

DH5 α (Gibco BRL): F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *phoA supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1*

- *Pichia pastoris*

GS115 (Invitrogen®): *his4*

Esta linhagem possui um alelo mutante (*his4*) do gene que codifica para histidinol desidrogenase para permitir a seleção de transformantes por complementação auxotrófica em meio mínimo sem histidina.

X-33 (Invitrogen®)

Trata-se de uma linhagem isogênica a GS115 sendo prototrófica para o fenótipo His⁺. Utilizada para transformação com vetores que não possuem o gene *HIS4* como marca de seleção para evitar a necessidade de suplementação do meio com histidina.

- *Saccharomyces cerevisiae*

RE1006: *MATa can1-100 his3-his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52.*

4.1.2 Vetores

- **pGEM-T** (Anexo 1)

Vetor de clonagem de produtos de PCR, possui o tamanho de 3 kb (Promega®).

- **pPCV-B**

Vetor de clonagem de produtos de PCR construído em nosso Laboratório e derivado do vetor pBluescript II KS com um *polilinker* contendo sítios para EcoRV e XcmI.

- **pPICZ α A** (Anexo 2)

Vetor de expressão para *P. pastoris* (Invitrogen®).

- **YEplac195** (Anexo 3)

Vetor episomal de *S. cerevisiae*.

4.1.3 Primers

A **Tabela 2** relaciona os *primers* usados nesse trabalho

Tabela 2: Sequência dos primers usados neste trabalho.

Primer	Sequência	Sítio
Kan-F1	5'- <u>GCCATGGGCCATAT</u> TCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGC CGCGATTAATTC	NcoI
Kan-R1	5'-G <u>AGGCCTGGG</u> ACCCGTGGGCGCCGTCGGACGTGTTAGAA AAACTCATCGAGCA	StuI
PGK-D10	5'- <u>CAGATCT</u> GCGAGGCAAGCATCTACT	BglII
3PROPP-R	5'- <u>GTCGACGCGGCCG</u> CACTAGTCCCGGGGAATTCGGCTTCAGC TTCTCTTTCTC	SalI, NotI, SpeI, SmaI, EcoRI
5-leud	5'- <u>GAGATCT</u> ATATATATTTCAAGGATATACCATTCTAAG	BglII
3-leud	5'- <u>GAGATCT</u> GTTTCATGATTTTCTGTTACACC	BglII
PPLEU2-F1	5'- <u>CAGCTGA</u> AGAGTCCAAGTCCAAG	PvuII
PPLEU2-R1	5'- <u>TGGATCCG</u> GAGATATTATGTTGGTGAAAAGT	BamHI
PPLEU2-F2	5'- <u>TGGATCC</u> TTGAATTCGAAAGAAAACCTGTATAAACCTG	BamHI, EcoRI
PPLEU2-R2	5'- <u>CAGCTGG</u> TGCCATTGGTGGTACTG	PvuII
5PP-LOX	5'- <u>AGGATCC</u> ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT CCCACACACCATAGCTTCAAAA	BamHI
3PP-LOX	5'- <u>AGAATCC</u> ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT ACCTTCTCAAGCAAGGTTTTTCAG	EcoRI

Obs: Os sítios de restrição estão sublinhados.

4.1.4 Tampões e soluções

- Tampão TE20

Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
EDTA	20 mM
- Ampicilina (500x)

Ampicilina	50 mg/mL
------------	----------

Dissolvida em água e esterilizada por filtração.

- Brometo de Etídeo
EtBr 10 mg/mL
- Tampão TAE (50x)
Tris-Acetato 2 M
EDTA 0,05 M
pH 8,0
- Tampão de amostra para gel de agarose (10x)
TAE 20x 50 % (v/v)
Glicerol 30 % (v/v)
Azul de bromofenol 0,25 % (p/v)
- Tampão de transformação I
RbCl 12 g/L
MnCl₂·4H₂O 9,9 g/L
Acetato de potássio 30 ml de uma solução 1M pH 7,5
CaCl₂·2H₂O 1,5 g/L
Glicerol 150 g
Ajustar para pH 5,8 com ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtração em membrana de 0,22 µm.
- Tampão de transformação II
MOPS 20 mL de uma solução 1 M (pH 6,8)

RbCl 1,2 g/L

CaCl₂ 11 g/L

Glicerol 150 g

Ajustar pH do MOPS para 6,8 com NaOH. Esterilizar por filtração em membrana de 0,22 µm.

- Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)

Tris-HCl 18,2 g

Água destilada (q.s.p) 100 mL

O pH foi ajustado com HCl fumegante.

- Tris-HCl 1 M (pH 6,8)

Tris 12,1 g

Água destilada (q.s.p) 100 mL

O pH foi ajustado com HCl fumegante.

- SDS 10% (p/v)

SDS 10 g

Água destilada (q.s.p.) 100 mL

- Liticase

Liticase 20 mg/mL (p/v)

- Tampão de amostra 2X

Tris-HCl 1M (pH 6,8)	200 mM
SDS	4% (p/v)
β -Mercaptoetanol	4% (v/v)
Glicerol	20% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

- Solução SE

Sorbitol	0,9 M
EDTA	10 mM
pH 7,5	

- Tampão acetato de sódio 0,5 M (pH 5,5)

Acetato de sódio	41 g
Água destilada (q.s.p.)	1 L

*Corrigir o pH para 5,5 com ácido acético glacial.

- Solução I

Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM
Glicose	50 mM

- Solução II

NaOH	0,2 M
------	-------

SDS	1,0%
-----	------

* Preparar a solução no momento do uso

- Solução III

Acetato de potássio	3 M
---------------------	-----

Ácido acético	2 M
---------------	-----

pH ajustado para 5,0

4.1.5 Marcadores de massa molecular para DNA

- Marcador de massa molecular de DNA de fago λ digerido com EcoRI e HindIII (λ EcoRI/HindIII)
- Marcador de massa molecular de DNA de fago λ digerido com BstEII (λ BstEII)

4.1.6 Meio de cultura

- LB (Luria-Bertani)

Extrato de levedura	0,5%
---------------------	------

Peptona de caseína	1,0%
--------------------	------

NaCl	1,0%
------	------

O pH foi ajustado para 7,2. Ao meio sólido foram adicionados 1,5% de ágar bacteriológico

- SOB

Bacto-triptona	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,0584% (p/v)
KCl	0,0186% (p/v)

O pH foi ajustado para 7,2

- SOC

SOB	100 mL
Glicose	20 mM
MgCl ₂	5,0 mM
MgSO ₄	5,0 mM

As soluções de glicose, MgCl₂ e MgSO₄ foram preparadas em água bidestilada e esterilizadas por filtração em membrana Millipore (0,2 µm).

- BMGY

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Tampão Asp-Glu (pH 6,8)	5% (v/v)
YNB*	1,34% (p/v)
Biotina	4x10 ⁻⁵ %

Glicerol 1% (v/v)

*Solução YNB 20X (sem aminoácidos)

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

(NH₄)₂SO₄ 10% (p/v)

Esterilização por filtração em membrana Millipore (0,2 µm).

- YPD

Extrato de levedura 1%

Peptona de caseína 2%

Glicose 2%

Ao meio sólido foram adicionados 2% de ágar bacteriológico

- YPDS

Extrato de levedura 1%

Peptona de caseína 2%

Glicose 2%

Sorbitol 1 M

Ao meio sólido foram adicionados 2% de ágar bacteriológico

- MD (Minimal Dextrose Medium)

YNB 1,34%

Biotina 4x10⁻⁵%

Glicose 2,0%

Ao meio sólido foram adicionados 2% de ágar bacteriológico

4.2 Métodos

4.2.1 Desenho Experimental

A estratégia geral está resumida esquematicamente na **Figura 1**. Nesse projeto, foi proposta a construção de vetores para seleção de eventos de integração multicópia em *P. pastoris*, além de ferramentas para o desenvolvimento de uma linhagem de *P. pastoris* com a mutação auxotrófica *leu2*.

O vetor contendo a marca dominante *kan^R* (resistência a kanamicina/G418) foi concebido para ser construído a partir de modificações genéticas no vetor comercial pPICZ α A que possui a marca *Sh ble* (resistência a zeocina). O gene *kan^R* foi obtido por PCR a partir do vetor pPIC9K (Invitrogen®) usando-se *primers* que introduzem os sítios de restrição para NcoI e StuI em suas extremidades, o que permitiu sua subclonagem no vetor pPICZ α A digerido com as mesmas enzimas a fim de substituir o gene *Sh ble*. A fim de testar a funcionalidade do cassete de expressão do gene *kan^R*, o vetor resultante, pPICK α , foi utilizado para transformar *P. pastoris* com seleção de transformantes em G418. Após o teste de funcionalidade do cassete de expressão o vetor teve o promotor do gene *AOXI* removido após digestão com BglII e SalI sendo substituído pelo promotor constitutivo do gene *PGK1* seguido de uma sequência de secreção do fator α com códons otimizados para *P. pastoris*. O vetor resultante foi denominado pPICK α PRO. Foi clonado, então, o gene da pró-quimosina B de *B. taurus* (fragmento XhoI-NotI) que foi utilizado para determinar a eficiência do vetor em produzir e secretar proteína heteróloga. O vetor resultante foi chamado pPICK α CHYM.

Em paralelo, o alelo *leu2-d* de *S. cerevisiae* foi obtido por PCR e testado quanto à sua funcionalidade por transformação de levedura *leu2*. Este alelo poderá ser incorporado ao vetor

pPICK α CHYM. Para testá-lo em *P. pastoris*, uma linhagem *leu2* será desenvolvida após ruptura gênica do gene endógeno *LEU2*. O vetor resultante receberá também a sequência do 5S rDNA (clonada no sítio de BamHI) que será obtida por PCR. A sequência do rDNA terá um sítio de restrição único que permitirá a linearização do vetor o que aumenta a eficiência de transformação. Serão feitos testes que indiquem o número de integração em linhagens transformantes selecionadas por determinação da atividade da pró-quimosina B.

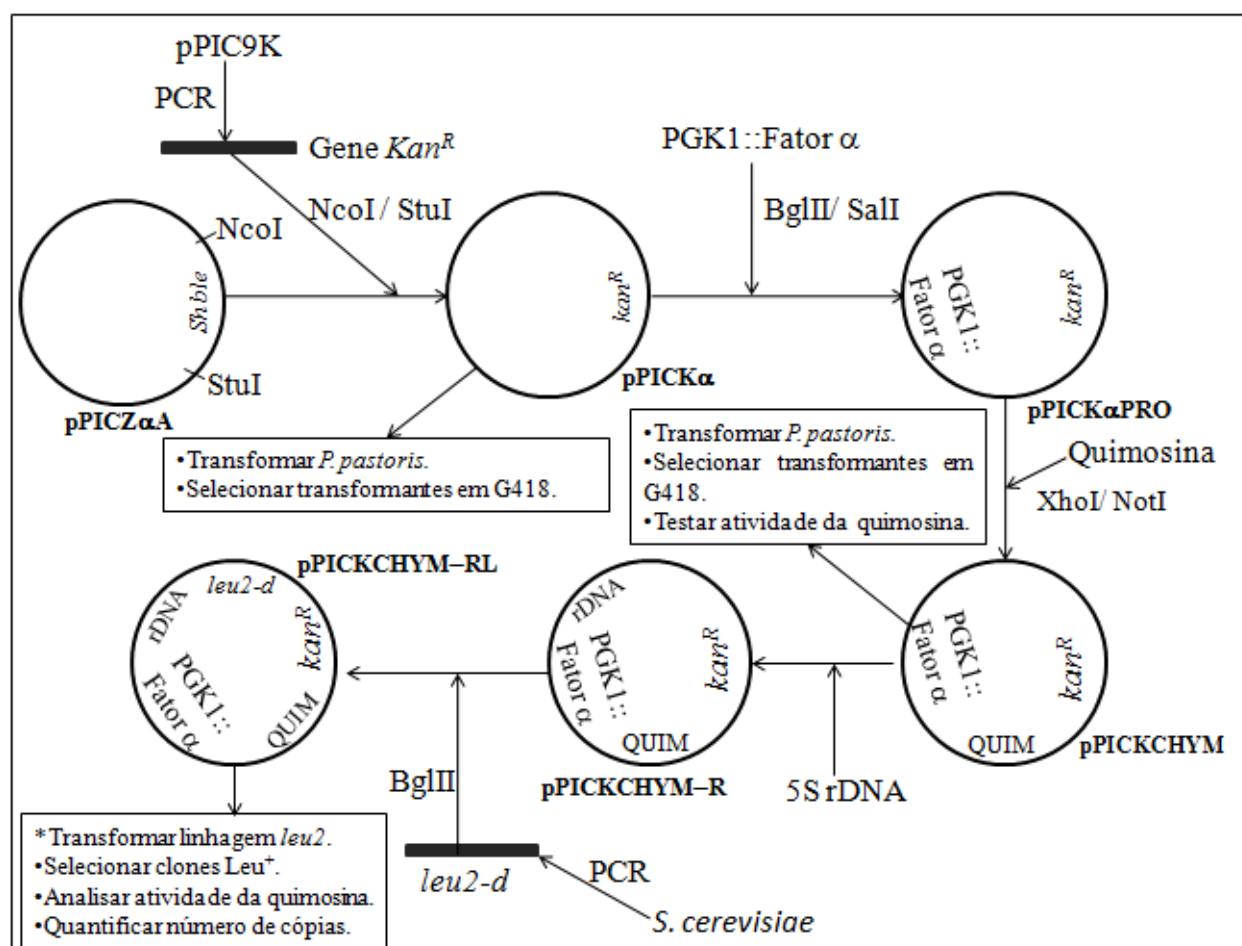


Figura 1: Estratégia para construção do vetor integrativo multicópia.

4.2.2 Cultivo de microrganismos

Bactérias foram cultivadas a 37°C em meio LB enquanto leveduras a 28°C em meio apropriado para cada experimento.

