

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

Utilização do promotor do gene *PGK1* de *Pichia pastoris* para expressão heteróloga

Andrelisse Arruda

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres

Brasília-DF

2008

---

---

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

Utilização do promotor do gene *PGK1* de *Pichia pastoris* para expressão heteróloga

Andrelisse Arruda

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília-DF

2008

---

---

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do Professor Fernando Araripe Torres, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. Fernando Araripe G. Torres - (UNB) – Orientador

Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima Grossi de Sá - (Embrapa Cenargen) - Examinador interno

Prof. Dr<sup>a</sup>. Lucília Helena Marcellino - (Embrapa Cenargen) - Examinador externo

### **Membro Suplente**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Elida Geralda Campos

25 de abril de 2008

---

---

*À minha família, meu porto seguro,  
principalmente à minha mãe que é meu  
grande exemplo de determinação e  
coragem.*

---

---

*Se não tivesse nadado contra a maré, eu não teria  
chegado até aqui...*

*Quem acredita sempre alcança...*

---

---

*Mas é claro que o sol  
Vai voltar amanhã  
Mais uma vez, eu sei  
Escuridão já vi pior,  
De endoidecer gente sã  
Espera que o sol já vem  
Nunca deixe que lhe digam  
Que não vale a pena acreditar  
No sonho que se tem  
Ou que seus planos nunca vão dar certo  
Ou que você nunca vai ser alguém...*

*...Se você quiser alguém em quem confiar  
Confie em si mesmo  
Quem acredita sempre alcança  
Quem acredita sempre alcança*

Renato Russo

---

---

## Agradecimentos

Ao Professor Fernando Araripe, pelo voto de confiança desde o período que antecedeu a seleção do mestrado, durante o período em que os resultados da pesquisa não saíam, até os últimos dias na bancada e na escrita desta dissertação quando o prazo havia se esgotado.

Muito Obrigada!

À professora Lídia Maria, por nunca deixar de sanar dúvidas, pelo seu tempo durante as explicações e teorias sobre a execução deste trabalho e também pelas sábias sugestões quando percebia o cansaço evidente. Muito Obrigada!

À Viviane Reis, muito companheira, que sempre ajudou durante os momentos difíceis e de sucesso, dando muitas idéias e sugestões. Muito obrigada!

Ao Grupo de Pesquisa do LAB 2, muito obrigada e meus parabéns pelo nosso grupo, onde temos a liberdade em dar sugestões e vontade de contribuir para o bom andamento dos trabalhos, tornando um local muito agradável de convivência.

A todos os companheiros da Biomol que ajudaram a fazer os dias muito mais felizes:

Camila e Rafael, Marciano, Luciano (agora na UFRJ), Pollyanna, Juliana, Loise, Patrícia, Bruno (obrigada por emprestar a carranca e o pé de coelho, depois disso os experimentos deram certo!!! hehee), Karen, Saulo, Basti, Hernandez, Daniel Paiva, Carol, Theyssa, Alex, Hugo, Camila e Rafael (veterinária), Beatriz, Isabel, Davi, Tiago, Túlio, Gil (pelas sugestões dos tópicos a estudar para a seleção do mestrado e principalmente pelas aulas de revisão de Biofísica!!)

Marielle e Marcelo(Goiânia), Cristiane (UFRJ), Andréia(USP)

À Janice, Ângela e Ezequiel e

Todos os colegas que fizeram parte do dia-a-dia compartilhando experiências.

À Dona Ivonildes e Dona Fátima pelo carinho, atenção, pelos sorrisos e conversas.

---

---

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular-UNB.

À Ana da coordenação, que sempre nos ajuda. Muito Obrigada!

Às meninas da república, que foram companheiríssimas logo que cheguei a Brasília:

Paula, Júlia, Marília, Maísa e todos seus amigos sempre muito gentis.

Também quero agradecer de coração a estes profissionais que tenho grande admiração e que de algum modo contribuem para minha formação:

Dr. Flávio Ribeiro Araújo (Embrapa-CNPGC)

Dr. Cleber Oliveira Soares (Embrapa-CNPGC)

Dr. Cláudio Roberto Madruga

Dr. Stênio Perdigão Fragoso (IBMP)

E outros grandes profissionais que também participaram:

Dr<sup>a</sup> Lenita Ramires dos Santos, Dr<sup>a</sup> Cacilda Borges do Valle (Embrapa-CNPGC), Letícia Jungmann Cançado (Embrapa-CNPGC), Dr<sup>a</sup> Lucimara Chiari (Embrapa-CNPGC).

Professora Doroty Mesquita Dourado (UNIDERP) que propiciou meu primeiro contato com a pesquisa.

Professores Ronaldo Rosa e Heron (Sistema Megawatt de Ensino) por mostrar que “o mundo está de braços abertos para quem quiser abraçá-lo”.

Aos amigos de longa data que mesmo à distância sempre deram muita força Dani, Alexandra, Erick.

A todos meus familiares que são muitos, cujos agradecimentos não caberiam aqui Obrigada tios e tias, primos e primas, à minha afilhada linda Nayane, e à minha madrinha querida Alzeni, por toda essa união que carrega nossas baterias.

---



---

Agradeço à Minha Avó Maravilhosa pelo imenso carinho e por ter enviado brigadeiro delicioso por mais de 1.200 Km.

Genaldo, grande amigo, obrigada pelo apoio e confiança, e por cuidar tão bem da minha mãe, hehehe. Você tem acompanhado essa jornada e sabe o quanto nos empenhamos em busca de nossas conquistas. Muito obrigada!

Pai, estou muito feliz com sua visita e já com saudades, obrigada por sua amizade e pela compreensão neste período que precisei ficar ausente. Te amo !

Ao meu lindo namorado, amado noivo, pela paciência em me acompanhar neste período, principalmente às idas ao laboratório aos sábados, domingos, feriados e várias madrugadas e por compreender esta grande dedicação. Sua companhia deixa os dias muito mais doces.

Não tenho palavras em meu coração para expressar a gratidão à minha MÃE  
Obrigada por tudo. Amo você MÃE!

Agradeço à Deus por me proporcionar tamanha felicidade, por ter iluminado meu caminho e abençoado minhas decisões, agradeço por manter-me saudável principalmente nos momentos mais críticos e por manter a paz em minha família, pois sem qualquer destes fatos, eu não teria conseguido.

Muito Obrigada!

---

---

# Índice

*Investir em conhecimento  
rende sempre os melhores  
juros.*

Benjamin Franklin

1706-1790

---

---

# Índice

<b>Índice de figuras</b>	i
<b>Índice de tabelas</b>	iv
<b>Lista de abreviaturas e símbolos</b>	v
<b>Resumo</b>	vii
<b>Abstract</b>	viii
<b>1. Introdução</b>	1
1.1 Leveduras metilotróficas e a via metabólica do metanol	1
1.2 <i>Pichia pastoris</i> como sistema para expressão de proteínas heterólogas	3
1.3 Linhagens de <i>P. pastoris</i>	4
1.4 Vetores de expressão	5
1.5 Integração em <i>P. pastoris</i>	7
1.6 Integração de múltiplas cópias	8
1.7 Promotores de <i>P. pastoris</i>	9
1.8 O Promotor P <sub>PGKI</sub>	10
1.9 Promotores constitutivos x induzíveis	11
<b>2. Justificativa</b>	12
<b>3. Objetivos</b>	13
<b>4. Material e métodos</b>	14
4.1 Microrganismos	14
4.2 Material	15
4.2.1 Vetores	15
4.2.2 Tampões e soluções	15
4.2.3. Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida	17

---

---

desnaturante (SDS-PAGE)	
4.2.4. Revelação de proteínas com <i>Coomassie blue</i>	18
4.2.5. Dosagem de atividade amilolítica	19
4.2.6. Soluções para extração de DNA plasmidial	19
4.2.7. Marcadores moleculares para DNA	20
4.2.8. Marcador de massa molecular para proteínas	20
4.2.9. Enzimas	20
4.2.10. Kits utilizados	21
4.2.11. Oligonucleotídeos	21
4.2.12. Meios de cultura para bactéria	22
4.2.13. Meios de cultura para levedura	23
4.2.14. Ferramentas de bioinformática	24
4.3. Métodos	25
4.3.1. Cultivo de microrganismos	25
4.3.2. Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico ( $\text{CaCl}_2$ )	25
4.3.3. Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico ( $\text{RbCl}$ )	25
4.3.4. Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico	26
4.3.5. Preparação de DNA Plasmidial em Pequena Escala (Miniprep) (Adaptado de Sambrook & Russel, 2001)	26
4.3.6. Preparação de DNA plasmidial em grande escala (Maxiprep)	27
4.3.7. Precipitação de DNA	27

---

---

4.3.8. Digestão de DNA com enzimas de restrição	27
4.3.9. Tratamento com Klenow DNA Polimerase	27
4.3.10. Análise em gel de agarose (Sambrook & Russel, 2001)	27
4.3.11. Sistema de ligação	28
4.3.12. Purificação e eluição de fragmentos de DNA	28
4.3.13. Deleções controladas do promotor $P_{PGKI}$	28
4.3.14. Desenho dos oligonucleotídeos	28
4.3.15. PCR	29
4.3.15.1. Com enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	29
4.3.15.1.2. PCR de colônia	29
4.3.15.3. Com enzima <i>Taq</i> Platinum	29
4.3.16. Purificação e clonagem dos produtos de PCR	29
4.3.17. Transformação em <i>P. pastoris</i> (adaptado de Scorer <i>et al.</i> , 1994)	30
4.3.18. Expressão de $\alpha$ -amilase em <i>P. pastoris</i>	31
4.3.19. Precipitação de proteínas com TCA	31
4.3.20. Precipitação de proteínas com acetona e TCA	31
4.3.21. Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	32
4.3.22. Determinação da atividade amilolítica	32
4.3.23. Ensaio de atividade de $\alpha$ -amilase em placa	32
4.3.24. Atividade amilolítica quantitativa (dextrinizante)	33
4.3.25. Análise de resistência a zeocina	33

---

---

4.3.26. Teste de atividade $\beta$ -galactosidade	33
4.3.26.1. Ensaio em placa (Guarente & Mason, 1983)	33
4.3.26.2. Permeabilização da parede celular de <i>P. pastoris</i> (adaptado de Rezaee, 2003)	34
4.3.26.3. Ensaio em placa (adaptado de Woods <i>et al.</i> , 1998)	34
4.3.27. PCR de colônia de leveduras	34
<b>5. Resultados</b>	36
5.1. Deleção do promotor $P_{PGKI}$ e transformação de <i>P. pastoris</i>	36
5.1.1. Integração do vetor pPZ $\alpha$ AMY no genoma de <i>P. pastoris</i>	36
5.1.2. Deleções controladas do promotor $P_{PGKI}$	37
5.2. Expressão intracelular em <i>P. pastoris</i> utilizando o promotor $P_{PGK}$	53
5.2.1. Construção de vetores para expressão intracelular	53
5.2.2. Amplificação e clonagem do gene <i>lacZ</i>	53
5.2.3. Clonagem de fragmentos do promotor $P_{PGK}$	53
5.3. Construção dos vetores para expressão intracelular de D-lactato desidrogenase	61
<b>6. Discussão</b>	65
<b>7. Conclusão</b>	73
<b>8. Perspectivas</b>	74
<b>9. Referências Bibliográficas</b>	75
<b>10. Anexos</b>	84

---

---

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Via metabólica do metanol em <i>Pichia pastoris</i>	3
<b>Figura 2.</b> Mapa físico do vetor pPZ $\alpha$ AMY	36
<b>Figura 3.</b> Teste de atividade amilolítica em placa de clones de <i>P. pastoris</i> GS115 transformados com o vetor pPZ $\alpha$ AMY	37
<b>Figura 4.</b> Estratégia de construção do vetor pPGK $\Delta$ 1AMY	38
<b>Figura 5.</b> Mapa físico do vetor pPGK $\Delta$ 1AMY	39
<b>Figura 6. Figura 6.</b> Teste de atividade amilolítica em placa de clones de <i>P. pastoris</i> GS115 transformados com o vetor pPGK $\Delta$ 1AMY	39
<b>Figura 7.</b> A – Foto da amplificação do promotor e P <sub>PGK<math>\Delta</math>2</sub> em gel de agarose 1%; B - Mapa físico do vetor pPGK $\Delta$ 2AMY	40
<b>Figura 8.</b> Teste de atividade amilolítica em placa de clones de <i>Pichia pastoris</i> GS115 transformados com o vetor pPGK $\Delta$ 2AMY	40
<b>Figura 9.</b> Estratégia de construção do vetor pPGK $\Delta$ 2AMY	41
<b>Figura 10.</b> Mapa físico do vetor pPGK $\Delta$ 3AMY	42
<b>Figura 11.</b> Teste de atividade amilolítica em placa para clones de <i>Pichia pastoris</i> GS115 transformados com o vetor pPGK $\Delta$ 3AMY	43
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática do tamanho relativo entre os fragmentos derivados do promotor P <sub>PGK1</sub>	43
<b>Figura 13.</b> Estratégia de construção do vetor pPGK $\Delta$ 3AMY	44
<b>Figura 14.</b> Mapa físico do vetor pPZ $\alpha$	45
<b>Figura 15.</b> Teste de atividade amilolítica em placa de clones de <i>P. pastoris</i> GS115	45

---

transformados com os vetores pPZ $\alpha$ , pPZ $\alpha$ AMY, pPGK $\Delta$ 1AMY e pPGK $\Delta$ 3AMY	
<b>Figura 16.</b> Estratégia de construção do vetor pPZ $\alpha$	46
<b>Figura 17.</b> Gráfico da atividade amilolítica em meio líquido (linha contínua) e curva de crescimento (linha tracejada) de <i>Pichia pastoris</i> transformada com o vetor pPZ $\alpha$	48
<b>Figura 18.</b> Gráfico da atividade amilolítica em meio líquido (linha contínua) e curva de crescimento (linha tracejada) de <i>Pichia pastoris</i> transformada com o vetor pPZ $\alpha$ AMY	48
<b>Figura 19.</b> Gráfico da atividade amilolítica em meio líquido (linha contínua) e curva de crescimento (linha tracejada) de <i>Pichia pastoris</i> transformada com o vetor pPGK $\Delta$ 1AMY	49
<b>Figura 20.</b> Gráfico da atividade amilolítica em meio líquido (linha contínua) e curva de crescimento (linha tracejada) de <i>Pichia pastoris</i> transformada com o vetor pPGK $\Delta$ 3AMY	49
<b>Figura 21.</b> Análise em SDS-PAGE 12,5 % do perfil protéico dos sobrenadantes de culturas de <i>P. pastoris</i> transformados com as construções pPZ $\alpha$ , pPZ $\alpha$ AMY, pPGK $\Delta$ 1AMY e pPGK $\Delta$ 3AMY	50
<b>Figura 22.</b> Teste de resistência a zeocina e atividade amilolítica em placa	51
<b>Figura 23.</b> Foto da amplificação por PCR do gene <i>lacZ</i> em gel de agarose 1%	54
<b>Figura 24.</b> Foto de análise de restrição do gene <i>lacZ</i> clonado no vetor pGEM-T em gel de agarose 0,8 %	54
<b>Figura 25.</b> Estratégia de construção do vetor pPICLACZ	55
<b>Figura 26.</b> Amplificação de fragmentos do promotor PGK analisados em gel de agarose 1 %	56
<b>Figura 27</b> Estratégia de construção dos vetores pPGKLACZ, pPGKD4LACZ,	57

---



---

pPGKD5LACZ, pPGKD6LACZ e pPGKD7LACZ

**Figura 28.** Mapa físico dos vetores: pPGKLACZ, pPGKD4LACZ, pPGKD5LACZ, 58  
pPGKD6LACZ e pPGKD7LACZ.

**Figura 29.** Análise de restrição dos vetores pPGKLACZ, pPGKD4LACZ, 59  
pPGKD5LACZ, pPGKD6LACZ e pPGKD7LACZ em gel de agarose 0,8 %

**Figura 30.** Teste de atividade de  $\beta$ -galactosidade em placa 59

**Figura 31.** Teste de atividade de  $\beta$ -galactosidase em papel de filtro 60

**Figura 32.** Estratégia de construção do vetor pPGKDLLD 62

**Figura 33.** Estratégia de construção do vetor pPZ 63

**Figura 34.** Foto de gel de agarose 1 % mostrando a confirmação da clonagem do 64  
 $P_{PGKI}$  no vetor pPGKDLLD após digestão com *Bgl*III e *Bst*BI para liberação do  
promotor

**Figura 35.** Foto de PCR de colônia em gel de agarose 1 % avaliando a integração do 64  
vetor pPGKDLLD no genoma de *Pichia pastoris*

**Figura 36.** Representação de integração com única cópia no *locus GAP* 68

**Figura 37.** Representação de integração com múltiplas inserções no *locus GAP* 68

---

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Vetores de clonagem	15
<b>Tabela 2</b> - Vetores de expressão	15
<b>Tabela 3</b> - Enzimas de restrição utilizadas	20
<b>Tabela 4</b> - <i>Primers</i> utilizados para amplificar fragmentos do P <sub>PGK1</sub>	21
<b>Tabela 5</b> - <i>Primers</i> utilizados para PCR de colônia de clones com gene <i>DLD3</i>	22
<b>Tabela 6</b> - <i>Primers</i> utilizados para PCR do gene <i>lacZ</i>	22
<b>Tabela 7</b> - Seleção de clones com única copia integrada do vetor pPGK $\Delta$ 3AMY	52

---

## Lista de abreviaturas e símbolos

AMY	$\alpha$ -amilase
ATP	adenosina trifosfato
BrEt	Brometo de etídeo
cm <sup>3</sup>	centímetro cúbico
DNA	ácido desoxiribonucléico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Faraday
<i>g</i>	força da gravidade
Kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanograma
O.D.	densidade óptica
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p/v	peso/volume
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PGK	3-fosfoglicerato quinase
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol

---

q.s.p	quantidade suficiente para
RNase A	ribonuclease A
rpm	Rotações por minuto
V	Volts
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
$\Omega$	Ohm
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$\mu\text{g}$	micrograma

---

## Resumo

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido utilizada com sucesso para a expressão de várias proteínas heterólogas sendo que diversos vetores já foram desenvolvidos para este sistema. Os principais vetores de expressão de *P. pastoris* são baseados no promotor do gene *AOX1* que codifica a enzima álcool oxidase 1. Alguns estudos têm sido realizados para o uso de promotores alternativos uma vez que o sistema *AOX1* apresenta algumas desvantagens. Em nosso laboratório foi isolado e caracterizado o promotor do gene *PGK1* de *P. pastoris* ( $P_{PGK1}$ ), um promotor forte e constitutivo, que representa uma alternativa promissora para a construção de novos vetores. O objetivo deste estudo foi determinar a região promotora mínima do  $P_{PGK1}$  por meio de deleções controladas utilizando o gene da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* como gene repórter. Quatro deleções foram obtidas sendo que a menor ( $P_{PGK\Delta 3}$ ), com ~400 pb, ainda manteve atividade promotora. Foi demonstrado que esta seqüência é capaz de dirigir a integração de um vetor no genoma de *P. pastoris* e 51% dos clones transformantes tiveram mais de uma cópia integrada. O uso deste promotor propiciou a expressão heteróloga de  $\alpha$ -amilase em altos níveis (250 U.mL<sup>-1</sup>). Também foram construídos vetores para expressão intracelular baseados no promotor PGK que, todavia, ainda necessitam ser aprimorados para uso em *P. pastoris*.