4.2.3 Preparação de células bacterianas competentes para transformação por choque térmico.

O preparo de células de *E. coli* competentes para choque térmico foi realizado como descrito por Cohen (1972). Células de *E. coli* DH5 α foram crescidas em 5mL de meio LB e incubadas a 37°C durante a noite sob agitação de 250 rpm. Em seguida, 1 mL do pré-inoculo foi adicionado a 30 mL de meio LB e essa cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm. Após atingira OD_{600nm} de 0,2 a 0,3 as células foram coletadas por centrifugação a 3000 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspendidas em 10 mL de solução 100 mM CaCl₂ estéril e gelada. Em seguida, as células foram submetidas à nova centrifugação sob as mesmas condições. Por fim, as células foram ressuspendidas em solução contendo 1,6 mL de 100 mM CaCl₂ e 0,4 mL de glicerol estéril. Alíquotas de 50 μ L ou 100 μ L, depositadas em tubos de microcentrífuga, foram utilizadas para transformação ou armazenadas a -80°C para posterior utilização.

4.2.4 Transformação de *E. coli* por choque térmico

Uma alíquota de célula competente foi utilizada para cada sistema de ligação. Células mantidas a -80°C foram descongeladas no gelo. Em seguida, foram adicionados 10 μ L do sistema de ligação às células, e as mesmas foram incubadas no gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas ao choque térmico, incubando-se a 42°C por 90 segundos, e retornando ao gelo por 2 minutos. Foram adicionados 800 μ L de meio LB ao sistema que foi incubado a 37°C por 1 hora. O plaqueamento foi feito em meio LB ágar com antibiótico adequado. Após transformações as placas foram incubadas a 37°C por período aproximado de 16 h.

4.2.5 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep)

A extração de plasmídeos em pequena escala foi feita de acordo com SAMBROOK *et al*, 2001 com adaptações. Uma colônia de bactéria foi incubada em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico adequado e cultivada a 37°C por 18 horas. Estas células foram coletadas através de centrifugação a 12.000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuscitado em 200 µL de solução I, e em seguida adicionou-se 360 µL de solução II recém-preparada. A amostra foi homogeneizada por inversão suave do tubo. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 300 µL de solução III gelada ao lisado, procedendo-se nova homogeneização por inversão do tubo. A amostra foi então incubada no gelo por 5 minutos e centrifugada a 12000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo adicionados 750 µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova centrifugação a 12000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 200 µL de solução TE. Foram então adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 M seguindo-se centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos (4°C). O sobrenadante foi recuperado em um tubo novo sendo adicionados 750 µL de etanol 100% gelado. A mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O precipitado foi lavado (sem ressuscitar) com 1 mL de etanol 70% gelado. Após secagem por exposição ao ar, o precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água e RNase A (20 µg/mL) e incubada a 37°C por uma hora. O DNA plasmidial foi estocado a -20°C até o uso.

4.2.6 Preparação de DNA plasmidial em média escala (midiprep)

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit *Qiagen Plasmid Midi* (Qiagen), de acordo com as orientações do fabricante.

4.2.7 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As digestões foram realizadas conforme instruções dos fabricantes das mesmas. O tempo de incubação, os tampões, as temperaturas de reação, as concentrações de DNA e enzima variavam de acordo com o material a ser digerido e a eficácia da enzima. Geralmente, foram utilizadas 10 U de enzima para cada 5 µg de DNA seguindo-se incubação a 37°C por 2h. O volume da enzima não ultrapassou 10% do volume final da reação.

4.2.8 Precipitação de DNA

Foram adicionados 0,3 M de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol 100% gelado ao DNA. Após a incubação a -20 C durante a noite, a amostra foi submetida à centrifugação a 1.200 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 70% e novamente o material foi centrifugado a 1,200 x g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi seco e ressuspenso em 10 µL de água Milli-Q e armazenado a 20°C

4.2.9 Análise eletroforética de DNA

A eletroforese em gel de agarose utilizada para análise dos fragmentos de DNA foi feita de acordo com SAMBROOK *et al*, 2001. O gel é composto por agarose na concentração de 1,0% (p/v) e por tampão de corrida TAE 1X com brometo de etídeo, na concentração final

de 0,5 µg/mL. As amostras e os marcadores moleculares foram aplicados no gel e submetidos a eletroforese com voltagem ajustada entre 1 a 5 V/cm. Para visualização das bandas de DNA, o gel foi exposto à luz ultravioleta.

4.2.10 Sistema de ligação

Os sistemas de ligação foram realizados com razão molar entre vetor e inserto de 1:3 a 1:10. Utilizou-se a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs) juntamente com os tampões de reação fornecidos pelos fabricantes. Os sistemas foram incubados a 16°C por 16 h.

4.2.11 Eluição de fragmentos de DNA

Após digestão dos vetores com enzimas de restrição apropriadas, fragmentos de DNA contendo sequências de interesse foram aplicados em gel de agarose e submetidos à eletroforese. Os fragmentos de DNA de interesse foram recortados do gel com lâmina de bisturi de aço carbono estéril (Wiltex plus) e purificados com o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen), segundo recomendações do fabricante.

4.2.12 Purificação e clonagem dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com o kit *Pure link PCR Purification Kit* (Invitrogen®). A quantificação do produto de PCR purificado foi realizada em gel de agarose 1,0% por comparação de intensidade de bandas com DNA de concentração conhecida. Após ligação dos fragmentos de PCR com o vetor de clonagem foram realizadas transformações de células competentes de *E. coli* DH5α. Os transformantes foram plaqueados em meio LB ágar contendo ampicilina e X-gal. Foram selecionadas colônias transformantes

brancas para mini-preparação plasmidial com o kit *DNA Purification System Wizard® Plus SV Minipreps* (Promega®).

4.2.13 Transformação em *P. pastoris*

O protocolo de transformação de *P. pastoris* foi uma adaptação daquele descrito por Scorer *et al.* (1994). Células da levedura *P. pastoris* foram crescidas em meio YPD ágar até o aparecimento de colônias isoladas. Foi realizado um pré-inóculo com 10 mL de YPD em frasco Erlenmeyer de 125 mL utilizando uma colônia isolada de levedura. O pré-inóculo foi incubado a 30°C durante a noite. No dia seguinte, foi medido a OD_{600nm} do pré-inóculo e calculado o volume a ser utilizado para o inóculo levando em consideração o tempo de geração de 2 horas. O volume de células suficiente para atingir a OD_{600nm} de 1.3 no horário programado foi adicionado a 200 mL de YPD em frasco Erlenmeyer de 1 L. Quando o inóculo atingiu o crescimento esperado, fez-se uma incubação no gelo por 15 minutos para cessar o crescimento. As células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g por 5 min a 4°C. O precipitado foi ressuscitado em 200 mL de água gelada. Foi realizada outra centrifugação nas mesmas condições anteriores e o precipitado ressuscitado em 100 mL de água estéril gelada por 2 vezes. Após mais uma centrifugação nas mesmas condições as células foram ressuscitadas em 10 mL de sorbitol 1 M gelado. Foi centrifugado novamente e as células ressuscitadas em 500 µL de sorbitol gelado. As células foram separadas e, alíquotas em tubo *Eppendorff* e mantidas no gelo até a utilização. Foram misturados 80 µL de célula com aproximadamente 10 µg de DNA linearizado (ressuscitado em água). A mistura foi colocada em cubetas de 0,2 cm e incubada por 5 minutos no gelo. A eletroporação foi realizada com os seguintes parâmetros: 1500 V, 25 µF, 400 Ω. Imediatamente após o choque foi adicionado 1 mL de sorbitol gelado na cubeta e o conteúdo transferido para tubo estéril de

1,5 mL. Seguiu-se incubação a 30°C sem agitação por 1 hora e foram plaqueados de 50 a 200 µL do sistema de transformação em YPDS contendo 250 µg/mL G418. As placas foram incubadas por no máximo 4 dias até o aparecimento das colônias. Foram selecionados clones para posterior análise.

4.2.14 Extração de DNA total de levedura

O protocolo usado foi uma adaptação de BURKE *et al* (2000). Uma colônia de levedura foi inoculada em 3 mL de meio YPD e cultivada a 28°C por cerca de 24 horas. 400 µL dessa cultura foram adicionados a 40 mL de meio YPD em frasco tipo *Erlenmeyer* de 250 mL. Seguiu-se o cultivo por 24 horas sob agitação a 28°C. Depois do crescimento as células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e ressuspensas em tampão SE. Em seguida, 100 µL de solução de liticase foram adicionados à amostra incubando-se por 1 hora a 37°C. Centrifugou-se a suspensão (3.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente), ressuspendeu-se as células em 3 mL de tampão TE20 e adicionou-se 0,5 mL de SDS 10% . A mistura foi incubada por 30 minutos, quando recebeu acetato de potássio 5M (pH 8,9) e foi incubada no gelo por 30 minutos. Centrifugou-se a suspensão (10.000 x g por 10 minutos a 4°C) e o precipitado foi descartado. Ao sobrenadante foi adicionado um volume de clorofane e após homogeneização gentil, a mistura foi centrifugada a 3000 x g por 10 minutos. A fase aquosa, e menos densa, foi recolhida para um novo tubo, recebendo 2,5 volumes de etanol 100%. Após ser incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. Depois da centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 0,5 mL de tampão TE mais 5 µL de RNase A (10 mg/mL), após ser secado por exposição ao ar. O DNA total de levedura foi guardado a 4°C para uso ou a -20°C para estoque.

4.2.15 Expressão heteróloga em *P. pastoris* e teste de atividade

Clones transformantes e controle negativo (*P. pastoris* linhagem X-33) foram crescidos em meio BMGY por 48 horas sob agitação (200 rpm) a temperatura de 28°C. Após crescimento uma alíquota foi centrifugada e 1 mL de sobrenadante foi recolhido para teste de atividade enzimática. A enzima foi convertida para sua forma cataliticamente ativa, pró-quimosina, a partir de um processo de acidificação/neutralização. O pH do sobrenadante foi ajustado para 2,0 e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o pH foi ajustado para 6,3 e incubado por mais 1 hora para posterior teste de coagulação. A solução de leite utilizada no teste é composta por 100 mg/mL de leite em pó dissolvido em água destilada, com 0,15 mM CaCl₂. Para o ensaio enzimático, 5 mL de leite foram incubados por 5 minutos a 37°C, em seguida foi adicionado 1 mL do sobrenadante contendo a enzima quimosina ativada e analisou-se o efeito de coagulação do leite pelo tempo de 15 minutos a 37°C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção de vetor com marca dominante *kan*^R

Com o objetivo de construir um vetor com uma marca de seleção que conferisse resistência a antibiótico tanto em levedura quanto em bactéria, foi selecionado o gene *kan*^R (derivado do transposon Tn 903) uma aminofosfotransferase. Este gene confere de resistência ao antibiótico kanamicina (em *E. coli*) e ao seu análogo G418 (em *P. pastoris*) atuando sobre a subunidade menor do ribossomo causando erros na tradução e inibição da translocação.

O gene *kan*^R foi obtido por PCR. Para tal, utilizou-se a DNA Polimerase de alta fidelidade Phusion (Finnzymes), os *primers* Kan-F1 e Kan-R1 e, como DNA molde, o vetor pPIC9K (Invitrogen®). O *primer* Kan-F1 foi desenhado de tal forma a alterar o nucleotídeo +4 da sequência codante do gene *kan*^R com o objetivo de criar um sítio de restrição para NcoI a fim de facilitar o processo de subclonagem no vetor de *Pichia*. O *primer* Kan-F1 altera, pois, o segundo resíduo de aminoácido da proteína de serina para glicina. Foi esperado que esta mudança não alterasse significativamente a função da proteína por estar localizada próxima da extremidade N-terminal. Uma segunda alteração foi feita no nucleotídeo +33, mas trata-se de uma mutação silenciosa, pois o códon original, UCU, que codifica para serina, foi alterado para UCG, que codifica para o mesmo aminoácido. Esta alteração foi feita com a finalidade de eliminar um sítio de restrição para XhoI (CTCGAG) o qual é importante para a clonagem do gene heterólogo no sítio de múltipla clonagem do vetor. Já o *primer* Kan-R1 se anela na região 3' do gene *kan*^R presente no vetor pPIC9K e amplifica 34 pb correspondentes ao início do terminador do gene *CYCI* até o sítio StuI. A **Figura 2** mostra a sequência do amplicon de ~850 pb, resultado da PCR.

```

1   M G H I Q R E T S C S R P R L N S N M D
-2 ccATGGGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGAT
   NcoI
21  A D L Y G Y K W A R D N V G Q S G A T I
61  GCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCTGGGCAATCAGGTGCGACAATC

41  Y R L Y G K P D A P E L F L K H G K G S
121 TATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGC

61  V A N D V T D E M V R L N W L T E F M P
181 GTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCT

81  L P T I K H F I R T P D D A W L L T T A
241 CTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTACTCACCCTGCG

101 I P G K T A F Q V L E E Y P D S G E N I
301 ATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATT

121 V D A L A V F L R R L H S I P V C N C P
361 GTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCTGTTTGTAAATTGTCCT

141 F N S D R V F R L A Q A Q S R M N N G L
421 TTTAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTG

161 V D A S D F D D E R N G W P V E Q V W K
481 GTTGATGCGAGTGATTTTGGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAA

181 E M H K L L P F S P D S V V T H G D F S
541 GAAATGCATAAGCTTTTGGCATTCTCACCAGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCA

201 L D N L I F D E G K L I G C I D V G R V
601 CTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTC

221 G I A D R Y Q D L A I L W N C L G E F S
661 GGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCT

241 P S L Q K R L F Q K Y G I D N P D M N K
721 CCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAA

261 L Q F H L M L D E F F -
781 TTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAACACGTCCGACGGCGGCCACGGGT

841 CCCAGGCCTC
   StuI

```

Figura 2: Sequência primária e tradução conceptual do amplicon contendo o gene *kan^R*. As mutações nas posições +4 (A→G) e +33 (G→T) estão destacadas em vermelho. A sequência do terminador da transcrição do gene *CYCI* estão em azul. Os sítios de restrição estão sublinhados.