**Palavras chave:** *Pichia pastoris*, promotor, expressão heteróloga de proteínas,  $\alpha$ -amilase

---

## Abstract

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has been successfully used for the expression of heterologous proteins and several different expression vectors have been developed for this system. The main expression vectors for *P. pastoris* are based on the alcohol oxidase 1 gene promoter, *AOX1*. Some studies have been carried out aiming at the use of alternative promoters once the *AOX1* system shows some disadvantages. Our laboratory has isolated and characterized the *P. pastoris* promoter from the *PGK1* gene ( $P_{PGK1}$ ), a strong and constitutive promoter, which represents a promising alternative for the construction of new vectors. The aim of this study was to determine the minimal promoter sequences from  $P_{PGK1}$  through controlled deletions using the  $\alpha$ -amylase gene from *Bacillus subtilis* as a reporter gene. Four deletions were obtained and the smallest ( $P_{PGK\Delta 3}$ ) with ~ 400 bp, still maintained promoter activity. We have demonstrated that this sequence was able to direct vector integration into the *P. pastoris* genome and 51% of the transformants showed more than one copy integrated. The use of this promoter allowed high level expression of  $\alpha$ -amylase (250 U mL<sup>-1</sup>). Also, vectors for intracellular expression were based on the PGK promoter were also constructed which however still need to be improved for use in *P. pastoris*.

**Key words:** *Pichia pastoris*, promoter, heterologous protein expression,  $\alpha$ -amylase

---

# Introdução

*Maravilhar-se é o primeiro  
passo para o descobrimento.*

Louis Pasteur

1822-1895

---

## 1. Introdução

Os fungos têm sido manipulados pelo homem há milhares de anos sendo que as leveduras (fungos unicelulares) têm tido grande destaque, sobretudo na indústria de alimentos (Kingsman & Kingsman, 1988). Dentre as leveduras de maior valor biotecnológico destaca-se *Saccharomyces cerevisiae* que é amplamente empregada em diferentes processos fermentativos que vão da panificação à produção de etanol (Cereghino & Cregg, 1999). Além destas aplicações tradicionais, *S. cerevisiae* também tem sido utilizada como importante sistema de expressão heteróloga, pois possui tanto as vantagens de sistemas procarióticos (fácil manipulação, crescimento rápido, genética molecular bem caracterizada) como de eucariotos (capacidade de realizar processamentos e modificações pós-traducionais típicas de sistemas eucarióticos). De fato, muitas proteínas eucarióticas não puderam ser eficientemente expressas em sistemas procarióticos, como *Escherichia coli*, devido à ausência de modificações pós-traducionais e defeitos no dobramento o que pode levar a baixos níveis de expressão.

Estudos de genética molecular com *S. cerevisiae* são realizados desde o final da década de 70, quando esta levedura foi transformada pela primeira vez (Beggs, 1978). Possui o genoma completamente seqüenciado (Goffeau *et al.*, 1996) e tem o status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) o que torna este organismo um modelo de estudo para as demais espécies de leveduras. A genética molecular de *S. cerevisiae* possui diversas ferramentas poderosas como vários tipos de vetores moleculares, inclusive cromossomos artificiais (Torres & Moraes, 2000). Entretanto, uma das limitações encontradas neste sistema é o fato desta levedura hiperglicosilar certas proteínas que são secretadas, o que pode ser um problema sério no caso de produção de proteínas terapêuticas injetáveis que podem causar reações imunogênicas em seres humanos (Gurcan & Ellar, 2005). Uma alternativa para contornar este problema é o uso da levedura metilotrófica *Pichia pastoris*.

### 1.1 Leveduras metilotróficas e a via metabólica do metanol

São conhecidos quatro gêneros de leveduras que são capazes de metabolizar metanol: *Candida*, *Hansenula*, *Torulopsis* e *Pichia*, e algumas têm a capacidade de utilizar metanol como única fonte de carbono (metilotróficas). Esta propriedade foi

---



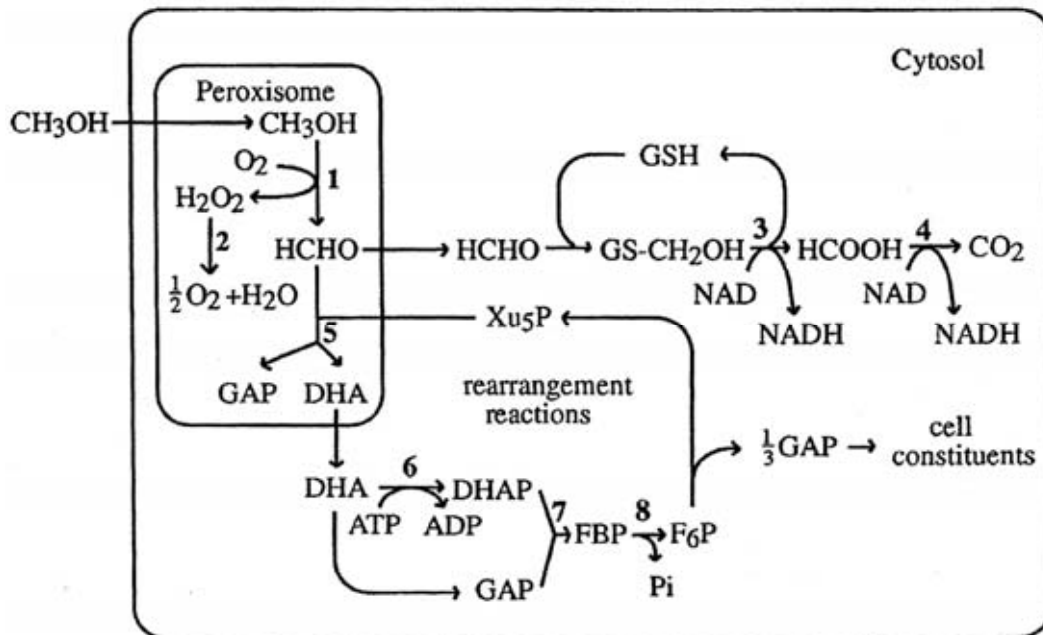
explorada na década de 60-70 para a produção de *single cell protein* (SCP) com baixos custos de produção para ração animal e alto teor protéico (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Dentre as leveduras metilotróficas que foram consideradas para a produção de SCP estava *P. pastoris* que hiperexpressa a enzima álcool oxidase que participa da via metabólica do metanol. Este fato despertou a atenção de pesquisadores que logo perceberam o potencial desta levedura para a expressão heteróloga em meio contendo metanol (Cregg *et al.*, 2000).

Na década de 80, a Companhia *Phillips Petroleum*, juntamente com a *Salk Institute Biotechnology/Industrial Inc.* (SIBIA, La Jolla, USA), avaliaram o potencial de *P. pastoris* como sistema para produção de proteína heterólogas. Desde então, esta levedura tem sido amplamente utilizada na produção de proteínas de interesse acadêmico e biotecnológico (Cereghino & Cregg, 2000). A Companhia *Phillips Petroleum* foi a primeira a desenvolver métodos de fermentação em meio definido contendo metanol para manutenção de *P. pastoris* em culturas contínuas de alta densidade celular, acima de 13% do peso seco das células (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

A via metabólica para utilização do metanol parece ser a mesma em todas as leveduras metilotróficas e envolve a ativação de um grupo único de enzimas (Couderc & Baratti, 1980; Cereghino *et al.*, 2006). A álcool oxidase (AOX) é a primeira enzima dessa via metabólica sendo responsável pela oxidação do metanol a formaldeído gerando peróxido de hidrogênio. Em *P. pastoris*, existem dois genes que codificam para AOX, *AOX1* e *AOX2*, a transcrição do primeiro é fortemente induzida por metanol enquanto o segundo é fracamente expresso. A atividade de AOX é encontrada no interior dos peroxissomos onde o peróxido de hidrogênio, que é citotóxico, é convertido a H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> pelas catalases presentes nesta organela. Uma parte do formaldeído escapa dos peroxissomos para ser, então, oxidado por duas desidrogenases citoplasmáticas levando à formação de formato e CO<sub>2</sub>. Estas reações proporcionam uma fonte adicional de energia para a levedura durante o crescimento em metanol. O formaldeído restante é assimilado para formar componentes celulares por meio de uma via cíclica iniciada pela condensação com a xilulose 5-monofosfato, uma reação catalisada pela dihidroxicetona sintase (DHAS), outra enzima peroxissomal. Essa reação gera gliceraldeído 3-fosfato e dihidroxicetona, que, ao saírem do peroxissoma, entram em uma via citoplasmática que regenera xilulose 5-monofosfato gerando uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato a

---

cada três ciclos (Cereghino & Cregg, 2000; Cereghino *et al.*, 2006). As principais reações envolvidas no metabolismo do metanol estão indicadas na Figura 1.



**Figura 1.** Via metabólica do metanol em *Pichia pastoris*. 1 - Álcool oxidase; 2 - Catalase; 3 - Formaldeído desidrogenase; 4 - Formiato desidrogenase; 5 - Dihidroxicetona sintase; 6 - Dihidroxicetona quinase; 7 - Frutose 1,6-bisfosfato aldolase; 8 - Frutose 1,6-bisfosfatase (Cereghino & Cregg, 2000).

## 1.2 *Pichia pastoris* como sistema para expressão de proteínas heterólogas

Proteínas heterólogas expressas em *P. pastoris* podem ser produzidas em grandes quantidades tanto intracelularmente como secretadas ao meio de cultura. Devido ao fato desta levedura secretar poucas proteínas nativas (Cregg *et al.*, 1993), a purificação de proteínas heterólogas no sobrenadante da cultura é facilitada. Em alguns casos a proteína heteróloga secretada pode representar a maior parte do total de proteínas secretadas no meio (Barr *et al.*, 1992). Observou-se também que os sistemas para secreção são mais eficazes para expressar genes que, em seus organismos nativos, codificam para proteínas que naturalmente são secretadas (Higgins & Cregg, 1998).

As pesquisas com *P. pastoris* não se limitam ao seu uso como sistema de expressão, pois também é utilizada como modelo para estudo de biogênese de peroxissomas (Gould *et al.*, 1992), análise genéticas de autofagia (Tuttle & Dunn, 1995) e ainda é um modelo para estudos de organização entre o retículo endoplasmático transicional e o aparato de Golgi (Rossanese *et al.*, 1999).

Dentre as características vantajosas de *P. pastoris* como sistema de expressão heteróloga, destaca-se o fato desta levedura ter o status GRAS (*Generally Regarded As Safe*) e converter de 30 a 40% do seu peso em proteínas (Ratner, 1989), além de glicosilar proteínas de forma mais próxima aos mamíferos – em média 8-14 resíduos de manose em cadeias de oligossacarídeos (Grinna & Tschoop, 1989), ao contrário de *S. cerevisiae* que pode hiperglicosilar proteínas heterólogas adicionando mais de 40 resíduos de manose (Innis, 1989). Essa diferença pode estar associada aos resíduos de manose com ligações  $\alpha$ -1,3-terminal, típicas de *S. cerevisiae*, que não são encontradas, por exemplo, na invertase secretada por *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 1993). Devido a todas estas vantagens *P. pastoris* tem sido cada vez mais utilizada como sistema de expressão eucariótico (Colao *et al.*, 2006) contando com mais de 550 proteínas já expressas (Cereghino *et al.*, 2006).

Outra vantagem é que as técnicas requeridas para a manipulação molecular de *P. pastoris*, tais como transformação, substituição gênica, clonagem por complementação, são semelhantes às descritas para *S. cerevisiae*. A forma preferencial de transformação em *P. pastoris* é via integração cromossomal por recombinação homóloga. Há várias vantagens em utilizar a transformação integrativa: estabilidade do cassete de expressão, obtenção de transformantes com múltiplas cópias, controle do sítio de integração e capacidade de construir diferentes modos de integração utilizando-se sítios apropriados de clivagem no DNA (Sreekrishna *et al.*, 1997).

Segundo Higgins & Cregg (1998), o sistema de expressão em *P. pastoris* é um dos mais produtivos sistemas de expressão eucarióticos existindo uma probabilidade de 50 a 75% de expressar uma proteína de interesse em *P. pastoris* em níveis razoáveis. Para estes autores o mais importante é conseguir expressar sua proteína em qualquer nível, pois existem parâmetros bem definidos que possibilitam a otimização da expressão de proteínas heterólogas neste sistema.

### **1.3 Linhagens de *P. pastoris***

Todas as linhagens utilizadas para expressão heteróloga em *P. pastoris* são derivadas da NRRL-Y 11430 (*Northern Regional Reserch Laboratories*, Peoria, IL), tipo selvagem. Algumas linhagens possuem a mutação *his4* (gene da histidinol desidrogenase) o que implica no uso de vetores contendo a versão selvagem deste gene (*HIS4*) para a seleção de transformantes por complementação auxotrófica em meio sem

---

histidina. Outras linhagens com mutações auxotróficas em outros genes, como *URA3*, também são utilizadas, embora menos frequentemente.

Algumas proteínas heterólogas secretadas podem ser instáveis em meio de cultura de *P. pastoris* onde podem ser rapidamente degradadas por proteases. Proteases vacuolares podem ser responsáveis pela instabilidade das proteínas heterólogas, principalmente em altas densidades celulares quando ocorre lise celular e liberação destas enzimas ao meio. Para tanto existem linhagens (chamadas SMD) que são mutantes para alguns dos genes que codificam algumas proteases, o que pode minimizar o problema da instabilidade protéica.

#### **1.4 Vetores de expressão**

Diversos vetores para expressão heteróloga em *P. pastoris* foram desenvolvidos apresentando algumas características em comum no cassete de expressão: seqüência promotora, que pode ser para expressão induzida ou constitutiva, sítios de restrição únicos para inserção do gene de interesse, seqüência de terminação transcricional do gene *AOX1* de *P. pastoris* que direciona um correto processamento e poliadenilação dos mRNA. Alguns vetores contêm, ainda, seqüências flanqueadoras do gene *AOX1* utilizadas para direcionar a integração do cassete de expressão por recombinação homóloga neste *locus* (Cregg *et al.*, 2000).

Todos estes vetores são do tipo *shuttle vectors*, podendo ser propagados em *E. coli* e *P. pastoris*. Para isso, apresentam uma origem de replicação e uma marca de seleção bacteriana (geralmente o gene *bla* que confere resistência a ampicilina) além de marcas de seleção para *P. pastoris*. As marcas para seleção de transformação de *P. pastoris* podem ser auxotróficas (*ADE1*, *ARG4*, *HIS4*, *URA3*) como dominantes, neste caso destaca-se o gene que confere resistência à droga G418 (Cereghino & Cregg, 2000). De particular interesse é a marca de seleção representada pelo gene *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* que confere resistência a zeocina e pode ser usada tanto para seleção em bactéria quanto em levedura. A zeocina é um antibiótico que atua na quebra da dupla fita do DNA cromossomal. A proteína que confere resistência a zeocina, produto do gene *Sh ble*, atua de forma estequiométrica, não enzimática, por associação à droga e conseqüente inativação da mesma (Higgins & Cregg, 1998).

Alguns vetores de expressão para *P. pastoris* possuem, ainda, características especiais para funções especializadas, como a secreção de proteínas heterólogas. Neste

---

caso, após a região promotora existe uma seqüência sinal responsável pela internalização da proteína expressa no retículo endoplasmático onde a mesma é direcionada para a via de secreção. As seqüências sinais mais utilizadas são derivadas do fator de acasalamento  $\alpha$  ( $\alpha$ -MF) de *S. cerevisiae* ou do gene *PHO1* (fosfatase ácida) de *P. pastoris*. As seqüências para secreção podem ser substituídas por seqüências sinais nativas da proteína a ser expressa, fator que pode otimizar a secreção de proteínas heterólogas em alguns casos (manual *Pichia Expression Kit* - Invitrogen).

Outra característica que pode ser encontrada em vetores de expressão são seqüências utilizadas para facilitar a detecção ou purificação da proteína expressa, como as seqüências *His<sub>6</sub>* e *myc*. Estas duas “etiquetas” (*tags*) permitem a detecção da proteína expressa usando anticorpos específicos para estas duas seqüências e, no caso do *His<sub>6</sub>*, a purificação por cromatografia de afinidade em resinas Ni-NTA.

Também são encontrados vetores de expressão com replicação autônoma em *E. coli* e *P. pastoris* e que expressam proteínas recombinantes em ambos os sistemas, o que permite uma economia na expressão e purificação de proteínas em diferentes hospedeiros sem a necessidade de subclonagens (Lueking *et al.*, 2000).

A maioria dos vetores de expressão desenvolvidos para utilização em *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 1993, Scorer *et al.*, 1993, Waterham *et al.*, 1997; Amaral, 2003) têm sua utilização limitada por causa do grande tamanho ou devido ao número reduzido de sítios de restrição para subclonagens (Sears *et al.*, 1998). Os vetores são considerados “grandes” quando apresentam de 7 a 10 Kb de tamanho podendo isto ser um fator limitante para manipulações que envolvem a clonagem de grandes fragmentos de DNA ou de múltiplas inserções. Diversos problemas têm sido relatados com a utilização destes vetores, principalmente porque fazem os passos de clonagem *in vitro* mais difíceis (Sears *et al.*, 1998) e a integração dos mesmos resultam tipicamente em transformantes que são menos estáveis (Romanos *et al.*, 1992).

Grande parte dos vetores utilizados para expressão heteróloga em *P. pastoris* possui o gene *HIS4* e o gene *bla*, marcas de seleção para leveduras e bactérias, respectivamente. O gene *HIS4* possui 3 Kb e sua utilização se limita a vetores para seleção em linhagens auxotróficas *his4*, necessitando a adição de uma segunda marca para identificar eventos de múltiplas integrações do vetor. Neste caso, pode-se usar o gene *kan* de *E. coli* que confere resistência a G418 em leveduras. Todavia, esta marca não pode ser utilizada isoladamente, mas sim em conjunto com a marca *HIS4* (Higgins *et al.*, 1998).

---

A combinação dos genes *HIS4*, *bla*, e *G418<sup>R</sup>* pode representar mais de 5,5 Kb de um típico vetor de expressão. A construção de vetores significativamente menores tem sido possível com a utilização de uma única marca de seleção dominante funcional em *E. coli* e em *P. pastoris* como é o caso do gene *Sh ble* que possui apenas 375 pb. Muitos vetores contêm a seqüência 3'AOX, mesmo sem a necessidade de sua utilização (Daly & Hearn, 2005). Portanto, seqüências que não são fundamentais para o funcionamento do sistema podem ser retiradas para reduzir o tamanho dos vetores.

### 1.5 Integração em *P. pastoris*

A utilização de vetores epissomais estáveis ainda não é comum em *P. pastoris*, por este motivo vetores que se integram no genoma são preferidos, pois a integração é eficiente e estável (Sears *et al.*, 1998; Romanos, 1995). Vetores epissomais com replicação autônoma, como o pHIL-A1, são de baixo números de cópias, instáveis e acabam invariavelmente integrados em um ou mais *loci* cromossomais, geralmente *AOX1*, *HIS4* e *ARS1*. Assim o uso de vetores autônomos necessita de uma seleção secundária para isolar integrantes estáveis e de múltipla-cópia (Sreekrishna *et al.*, 1997; Daly & Hearn, 2005). A vantagem mais significativa dos vetores de replicação autônoma é a alta freqüência de transformação que conferem quando comparado aos vetores integrativos lineares (Sreekrishna *et al.*, 1997).

Existem várias vantagens na utilização de vetores integrativos que incluem estabilidade do cassete de expressão, geração de clones com múltiplas-cópias integradas, controle do sítio de integração e a habilidade para construir diferentes modelos de integração de acordo com o padrão de clivagem do DNA (Daly & Hearn, 2005).

Assim como em *S. cerevisiae*, vetores linearizados podem gerar transformantes estáveis em *P. pastoris* via recombinação homóloga entre seqüências compartilhadas entre o vetor e o genoma da levedura (Cregg *et al.*, 2000). Os integrantes têm uma forte estabilidade na ausência de pressão seletiva mesmo que presentes em múltiplas cópias (Higgins & Cregg, 1998).

Todos os vetores de expressão integrativos para *P. pastoris* possuem pelo menos uma seqüência de DNA homóloga a uma seqüência de DNA do genoma de *P. pastoris* que pode ser representada pelas seqüências promotoras ou da marca de seleção auxotrófica. A digestão do vetor com enzima de restrição permite direcionar o vetor a

---

integrar no genoma da levedura por *crossover* simples, o que leva a integração de todo vetor (integração por adição), ou por *crossover* duplo entre as regiões homólogas causando a deleção da região homóloga na levedura (integração por substituição). Qualquer que seja o tipo de integração ocorrida, os transformantes podem não conter o vetor de expressão por causa de eventos de conversão gênica que ocorre quando há recombinação somente entre as regiões homólogas sem qualquer adição da sequência do vetor. Este evento pode ser observado em 10 a 50% das colônias transformantes quando a integração é direcionada para o *locus his4* e parece ocorrer com maior frequência quando a transformação é feita por eletroporação (Higgins & Cregg, 1998).

### **1.6 Integração de múltiplas cópias**

A integração de múltiplas cópias de vetores de expressão pode ocorrer de duas maneiras: espontânea ou artificialmente. A construção de múltímeros *in vitro* é facilitada pela presença de sítios de restrição que flanqueiam o cassete de expressão; esta região é digerida com enzimas específicas e novamente clonada no vetor linearizado, e este processo pode ser repetido mais de uma vez o que leva à formação de múltímeros - um único vetor pode conter até 7-8 cópias de um único cassete de expressão (Higgins & Cregg, 1998). Todavia, estes vetores construídos *in vitro* podem ser tão grandes que são considerados geneticamente instáveis (Daly & Hearn, 2005). Os eventos espontâneos de integração de múltiplas cópias podem ocorrer como inserções gênicas tanto no *locus AOX1* quanto no *his4* podendo ser detectados por diferentes métodos de análise de DNA, como PCR e *Southern Blot*, e também por métodos que avaliam diretamente os níveis de proteínas expressas como ensaios de atividade, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ou, ainda, *immunoblotting* de colônia (Higgins & Cregg, 1998). Também é possível selecionar clones com múltiplas cópias em vetores que possuam marcas de resistência a drogas, como G418<sup>R</sup> e *Sh ble*, selecionando estes clones em placas contendo concentrações crescentes do antibiótico (Vassileva, 2001). A maioria dos clones obtidos por este método contem de 1 a 5 cópias integradas do vetor – para isolar clones com 20 ou mais cópias integradas é normalmente necessário testar de 50 a 100 clones resistentes (Higgins & Cregg, 1998).

A seleção direta de transformantes resistentes a zeocina pode ser utilizada rotineiramente para selecionar clones com múltiplas cópias integradas do cassete de

expressão, fato que pode resultar em um aumento no nível de produção de proteínas heterólogas (Higgins *et al.*, 1998).

### 1.7 Promotores de *P. pastoris*

Os principais vetores de expressão de *P. pastoris* são baseados no promotor do gene *AOXI* que codifica a enzima álcool oxidase 1. O promotor deste gene foi isolado pela companhia de biotecnologia *Salk Institute Biotechnology Industrial Associates* (SIBIA) e demonstrou ser altamente regulado pela presença de metanol. O mecanismo de ativação do gene *AOXI* envolve dois processos: a indução de seu promotor por metanol e a desrepressão pela ausência de outras fontes de carbono, como a glicose. A simples desrepressão não resulta em qualquer ativação do gene *AOXI*, pois é necessária a presença de metanol como ativador para a indução do gene (Cregg *et al.*, 2000).

Muitos estudos têm sido realizados para o uso de promotores alternativos ao do gene *AOXI*, pois este apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, o fato de o metanol ser tóxico em determinadas concentrações, assim como os subprodutos gerados durante seu metabolismo (Exe: formaldeído e o peróxido de hidrogênio). Em fermentações de grande escala, existe o risco de incêndios pelo armazenamento de grandes quantidades de metanol e, em fermentações pequenas, há uma rápida evaporação do metanol dificultando seu monitoramento no meio, o que torna este processo laborioso (Cereghino & Gregg, 2000).

Outro promotor induzível é o do gene *FLDI* que é induzido por metanol ou metilamina, fonte de nitrogênio barata e não tóxica. Este promotor é reprimido por glicose e íons amônio (Shen *et al.*, 1998).

Promotores reguláveis são desejáveis, por exemplo, para expressão de proteínas que são tóxicas para *P. pastoris*, como a imunotoxina anti-célula-T (Woo *et al.*, 2002) pelo fato de que nestes sistemas o crescimento celular ocorre primeiramente até atingir grande biomassa, para somente, então, haver a indução da proteína (Waterhan *et al.*, 1997).

Dentre os promotores constitutivos, o promotor GAP do gene que codifica a enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), promove uma alta expressão e tem sido testado como uma alternativa ao promotor do gene *AOXI*, pois possui uma expressão forte e constitutiva (Waterham, *et al.*, 1997, Vassileva, *et al.*,



2001a) sendo indicado para expressão de genes cujos produtos não são tóxicos para *P. pastoris*. Outro promotor constitutivo, mas que controla a expressão moderadamente é o promotor do gene *YPT1*, um gene que codifica uma pequena GTPase envolvida em secreção e também utilizado para expressão heteróloga em *P. pastoris* (Sears *et al.*, 1998; Cereghino & Cregg, 2000).

A utilização de promotores constitutivos é atrativa principalmente para a produção de proteínas em larga escala, tendo a vantagem de não requererem agentes indutores e permitirem a purificação da proteína recombinante sob condições de fermentação contínua. Porém, existe a desvantagem de não poderem ser utilizados para a expressão de genes cujos produtos são tóxicos.

### **1.8 O Promotor P<sub>PGKI</sub>**

Genes da via glicolítica são altamente expressos e as enzimas correspondentes constituem cerca de 30-60% das proteínas solúveis em *S. cerevisiae* (Fraenkel, 1982; Baker, 1991). A enzima glicolítica 3-fosfoglicerato quinase (PGK) participa do metabolismo da glicose transferindo o grupamento fosfato do 1,3 bisfosfoglicerato para o ADP gerando o primeiro ATP da via e 3-fosfoglicerato, atuando também na via gliconeogênica.

A enzima PGK pode constituir cerca de 5 % do total de proteínas celulares e seu mRNA é igualmente abundante (Holland & Holland, 1978) sendo a enzima constitutivamente expressa e seu promotor considerado forte. O promotor do gene *PGKI* tem sido utilizado na construção de vetores de expressão para diversas leveduras, como: *S. cerevisiae* (Kingsman *et al.*, 1985; Grange *et al.*, 1996), *Candida maltosa* (Masuda *et al.*, 1994), *Yarrowia lipolytica* (Dall *et al.*, 1996) e fungos filamentosos: *Rhizopus niveus* (Takaya *et al.*, 1994) e *Trichoderma reesei* (Vanhanen *et al.*, 1989, 1991).

O gene *PGKI* de *P. pastoris* foi isolado e caracterizado por Almeida *et al.* (2005) e possui uma ORF de 1251 pb que codifica para uma proteína de 416 resíduos de aminoácidos. O gene foi identificado como sendo de cópia única no genoma de *P. pastoris*. Na região promotora deste gene (P<sub>PGK</sub>) foram encontrados elementos *cis*-regulatórios também presentes em outros promotores PGK de outras leveduras. O TATA box, que é responsável pela correta iniciação da transcrição, foi identificado na posição -71 do ATG do gene *PGK* e o elemento *heat shock* (HSE) na posição -425 a -

---

440; este é responsável pelo aumento dos níveis de mRNA quando a temperatura é aumentada (Piper *et al.*, 1988), o que sugere que em *P. pastoris* este gene é sujeito a termo-regulação. Outra sequência relevante encontrada no P<sub>PGKI</sub> são sítios de ligação para a proteína Gcr1 que é essencial para ativação de altos níveis dos genes da via glicolítica como relatado em *S. cerevisiae* (Dominoff & Santangelo, 2001).

Quando células de *P. pastoris* forma crescidas em meio com glicose observou-se que o nível de mRNA de um gene repórter sob o controle do P<sub>PGKI</sub> foram duas vezes maior do que na presença de glicerol. O fato dos promotores PGK serem considerados fortes e constitutivos, sobretudo em meio com glicose, desperta o interesse do seu uso para a expressão heteróloga em *P. pastoris* (Almeida *et al.*, 2005).

### **1.9 Promotores constitutivos X induzíveis**

Segundo estudo de Waterham *et al.* (1997), no qual foi comparada a força dos promotores AOX (induzível) e GAP (constitutivo), ambos de única cópia e integrados no locus *his4*, observou-se que o segundo era capaz de produzir maiores níveis de  $\beta$ -lactamase que o primeiro em culturas crescidas em glicose. Este trabalho contrastou com os resultados de Sears *et al.* (1998) que estudaram os níveis de expressão da enzima  $\beta$ -glucuronidase sob controle dos promotores AOX1, GAP e YPT1 sendo que o primeiro foi bem superior aos outros (AOX1 587 U/mL; GAP 70,4 U/mL e YPT1 1,67 U/mL). Nestes exemplos, é evidente que o tipo de promotor não é o único fator que determina os altos níveis de expressão heteróloga, mas sim, a combinação de vários fatores, como tipo vetor de expressão empregado, linhagem hospedeira, local de integração do cassete de expressão, composição do meio de cultura e propriedades da proteína a ser expressa (Lueking *et al.*, 2003). O conjunto destes estudos mostra, pois, que as condições ótimas de expressão devem ser analisadas caso a caso, e que os dados obtidos com um determinado clone não são, geralmente, transferíveis para a expressão de outra proteína e a otimização do processo deve ser buscada para cada novo produto (Hong *et al.*, 2006).

Neste contexto, existe a necessidade de aumentar a gama de promotores e vetores de expressão para atender a ampla variedade de combinações destes fatores para gerar sistemas de expressão cada vez mais eficientes.

---

# Justificativa

*O pensamento só começa  
com a dúvida.*

Roger Martin Du Gard

1881-1958

---

## 2. Justificativa

Os sistemas de expressão de proteínas heterólogas mais utilizados em *P. pastoris* são baseados no promotor AOX, que é um sistema eficiente, mas inconveniente por depender de um laborioso processo onde é necessária a monitoração periódica da concentração de metanol na cultura, além da necessidade de haver a troca de fontes de carbono durante as diferentes fases de crescimento e indução. Ademais, o uso comercial de vetores baseados no promotor AOX é condicionado ao pagamento de *royalties* à Invitrogen, que detém as patentes mundiais desses vetores. Portanto, outros esforços são realizados para obter sistemas alternativos ao AOX, com promotores diferenciados que possibilitem a expressão heteróloga em escalas compatíveis com as exigências do setor produtivo. O promotor do gene *PGK1* de *P. pastoris* ( $P_{PGK1}$ ) foi caracterizado em nosso laboratório (Almeida *et al.*, 2005) e demonstrou ser um promotor forte e constitutivo, sendo, portanto uma alternativa promissora para a construção de novos vetores. Todavia, o tamanho do promotor  $P_{PGK1}$  isolado é de cerca de 2 Kb o que aumenta consideravelmente o tamanho final do vetor de expressão baseado neste sistema. O presente trabalho buscou determinar a região promotora mínima deste promotor para que, a partir, deste estudo, um novo vetor de expressão fosse desenvolvido.

---

# Objetivos

*Mestre não é quem  
sempre ensina, mas  
quem, de repente,  
aprende.*

João Guimarães Rosa

1908-1967

---

### 3. Objetivos

#### Geral

Determinar a região promotora mínima do promotor  $P_{PGKI}$  de *P. pastoris* para o desenvolvimento de vetores de expressão baseados neste sistema.

#### Específicos

1. Analisar a integração de um vetor (pPZ $\alpha$ AMY) contendo as seqüências originais (2Kb) do promotor  $P_{PGKI}$ ,
2. Determinar a região promotora mínima do  $P_{PGKI}$  por meio de deleções controladas utilizando o gene da  $\alpha$ -amilase (AMY) de *Bacillus subtilis* como gene repórter,
3. Avaliar a atividade do promotor  $P_{PGKI}$  e seus diversos fragmentos utilizando o gene *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase) como gene repórter em sistema de expressão intracelular,
4. Avaliar o  $P_{PGKI}$  em sistema de expressão intracelular utilizando o gene *DLD3* (D-lactato desidrogenase) de *S. cerevisiae*.

---

# Material e Métodos

*A imaginação é mais  
importante que o  
conhecimento.*

Albert Einstein

1879-1955

---

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Microrganismos

#### A) *Escherichia coli*

**DH5 $\alpha$**  (Gibco BRL): F<sup>-</sup>  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>) *phoA supE44*  $\lambda$ - *thi-1 gyrA96 relA1*

**TOP10** (Invitrogen®): F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *deoR recA1 endA1 ara* $\Delta$ 139  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU galK*  $\lambda$ - *rpsL(StrR) nupG*

**EPI300** (*Epicentre Biotechnologies*®): F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 endA1 ara* $\Delta$ 139  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU galK* $\lambda$ -*rpsL nupG tonA*

#### B) *Pichia pastoris*

**GS115** (Invitrogen®): *his4*

Esta linhagem possui uma mutação (*his4*) no gene da histidinol desidrogenase para permitir a seleção de transformantes por complementação auxotrófica em meio mínimo sem histidina. Foi utilizada neste trabalho para a transformação com vetores que possuem a marca de seleção dominante *Sh ble*, sendo, portando, necessária a adição de histidina quando as leveduras foram crescidas em meio mínimo.

**X33** (Invitrogen®)

Trata-se de uma linhagem isogênica a GS115 sendo prototrófica para o fenótipo His<sup>+</sup>. 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. Foi utilizada neste trabalho para a transformação do vetor contendo o gene da enzima D-lactato desidrogenase.

#### C) *Saccharomyces cerevisiae*

---



**RE1006:** MATa *can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52*. Esta linhagem foi transformada com o vetor pFAPXPGK de (Reis, 2003) e usada como controle positivo para a expressão do gene *lacZ*.

## 4.2. Material

### 4.2.1. Vetores

**Tabela 1.** Vetores de clonagem

Nome	Características principais	Origem
pGEM-T	Tamanho: 3 Kb Vetor de clonagem de produtos de PCR (Vide Anexo 5)	Promega®
pTOPOAMY	Tamanho: 5.3 Kb Derivado do vetor pCR2.1-TOPO com o gene AMY clonado entre os sítios de <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i> (Vide Anexo 6)	Amaral (2003)
PCR 2.1- TOPO	Tamanho: 3.9 Kb Vetor de clonagem de produtos de PCR	Invitrogen®

**Tabela 2.** Vetores de expressão

Vetor	Características principais	Origem
pPZ $\alpha$	Tamanho aproximado: 4,6 Kb Derivado de pPICZ $\alpha$ no qual o promotor AOX foi substituído pelo P <sub>PGK1</sub> de 2 Kb.	Araújo (2008)
pPZ $\alpha$ AMY	Tamanho: 6,1 kb Derivado do pPICZ $\alpha$ A com gene AMY sob o controle do P <sub>PGK1</sub> de 2Kb	Almeida (2003)
pZ0 (pLGA178)	Tamanho: 9,1 Kb Vetor episomal de <i>S. cerevisiae</i> contendo o gene repórter <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i>	Guarente & Mason (1983)
pFAPXPGK	Tamanho: 9,1 Kb Derivado do vetor pZ0 e contendo o gene <i>lacZ</i> sob controle do promotor PGK de <i>S. cerevisiae</i>	Reis (2003)

### 4.2.2. Tampões e soluções

#### **Tampão TE**

Tris-HCL pH 8,0	10 mM
EDTA	1mM

**X-gal**

X-gal	20 mg/mL
N,N-Dimetilformamida	1 mL

**Ampicilina (500x)**

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

Dissolvida em água e esterilizada por filtração

**Brometo de Etídeo**

EtBr	10 mg/mL
------	----------

Dissolvido em água

**Tampão TAE (50 X)**

Tris-Acetato	2 M
EDTA	0,05 M

pH 8

**Tampão Z (pH 7,0)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 mM
KCl	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
β- mercaptoetanol	50 mM

**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
------	--------

---

MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	9,9 g/L
Acetato de potássio	30 mL do estoque de 1 M pH 7,5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	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
CaCl <sub>2</sub>	11 g/L
Glicerol	150 g

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

#### **4.2.3. Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)**

##### **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

##### **Persulfato de Amônio (APS) 10% (p/v)**

---

---

APS	1 g
Água destilada (q.s.p.)	10 mL

O APS foi dissolvido em água e utilizado na hora.

### **Tampão de amostra 2X**

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

### **Tampão de corrida: Tris-glicina 5X (Estoque)**

Trizma base	125 mM
Glicina	0,96 M
SDS	0,5 % (p/v)

### **Gel concentrador 5%**

Acrilamida:Bis-acrilamida (30:0,8)	2,5 mL
Tris-HCl 1M pH 6,8	2,5 mL
Água destilada	14,635 mL
SDS 10% (p/v)	200 $\mu$ L
APS 10% (p/v)	150 $\mu$ L
TEMED (Gibco BRL)	15 $\mu$ L
Volume final	20 mL

### **Gel separador 12,5%**

Acrilamida:Bis-acrilamida (30:0,8)	12,5 mL
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	7,5 mL
Água destilada	9,46 mL
SDS 10% (p/v)	300 $\mu$ L
APS 10% (p/v)	225 $\mu$ L
TEMED	15 $\mu$ L
Volume final	30 mL

---

---

#### 4.2.4. Revelação de proteínas com *Coomassie blue*

##### Solução corante

<i>Coomassie brilliant blue G-250</i>	0,25 % (p/v)
Metanol	30 % (v/v)
Ácido acético glacial	7 % (v/v)

##### Solução descorante

Metanol	30 % (v/v)
Ácido acético glacial	7 % (v/v)

#### 4.2.5. Dosagem de Atividade Amilolítica

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

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

\* corrige o pH para 5,5 com ácido acético glacial

##### Ácido Acético 1M

Ácido acético glacial (PA)	2,9 mL
Água destilada (q.s.p)	50 mL

##### Reagente Fuwa

Iodo (I <sub>2</sub> )	1% (p/v) diluído em etanol 100%
Iodeto de potássio (KI)	10 % (p/v)
A solução de uso é I <sub>2</sub> /KI/H <sub>2</sub> O	1:1:3

##### Solução de Amido Solúvel 0,5% (Synth)

Foi pesado 0,5 g de amido e adicionado 90 mL de água destilada em um Erlenmeyer. A mistura foi aquecida em microondas até tornar-se transparente. O volume foi completado para 100 mL com água destilada utilizando uma proveta. A solução foi mantida à temperatura ambiente até sua utilização.