A amplificação do gene gerou um fragmento de ~850 pb, conforme pode ser visto na **Figura 3**. Este foi purificado e ligado ao vetor de clonagem pBluescript II KS. O sistema de ligação foi usado para transformação por choque térmico de *E. coli* DH5 α , seguindo-se de seleção em meio contendo X-gal e o antibiótico ampicilina. Duas colônias brancas foram escolhidas para extração de DNA plasmidial (miniprep).

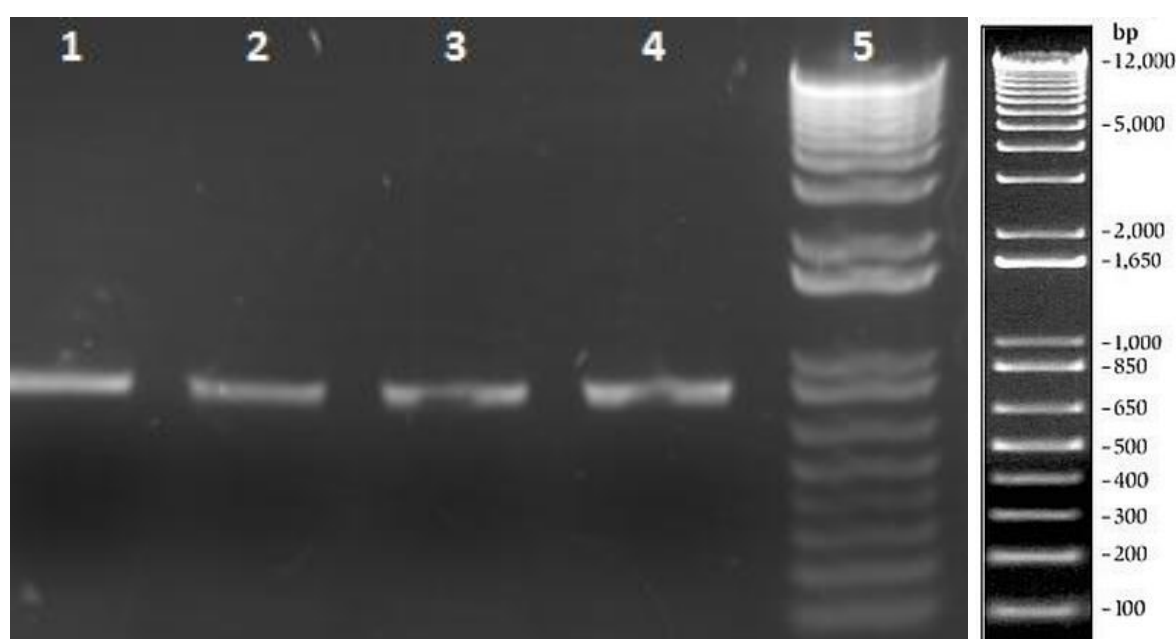


Figura 3: Análise eletroforética da amplificação do gene *Kan^R*. Poços 1, 2, 3 e 4: produto de amplificação do gene *Kan^R* derivados de quatro amplificações diferente. Poço 5: marcador 1 Kb Plus DNA ladder (*Invitrogen*®).

A fim de verificar a presença do inserto, bem como sua integridade, o DNA extraído de 2 clones selecionados foi digerido com as enzimas de restrição NcoI ou StuI. Ambas as enzimas possuiriam apenas um sítio de restrição no vetor resultante, portanto, quando digerido com apenas uma enzima, o vetor seria linearizado enquanto que, ao ser digerido com ambas as enzimas, o vetor liberaria fragmentos de ~850 pb e ~3,0 kb. A digestão com StuI,

embora parcial (**Figura 4**, poço 3), permitiu a liberação de um fragmento de ~850 pb quando a digestão dupla foi realizada (**Figura 4**, poços 1 e 4).

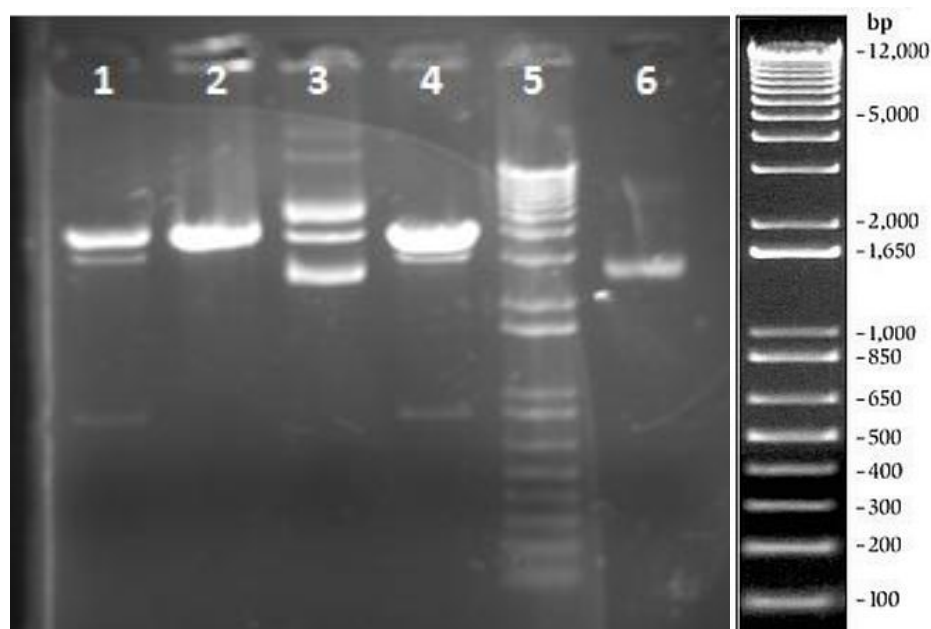


Figura 4: Análise eletroforética do perfil de restrição da clonagem do gene *Kan^R* em pBluescript II KS. Poço 1: pBluescript II KS + *kan^R* digerido com NcoI + StuI; Poço 2: pBluescript II KS + *kan^R* digerido com NcoI; Poço 3: pBluescript II KS + *kan^R* digerido com StuI; poço 4: pBluescript II KS + *kan^R* digerido com NcoI + StuI ; Poço 5: marcador 1 Kb DNA Plus ladder; Poço 6: pBluescript II KS + *kan^R* intacto.

Após confirmação da clonagem, um plasmídeo selecionado foi digerido com as enzimas StuI e NcoI, e, em seguida, o gene *kan^R* foi purificado e subclonado no vetor pPICZ α A. Para que o vetor pPICZ α A recebesse o gene de resistência, o mesmo foi previamente digerido com StuI e NcoI produzindo extremidades complementares para a ligação após a liberação do gene *Sh ble* (que confere resistência a zeocina). Após ligação e transformação de *E. coli* seguiu-se seleção em meio contendo kanamicina. Um clone selecionado foi digerido com StuI e NcoI a fim de confirmar a clonagem. O vetor resultante, denominado pPICK α , possui ~4 kb e seu desenho esquemático é representado na **Figura 5**.

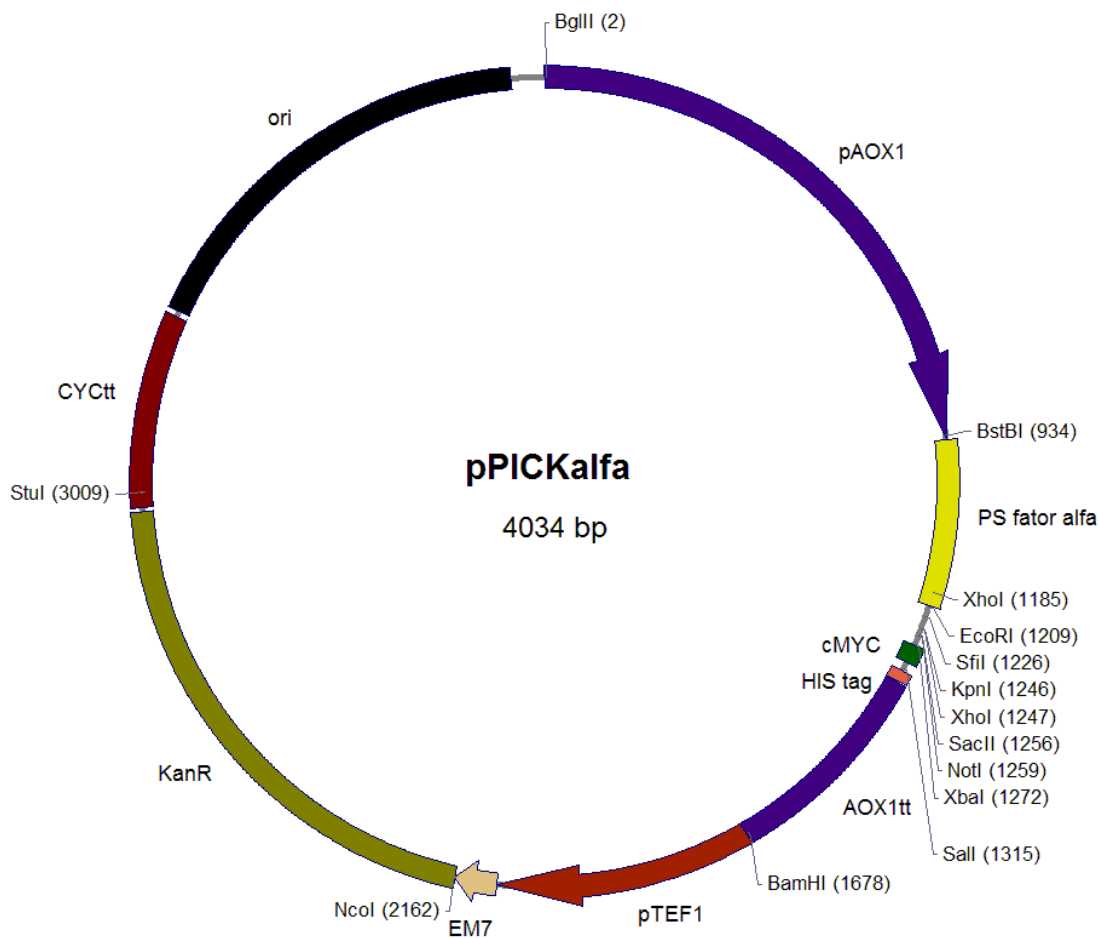


Figura 5: Desenho esquemático do vetor pPICK α .

O vetor pPICK α foi amplificado e usado para transformação da levedura *P. pastoris* X-33 por eletroporação. Os transformantes foram crescidos e selecionados em meio YPD suplementado com G418 (250 $\mu\text{g/mL}$). Alguns transformantes tiveram o DNA genômico extraído, com posterior realização de PCR com Os *primers* Kan-F1 e Kan-R1 para comprovar a presença do gene *kan^R* integrado. A **Figura 6** mostra que todos os clones analisados possuíam em seu genoma o gene *kan^R*.

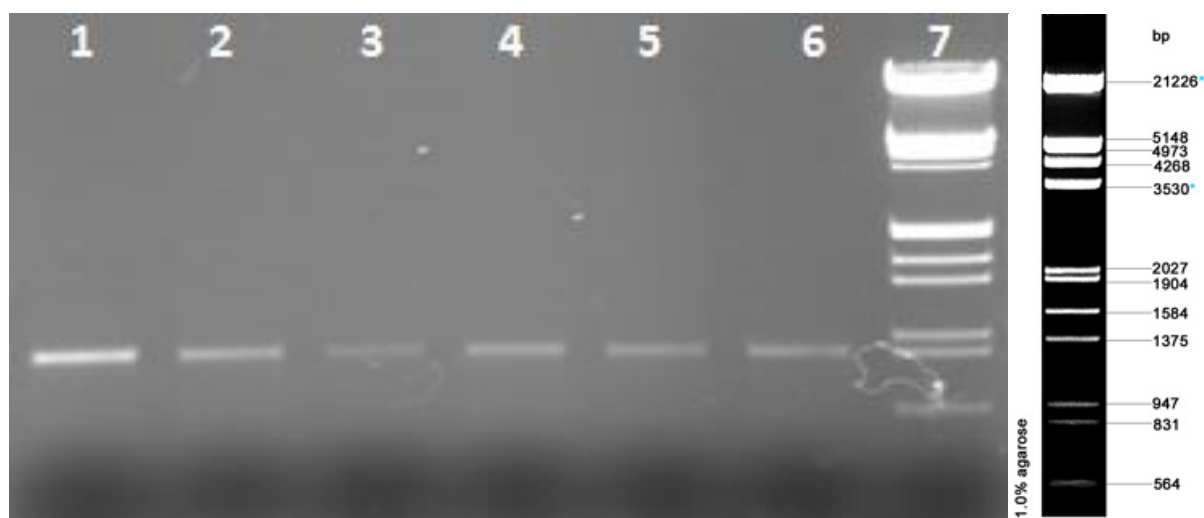


Figura 6: Análise eletroforética da amplificação do gene *kan^R* a partir de DNA genômico de *P. pastoris* transformada. Poços 1, 2, 3, 4, 5 e 6: produto de amplificação do gene *kan^R* de seis diferentes transformantes; Poço 7: marcador de DNA λ EcoRI/HindIII.

Após construção do vetor pPICK α , buscou-se a clonagem de um cassete que promoveria a substituição do promotor P_{AOX1} pelo promotor P_{PGK1} além da substituição da sequência de secreção do fator α de acasalamento de *S. cerevisiae* por uma versão com códons otimizados para *P. pastoris* construída em nosso laboratório. Além disto, um novo *polilinker* contendo sítio para múltiplas clonagens (MCS) foi adicionado. Esse cassete foi denominado *PGK1::Fator α* e sua sequência é mostrada na **Figura 7**.

O cassete *PGK1::Fator α* contém 618 pb do promotor *PGK1* de *P. pastoris* que incluem alguns sítios de restrição: PvuI, SacI e XbaI. Estes sítios únicos são úteis para a linearização do vetor a fim de facilitar a integração homóloga por adição no *locus PGK1* de *P. pastoris*. O cassete contém, ainda, 267 pb da sequência sinal do fator α de *S. cerevisiae* com códons otimizados para *P. pastoris*. Embora se tenha mantido sequência original de resíduos de aminoácidos original, a sequência otimizada com códons preferenciais de *P. pastoris* visou contribuir para uma eficiente tradução/secreção da proteína heteróloga. Como resultado da

otimização dos códons, manteve-se o sítio original de XhoI, que permite a clonagem de genes em fase com o peptídeo sinal, e a eliminação de um sítio de HindIII presente na sequência original. A vantagem do sítio de XhoI é que ele se encontra antes dos sítios para as proteases Kex2p e Ste13p, dessa forma, no processo de clonagem, as sequências do gene heterólogo podem reconstituir esses sítios o que permite o processamento da proteína por estas proteases gerando um N-terminal com o amino terminal desejado.

AGATCTGCGAGGCAAGCATCTACTAATGTTTATTTTTCGTCCAACCTAATTGTGGTTTCA
BglII

AAGCGCTATCAGGTGGGGGTAAGAGGAATGTGAGTGGAAGCGAAAATAACTGGCAGCT
GGGGTCAGATCCCGTGATGCCACCTCTTGTGGTATTTTGAAACGCGTGTTGCGATTGGCC
GCGAGAACGGAAGGAATATATTTACTGCCGATCGCATTTTGGCCTCAAATAAATCTTGA
PvuI

GCTTTTGGACATAGATTATATGTTCTTCTTGGAAAGCTCTTTCAGCTAATAGTGAAGTGT
TTCCTACTAAGGATCGCCTCAAACGTTCCAACACTACGGGCGGAGGTTGCAAAGAAAACGG
GTCTCTCAGCGAATTGTTCTCATCCATGAGTGAGTCCTCTCCGTCCTTTCCTCGCGCCTG
GCAATAAAGCCTCCTTCGGAGGAGCTCCGTCTAGAGAATAATTGCTGCCTTTCTGACTTT
SacI **XbaI**

CGGACTAGCGCCAACCGCGAACCACACCACACCATCACTGTCACCCGTCATAGTTCA
TCCCTCTCTCCTTATAAAGCATCTAATAGGTTCCACAATTGTTTGCCACAAAATCTCTT
AGCATAGCCCAATTGATTACGAAATTCGAAACGATGAGATTCCCATCTATCTTCACTGCT
BstBI

GTTTTGTTGCTGCTTCCCTCTGCCTTGGCTGCTCCAGTTAACACCACTACTGAGGACGAG
ACTGCTCAGATCCAGCCGAGGCTGTCATTGGATACTCTGACTTGGAGGGAGATTTGAT
GTTGCTGTTTTGCCATTCTCCAACCTTACCAACAACGGTTTGTTGTTTATTAAACACCACC
ATCGCTTCTATCGCTGCCAAGGAGGAGGGTGTCTCTCTCGAGAAGAGAGAAGCTGAAGCC
XhoI

GAATTCCCCGGGACTAGTGCGGCCGCGTCGAC
EcoRI **SmaI** **SpeI** **NotI** **SalI**

Figura 7: Sequência do cassete *PGKI::Fator α*. Em vermelho, as sequências do promotor P_{PGKI} de *P. pastoris*; em azul, o sinal de secreção do fator α de *S. cerevisiae* com códons otimizados para *P. pastoris*; em preto, o MCS. Sítios de restrição relevantes estão sublinhados.

Após a sequência sinal, encontra-se um novo MCS com sítios para EcoRI, SmaI, SpeI, NotI e SalI. Com exceção de SmaI, que está presente no gene *kan^R*, todos os outros sítios são únicos no vetor. Em suas extremidades, o cassete *PGK1::Fator α* contém sítios para BglII e SalI para subclonagem no vetor pPICK α . Nesta subclonagem, todo o *polilinker* original do vetor pPICZ α A, assim como o *tag* c-myc, foram substituídos. Manteve-se, contudo, as sequências originais do *His tag* caso se deseje adicionar uma cauda de 6 histidinas no C-terminal da proteína. Nesse caso, o gene subclonado não deve possuir *stop codon* para que a sequência *His tag* seja traduzida.

Os fragmentos correspondentes ao promotor P_{PGK1} e fator α de acasalamento foram obtidos usando-se como molde outros vetores construídos no nosso laboratório. O promotor P_{PGK1} foi amplificado com os *primers* PGK-D10 e PGK-RZ, enquanto o fator α com os *primers* 5PROPP-F e 3PROPP-R. As **Figuras 8A e 8B** mostram a análise desses fragmentos em gel de agarose, onde são observados fragmentos com os tamanhos esperados de 618 pb (P_{PGK1}) e 267 pb (fator α), respectivamente. Os fragmentos foram então digeridos com a enzima de restrição BstBI e ligados. O sistema de ligação foi utilizado como molde para uma PCR na qual foram utilizados os *primers* PGK-D10 e 3PROPP-R. O fragmento amplificado de ~0,9 kb (**Figura 8C**) foi então clonado no vetor pPCV-B. Células de *E. coli* DH5 α foram transformadas com o sistema de ligação e, após seleção em meio contendo X-gal e o antibiótico ampicilina, realizou-se extração do DNA de algumas colônias brancas seguindo-se digestão com as enzimas BglII e SalI.

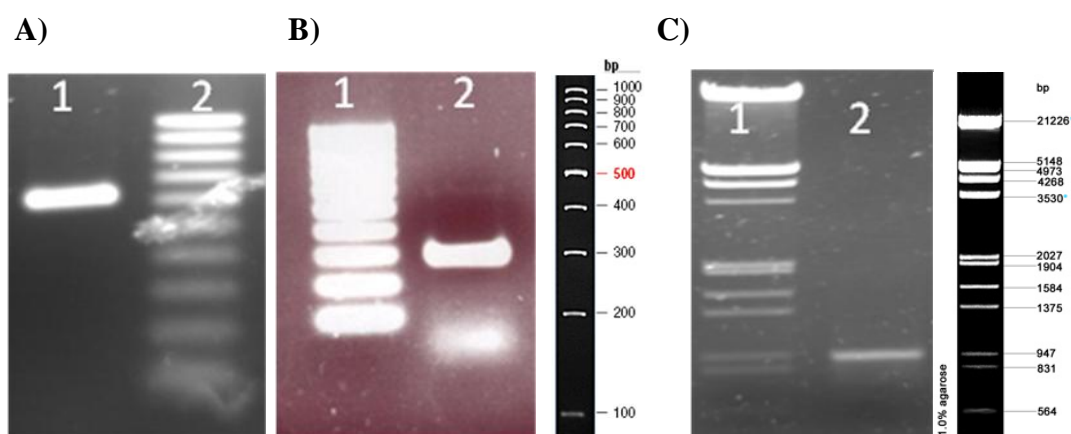


Figura 8: Análise eletroforética da amplificação do promotor P_{PGK1} e do fator α de acasalamento. **A)** Poço 1: produto de amplificação promotor P_{PGK1} ; Poço 2: Marcador de DNA 100 pb (Fermentas). **B)** Poço 1: Marcador de DNA 100 pb (Fermentas); Poço 2: produto de amplificação do fator α de acasalamento. **C)** Poço 1: marcador de DNA λ EcoRI/HindIII; Poço 2: produto de amplificação do cassete $PGK1::Fator \alpha$.

O resultado da digestão de um clone selecionado mostrou a liberação do cassete $PGK1::Fator \alpha$, que possui o tamanho aproximado de 0,9 kb (**Figura 9A**). Este fragmento foi purificado e subclonado no vetor $pPICK\alpha$, digerido previamente com as mesmas enzimas. Quando digerido com BglII e SalI, o vetor $pPICK\alpha$ libera dois fragmentos, um de ~1,3 kb, contendo o promotor P_{AOX1} , o fator α e o sítio múltiplo de clonagem, e outro, de 2,7 kb, que foi purificado (**Figura 9B**).

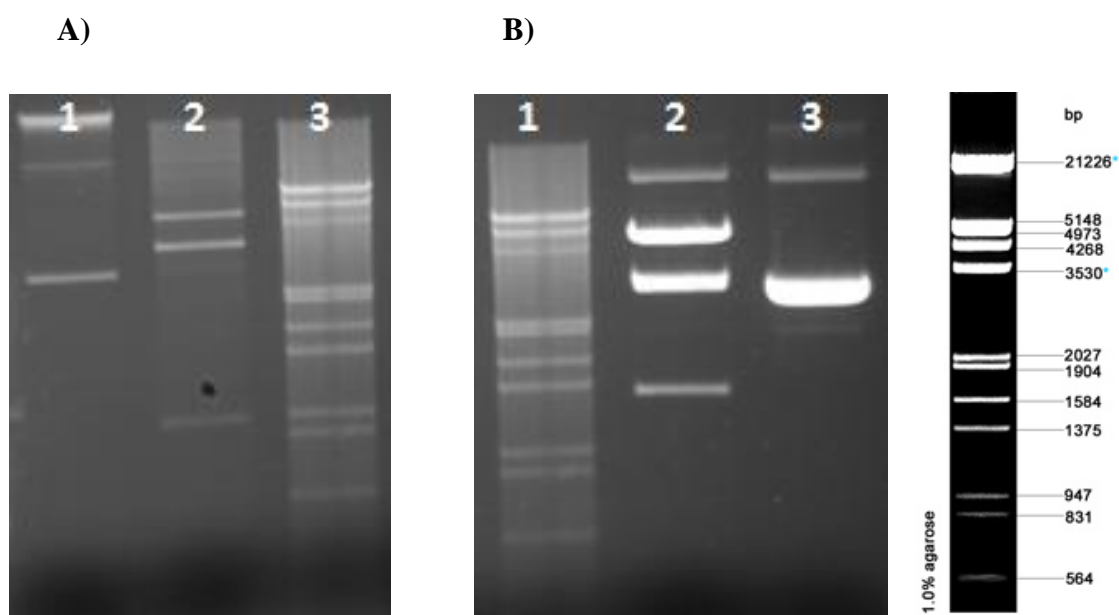


Figura 9: Análise eletroforética do perfil de restrição da clonagem do cassete *PGKI::Fator α* no vetor **pPCV-B**. **A)** Poço 1: vetor pPCV-B + *PGKI::Fator α* intacto; Poço 2: vetor pPCV-B + *PGKI::Fator α* digerido com SalI + BglII; Poço 3: marcador de DNA λ EcoRI/HindIII. **B)** Poço 1: marcador de DNA λ EcoRI/Hind III; Poço 2: pPICK α digerido com BglII + SalI; Poço 3: pPICK α intacto.

O fragmento de 2,7 kb eluído foi ligado ao cassete *PGKI::Fator α* purificado. O plasmídeo resultante de ~3,6 kb foi denominado pPICK α PRO e seu desenho esquemático está representado na **Figura 10**.

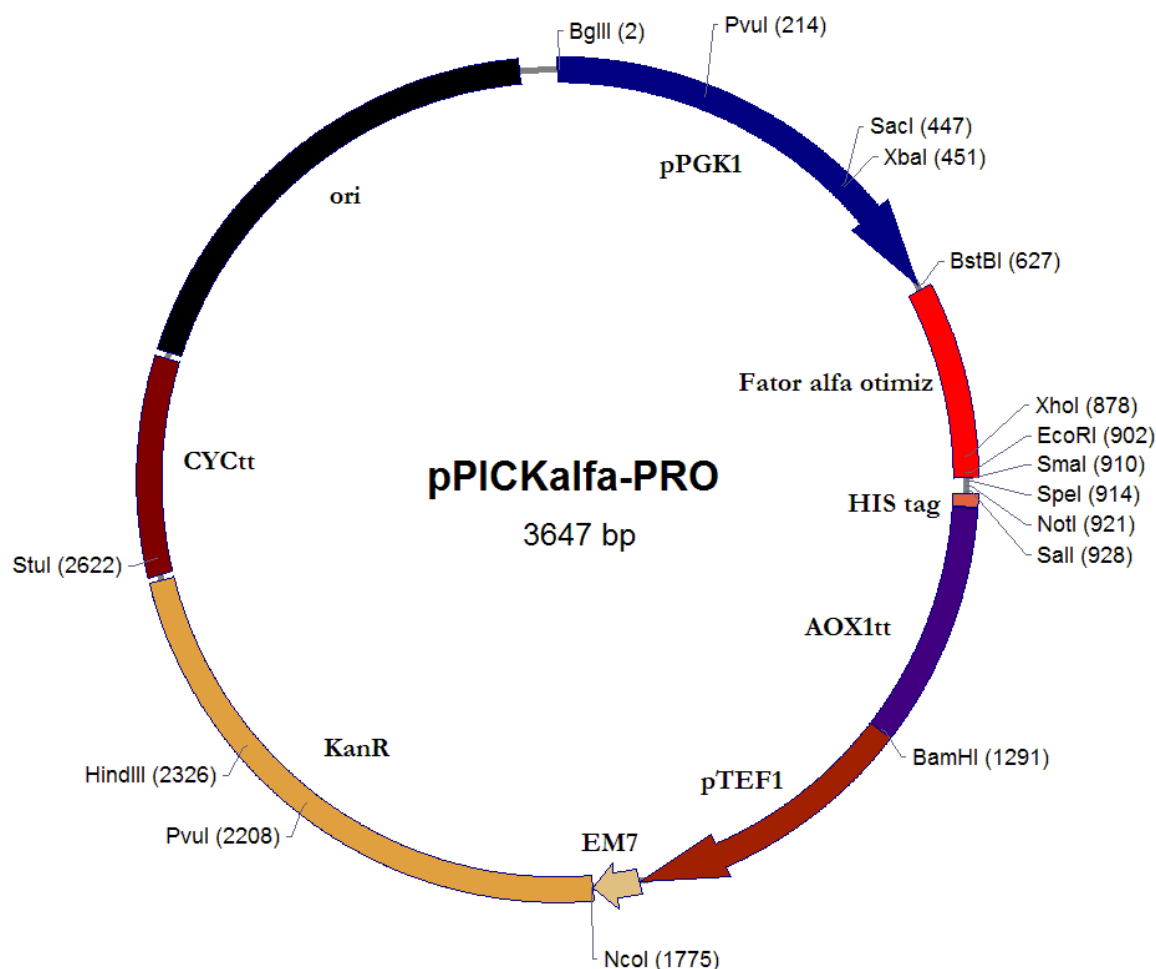


Figura 10: Desenho esquemático do vetor pPICK α PRO.