#### 4.2.6. Soluções para extração de DNA plasmidial

##### 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%

A solução II deve ser preparada somente na hora da utilização.

##### Solução III

Acetato de potássio	3 M
Ácido Acético	2 M
pH ajustado para 5,0	

#### 4.2.7. Marcadores moleculares para DNA

$\lambda$ EcoRI / HindIII (Anexo 4)

$\lambda$ BstEII (Anexo 4)

#### 4.2.8. Marcador de massa molecular para proteínas

*Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas Life Science®)

#### 4.2.9. Enzimas

##### Enzimas de restrição

**Tabela 3.** Enzimas de restrição utilizadas

Enzima	Sítio de Clivagem	Tampão	Temperatura de incubação	Procedência
<i>Bgl</i> II	A <sup>^</sup> GATCT	NEB 3	37 °C	New England Biolabs
<i>Bst</i> BI	TT <sup>^</sup> CGAA	NEB 4	65 °C	New England Biolabs
<i>Not</i> I	GC <sup>^</sup> GGCCGC	React 3	37 °C	Invitrogen

<i>NotI</i>	GC <sup>^</sup> GGCCGC	NEB 3	37 °C	New England Biolabs
<i>PvuII</i>	CAG <sup>^</sup> CTG	React 6	37 °C	Invitrogen
<i>PvuI</i>	CGAT <sup>^</sup> CG	NEB 3	37 °C	New England Biolabs
<i>SacI</i>	GAGCT <sup>^</sup> C	NEB 1	37 °C	New England Biolabs
<i>KpnI</i>	GGTAC <sup>^</sup> C	J	37 °C	Promega
<i>XbaI</i>	T <sup>^</sup> CTAGA	Tango	37 °C	Fermentas
<i>EcoRI</i>	G <sup>^</sup> AATTC	NEB 1	37 °C	New England Biolabs
<i>KpnI</i>	GGTAC <sup>^</sup> C	NEB 1	37 °C	New England Biolabs

### Outras enzimas

T4 DNA ligase: 400 U/μL (New England Biolabs)

Taq DNA polimerase: 2 U/μL (Cenbiot)

Klenow DNA Polimerase 5 U/mL (New England Biolabs)

#### 4.2.10. Kits utilizados

*DNA Purification System-Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps* (Promega)

*Kit Pure link – Quick Gel Extration Kit* (Invitrogen)

*PureLink<sup>™</sup> PCR Purification Kit* (Invitrogen)

#### 4.2.11. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos (*primers*) foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.) e foram diluídos para 5 pmoles/μL (concentração de trabalho). A Tabela 4 relaciona os *primers* utilizados para amplificação das seqüências derivadas do *P<sub>PGKI</sub>*. A região de anelamento dos *primers* pode ser visualizada no Anexo 1.

**Tabela 4.** *Primers* utilizados para amplificar fragmentos do *P<sub>PGKI</sub>*.

<i>Primer</i>	Seqüência	Sítio de restrição adicionado	T <sub>m</sub>	Tamanho do amplicon
PGK-D4	5'- GAGATCTTGCAGCCCTAGATTTTAG	<i>BglIII</i>	55 °C	1,5 Kb
PGK-D5	5'- GAGATCTCAAGGGGAATGTTTGATTGTTTG	<i>BglIII</i>	55 °C	1,1 Kb
PGK-D6	5'- GAGATCTCCCCTGATGCCACCTCTTG	<i>BglIII</i>	55 °C	0,5 Kb
PGK-D7	5'- GAGATCTGTTCTCATCCATGAGTGAGTC	<i>BglIII</i>	55 °C	0,25 Kb
PGK-D8	5'-AGATCTCGAGCAAGTGTCCCTATGCTG	<i>BglIII</i>	55 °C	0,8 Kb
PGK-RZ	5'- GTTCGAATTCGTAATCAATTGGGCTATG	<i>BstBI</i>	55 °C	<i>primer</i> reverso

As regiões de anelamento no promotor  $P_{PGKI}$  estão sublinhadas e os sítios de restrição adicionados estão em negrito. As temperatura de anelamento foram calculadas pela fórmula empírica  $4(G+C) + 2(A+T)$  desconsiderando nucleotídeos adicionados para sítios de restrição e diminuindo 5 °C da menor  $T_m$  entre cada par de *primers*.

**Tabela 5.** *Primers* utilizados para PCR de colônia de clones com gene *DLD3*

<i>Primer</i>	Seqüência	$T_m$	Tamanho do amplicon
DLD5	5'- GCTGCATTATGACGGCCGCACATCC	60 °C	1,5 Kb
DLD3	5'- CGTCGACAATGTACTTGTATGGGTTTAAGA	60 °C	

**Tabela 6.** *Primers* utilizados para PCR do gene *lacZ*

<i>Primer</i>	Seqüência	Sítio de restrição adicionado	$T_m$	Tamanho do amplicon
LACZ-F	5'-ACCGCGGATAATGTCTCGATCATCCGGAGC	<i>SacII</i>	62 °C	3,1Kb
LACZ-R	5'- AGGGCCCTTATTTTTGACACCAGACCAACTG	<i>ApaI</i>	66 °C	

#### 4.2.12. Meios de cultura para bactéria

Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada e posteriormente autoclavados a 120 °C por 20 min. Os meios com ampicilina tiveram sempre a concentração final de 100 µg/mL. Já a zeocina foi usada a 25 µg/mL em meios para crescimento de *E. coli* e 100 µg/mL em meios para *P. pastoris*.

##### Meio 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

##### Meio LBLS (Luria-Bertani Low Salt)

Extrato de levedura	0,5 %
Peptona de caseína	1,0 %
NaCl	0,5 %



---

O pH foi ajustado para 7,5.

Ao meio sólido foram adicionados 1,5% de ágar bacteriológico

### **Meio 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.

### **Meio SOC**

SOB	100 ml
Glicose	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	5,0 mM
MgSO <sub>4</sub>	5,0 mM

As soluções de glicose, MgCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub> foram preparadas em água bidestilada e esterilizadas por filtração em membrana Millipore (0,2 µm).

## **4.2.13. Meios de cultura para levedura**

### **Meio YNB 20X (sem aminoácidos)**

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

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

### **Meio MD (Minimal Dextrose Médium)**

YNB	1,34 %
Biotina	4 x 10 <sup>-5</sup> %
Glicose	2,0 %

Ao meio sólido foram adicionados 1,5% de ágar bacteriológico

### **Meio MMA**

---

---

YNB	1,34 %
Biotina	4 x 10 <sup>-5</sup> %
Amido	1,5 %
Tampão fosfato pH 6,0	0,4 %
Ágar	1,5 %

**Meio MDHA**

YNB	1,34 %
Biotina	4 x 10 <sup>-5</sup> %
Amido	1,5 %
Tampão fosfato pH 6,0	100 mM
Glicose	2 %
Histidina	0,002 % (p/v)
Ágar	1,5 %

**Meio YPD**

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

Ao meio sólido foram adicionados 2% de ágar bacteriológico

**Meio YPDS - Ágar**

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Peptona de caseína	2 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Sorbitol	1 M
Ágar	2 % (p/v)

**4.2.14. Ferramentas de Bioinformática**

NEBCutter V2.0 (New England Biolabs) - Software para análise de restrição disponível no sítio: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

Visual Cloning - Software para desenho de vetores

### 4.3. Métodos

#### 4.3.1. Cultivo de microrganismos

As bactérias foram cultivadas a temperatura de 37 °C em meio LB. As leveduras foram cultivadas a 28 °C em meio apropriado para cada experimento.

#### 4.3.2. Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico (CaCl<sub>2</sub>)

O preparo de células de *E. coli* competentes para choque térmico foi realizado como descrito por Cohen (1972) com algumas modificações. As células da linhagem de *E. coli* desejada foram crescidas em 5 mL de meio LB e incubadas a 37 °C durante a noite sob agitação a 250 rpm. Em seguida 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio LB e essa cultura incubada a 37 °C sob agitação (250 rpm) até atingir uma O.D.<sub>600</sub> de 0,2 a 0,3. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM estéril e gelado. Em seguida as células foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições. Finalmente, as células foram aliqüotadas em tubos *Eppendorff* (50 ou 100 µL/tubo) e estocadas a -80 °C.

#### 4.3.3. Preparação de células bacterianas competentes para choque térmico (RbCl)

Após fazer o inóculo de uma colônia bacteriana isolada em 10 mL de meio SOB, o inóculo foi mantido sob agitação a 37 °C durante a noite. Oito mililitros do inóculo foram adicionados em frasco Erlenmeyer contendo 200 mL de meio SOB seguindo-se incubação a 37 °C sob agitação moderada até atingir a O.D.<sub>600</sub> de 0,3. A cultura foi coletada por centrifugação a 3000 x g e resfriada por 15 minutos em gelo para cessar o crescimento celular. Os frascos foram centrifugados a 3000 x g por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 16 mL de tampão de transformação I para cada 50 mL da cultura original. A mistura foi mantida no gelo novamente por 15 minutos e centrifugada nas mesmas condições. As células foram ressuspensas em 4 mL de tampão de transformação II para cada 50 mL da cultura original e aliqüotadas em tubos de 1,5 mL no volume de 100 µL cada. Imediatamente após as células foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até a utilização.

---

#### 4.3.4. Transformação de *E. coli* por choque térmico

Uma alíquota de célula competente previamente preparada foi utilizada para cada sistema de ligação. As células foram retiradas do *freezer* a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e deixadas no gelo até que descongelassem. Em seguida, foram adicionados  $5\text{ }\mu\text{L}$  do sistema de ligação às células, e as mesmas foram novamente incubadas no gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 5 minutos e, o sistema foi incubado no gelo por 2 minutos. Foram adicionados  $900\text{ }\mu\text{L}$  de meio LB ao sistema que foi incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. O plaqueamento foi feito em 3 placas contendo LB ágar e o antibiótico adequado. As placas foram incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante a noite.

#### 4.3.5. Preparação de DNA Plasmidial em Pequena Escala (Miniprep) (Adaptado de Sambrook & Russel, 2001).

Uma colônia de bactéria foi inoculada em  $5\text{ mL}$  de meio LB contendo o antibiótico adequado ( $100\text{ }\mu\text{g/mL}$  de ampicilina ou  $25\text{ }\mu\text{g/mL}$  de zeocina) e cultivada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Estas células foram coletadas através de centrifugação a  $12000\text{ } \times g$  por 2 minutos temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em  $200\text{ }\mu\text{L}$  de solução I, e em seguida adicionou-se  $360\text{ }\mu\text{L}$  de solução II recém-preparada. A amostra foi homogeneizada, com cuidado, por inversão rápida do tubo. Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados  $300\text{ }\mu\text{L}$  de solução III gelada ao lisado, procedendo-se nova homogeneização por inversão do tubo, gentilmente. A amostra foi então incubada no gelo por 5 minutos e centrifugada a  $12000\text{ } \times g$  por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado  $750\text{ }\mu\text{L}$  de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova centrifugação a  $12000\text{ } \times g$  por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em  $200\text{ }\mu\text{L}$  de solução TE. Foi adicionado  $110\text{ }\mu\text{L}$  de acetato de amônio  $7,5\text{ M}$ . Após forte agitação, o sistema foi centrifugado a  $12000\text{ } \times g$  por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado em um tubo limpo, onde foi adicionado  $750\text{ }\mu\text{L}$  de etanol  $100\text{ }\%$  gelado. A mistura foi centrifugada a  $12000\text{ } \times g$  por 5 minutos a temperatura ambiente. O pellet foi lavado (sem ressuspenso) com  $1\text{ mL}$  de etanol  $70\text{ }\%$  gelado. Após secagem por exposição ao ar, o precipitado foi ressuspenso em  $50\text{ }\mu\text{L}$  água e RNase ( $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) e incubada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 hora. O DNA plasmidial foi estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso.

---

#### **4.3.6. Preparação de DNA Plasmidial em grande Escala (Maxiprep)**

A Maxiprep foi realizada seguindo o protocolo de Maranhão & Moraes (2003).

#### **4.3.7. Precipitação de DNA**

Às reações de PCR foram adicionados 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M, 2,5 volumes de etanol 100 % gelado e 1  $\mu\text{L}$  de glicogênio, procedendo-se a incubação a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante a noite. No dia seguinte as amostras foram submetidas à centrifugação a  $12000 \times g$ , por quarenta minutos em microcentrífuga refrigerada a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e, em seguida, adicionou-se 1 mL de etanol 70 % gelado. Foi feita uma nova centrifugação a  $4.000 \times g$ , por 5 minutos, sendo o sobrenadante novamente descartado. O precipitado foi seco, ressuspendido em 10  $\mu\text{L}$  de água MilliQ e estocado no freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3.8. Digestão de DNA com enzimas de restrição**

As digestões foram realizadas conforme instruções dos fabricantes das enzimas. 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  $\mu\text{g}$  de DNA seguindo-se incubação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 h. O volume da enzima não ultrapassava 10 % do volume final da reação.

#### **4.3.9. Tratamento com Klenow DNA Polimerase**

A reação foi preparada para volume final de 10  $\mu\text{L}$ , contendo tampão NEB2 (New England Biolabs) na concentração final de 1X, 50 ng de vetor linearizado, 100  $\mu\text{M}$  de dntps e 0,05 U da enzima. A reação foi incubada a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e posteriormente foi adicionado 5  $\mu\text{L}$  de EDTA 30 mM seguido de inativação da enzima por 20 minutos a  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Procedeu-se com a religação do vetor com T4 DNA ligase.

#### **4.3.10. Análise em gel de agarose (Sambrook & Russel, 2001)**

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise dos fragmentos de DNA. A agarose foi preparada na concentração de 0,8 % (p/v) em tampão de corrida TAE 1X e foi adicionado brometo de etídeo para concentração final de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O tampão de amostra foi diluído nas amostras de DNA para a concentração final de 1X.

---

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

#### **4.3.11. Sistema de ligação**

Os sistemas de ligação foram feitos de modo que a razão molar entre vetor e inserto ficasse entre 1:3 e 1:10. A enzima T4 DNA Ligase foi utilizada com os tampões de reação fornecidos pelos fabricantes. Os sistemas foram incubados a 14 °C durante a noite e, então, utilizados para transformação de bactérias.

#### **4.3.12. Purificação e eluição de fragmentos de DNA**

Após digestão dos plasmídios com as enzimas de restrição apropriadas, os fragmentos de DNA contendo as seqüências de interesse foram aplicados em gel de agarose e submetidos a eletroforese. Os fragmentos de DNA de interesse foram recortados do gel e purificados utilizando-se o *kit QIAquick Gel Extraction*, conforme as especificações do fabricante.

#### **4.3.13. Deleções controladas do promotor P<sub>PGKI</sub>**

Para a estratégia de construção do vetor para expressão de proteínas para secreção, as deleções no promotor foram realizadas por meio de digestão com enzimas de restrição específicas e posterior tratamento com a enzima Klenow DNA Polimerase para favorecer a religação do vetor. A deleção do promotor PGK do fragmento de 0,8 Kb foi realizada por PCR utilizando os *primers* PGK-D8 e PGK-RZ.

#### **4.3.14. Desenho dos oligonucleotídeos**

Para a estratégia de construção do vetor para expressão de proteínas intracelulares as deleções foram realizadas via PCR. Os *primers* foram desenhados por análise de complementaridade dos fragmentos do DNA molde com a adição de um sítio de restrição para a enzima *Bgl*III nas extremidades 5' dos *primers* PGK-D4, PGK-D5, PGK-D6 e PGK-D7, PGK-D8, e *Bst*BI, na extremidade 5' do *primer* PGK-RZ. Os *primers* estão descritos na Tabela 4.

---

#### 4.3.15. PCR

##### 4.3.15.1. Com enzima *Taq* DNA polimerase

Para amplificar os diferentes fragmentos do promotor  $P_{PGKI}$ , foi utilizado como molde o vetor pCR 2.1-TOPO (5,9 Kb) que contém um fragmento de aproximadamente 2 Kb referente a seqüência do promotor  $P_{PGKI}$ . A condição de PCR empregada foi: 30 ciclos de 94 °C/30 segundos, 55 °C/15 segundos, 72 °C/30 segundos, seguindo uma extensão final de 72 °C/5 minutos.

##### 4.3.15.2. PCR de colônia

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: Inicialmente passo de desnaturação a 94°C por 10 minutos, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72 °C por 1,5 minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

##### 4.3.15.3. Com enzima *Taq* Platinum

Para amplificar o gene *lacZ* foi utilizado como “DNA molde” o vetor pZ0. Foram utilizados 10 ng de DNA, 200 µM dNTP, 1 U da Polimerase *Taq* Platinum, 2 mM de  $MgSO_4$ , Tampão 1X e 10 pmoles de cada *primer*. A condição de PCR utilizada foi: 1 passo inicial de desnaturação a 94 °C por 1 minuto e 30 segundos, 30 ciclos de 94 °C/30 segundos, 55 °C/30 segundos, 68 °C/3 minutos, seguindo uma extensão final de 68 °C/5 minutos.

#### 4.3.16. Purificação e clonagem dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com o kit *Pure link (PCR Purification KIT)*, da Invitrogen. A quantificação do produto de PCR purificado foi realizada em gel de agarose 0,8% por comparação de intensidade de bandas com DNA de concentração conhecida. Para fazer as ligações dos fragmentos de PCR obtidos com o vetor de clonagem pGEM-T (vide Anexo 5). Foi utilizada a relação molar de 3:1 de inserto e vetor respectivamente, referentes a 50 ng de vetor.

As transformações foram realizadas por choque térmico usando como hospedeiras células competentes de *E. coli* TOP10. Os transformantes foram plaqueados em placas de 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). Inicialmente, os plasmídios purificados foram digeridos com *PvuII* para verificar a presença de inserto – clones sem insertos liberam um fragmento de aproximadamente 400 pb. Os plasmídios foram, então, digeridos com *BglIII* e *BstBI* e os insertos eluídos de gel de agarose 0,8% com o auxílio do kit *GeneClean* (BIO101).