Para testar o vetor pPICK α PRO em *P. pastoris*, foi feita a clonagem do gene da pró-quimosina B de *Bos taurus*. O gene da pró-quimosina B foi escolhido para que a expressão desta enzima em *P. pastoris* servisse como indicador da capacidade do vetor de produzir uma proteína heteróloga e posteriormente sua eficiência em aumentar a expressão em decorrência de integração em múltiplas cópias no genoma. A escolha dessa enzima deveu-se ao fato de despertar interesse biotecnológico, sendo utilizada no processo de coagulação do leite. A pró-quimosina B é uma protease aspártica encontrada em abundância no estômago de mamíferos recém-nascidos (KAPPELER *et al*, 2006). É sintetizada intracelularmente como “pré-pró-

quimosina” e secretada na forma de pró-enzima com liberação de um peptídeo sinal com 16 aminoácidos. A pró-quimosina é ativada em condições ácidas com a retirada de um peptídeo com 42 resíduos de aminoácidos (VALLEJO *et al*, 2008). Sua ação envolve a clivagem proteolítica entre os resíduos de aminoácidos fenilalanina-105 e metionina-106 da caseína κ que, em sua forma íntegra, impede a coagulação do leite, pois gera uma repulsão eletrostática entre as micelas. Após a clivagem, a caseína κ perde sua função solubilizadora diminuindo a repulsão eletrostática e permitindo a aglomeração de micelas juntamente com proteína (KUMAR *et al*, 2006) (REID *et al*, 1997). Devido à sua atividade de coagulação, a quimosina B é a enzima favorita na produção de queijos, apresentando alta especificidade para caseína κ além de possuir baixa atividade hidrolítica para outras proteínas do leite evitando, assim, a formação de peptídeos hidrofóbicos indesejáveis que alteram o sabor do queijo (KAPPELER *et al*, 2006).

O vetor pPICK α PRO foi digerido com as enzimas XhoI e NotI de forma que pudesse receber o gene da pró-quimosina B (CHYMb) clonado no vetor pBluescript II KS, e sintetizado quimicamente com códons preferenciais de *P. pastoris* na forma de um inserto XhoI-NotI de ~1,1 kb. Após transformação, o vetor formado foi digerido com as mesmas enzimas para confirmação da clonagem. Os fragmentos gerados são mostrados na **Figura 11**. O vetor resultante foi denominado pPICKCHYM e sua representação esquemática encontra-se na **Figura12**.

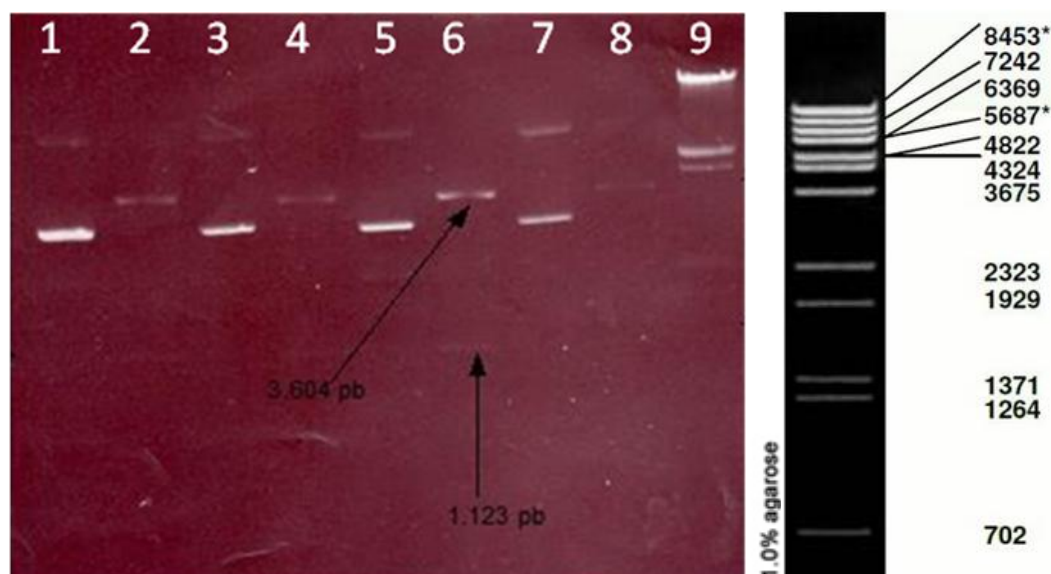


Figura 11: Análise eletroforética do perfil de restrição da clonagem do gene da pró-quimosina B no vetor pPICK α PRO. Poço 1: pPICK α PRO + quimosina intacto (clone 1); Poço 2: pPICK α PRO + quimosina digerido com XhoI + NotI (clone 1); Poço 3: pPICK α PRO + quimosina intacto (clone 2); Poço 4: pPICK α PRO + quimosina digerido com XhoI + NotI (clone 2); Poço 5: pPICK α PRO + quimosina intacto (clone 3); Poço 6: pPICK α PRO + quimosina digerido com XhoI + NotI (clone 3); poço 7: pPICK α PRO + quimosina intacto (clone 4); Poço 8: pPICK α PRO + quimosina digerido com XhoI + NotI (clone 3); Poço 9: Marcador de DNA λ BstEII. As setas indicam as bandas esperadas de 1.123pb (quimosina) e 3.604 pb (restante do vetor).

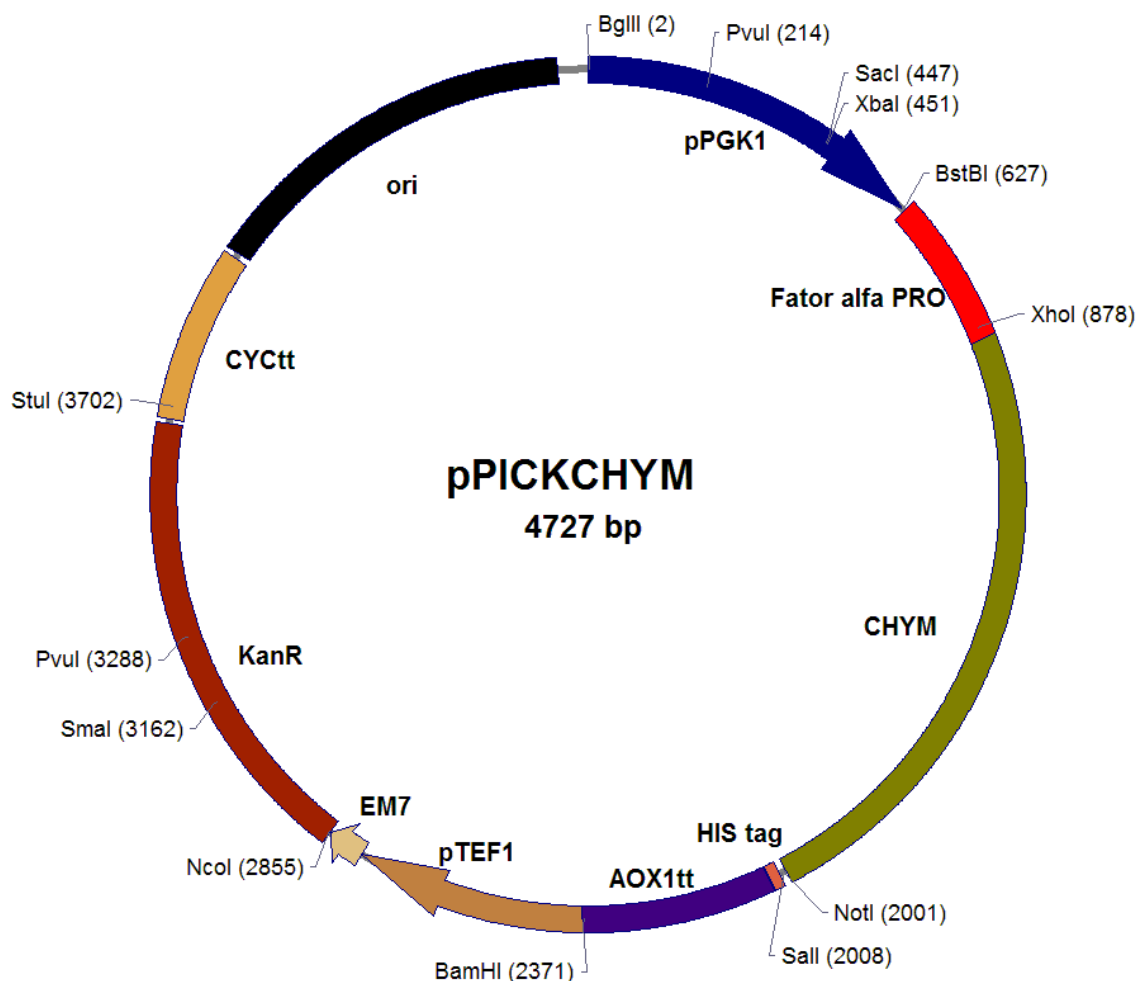


Figura 12: Desenho esquemático do vetor pPICKCHYM.

O vetor pPICKCHYM foi usado para transformação da levedura *P. pastoris* X-33 por eletroporação. O vetor foi digerido previamente com SacI para dirigir a integração do cassete de expressão para o *locus PGK1*, pois sítio de restrição encontra-se no promotor P_{PGK1} presente no vetor. Os transformantes foram crescidos a 28°C em placa com YPD contendo G418 (0,5 mg/mL). As colônias isoladas resistentes foram selecionadas e transferidas para uma nova placa contendo G418 (0,5 mg/mL) para posterior realização de testes de atividade da quimosina B.

Para realização de teste de atividade da quimosina B, 3 clones transformantes e 1 controle negativo (*P. pastoris* X-33) foram crescidos em meio BMGY por 48 horas sob agitação (200 rpm) a 28°C. Após crescimento, uma alíquota foi coletada por centrifugação e 1 mL de sobrenadante foi recolhido para teste de atividade enzimática.

Por ser secretada em sua forma inativa – pró-quimosina –, a enzima foi convertida para sua forma cataliticamente ativa por um processo de acidificação/neutralização que libera 42 resíduos de aminoácidos e permite que a enzima realize a clivagem da caseína κ com consequente coagulação do leite (VALLEJO *et al*, 2008). Para o ensaio enzimático, 5 mL de leite foram incubados por 5 minutos a 37°C, em seguida foi adicionado 1 mL do sobrenadante contendo a enzima quimosina ativada e analisou-se o efeito de coagulação do leite pelo tempo de 15 minutos a 37°C. O controle negativo (*P. pastoris* X-33) não apresentou coagulação. O tempo de coagulação dos três clones foi de aproximadamente 4 minutos, indicando que a enzima apresenta atividade.

Análises eletroforéticas da expressão proteica deverão ser feitas e novos ensaios enzimáticos com um número maior de clones serão realizados. Esses novos testes serão feitos juntamente com quantificação da proteína contida no ensaio e medição da densidade celular no momento da coleta do sobrenadante.

5.2 Construção de um vetor com marca auxotrófica *leu2-d*

Para que se possa utilizar a marca auxotrófica *leu2-d* em *P. pastoris*, três etapas foram propostas:

- a) Clonagem e verificação da funcionalidade do gene defeutivo *leu2-d* em *S. cerevisiae*.
- b) Criação de linhagem de *P. pastoris* auxotrófica para leucina a partir da deleção do gene *LEU2*.
- c) Construção de vetor de transformação de *P. pastoris* contendo o gene *leu2-d*.

5.2.1 Clonagem do alelo *leu2-d*

O gene *leu2-d* foi amplificado a partir do DNA genômico da linhagem de *S. cerevisiae* S288c usando os *primers* 5-leud e 3-leud. A sequência do amplicom é mostrada na **Figura 13**. O alelo *leu2-d* (~1,4 kb) possui apenas 29 pb da região 5' regulatória do gene além das regiões codante e terminadora de transcrição. Sítios de restrição para a enzima BglIII foram adicionados nas extremidades para posterior subclonagem do alelo em vetor de *Pichia*.

```

1  AGATCTATATATATTTCAAGGATATACCATTCTAATGTCTGCCCTAAGAAGATCGTCGT
61  TTTGCCAGGTGACCACGTTGGTCAAGAAATCACAGCCGAAGCCATTAAGGTTCTTAAAGC
121 TATTTCTGATGTTTCGTTCCAATGTCAAGTTCGATTCGAAAATCATTTAATTGGTGGTGC
181 TGCTATCGATGCTACAGGTGTCCACTTCCAGATGAGGCGCTGGAAGCCTCCAAGAAGC
241 TGATGCCGTTTTGTTAGGTGCTGTGGGTGGTCCTAAATGGGGTACCGGTAGTGTTAGACC
301 TGAACAAGGTTTACTAAAAATCCGTAAAGAACTTCAATTGTACGCCAACTTAAGACCATG
361 TAACTTTGCATCCGACTCTCTTTTAGACTTATCTCCAATCAAGCCACAATTTGCTAAAGG
421 TACTGACTTCGTTGTTGTCAGAGAATTAGTGGGAGGTATTTACTTTGGTAAGAGAAAGGA
481 AGACGATGGTGTGATGGTGTGCGTTGGGATAGTGAACAATACACCGTTCCAGAAGTGCAAAG
541 AATCACAAGAATGGCCGCTTTCATGGCCCTACAACATGAGCCACCATTGCCTATTTGGTC
601 CTTGGATAAAGCTAATGTTTTGGCCTCTTCAAGATTATGGAGAAAACTGTGGAGGAAAC
661 CATCAAGAACGAATCCCTACATTGAAGGTTCAACATCAATTGATTGATTCTGCCGCCAT
721 GATCCTAGTTAAGAACCCAACCCACCTAAATGGTATTATAATCACCAGCAACATGTTTGG
781 TGATATCATCTCCGATGAAGCCTCCGTTATCCCAGGTTCCCTTGGGTTTGTGCCATCTGC
841 GTCCTTGGCCTCTTTGCCAGACAAGAACACCGCATTGTTTGTACGAACCATGCCACGG
901 TTCTGCTCCAGATTTGCCAAAAGAATAAGGTCAACCCTATCGCCACTATCTTGTCTGCTGC
961 AATGATGTTGAAATTGTCATTGAACCTGCCTGAAGAAGGTAAGGCCATTGAAGATGCAGT
1021 TAAAAAGGTTTTGGATGCAGGTATCAGAACTGGTGATTTAGGTGGTTCCAACAGTACCAC
1081 CGAAGTCGGTGATGCTGTCGCCGAAGAAGTTAAGAAAATCCTTGCTTAAAAAGATTCTCT
1141 TTTTTTATGATATTTGTACATAAACTTTATAAATGAAATTCATAATAGAAACGACACGAA
1201 ATTACAAAATGGAATATGTTTCATAGGGTAGACGAAACTATATACGCAATCTACATACATT
1261 TATCAAGAAGGAGAAAAAGGAGGATGTAAAGGAATACAGGTAAGCAAATTGATACTAATG
1321 GCTCAACGTGATAAGGAAAAAGAATTGCACTTTAACATTAATATTGACAAGGAGGAGGGC
1381 ACCACACAAAAAGTTAGGTGTAACAGAAAATCATGAAACAGATCT

```

Figura 13: Sequência predita do alelo *leu2-d* isolado por PCR. Em preto, a região promotora truncada do gene *LEU2*; em vermelho, a região codante; em azul, o terminador da transcrição. Os sítios para BglII estão sublinhados.