#### 4.3.17. Transformação em *P. pastoris* (adaptado de 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 Erlenmeyer de 125 mL utilizando uma colônia isolada e fresca de levedura. O pré-inóculo foi incubado a 30 °C durante a noite. No dia seguinte, foi medido a O.D.<sub>600</sub> 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 O.D.<sub>600</sub> de 1.3 no horário programado foi adicionado a 200 mL de YPD em Erlenmeyer de 1 L.

Quando inóculo atingiu a O.D.<sub>600</sub> esperada, fez-se uma incubação no gelo por 15 minutos para cessar o crescimento. As células foram centrifugadas a 1500 x g por 5 min a 4 °C. O *pellet* foi ressuscitado em 200 mL de água gelada. Foi realizada outra centrifugação nas mesmas condições anteriores e o *pellet* 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 aliqüotadas em tubo *Eppendorf* 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, posteriormente, foi adicionado 1 mL de YPD incubando-se a 30 °C sob agitação de 200 rpm por mais uma hora para permitir a expressão do gene *Sh ble* que confere resistência a zeocina. Foram plaqueados de 50 a 200 µL do sistema de transformação em YPDS contendo 100 µg/mL de zeocina e as placas foram incubadas por no máximo 4 dias até o aparecimento das colônias. Foram selecionados 50 clones

---



para serem transferidos para placas de YPD contendo 100 µg/mL de zeocina para posterior análise dos clones.

#### **4.3.18. Expressão de $\alpha$ -amilase em *P. pastoris***

Uma colônia isolada de cada clone de levedura foi ressuspensa em 1 mL de YPD em condições estéreis. As células foram contadas em câmara de Neubauer e  $9 \times 10^4$  células foram adicionadas em cada um dos pré-inóculos para o volume de 20 mL de meio YPD num Erlenmeyer de 125 mL. O pré-inóculo foi crescido durante a noite a 28°C em *shaker* sob rotação de 200 rpm. No dia seguinte, foram inoculados em 100 mL de YPD o volume do pré-inóculo correspondente a uma O.D.<sub>600</sub> final de 0,03 em frasco Erlenmeyer de 1 L. O cultivo foi realizado em *shaker* a 28 °C sob agitação a 200 rpm por até 96 horas. Em intervalos de 12 horas, alíquotas de 3 mL foram retiradas da cultura e estocadas em tubos *Eppendorff* de 1,5 mL. Após contagem celular (O.D.<sub>600</sub>), a amostra foi centrifugada a 5000 x g por 5 minutos. O pellet foi descartado, 1 mL do sobrenadante foi utilizado para análise da proteína secretada em gel de poliacrilamida, e 1 mL utilizado para medir a atividade amilolítica pelo teste de Fuwa (ver adiante). Com os valores do crescimento celular e atividade enzimática foi realizado uma curva de crescimento da levedura *P. pastoris*.

#### **4.3.19. Precipitação de proteínas com TCA**

Um mililitro do sobrenadante das fermentações foi precipitado com 250 µL de TCA 100 %. Após incubação no *freezer* por 3 horas, centrifugou-se a 12.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi lavado com 1 mL de acetona gelada e novamente centrifugado a 12.000 x g por 30 minutos. O precipitado foi secado em centrífuga a vácuo por 5 minutos e ressuspensa em 20 µL do tampão de amostra 2X. As amostras foram estocadas a -20 °C até a análise em gel SDS-PAGE.

#### **4.3.20. Precipitação de proteínas com acetona e TCA**

Para cada 1 mL de sobrenadante coletado da cultura adicionaram-se 8 mL de acetona gelada (-20 °C) e 1 mL TCA. Em seguida, a mistura foi alíquotada em tubos *Eppendorff* 1,5 mL. A mistura foi incubada a -20 °C por 1 hora seguindo-se centrifugação a 12.000 x g por 30 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o

---

*pellet* lavado (sem ressuspensão) com 1 mL de acetona a -20 °C seguindo-se centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e, após secagem, o *pellet* foi ressuspendido em 50 µL água deionizada e, então, adicionou-se tampão de amostra 2 X .

#### **4.3.21. Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)**

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante segundo Laemmli (1970) no sistema de eletroforese da GE Healthcare. Antes da aplicação no gel, as amostras foram fervidas durante 5 minutos para desnaturação das proteínas. A corrida foi realizada a 130 volts. Após a eletroforese, o gel foi corado com a solução *Coomassie blue* por aproximadamente por 1 hora sob agitação e, posteriormente, descorado com a solução descorante, também sob agitação.

#### **4.3.22. Determinação da atividade amilolítica**

A atividade amilolítica foi detectada por dois diferentes métodos utilizando amido como substrato, um método qualitativo em placa e um método quantitativo (Fuwa, 1954).

#### **4.3.23. Ensaio de atividade de $\alpha$ -amilase em placa**

Basicamente, seguiu-se o protocolo descrito por Moraes *et al.* (1995). Clones transformantes que cresceram em meio YPD com 100µg/mL de zeocina foram selecionados para esta análise. Os clones foram semeados em meio mínimo com amido (MDHA) concentração de 1,5 %. As placas foram incubadas por 20 horas a 30 °C para o crescimento das células. As placas contendo amido foram utilizadas para a seleção de clones secretores de  $\alpha$ -amilase por coloração com vapor de iodo. Para este procedimento, a placa contendo os clones recombinantes foi invertida sobre a tampa de uma placa de Petri que continha iodo sólido, com isto a superfície da placa foi corada pelo vapor de iodo. O iodo tem afinidade por amido, portanto as regiões circundantes aos clones que não expressam  $\alpha$ -amilase, ou seja, não degradam amido, coram-se de roxo, enquanto as regiões circundantes aos clones que expressam  $\alpha$ -amilase, degradando o amido, ficam incolor.

---

#### 4.3.24. Atividade amilolítica quantitativa (dextrinizante)

Para a determinação da atividade enzimática em solução, adicionou-se 60  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da cultura crescida em YPD, 40  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 0,5 M pH 6,0, e 100  $\mu\text{L}$  de solução de amido 0,5 % (p/v). Inicialmente a mistura foi incubada a 40  $^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, mas à medida que o amido restante não era detectado (por motivo da degradação deste pela enzima  $\alpha$ -amilase que aumentava no sobrenadante) o tempo foi reduzido até 10 minutos. Quando o amido, restante da hidrólise, não foi detectado após incubação de 10 minutos a 40  $^{\circ}\text{C}$  com 60  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, o volume de extrato enzimático foi reduzido gradualmente, até o volume mínimo de 2,5  $\mu\text{L}$  completando-se o volume com água deionizada.

A reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético 1 M e corada com a adição de 220  $\mu\text{L}$  da solução reagente de Fuwa. O volume da reação foi completado para 10 mL com água destilada seguindo-se homogeneização e determinação da absorbância a 660 nm. A quantidade de amido degradado foi calculada de acordo com uma curva padrão preparada com concentrações crescentes (0-5 mg/mL) da solução de amido utilizada para o teste. A atividade amilolítica foi monitorada pela degradação do amido conforme descrito por Moraes *et al.* (1995). Uma unidade (1U) de atividade de amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto a 40  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.3.25. Análise de resistência a zeocina

A análise de resistência a altas concentrações de zeocina permitiu estimar o número de cópias integradas em clones transformados com vetores contendo o gene *Sh ble*. Clones transformantes foram semeados em uma placa de meio YPD com diferentes concentrações de zeocina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) seguindo-se crescimento a 30  $^{\circ}\text{C}$  por 4 dias. Estimou-se o número de cópias do vetor integradas no genoma de *P. pastoris* analisando o crescimento nas diferentes concentrações de zeocina.

#### 4.3.26. Teste de atividade $\beta$ -galactosidase

##### 4.3.26.1. Ensaio em placa (Guarente & Mason, 1983)

Clones transformantes foram crescidos a 28  $^{\circ}\text{C}$  em placas contendo YPDS e 100  $\mu\text{g}$  zeocina. Após 24 horas de crescimento, os clones foram transferidos para uma placa de YPD e crescidos por mais 48 horas a 28  $^{\circ}\text{C}$ . As colônias foram transferidas para um

---

papel de filtro Watman 40 pressionando-o sobre a placa uniformemente. Após verificação visual da transferência das colônias para o filtro, o mesmo foi secado a temperatura ambiente por 1 minuto. O filtro foi imerso em nitrogênio líquido por 3 minutos e deixado a temperatura ambiente até descongelar. O tampão de reação (3 mL Tampão Z; 24 µL X-gal 4 %; 1,2 µL β-mercaptaetanol) foi colocado em uma placa de Petri, em seguida uma folha de papel de filtro Watman 3 foi imersa nesta solução sem a formação de bolhas. O papel de filtro com as colônias descongeladas foi colocado sobre o papel filtro Watman 3 saturado com o tampão de reação, com as colônias voltadas para cima. A placa foi incubada a 30 °C por tempos variados (até 24 h). Quando visualizada a atividade enzimática (coloração azul), a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M.

#### **4.3.26.2. Permeabilização da parede celular de *P. pastoris* (adaptado de Rezaee, 2003).**

Colônias de leveduras foram crescidas em YPD ágar a 28 °C e transferidas para placas de 96 poços contendo 600 µL de Tampão Z com agentes permeabilizantes (10 µL de SDS 10 % e 20 µL de clorofórmio). As placas foram incubadas a 30°C por 30 min. Após a permeabilização, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspenso em 100 µL de tampão Z pH 7,0 contendo 1 mg/mL de X-gal. A placa de 96 poços foi incubada a 37 °C por 60 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 110 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,5 M.

#### **4.3.26.3. Ensaio em placa (adaptado de Woods *et al.*, 1998)**

Neste método, X-gal (concentração final de 0,01 %) foi adicionado diretamente à solução YPD ágar seguindo-se crescimento por 48 horas a 28 °C até a formação da coloração azul. Alternativamente, foram adicionados 2 µL de X-gal (40 mg/mL) em cima de cada colônia seguindo-se incubação por aproximadamente 10 minutos (temperatura ambiente) até formação da coloração azul.

#### **4.3.27. PCR de colônia de leveduras**

---

Utilizou-se um palito estéril para transferir uma colônia selecionada para tubos *Eppendorff* contendo 10  $\mu\text{L}$  de água deionizada. As amostras foram fervidas por 5 minutos sendo, em seguida, colocadas no gelo até que atingissem a temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 10000  $\times g$  por 1 minuto. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e 1  $\mu\text{L}$  foi utilizado como DNA molde para a PCR.

---

# Resultados

*Persistência*

*Nada na vida pode substituir a persistência:  
Nem o talento o fará, pois o mundo está  
cheio de homens de talento, fracassados.  
Nem a genialidade o fará, pois encontramos  
muitos diplomados medíocres.*

Irmãos B. Ribeiro, 2001.

---

## 5. Resultados

### 5.1. Deleção do promotor $P_{PGK1}$ e transformação de *P. pastoris*

#### 5.1.1. Integração do vetor pPZ $\alpha$ AMY no genoma de *P. pastoris*

O vetor pPZ $\alpha$ AMY, construído por Almeida (2003), foi utilizado como plataforma para a construção dos vetores para expressão heteróloga da  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis*. Este vetor é derivado do pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen) no qual o promotor AOX (0,9 Kb) foi substituído pelo promotor PGK (2 Kb) de *P. pastoris* (clonado entre os sítios de *Bgl*III e *Bst*BI) além de possuir o gene da  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis* (clonado entre os sítios para *Eco*RI e *Not*I) (Figura 2). Procuramos investigar se as seqüências promotoras presentes neste vetor poderiam dirigir a integração para o *locus PGK1* sem comprometimento da viabilidade celular. O vetor pPZ $\alpha$ AMY foi linearizado com *Kpn*I ou com *Sac*I, ambas enzimas clivam somente uma vez no plasmídio e seus sítios de restrição estão localizados dentro da seqüência do promotor. Com a linearização em *Kpn*I foram obtidos mais de 100 transformantes resistentes a zeocina e destes, 50 foram selecionados para teste de atividade da  $\alpha$ -amilase em placa. Em todos os clones testados foi observado um halo de degradação do amido (Figura 3A).

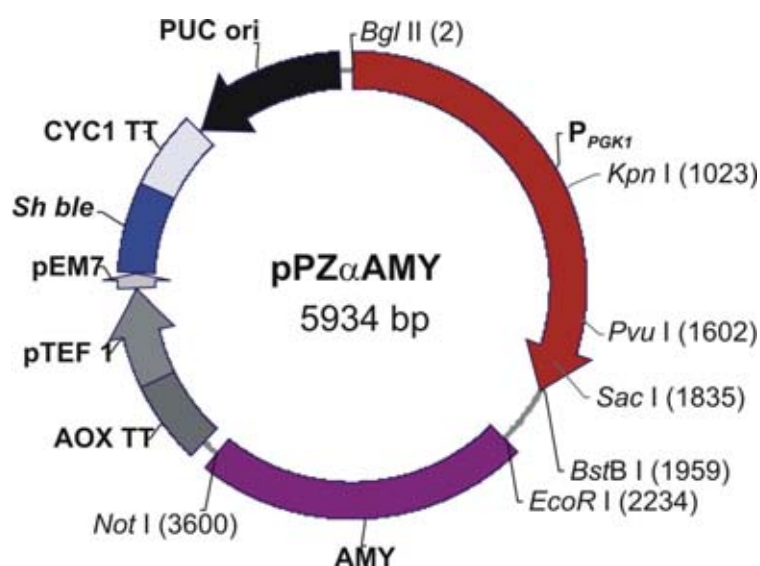
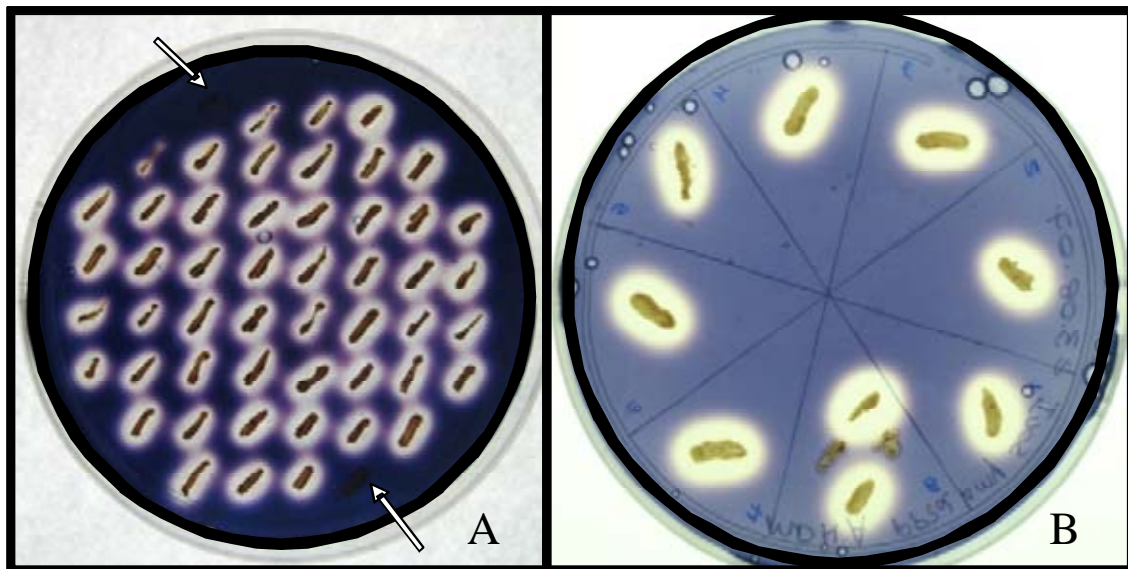


Figura 2. Mapa físico do vetor pPZ $\alpha$ AMY.

Com a linearização em *SacI* foram obtidos 11 transformantes resistentes a zeocina, estes clones foram submetidos ao teste de atividade da  $\alpha$ -amilase em placa e em 8 clones mostraram atividade amilolítica (Figura 3B). Estes resultados mostram que é possível dirigir a integração de vetores contendo o promotor PGK após digestão com estas enzimas de restrição.

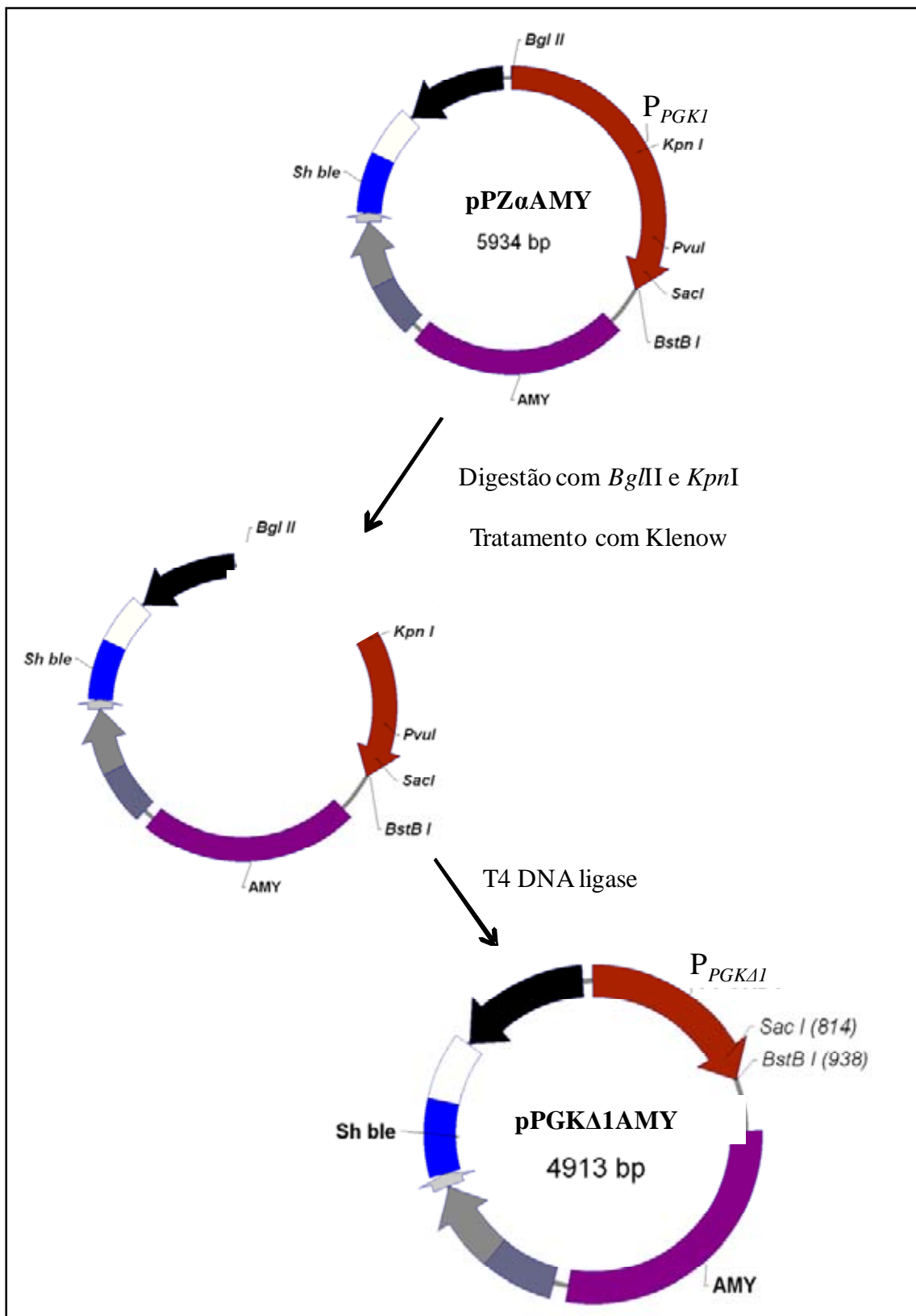


**Figura 3.** Teste de atividade amilolítica em placa de clones de *P. pastoris* GS115 transformados com o vetor pPZ $\alpha$ AMY. A) Vetor digerido com *KpnI*.; B) Vetor digerido com *SacI*. As setas indicam controle negativo.