Após a PCR, o amplicon de ~1,4 kb foi purificado e ligado ao vetor de clonagem pBluescript II KS seguindo-se transformação de *E coli* DH5 α . Após extração de DNA plasmidial de alguns transformantes, realizou-se a digestão com a enzima de restrição PvuII, que possui dois sítios no vetor, o que gera dois fragmentos, um de ~1,9 kb e outro de ~2,5 kb, conforme mostrado na **Figura 14**.

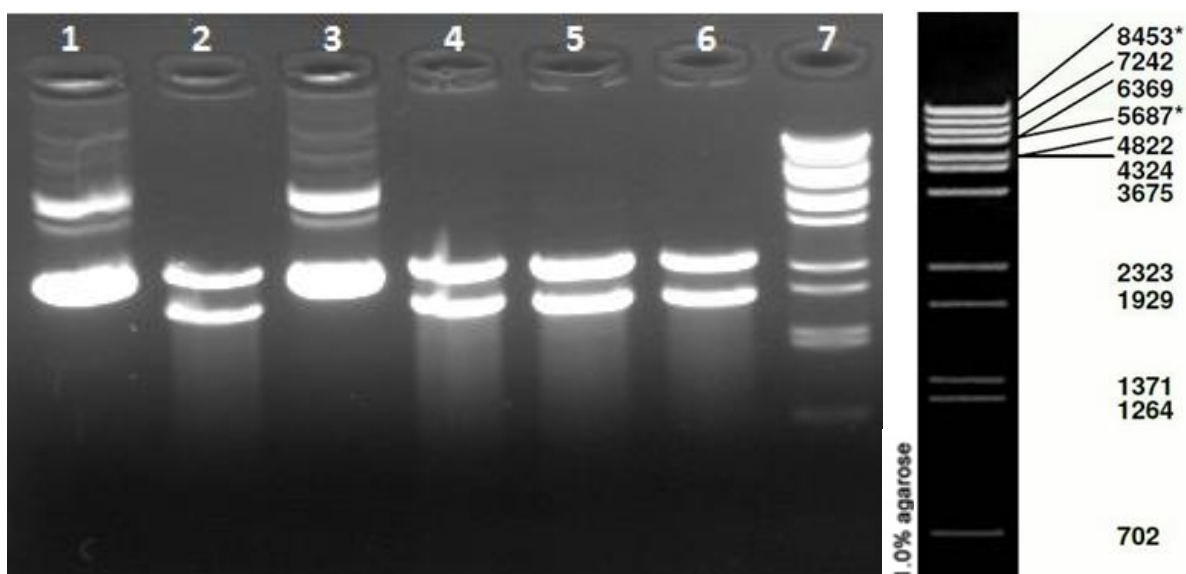


Figura 14: Análise eletroforética do perfil de restrição da clonagem do gene *leu2-d* no vetor **pBluescript II KS**. Poço 1: pBluescript II KS + *leu2-d* intacto (clone 1); Poço 2: clone 1 digerido com PvuII; Poço 3 pBluescript II KS + *leu2-d* intacto (clone 2); Poço 4: clone 2 digerido com PvuII (clone 2); Poço 5: clone 3 digerido com PvuII; Poço 6: clone 4 digerido com PvuII; ; poço 7: marcador de DNA λ BstEII.

Após a digestão com PvuII, um clone selecionado foi digerido com BglII para confirmar a presença do alelo *leu2-d* (~1,4 kb). Embora parcial, a digestão permitiu visualizar a banda de tamanho esperado (**Figura 15**). O vetor resultante foi denominado pBlue-*leu2-d*.

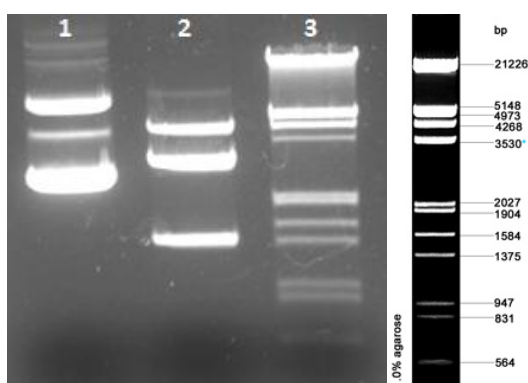


Figura 15: Análise Eletroforética do perfil de restrição da clonagem do gene *leu2-d* no vetor **pBluescript II KS**. Poço 1: pBluescript II KS + *leu2-d* intacto (clone 1); Poço 2: clone 1 digerido com BglII; Poço 3: marcador de DNA λ EcoRI/Hind III.

Para testar a funcionalidade do alelo *leu2-d* o mesmo foi subclonado no vetor de *S. cerevisiae* YEplac195 (ANEXO3). Este vetor foi digerido com BamHI, o que gera uma extremidade compatível com a gerada pela enzima BglII o que permite a subclonagem do alelo *leu2-d* que possui este sítio em suas extremidades. Após a digestão, o vetor YEplac195 foi desfosforilado e ligado ao alelo *leu2-d* purificado após digestão do vetor pBlue-*leu2-d* com BglII. Células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com o sistema de ligação e selecionada em meio contendo ampicilina 100 μ l/ μ l. A clonagem foi confirmada através do padrão de bandas após digestão com PvuII e KpnI (**Figura 16**). O vetor resultante foi denominado YEplac195-*leu2-d*.

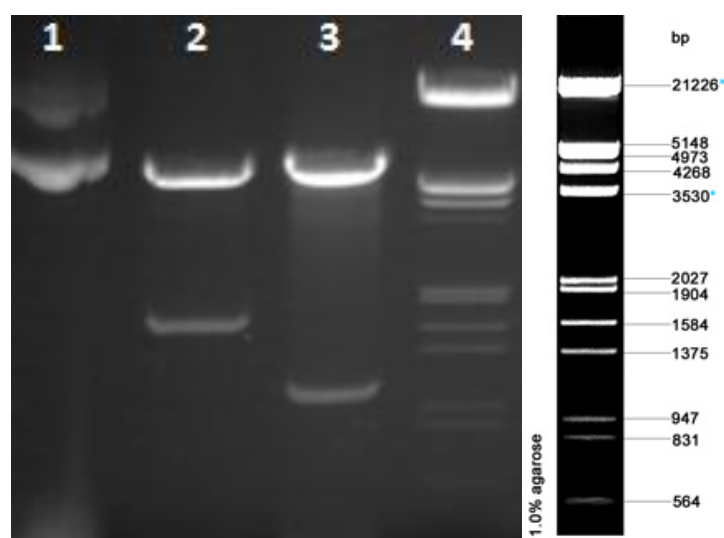


Figura 16: Análise Eletroforética do perfil de restrição da clonagem do gene *leu2-d* no vetor YEplac195. Poço 1: YEplac195-*leu2-d* intacto; poço 2: YEplac195-*leu2-d* digerido com PvuII; Poço 3: YEplac195-*leu2-d* digerido com KpnI; Poço 4: marcador de DNA λ EcoRI/HindIII.

O vetor YEplac195-*leu2-d* foi usado para transformar *S. cerevisiae* RE1006. A seleção dos transformantes se deu com a utilização de meio mínimo contendo histidina, triptofano e leucina omitindo-se uracila já que o vetor possui a marca auxotrófica *URA3*. As colônias

transformantes foram, então, transferidas para meio mínimo contendo histina e triptofano, mas sem leucina. O crescimento das colônias nessas placas mostrou que as células transformadas adquiriram o fenótipo Leu^+ devido à presença do gene *leu2-d*. Paralelamente, foi realizado, como controle negativo, uma transformação de *S. cerevisiae* RE1006 com o vetor YEplac195. O controle negativo cresceu na placa original de transformação (meio mínimo contendo histidina, triptofano e leucina), mas não apresentou colônias quando foi transferido para placa sem leucina.

Esses resultados demonstram o sucesso da clonagem e a funcionalidade do alelo *leu2-d* de *S. cerevisiae* que será usado para complementação auxotrófica de mutantes *leu2* de *P. pastoris*, tendo em vista a proximidade genética das duas leveduras.

5.2.2 Construção de linhagem auxotrófica para leucina

A fim de deletar o gene *LEU2* de *P. pastoris* que está relacionado com a via de biossíntese de leucina, propusemos a construção de um “cassete de deleção”. A deleção será feita por recombinação homóloga por substituição de toda a região codante do gene *LEU2* pelo gene *Sh ble* (resistência a zeocina). Dessa forma, gera-se um mutante *null* para o gene *LEU2* sendo que a seleção será feita em placas contendo zeocina. O gene *LEU2* de *P. pastoris* está localizado no cromossomo 3 (entre os nucleotídeos 86.733 e 87860) e sua região codante possui 1228 pb. Neste trabalho, foi escolhida a linhagem de *P. pastoris* X-33 para se construir a linhagem mutante *leu2*.

A estratégia geral para criação da linhagem *leu2* é mostrada na **Figura 17**. Para que seja feita a deleção por recombinação homóloga o cassete de deleção deve conter sequências com alta identidade aos alvos de integração nas suas extremidades 5' e 3' a fim de que ocorra

dois eventos de recombinação no *locus* desejado. Para isso, foram desenhados dois pares de *primers* para amplificação de regiões 5' e 3' do gene *LEU2* de *P. pastoris*. O primeiro par, PPLEU2-F1 e PPLEU2-R1, amplifica a porção 5' do gene, enquanto o par PPLEU2-F2 e PPLEU2-R2, amplifica uma porção 3'.

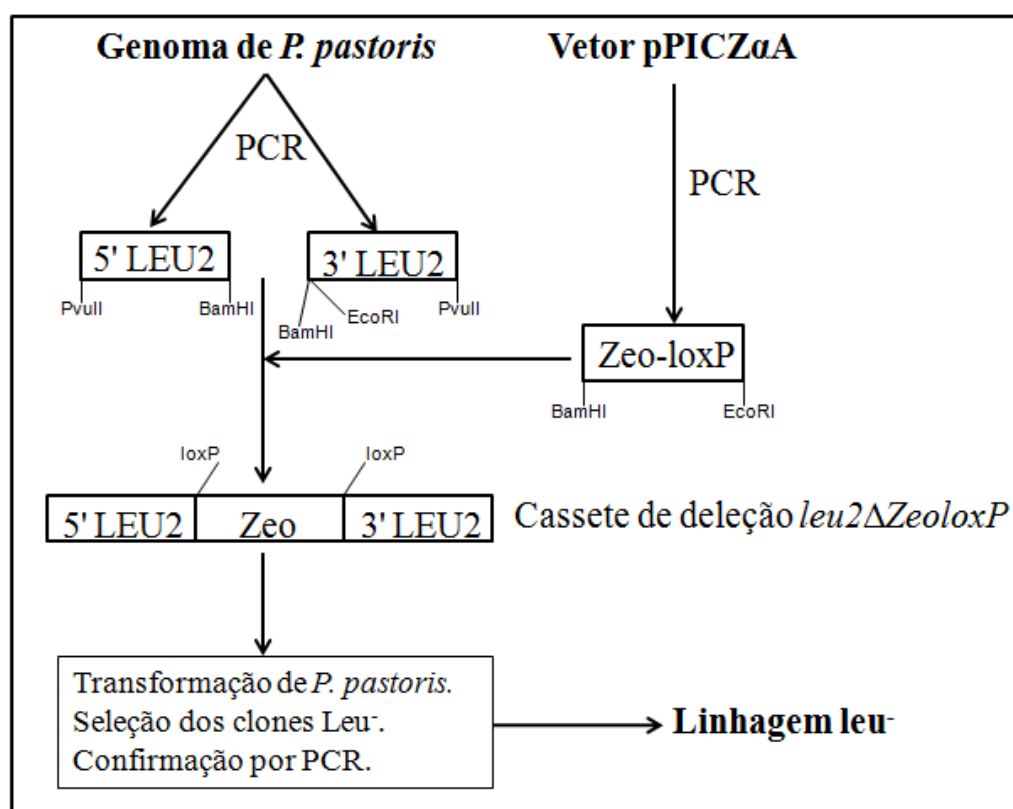


Figura 17: Estratégia para deleção do gene *LEU2* de *P. pastoris*.

As sequências das regiões amplificadas 5' e 3' estão representadas na **Figura 18**. A região amplificada 5' (5'*LEU2*) possui 324 pb e suas extremidades possuem os sítios para PvuII e BamHI. Já a região amplificada 3' (3'*LEU2*) possui 343 pb e em uma de suas extremidades estão presentes os sítios para BamHI e EcoRI, e na outra extremidade, PvuII. O resultado da PCR de ambas as sequências é mostrado na **Figura 19**.