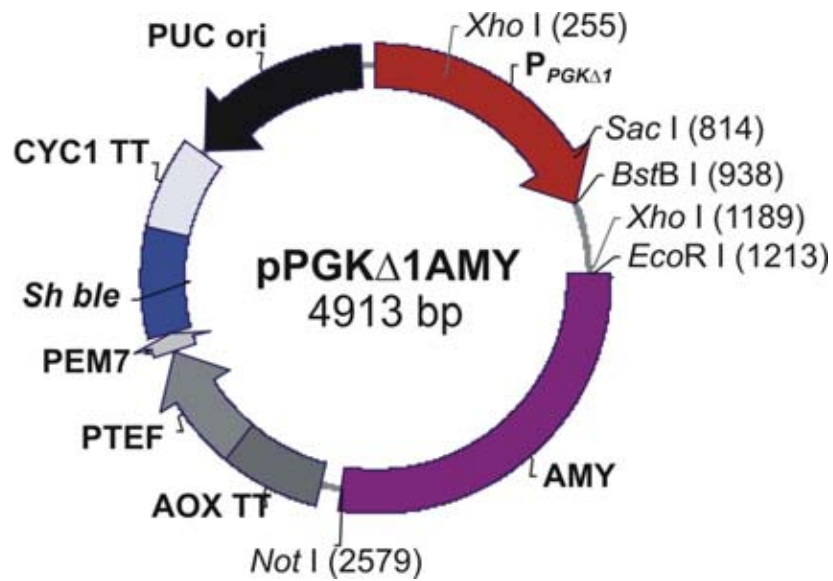
### 5.1.2 Deleções controladas do promotor P<sub>PGKI</sub>

Com intuito de reduzir o tamanho do promotor P<sub>PGKI</sub> para verificar o tamanho mínimo que ainda contém atividade promotora, o vetor pPZ $\alpha$ AMY foi primeiramente digerido com as enzimas *BglII* e *KpnI*, eliminando-se ~1 Kb do promotor PGK. O vetor linearizado foi tratado com a enzima Klenow DNA Polimerase e religado utilizando a enzima T4 DNA Ligase seguindo-se transformação de *E. coli*. Após análise de restrição de plasmídios extraídos de clones transformantes selecionados, um clone positivo foi selecionado e chamado pPGK $\Delta$ 1AMY (Figura 5). A estratégia utilizada para a construção do vetor pPGK $\Delta$ 1AMY pode ser visualizada na figura 4. O vetor foi digerido com a enzima *SacI*, que cliva dentro do promotor, para dirigir a integração para o locus *PGKI*.



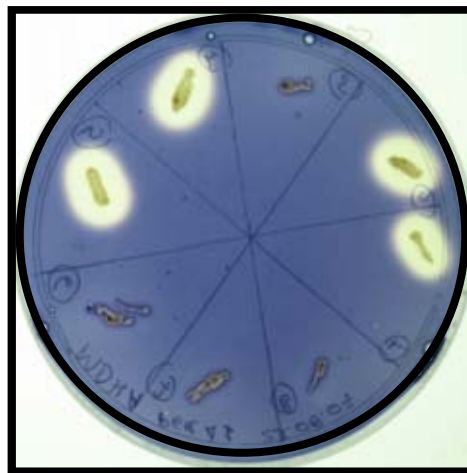


**Figura 4.** Estratégia de construção do vetor pPGKΔ1AMY



**Figura 5.** Mapa físico do vetor pPGK $\Delta$ 1AMY

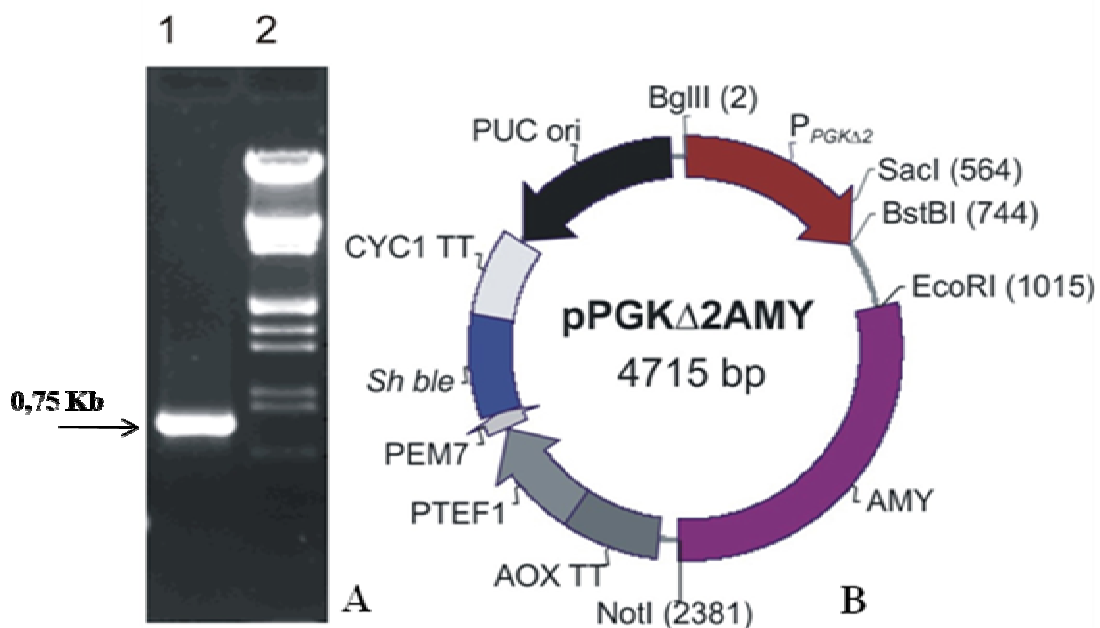
Células de *P. pastoris* GS115 foram transformadas com o vetor linearizado e foram obtidos 8 clones resistentes a zeocina, mas apenas 4 apresentaram halos de degradação do amido em placa (Figura 6).



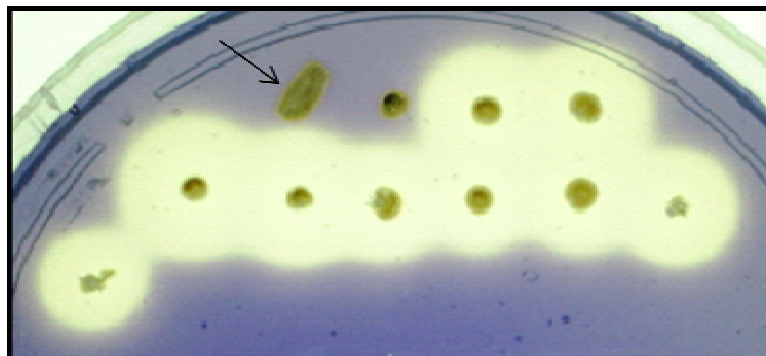
**Figura 6.** Teste de atividade amilolítica em placa de clones de *P. pastoris* GS115 transformados com o vetor pPGK $\Delta$ 1AMY.

Uma segunda deleção realizada para reduzir o tamanho do promotor para cerca de 740 pb. Para tanto, foi feita uma PCR com *primers* PGKD8 e PGKRZ (Tabela 4) que possuem sítios para as enzimas de restrição *Bgl*III e *Bst*BI nas extremidades, respectivamente. A região de anelamento dos *primers* está indicada no Anexo 1. O

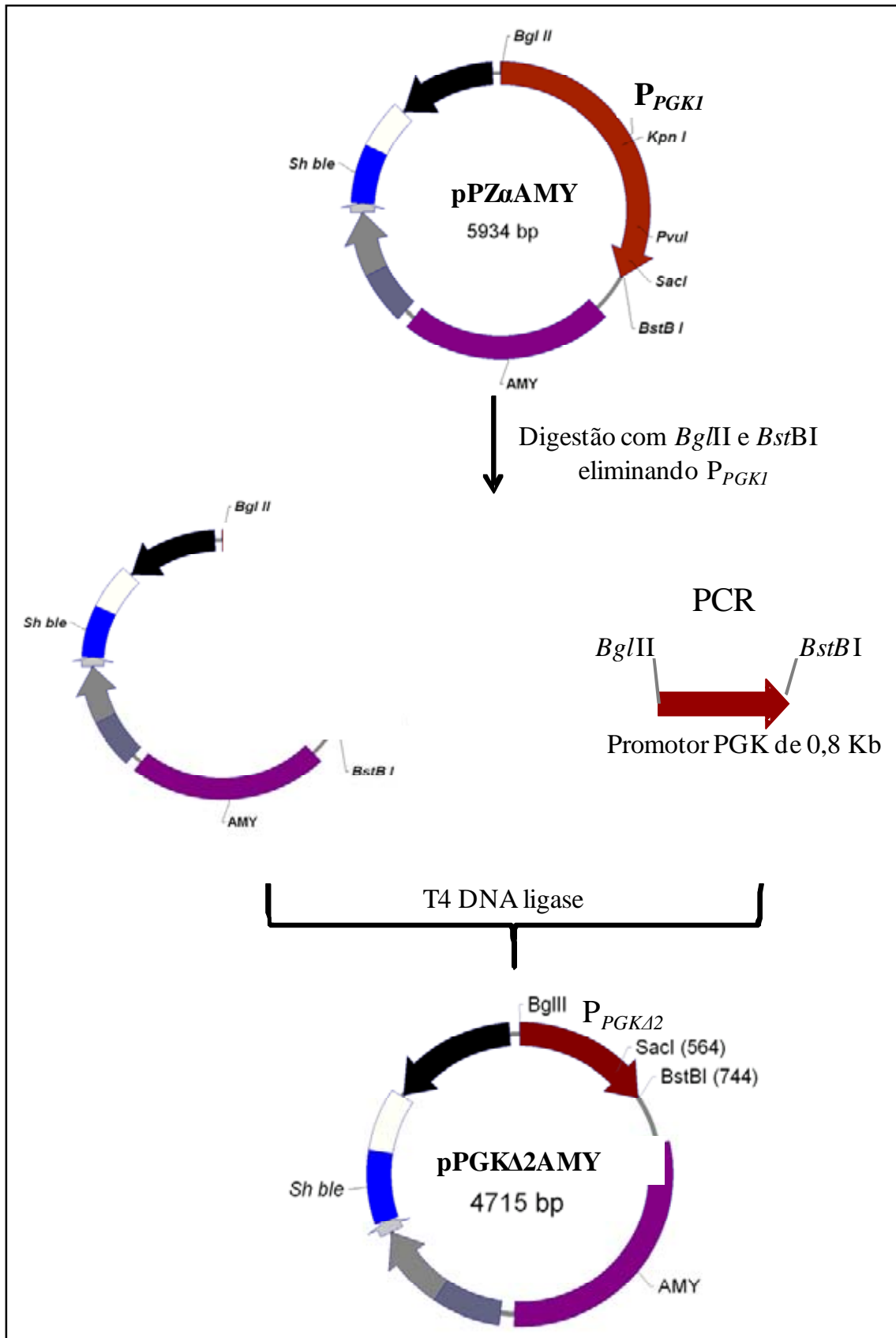
amplicom de ~740 pb (Figura 7A) foi clonado no vetor pGEM-T para depois ser subclonado no vetor pPZ $\alpha$ AMY após digestão com *Bgl*III e *Bst*BI (substituição de promotor de 2 Kb pelo de 740 pb). O vetor resultante, pPGK $\Delta$ 2AMY (Figura 7B) foi linearizado com *Sac*I antes da transformação de *P. pastoris* GS115. A estratégia utilizada para a construção do vetor pPGK $\Delta$ 2AMY pode ser visualizada na figura 9. Foram obtidos 9 clones resistentes a zeocina e estes foram submetidos ao teste de atividade amilolítica em placa. Todos apresentaram atividade como pode ser observado com os halos de hidrólise do amido na Figura 8.



**Figura 7.** A) Foto da amplificação do promotor P<sub>PGK $\Delta$ 2</sub> em gel de agarose 1%; B) Mapa físico do vetor pPGK $\Delta$ 2AMY.



**Figura 8.** Teste de atividade amilolítica em placa de clones de *Pichia pastoris* GS115 transformados com o vetor pPGK $\Delta$ 2AMY. O controle negativo está indicado por uma seta.

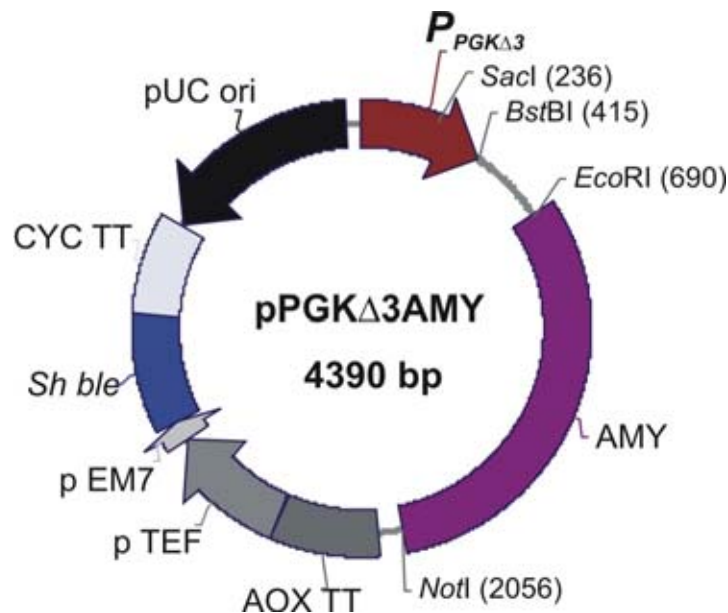


**Figura 9.** Estratégia de construção do vetor pPGK $\Delta$ 2AMY.

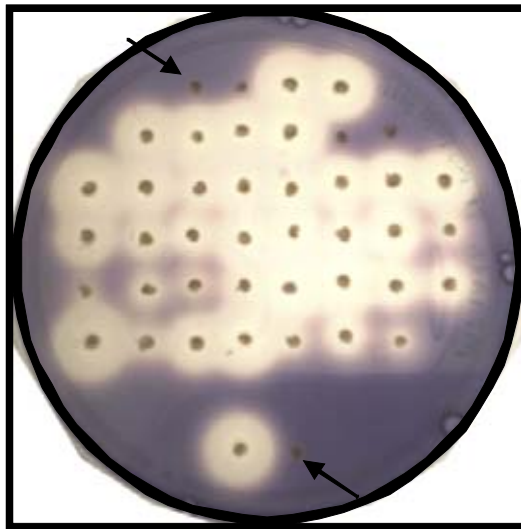
A terceira deleção foi feita no vetor pPZ $\alpha$ AMY após digestão com as enzimas *Bgl*III e *Pvu*I, eliminando-se ~1,6 Kb das seqüências promotoras. O procedimento para esta deleção seguiu as mesmas condições descritas anteriormente para a construção do vetor pPGK $\Delta$ 1AMY. O vetor resultante foi denominado pPGK $\Delta$ 3AMY (Figura 10). A estratégia utilizada para a construção do vetor pPGK $\Delta$ 3AMY pode ser visualizada na figura 13.

O vetor pPGK $\Delta$ 3AMY linearizado com *Sac*I foi utilizado para transformação de *P. pastoris* GS115. Foram obtidos 39 clones resistentes a zeocina e apenas 2 não expressaram  $\alpha$ -amilase (Figura 11). Este experimento mostrou que apenas cerca de 400 pb do promotor  $P_{PGK}$  são suficientes para dirigir a expressão do gene repórter. Não foram realizadas outras deleções no promotor PGK, pois algumas seqüências UAS reconhecidas como fundamentais para a transcrição, como TATA box, poderiam ser comprometidas (ver a seqüência original do promotor PGK no Anexo 1).

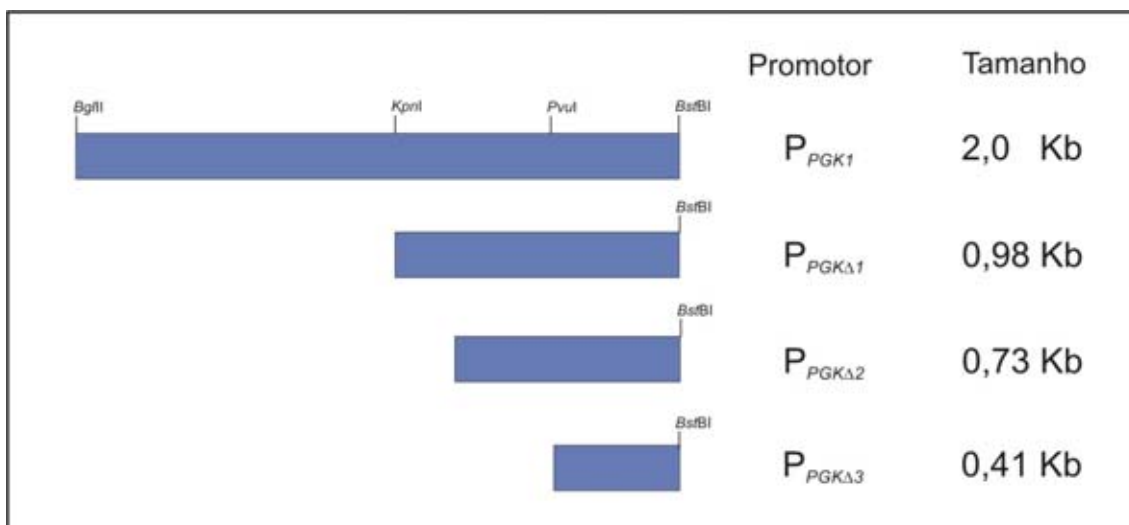
A Figura 12 mostra de forma esquemática as deleções resultantes do promotor  $P_{PGK1}$ .