GCTGAAGAGTCCAAGTCCAAGGTCTCCAATTCCGGAAGGGCTGAACTCGAGTATGTCGAC
 PPLEU2-F1
 ATTGATAAGTATATTGAGGAGCAGAAGTAGATGTTAAAGCATTTTTTATTTGTATTTTTG
 ATTGTAGTTTACCTCTGCCAAGTGTATAGCTCTTTGGGCCATATTGCCTTCCAATAGCCA
 CTCTTGCCCAATAATTCAACTGAAAGATGATTTGCTTTAGTGTATACTTTCCATCTAACA
 TCCGCTCCACAATGTCGCGACGATGTGATGAATCATTCCGTATACTCAGGGACTTTTCAC
CAACATAATATCTCCCTGATGTCCGAACCAATTACCAAGAAACCCAAGTCTGTGATTCC
 PPLEU2-R1
 CAAGAAGATCGTTCTTCTTCCAGGTGACCACGTTGGTGTGAAATTATTGACGAGGCCGT
 CAAAGTCTGAAAGCCATTAGCAGCGTTTCTCCAAATGCTGATTTTGAGTTCCAAACTCA
 ACTAATCGGAGGAGCTGCTATTGATGCCACCGGTTCTCCACTACCAGATGAAACCTTGGA
 AGCTGCTAGAGGCGCTAATGCTGTCTTTTTGGGGGCTGTTGGTGGGCCATAATGGGGTAC
 AGGTGATGTCAGACCAGAACAAGGTCTACTGAAAATTAGAAAAGAACTCAACTTGTATGC
 TAACTTGCGTCTTGTAACTTTGCCAGTGACTCTCTTCTAAAGCTCTCCCCATTGAAAGA
 GGATATCGTTCGTGGAACCAACTTCACTGTTGTTTCGTGAGCTTGTAGGCGGTATCTACTT
 TGGAGAAAAGAACTGAAGATGATGGCTCAGGAGTTGCCTGGGATACTGAGAAATACTCTGT
 CCCTGAAGTGCAACGTATTACCCGTATGGGTGCATTTCTGGCTCTGCAAAGCGATCCTCC
 TTTGCCAATATGGTCTTTGGACAAGGCAAATGTCTTGGCTTCTCCCGTTTGTGGAGAAA
 AACCGTTACTGAAACTTTGGAGAAGGAGTTTCCCAATTGACTTTGAACCATCAATTGAT
 CGACTCTGCGGCCATGATTTTGTAGTAAATCTCCTTCCAAGCTGAATGGTATTGTTTTGAC
 TAATAACATGTTCCGGAGATATCATTTCCGATGAAGCATCCATGATTCAGGCTCTTTAGG
 ACTGTTGCCATCGGCTTCTCTAGCTTCTCTGCCAGATTCTAACGAAGCCTTTGGACTGTA
 CGAGCCTTGCCATGGCTCAGCTCCAGATTTGGACAAAGGTAAGGTCAACCCTGTAGCTAC
 AATCTTGTCTGCAGCTATGATGCTTCGTCTATCCCTGAATCTTACAGAAGAAGCTGATGC
 TTTAGAGAAAAGCCGTCGGTCAAGTTTTGGACTCTGGGATCATGACTGGAGATTTAGGAGG
 CTCCAACTCTACCACTGAAGTAGGAGATGCTATTTCCAAGGCTGTGGTCGACATTTTGAA
AAACTAGACGAAAGAAAACTTGTATAAACACTGCAATAAATATAGATAATCAAGTCTAA
 PPLEU2-F2
 CTATTTCTCTACTGTAAGGTTTCGGAAAAAGTCCATACAAGTGGTAAATACCACCAGTAAG
 ATACCTCCTCCTGGTCC TAGACGTAACACTTTAGGTAGGAATCCTTTATAAAGAGCTGAG
 AAACCTTCTCTTTGGTAACCAGCAGCAACGATGGTAAAGTCCAGTTATACTTCGGAACC
 ACACCAGGAACCTTGACAGTGTTTTGGATACGAGACTTGACCACGTCAAATGGAGTATTC
 AGTATGGTACCGACAGTACCACCAATGGCACCAG
 PPLEU2-R2

Figura 18: Sequência do locus *LEU2* de *P. pastoris*. Em vermelho, a região codante do gene *LEU2*. A região de anelamento dos *primers* está sublinhada. A sequência foi obtida a partir dos dados do genoma da linhagem GS115 de *P. pastoris* (SCHUTTER *et al*, 2009).

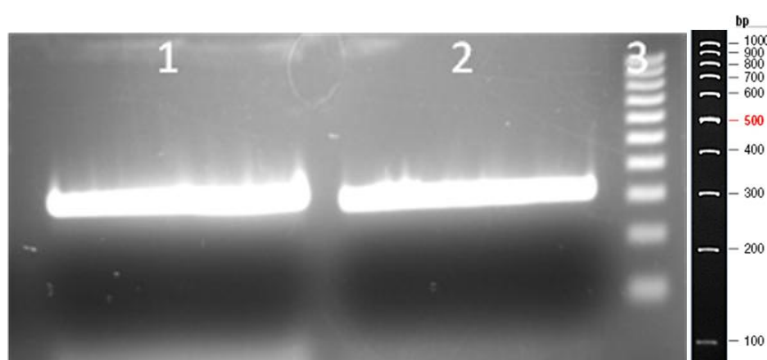


Figura 19: Análise eletroforética da amplificação da sequência 5'*LEU2* e da sequência 3'*LEU2*. Poço 1: produto de amplificação da sequência (5'*LEU2*). Poço 2 produto de amplificação da sequência 3'*LEU2*. Poço 3: Marcador de DNA 100 pb (Fermentas).

O gene de resistência *Sh ble*, ao ser amplificado do vetor pPICZ α A receberá em cada extremidade uma sequência *loxP* oriunda dos *primers* 5PP-LOX e 3PP-LOX. Essa sequência permitirá a excisão do gene *Sh ble* por recombinação para a reciclagem desta marca de seleção.

A sequência *loxP* é a mesma sequência do sítio *lox* encontrado no genoma do bacteriófago, ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT, e é formada por dois palíndromos invertidos de 13 pb e uma sequência central de 8 pb (em negrito) totalizando 34 pb. As duas sequências palindrômicas são sítios de ligação para a enzima Cre recombinase enquanto que os 8 pb centrais funcionam como espaçador e direcionam a sequência. Duas sequências que estejam orientadas na mesma direção ao serem recombinadas produzem um sítio único de *loxP* com liberação do fragmento interno entre elas. A proteína Cre é uma recombinase sítio-específica e catalisa a reação de recombinação entre as duas sequências *loxP* (CARTER & DELNERI, 2010).

O fragmento amplificado do gene *Sh ble* foi denominado ZEO*loxP* (**Figura 20**).

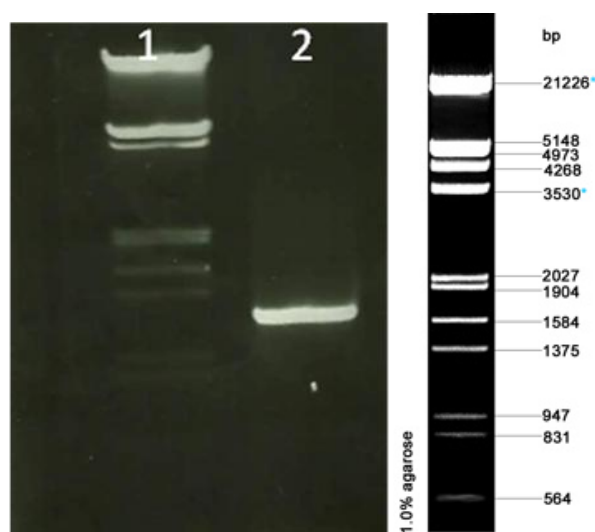


Figura 20: Análise eletroforética da amplificação da sequência ZEOloxP. Poço 1: marcador de DNA λ EcoRI/HindIII. Poço 2: produto de amplificação da sequência ZEOloxP.

Após amplificação, os três fragmentos, *5'LEU2*, *3'LEU2* e ZEOloxP, foram clonados no vetor pPCV-B para posterior montagem do cassete de deleção. Os vetores resultantes foram denominados pPCV-B5leu2, pPCV-B3leu2 e pPCV-BZeolox. As **Figuras 21, 22 e 23** mostram a análise eletroforética do perfil de restrição dos vetores pPCV-B5leu2, pPCV-B3leu2 e pPCV-BZeolox, respectivamente, confirmando a clonagem dos fragmentos, *5'LEU2*, *3'LEU2* e ZEOloxP.

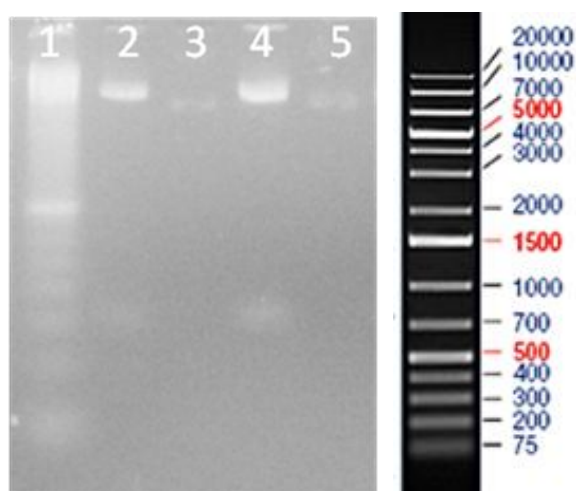


Figura 21: Análise Eletroforética do perfil de restrição da clonagem do fragmento 5'*LEU2* no vetor pPCV-B (pPCV-B5leu2). Poço 1: Marcador de DNA GeneRuler™ 1kb Plus (Fermentas); poço 2: vetor pPCV-B5leu2 digerido com BamHI + PvuII (clone 1); Poço 3: vetor pPCV-B5leu2 intacto (clone 1); Poço 4: vetor pPCV-B5leu2 digerido com BamHI + PvuII (clone 2); Poço 5: vetor pPCV-B5leu2 intacto (clone 2).

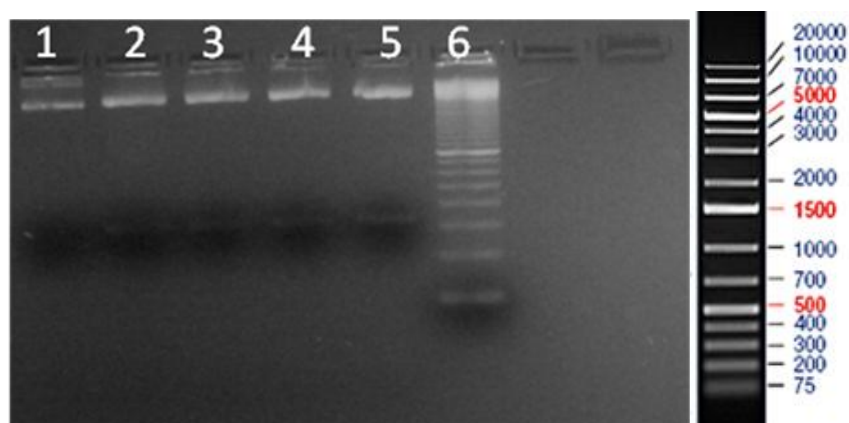


Figura 22: Análise Eletroforética do perfil de restrição da clonagem do fragmento 3'*LEU2* no vetor pPCV-B (pPCV-B3leu2). Poço 1: vetor pPCV-B3leu2 intacto (clone 1); poço 2: vetor pPCV-B3leu2 digerido com BamHI e PvuII (clone 1); Poço 3: vetor pPCV-B3leu2 digerido com BamHI + PvuII (clone 2); Poço 4: vetor pPCV-B3leu2 digerido com BamHI + PvuII (clone 3); Poço 5: vetor pPCV-B3leu2 digerido com BamHI + PvuII (clone 5); Poço 6: Marcador de DNA GeneRuler™ 1kb Plus (Fermentas).

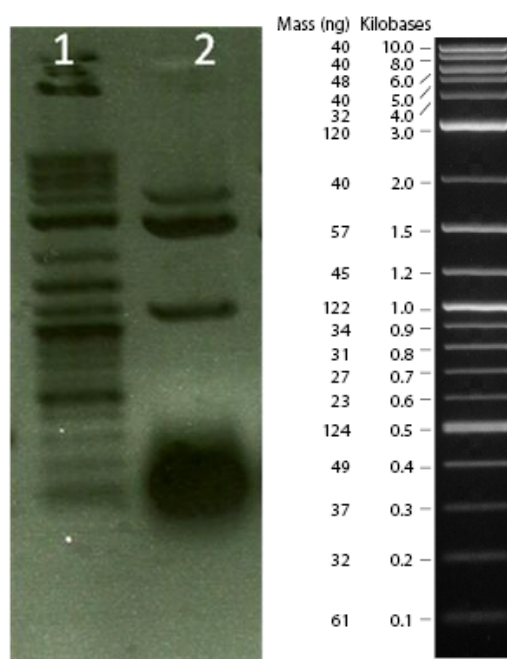


Figura 23: Análise Eletroforética do perfil de restrição da clonagem do cassete ZEOloxP no vetor pPCV-BZeolox. Poço 1: marcador de DNA 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs); poço 2: digestão do vetor pPCV-BZeolox com BamHI e EcoRI.

Para montagem do cassete de deleção, do fragmento 3'*LEU2* será retirado do vetor pPCV-B3leu2 após digestão com BamHI e SacI (este último sítio está presente no vetor) e subclonado no vetor pPCV-B5leu2 digerido com as mesmas enzimas. O último passo para montagem do cassete de deleção será a subclonagem do fragmento ZEOloxP entre os fragmentos clonados 5'*LEU2* e 3'*LEU2* após digestão com BamHI. A digestão do vetor resultante com PvuII liberará o cassete de deleção que, após purificação, poderá ser usado para transformar *P. pastoris*.