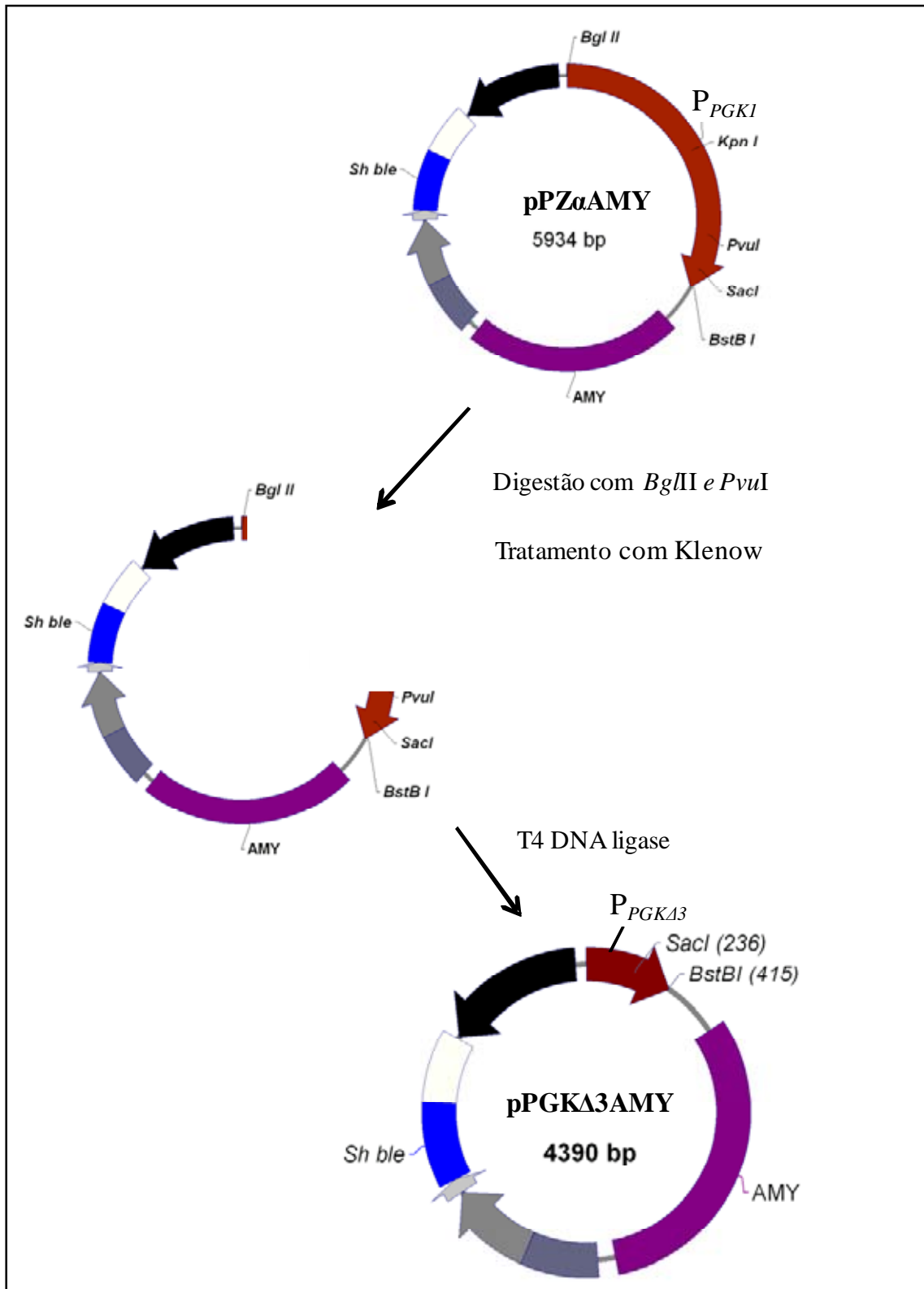
**Figura 10.** Mapa físico do vetor pPGK $\Delta$ 3AMY.



**Figura 11.** Teste de atividade amilolítica em placa para clones de *Pichia pastoris* GS115 transformados com o vetor pPGK $\Delta$ 3AMY. As setas indicam controles negativo.

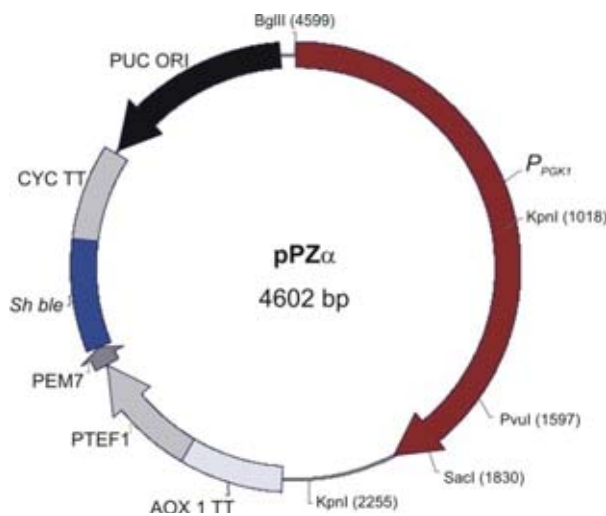


**Figura 12.** Representação esquemática do tamanho relativo entre os fragmentos derivados do promotor P<sub>PGK1</sub>.



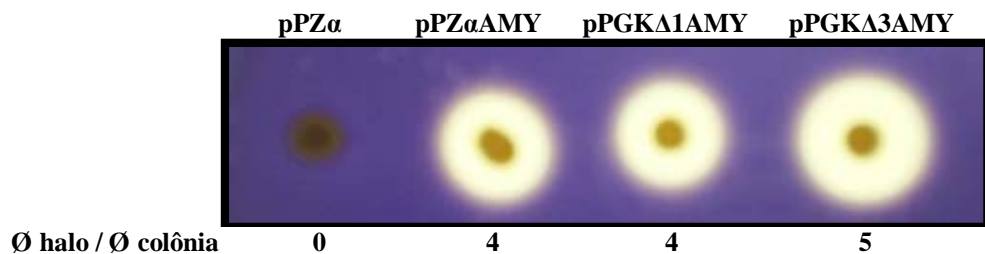
**Figura 13.** Estratégia de construção do vetor pPGK $\Delta$ 3AMY

Para comparar qualitativamente a expressão de  $\alpha$ -amilase dirigida pelas diversas deleções do promotor PGK, foram escolhidos clones aleatórios de cada construção para teste em placa MDHA 1,5 % a fim de comparar os tamanhos dos halos de hidrólise. Neste estudo, não foi utilizado o clone transformado com o vetor pPGK $\Delta$ 2AMY. O vetor pPZ $\alpha$  (Figura 14), construído por Araújo (2008), que possui o promotor PGK original sem gene repórter, foi utilizado como controle negativo. A estratégia utilizada para a construção deste vetor pode ser visualizada na figura 16.



**Figura 14.** Mapa físico do vetor pPZ $\alpha$ . Vetor utilizado como controle negativo nos experimentos de secreção de proteínas.

A Figura 15 mostra que, comparativamente, a relação diâmetro do halo/diâmetro da colônia é maior para o clone transformado com o vetor pPGK $\Delta$ 2AMY o que sugere que tenha maior atividade amilolítica.



**Figura 15.** Teste de atividade amilolítica em placa de clones de *P. pastoris* GS115 transformados com os vetores pPZ $\alpha$ , pPZ $\alpha$ AMY, pPGK $\Delta$ 1AMY e pPGK $\Delta$ 3AMY.



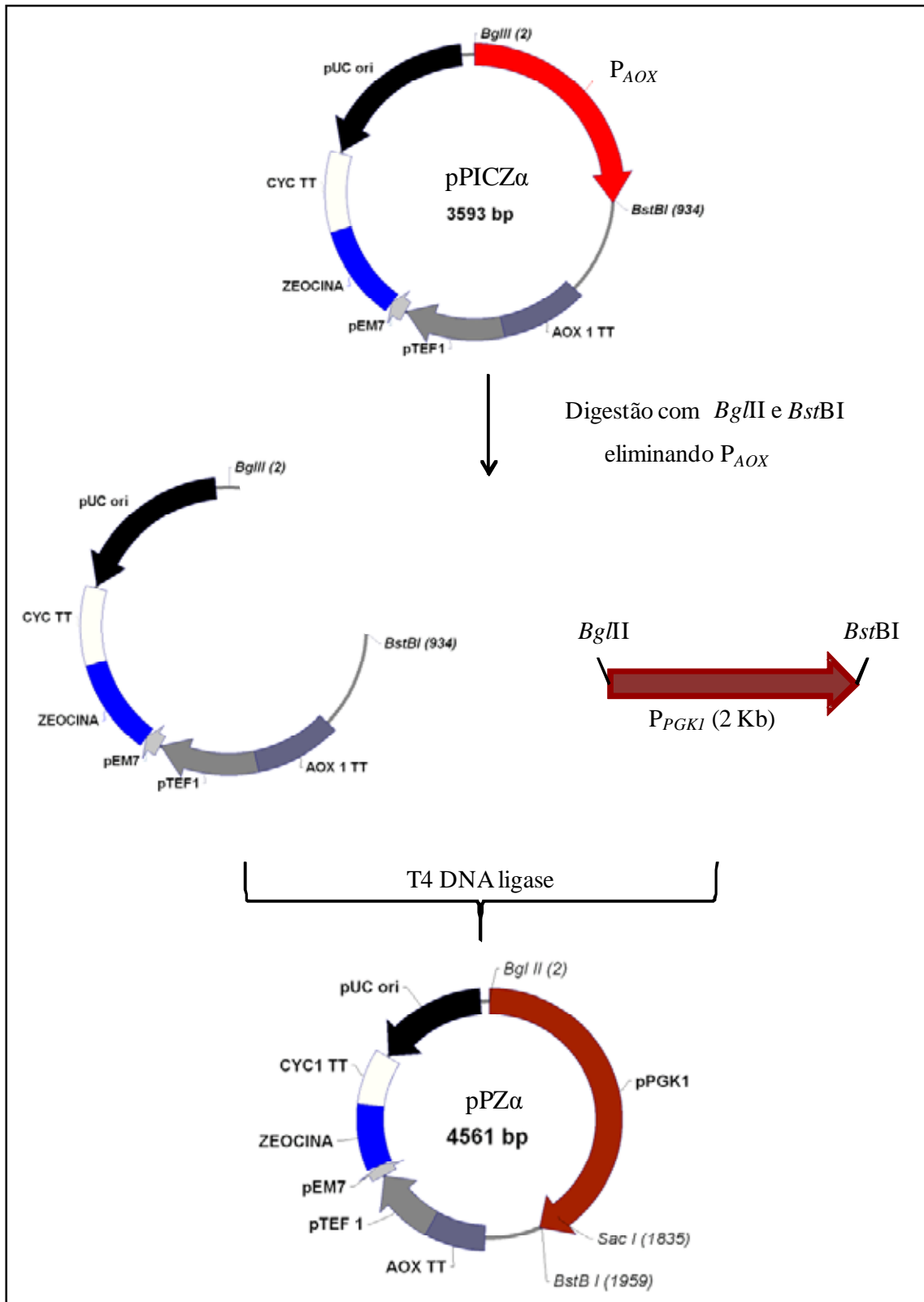


Figura 16. Estratégia de construção do vetor pZα.

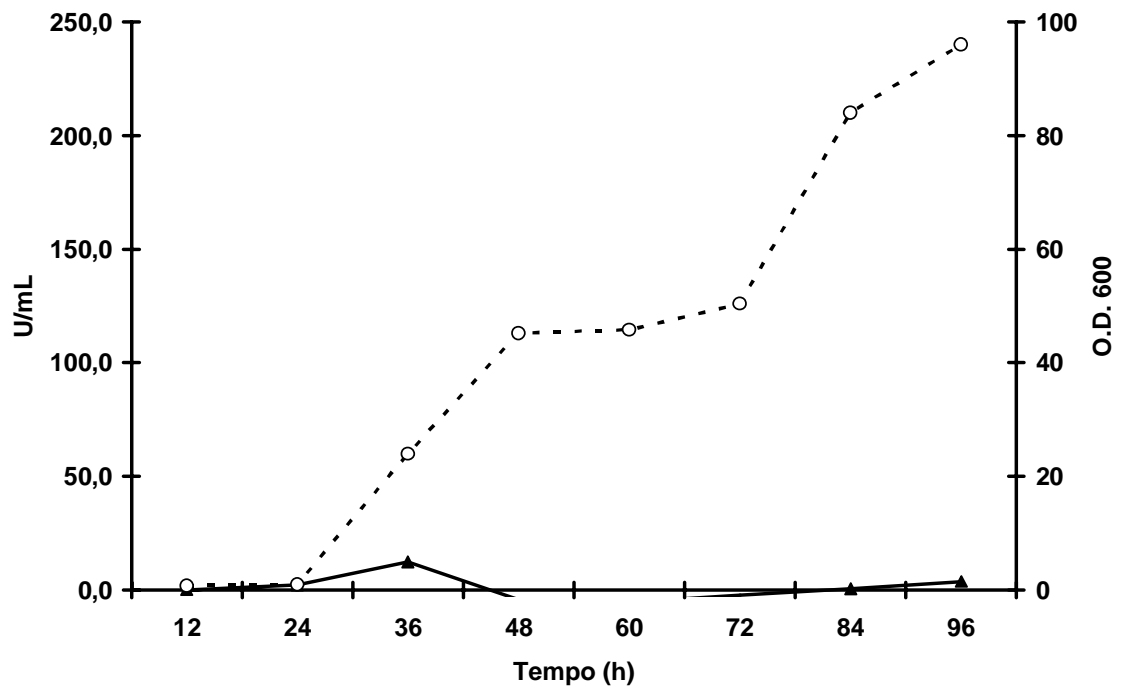
Para avaliar quantitativamente a produção de  $\alpha$ -amilase derivada deste clones, os mesmos foram crescidos em 100 mL de YPD sob agitação por 96 horas e a cada 12 horas foram coletadas amostras da cultura para medir a densidade celular, a atividade da enzima e analisar o perfil protéico em gel SDS-PAGE.

O clone transformado com o vetor pPGK $\Delta$ 3AMY apresentou a maior atividade amilolítica atingindo aproximadamente 4 vezes o valor da atividade específica observada com os clones transformados com os vetores pPZ $\alpha$ AMY e pPGK $\Delta$ 1AMY (Figuras 17, 18, 19 e 20). Todos os clones tiveram o crescimento celular aproximado, inclusive o controle negativo (pPZ $\alpha$ ).

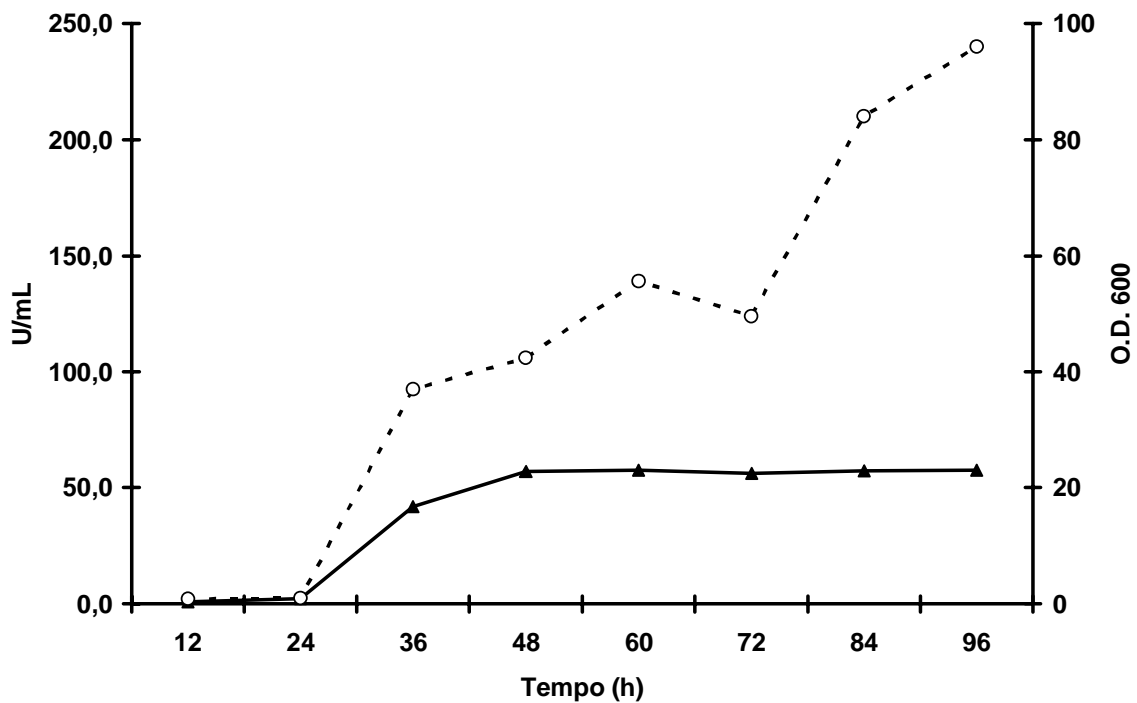
O perfil protéico das culturas foi analisado em gel SDS-PAGE após precipitação dos sobrenadantes com TCA (Figura 21). Em todos os clones que expressavam  $\alpha$ -amilase foi observada uma banda de ~60 KDa que não está presente no sobrenadante do controle negativo (pPZ $\alpha$ ).

Posteriormente, foi verificado por meio de teste de resistência a droga zeocina (marca de seleção destes vetores) que o transformante do vetor pPGK $\Delta$ 3AMY, deve apresentar maior número de cópias integradas que os demais, pois apresentou-se mais resistente a zeocina após 96 horas de crescimento em placa (Figura 22 C). Os clones pPZ $\alpha$ AMY e pPGK $\Delta$ 1AMY utilizados têm somente uma cópia integrada no genoma da levedura, pois ambos não tiveram bom crescimento em meio contendo 500  $\mu$ g/mL de zeocina (Figura 22 C).

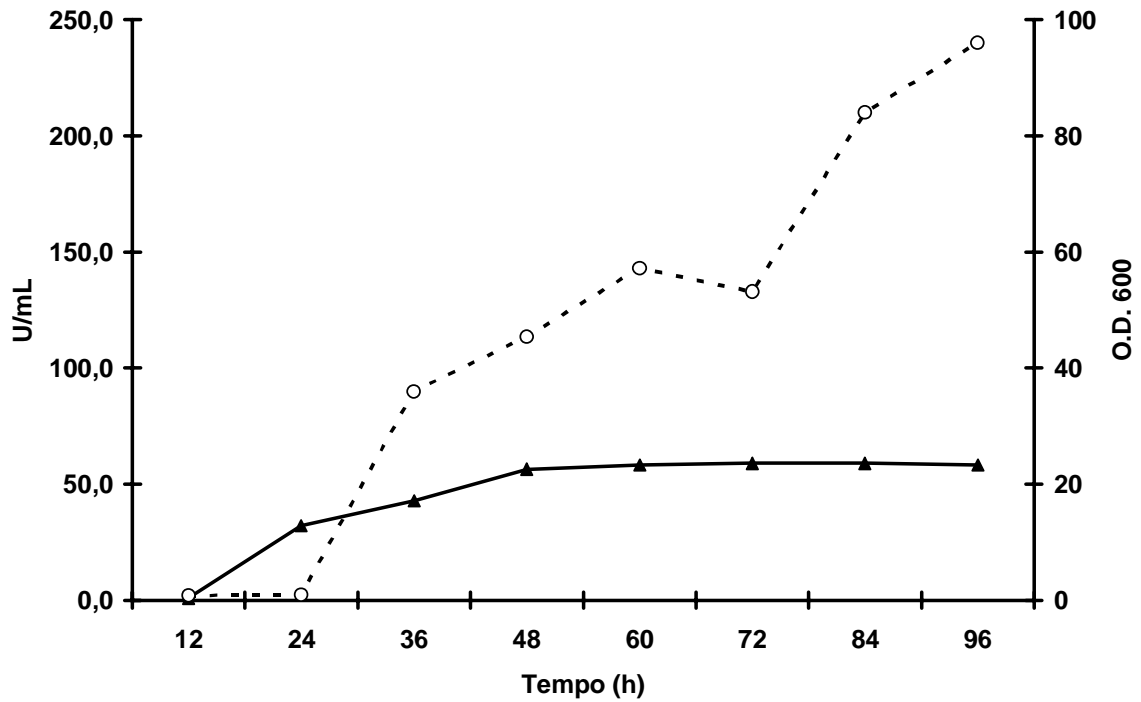
Para selecionar clones que contivessem somente uma cópia do vetor pPGK $\Delta$ 3AMY foi realizado um teste de resistência a zeocina em placa (conforme Vassileva *et al.*, 2001b). Foram testados 49 clones resultantes de uma transformação que foram analisados quanto à atividade amilolítica assim como crescimento em duas concentrações de zeocina (100 e 500  $\mu$ g/mL). Apenas 2 clones (29 e 45) apresentaram o perfil de única cópia: cresceram na concentração de zeocina 100  $\mu$ g/mL e não na de 500 $\mu$ g/mL (Tabela 7). Estes clones deverão ser usados em análises futuras.