Após transformação de *P. pastoris* com o cassete de deleção, o cultivo dos transformantes deverá ser feito em meio YPD com zeocina, selecionando os transformantes primeiramente com a marca dominante. Posteriormente, serão feitas análises do fenótipo em meio mínimo com e sem leucina para confirmar a entrada do cassete de deleção no *locus*

esperado. Uma PCR será realizada para confirmação da deleção da região codante do *locus LEU2*.

A levedura resultante será usada com hospedeira para transformação com o vetor contendo a marca *leu2-d*. Para que surjam transformantes prototróficos, o vetor deverá se integrar em múltiplas cópias no genoma a fim de compensar a deficiência no promotor *leu2-d*. Isto será obtido após a clonagem das sequências do rDNA 5S, um trabalho que também será realizado posteriormente. Para confirmar a integração de múltiplas cópias do vetor, os clones transformantes serão transferidos para placas contendo concentrações crescentes de G418 uma vez que a resistência a esse antibiótico é dose dependente. Além disso, a atividade de quimosina B nos sobrenadantes das culturas será testada. Espera-se que as modificações introduzidas nesse vetor contribuam para um incremento da produção da proteína heteróloga.

6 CONCLUSÃO

- 1) Com a utilização do gene de resistência *kan^R* foi possível a seleção de transformantes em meio contendo o antibiótico G418 apesar de terem sido feitas mudanças na região codante do gene, com substituição de um aminoácido.
- 2) O promotor P_{PGK1}, com códons otimizados, mostrou-se funcional para a expressão da proteína heteróloga quimosina B de *B. taurus* neste vetor.
- 3) O peptídeo sinal fator α de acasalamento de *S. cerevisiae* com códons otimizados para *P. pastoris* foi capaz de promover a secreção eficiente da quimosina B.
- 4) A quimosina B expressa mostrou-se funcional promovendo a coagulação de leite após ser ativada por baixo pH.
- 5) O alelo defectivo *leu2-d* foi clonado com sucesso sendo capaz de complementar a mutação auxotrófica *leu2* em linhagem de *S. cerevisiae* quando clonado em vetor episomal.
- 6) Foram desenvolvidas ferramentas para construção de uma linhagem de *P. pastoris* mutante auxotrófica para o gene *LEU2*.
- 7) Em seu conjunto, os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o desenvolvimento de tecnologia que poderá permitir um incremento da expressão heteróloga em *P. pastoris* por meio de estratégias de aumento do número de cópias integradas do vetor no genoma desta levedura.

7 PERSPECTIVAS

A fim de gerar um vetor com maior potencial para integração de multicópias os vetores construídos nesse projeto receberão uma sequência do DNA ribossomal (rDNA) 5S. Estudos de bioinformática serão desenvolvidos para se determinar a sequência exata do rDNA 5S de *P. pastoris* permitindo que uma porção desta sequência seja amplificada e clonada no vetor pPICKCHYM formando o novo vetor pPICKCHYM-R. A sequência rDNA 5S será utilizada como sequência alvo para integração do vetor no genoma e espera-se que facilite a ocorrência de eventos de integração.

O vetor pPICKCHYM-R receberá a sequência *leu2-d*, formando o vetor pPICKCHYM-RL que será utilizado para transformar uma linhagem de *P. pastoris leu2* a ser criada neste projeto. Após transformação da linhagem *P. pastoris leu2* com o vetor pPICKCHYM-RL e seleção em G418, a habilidade do vetor em produzir transformantes prototróficos será testada. Esperamos que um clone selecionado em meio mínimo sem a adição de leucina possua um alto número de cópias, pois o alelo defectivo *leu2-d* proporciona um baixo nível de expressão e necessita estar em grande número de cópias para restabelecer a via biossintética de leucina e suprir a necessidade nutricional deste aminoácido.

Colônias isoladas transformadas com o vetor pPICKCHYM-RL serão semeadas em placas com maiores concentrações do antibiótico G418. A partir desse gradiente serão selecionados clones com resistência a altas concentrações do antibiótico, sendo esperado que a resistência a altas quantidades da droga seja decorrente do aumento no número de cópias do gene de resistência. Análises do número de cópias do vetor integrado serão feitas a partir de RT-PCR e southern blot, para relacionar possíveis variações no nível de expressão proteica às alterações no número de cópias do vetor integrado ao DNA.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J.; HONG, J.; LEE, H.; PARK, M.; LEE, E.; KIM, C.; CHOI, E.; JUNG, J.; LEE, H. Translation elongation factor 1- α gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 601-608, 2007.

ALMEIDA, J. R. M.; MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGK1*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 22, p. 725-737, 2005.

CARTER, Z.; DELNERI, D. New generation of loxP-mutated deletion cassettes for the genetic manipulation of yeast natural isolates. **Yeast**, v. 27, p. 765-775, 2010.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; SUNGA, A. J.; 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.

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

CLARE, J. J., ROMANES, M. A., RAYMENT, F. B., ROWEDDER, J. E., SMITH, M. A., PAYNE, M. M., SREEKRISHNA, K., HENWOOD, C. A. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. **Gene**, v. 105, p. 205-212, 1991.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p. 23-52, 2000.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. **Molecular and General Genetics**, v. 219. p. 320-323, 1989.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, p. 119-138, 2005.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297–306, 2009.

ERHART, E.; HOLLENBER, G. C. P. The presence of a defective LEU2 gene on 2 μ m DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number. **Journal of Bacteriology**, v. 156, p 625–635, 1983.

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, p. 1-15, 2008.

INVITROGEN. pPICZ α A, B, and C *Pichia* expression vectors for selection on ZeocinTM and purification of secreted, recombinant proteins. v. 195-20, 2010.

KAPPELER, S. R.; BRINK, H. (J.) M. V. D.; RAHBEEK-NIELSEN, H.; FARAH, Z.; PUHAN, Z.; HANSEN, E. B.; JOHANSEN, E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 647-654, 2006.

KUMAR, A.; SHARMA, J.; MOHANTY, A. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 108-113, 2006.

MARANHÃO, A. Q.; MORAES, L. M. P. Extração e purificação de DNA. *In*: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; De-SOUZA, M. T.(Orgs.), 2003.

MARX, H., MECKLENBRÄUKER, A., GASSER, B., SAUER, M. MATTANOVICH, D. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1260–1270, 2009.

MENÉNDEZ, J., GARCÍA, B., HIDALGO, Y. New method for the selection of multicopy transformants of *Pichia pastoris* using 3-Amino-1,2,4 Triazol. **BioTechniques**, v. 29, p. 1094-1099, 2000.

PAPAKONSTANTINO, T., HARRIS, S., HEARN, M. T. W. Expression of GFP using *Pichia pastoris* vectors with zeocin or G-418 sulphate as the primary selectable marker. **Yeast**, v. 26, p. 311–321, 2009.

PATRICK, S. M.; FAZENDA, M. L.; McNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005.

REID, J.R.; COOLBEART, T.; AYERS, J. S.; COOLBER, K. P. The Action of chymosin on κ -casein and its macropeptide: effects of pH and analysis of products of secondary hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 559-569, 1997.

ROMANOS, M. A., SCORER, C. A., CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v. 8, p. 423–488, 1992.

ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level expression. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 527-533, 1995.

ROMANOS, M., SCORER, C., SREEKRISHNA, K., CLARE, J. The generation of multicopy recombinant strains. **Methods in Molecular Biology**, v. 103, p. 55–72, 1998.

SAMBROOK, j.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHUTTER, K. D.; LIN, Y. C.; TIELS, P.; HECKE, A. V.; GLINKA, S.; LEHMANN, J. W.; ROUZE, P. PEER, Y. V.; CALLEWAERT, N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 561-569, 2009.

SEARS, I. B., OCONNOR, J., ROSSANESE, O. W., GLICK, B. S. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 14, p. 783–790, 1998.

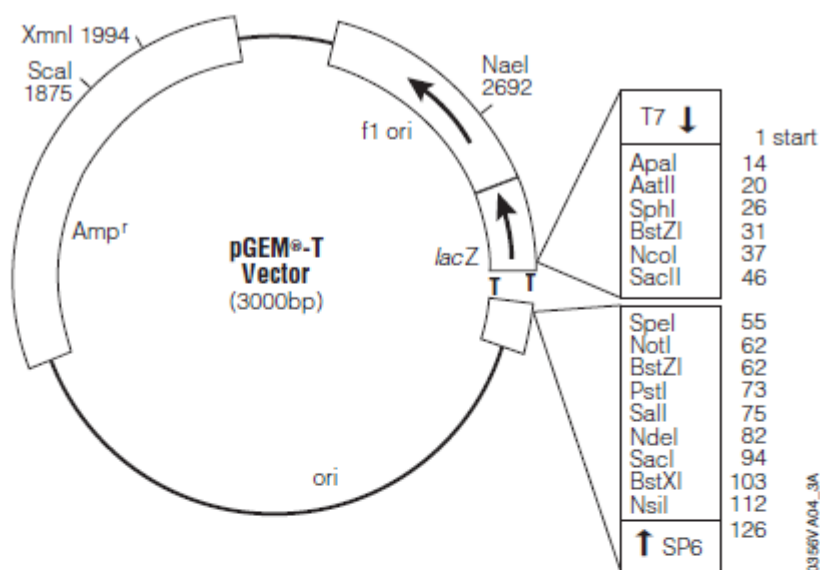
SERVIENÉ, E., MELVYDAS, V. Effect of the defective leucine gene *leu2-d*, on the properties of recombinant plasmid in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biologija**, v. 4, p. 30-33, 2001.

STORICI, F., COGLIEVINA M., BRUSCHI. A 2- μ m DNA-based marker recycling system for multiple gene disruption in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 15, p. 271-283, 1999.

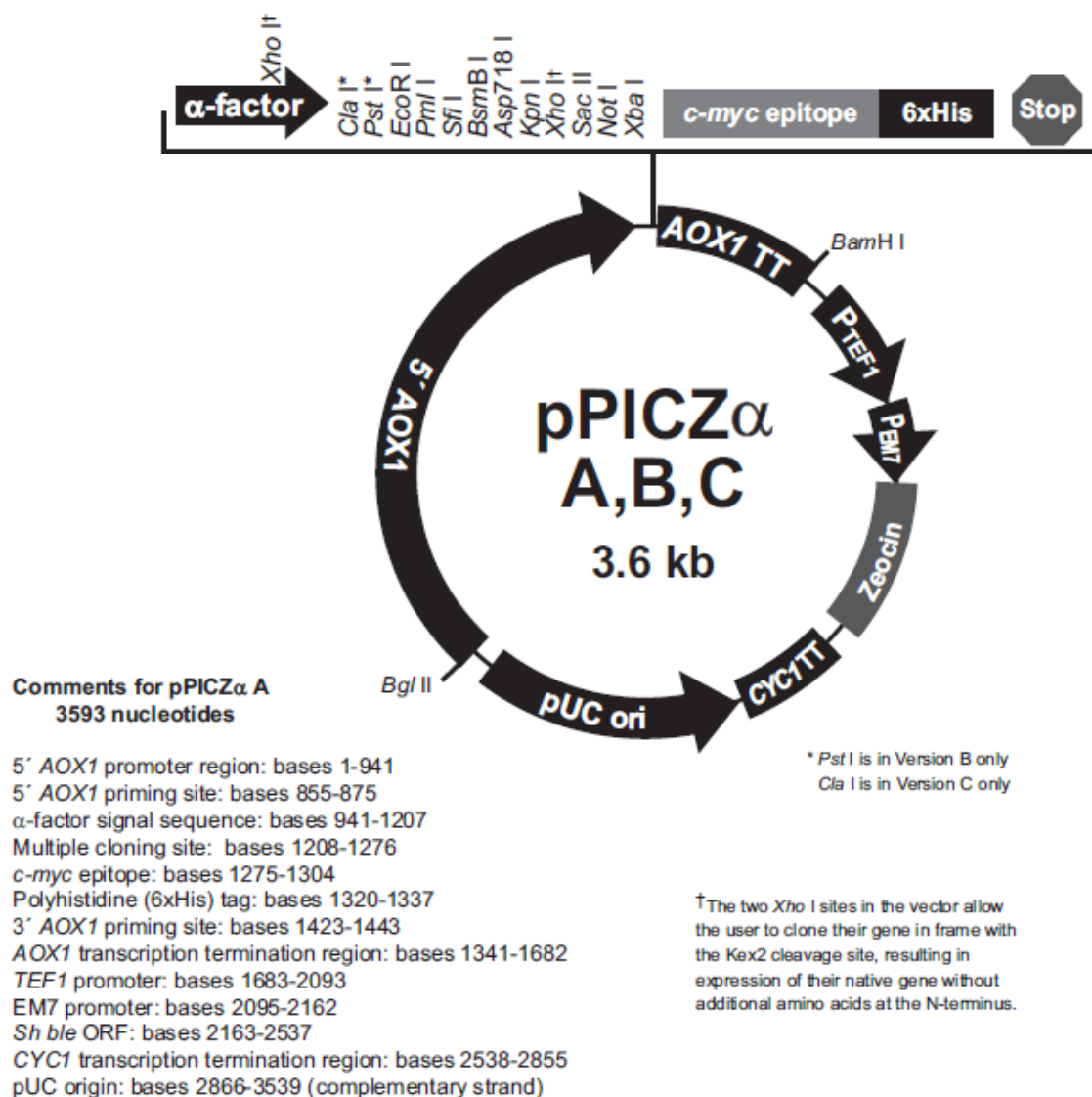
SUNGA, A. J., TOLSTORUKOV, I., CREGG, J. M. Posttransformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 870–876, 2008.

VALLEJO, J. A.; AGEITOS, J. M.; POZA, M. VILLA, T. G. Cloning and expression of buffalo active chymosin in pichia pastoris. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 10606-10610, 2008.

Anexo 1. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM®-T (Promega)

**pGEM®-T Vector sequence reference points:**

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-113
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161-177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185-201
β -lactamase coding region	1322-2182
phage f1 region	2365-2820
<i>lac</i> operon sequences	2821-2981, 151-380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941-2957
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2984-3

Anexo 2. Representação esquemática do mapa físico do vetor pPICZ α A (Invitrogen)

Anexo 3. Representação esquemática do mapa físico do vetor YEplac 195