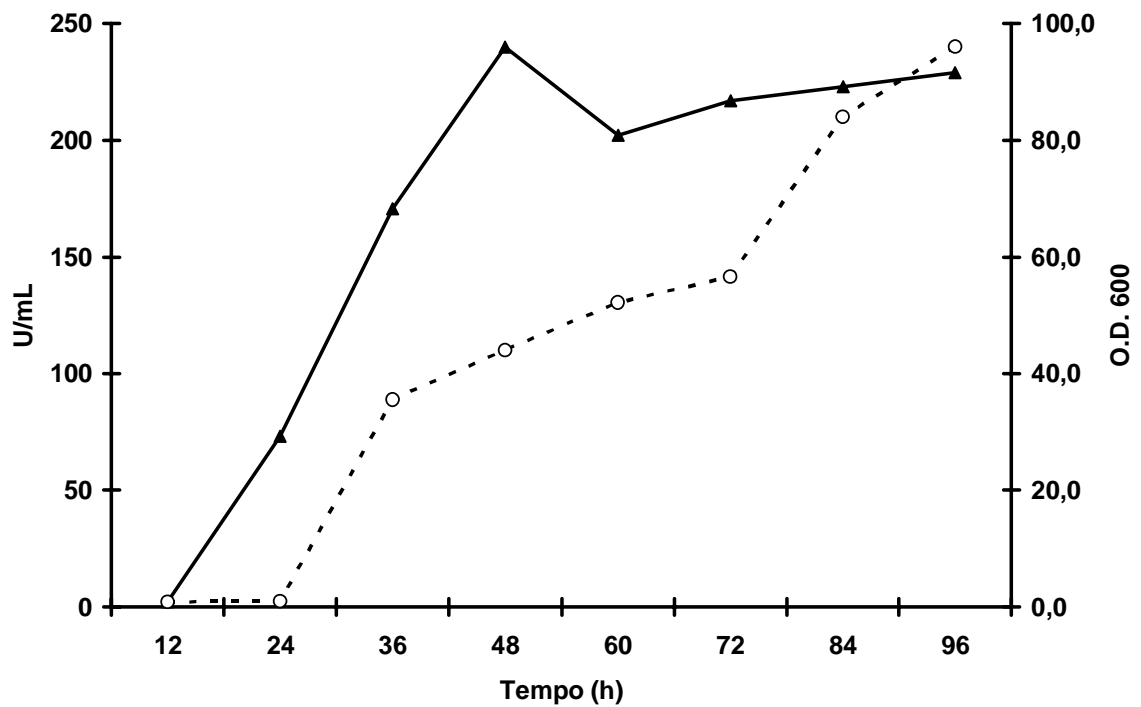
**Figura 17.** Gráfico da atividade amilolítica em meio líquido (linha contínua) e curva de crescimento (linha tracejada) de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPZα.



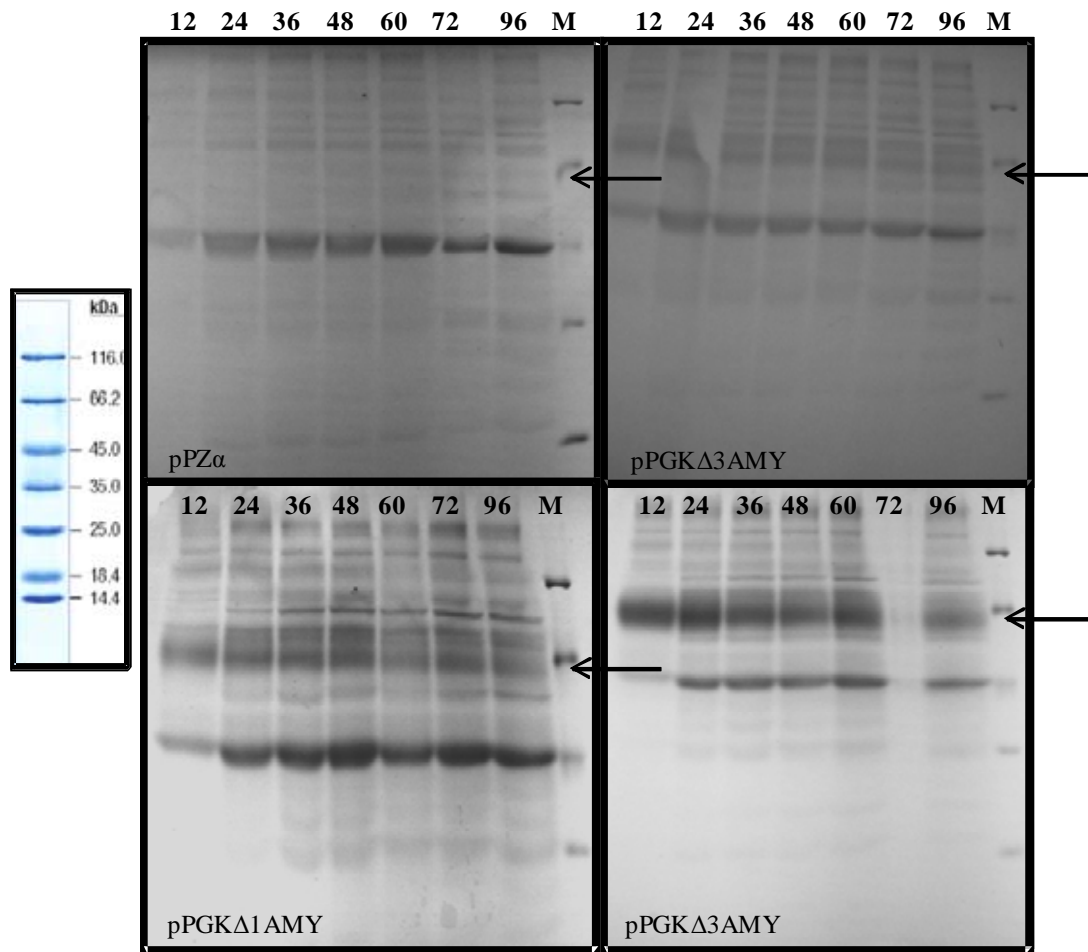
**Figura 18.** Gráfico da atividade amilolítica em meio líquido (linha contínua) e curva de crescimento (linha tracejada) de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPZαAMY.



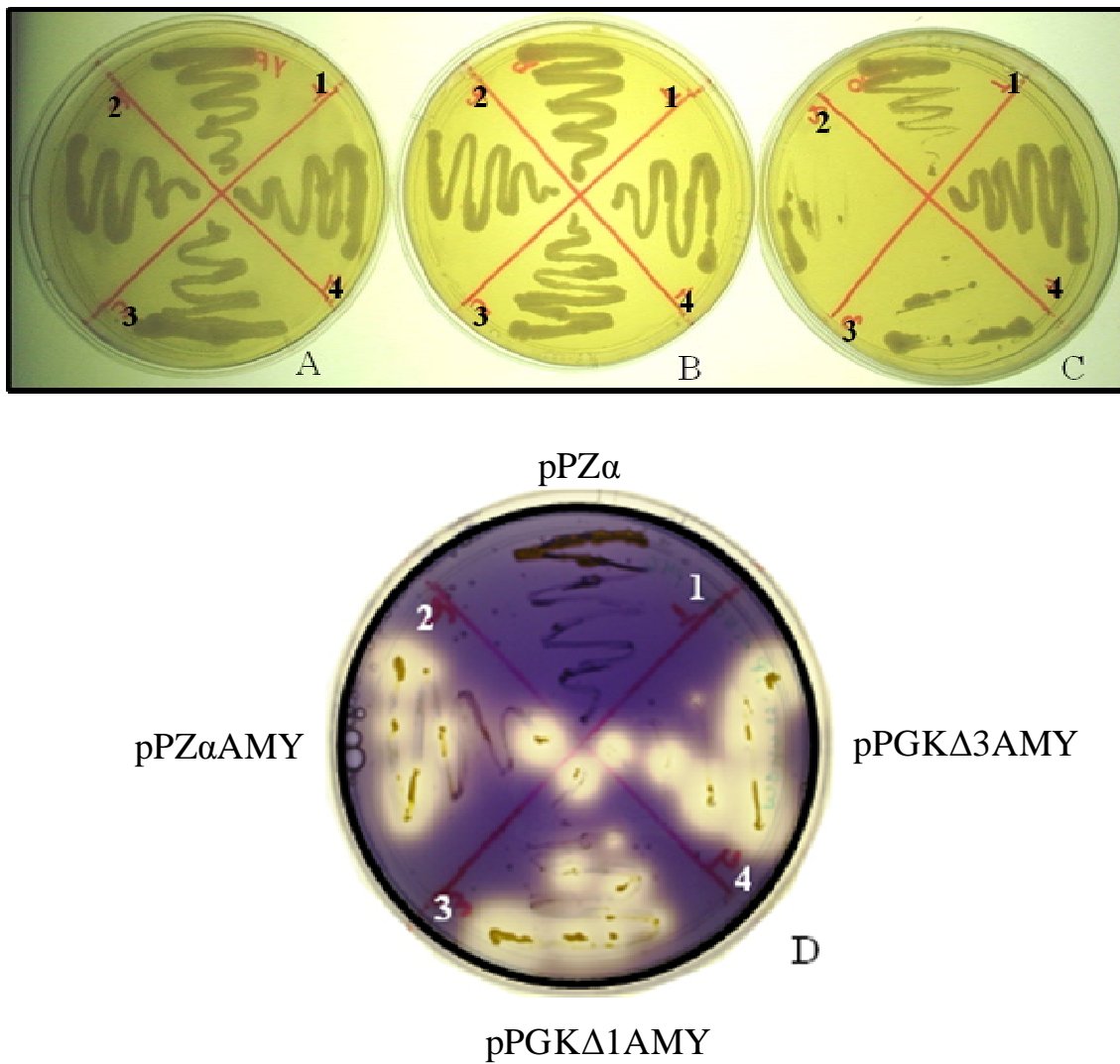
**Figura 19.** Gráfico da atividade amilolítica em meio líquido (linha contínua) e curva de crescimento (linha tracejada) de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPGKΔ1AMY.



**Figura 20.** Gráfico da atividade amilolítica em meio líquido (linha contínua) e curva de crescimento (linha tracejada) de *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPGKΔ3AMY.



**Figura 21.** Análise em SDS-PAGE 12,5 % do perfil protéico dos sobrenadantes de culturas de *P. pastoris* transformados com as construções pPZ $\alpha$ , pPZ $\alpha$ AMY, pPGK $\Delta$ 1AMY e pPGK $\Delta$ 3AMY. M: Marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (*Fermentas Life Science*). Tempo de indução 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 h. As setas indicam possível banda referente à enzima  $\alpha$ -amilase ~ 60 KDa.



**Figura 22.** Teste de resistência a zeocina e atividade amilolítica em placa. A) meio YPD; B) meio YPD com 100µg/mL zeocina; C) meio YPD com 500 µg/mL zeocina; D) meio MDHA corada com vapor de iodo. A numeração indica o vetor integrado: 1 - pPZα; 2 - pPZαAMY; 3 - pPGKΔ1AMY; 4 - pPGKΔ3AMY.

**Tabela 7.** Seleção de clones com única cópia integrada do vetor pPGK $\Delta$ 3AMY.

Clone	MDHA 1,5%	zeocina 100 $\mu$ g/mL	zeocina 500 $\mu$ g/mL
1	+++	++	++
2	+++	++	++
3	+++	++	++
4	+++	++	++
5	+++	++	++
6	+++	++	++
7	-	++	++
8	-	++	++
9	+	+	+
10	+++	++	++
11	+++	++	++
12	+	+	+
13	+++	+	++
14	+++	++	++
15	+++	++	++
16	+++	++	++
17	+++	++	++
18	+++	++	++
19	+	+	+
20	+	+	+
21	+++	++	++
22	+++	++	+
23	+	+	+
24	+++	++	+
25	++	+	+
<b>26</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
27	+	++	+
28	-	+	+
29	+	++	++
30	+++	++	++
31	+++	++	++
32	++	++	++
33	+	++	++
34	+++	++	++
35	-	+	+
36	+++	++	+
37	+++	++	+
38	+	++	+
39	++	++	+
40	-	+	+
41	+	++	-
42	-	+	-
43	-	++	-
44	-	-	-
<b>45</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>-</b>
46	-	+	-
47	-	+	-
48	+++	++	++
49	+++	++	++

Para atividade amilolítica: +++ halo de hidrólise grande; ++ halo de tamanho intermediário; + halo pequeno; - sem halo. Para crescimento em zeocina: ++ forte crescimento; + pouco crescimento; - sem crescimento.

---

## 5.2. Expressão intracelular em *P. pastoris* utilizando o promotor P<sub>PGK</sub>

### 5.2.1. Construção de vetores para expressão intracelular

Após investigar o uso do promotor P<sub>PGKI</sub> para dirigir a secreção de proteínas heterólogas em *P. pastoris*, analisamos o seu uso para a expressão intracelular usando o gene *lacZ* de *E. coli* como gene repórter. Para a construção dos vetores para este fim foi utilizado como plataforma o vetor comercial pPICZA (Invitrogen). Para favorecer as clonagens necessárias no decorrer das construções, foi retirado um fragmento de 38 pb correspondente ao sítio de clonagem *EcoRI-XhoI* (ver Anexo 2). O vetor foi digerido com estas enzimas, tratado com a enzima Klenow DNA Polimerase e religado utilizando a enzima T4 DNA Ligase. O clone resultante foi chamado de pPICZA<sup>-</sup>. Este vetor foi então digerido com as enzimas *SacII* e *ApaI* para clonagem direcionada do gene *lacZ*.

### 5.2.2. Amplificação e clonagem do gene *lacZ*

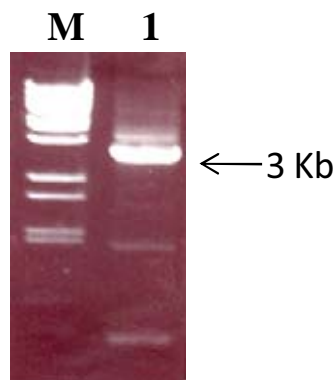
O gene *lacZ* foi obtido por PCR usando os *primers* LACZ-F e LACZ-R e o vetor pZ0 de *S. cerevisiae* como *template*. O tamanho esperado do amplicom é de ~3100 pb. A Figura 23 mostra a amplificação do fragmento. O produto de PCR foi clonado em pGEM-T e digerido com as enzimas *SacII*, *ApaI* e *ScaI* para liberar o fragmento do gene *lacZ* (Figura 24) para a clonagem direcionada no vetor pPICZA<sup>-</sup> digerido anteriormente com as mesmas enzimas. Após a confirmação da correta clonagem do gene *lacZ* no vetor pPICZA<sup>-</sup>, o vetor passou a ser denominado pPICLACZ. A estratégia para a construção deste vetor pode ser visualizada na figura 25.

O vetor pPICLACZ foi digerido com as enzimas de restrição *BglIII* e *BstBI* para retirada do promotor AOX e posterior inserção dos diversos fragmentos do promotor PGK.

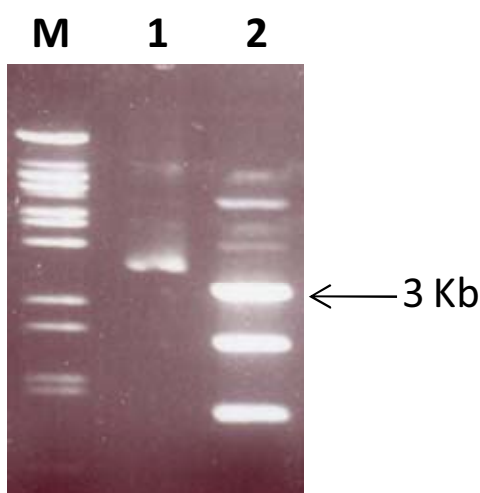
### 5.2.3. Clonagem de fragmentos do promotor P<sub>PGK</sub>

Além do fragmento original de 2 Kb, quatro diferentes fragmentos do promotor PGK foram obtidos por PCR para análise de expressão intracelular. Estes fragmentos foram amplificados com os *primers* PGK-D4, PGK-D5, PGK-D6 e PGK-D7 (Tabela 4) em combinação com *primer* reverso PGK-RZ e geraram fragmentos de 1,5 Kb, 1,1 Kb, 0,5 Kb e 0,3 Kb, respectivamente (Figura 26).





**Figura 23.** Foto da amplificação por PCR do gene *lacZ* em gel de agarose 1%. A seta indica o amplicon de ~3,1 Kb correspondente ao gene *lacZ*. M – Marcador  $\lambda$  *BstEII*.



**Figura 24.** Foto de análise de restrição do gene *lacZ* clonado no vetor pGEM-T em gel de agarose 0,8 %. 1) Marcado  $\lambda$  *BstEII*; 2) Vetor intacto; 3) Vetor digerido com *ApaI*, *SacII* e *ScaI*. A seta indica a posição do gene *lacZ*.

As posições de anelamento dos *primers* podem ser vistas no Anexo 1. Todos os amplicons possuíam sítios para as enzimas de restrição *BglII* e *BstBI* nas suas extremidades (vide Tabela 4) para facilitar a clonagem direcionada no vetor pPICLACZ.

O fragmento amplificado pela combinação dos *primers* PGK-D8 e PGK-RZ foi utilizada para construção do vetor pPGK $\Delta$ 2AMY para expressão extracelular, como descrito anteriormente.

Os produtos de PCR foram purificados e clonados no vetor pGEM-T. Em seguida, os fragmentos foram purificados após digestão dos vetores resultantes com *BglII* e *BstBI* para depois serem clonados no vetor pPICLACZ previamente digerido com as mesmas enzimas (Figura 27).

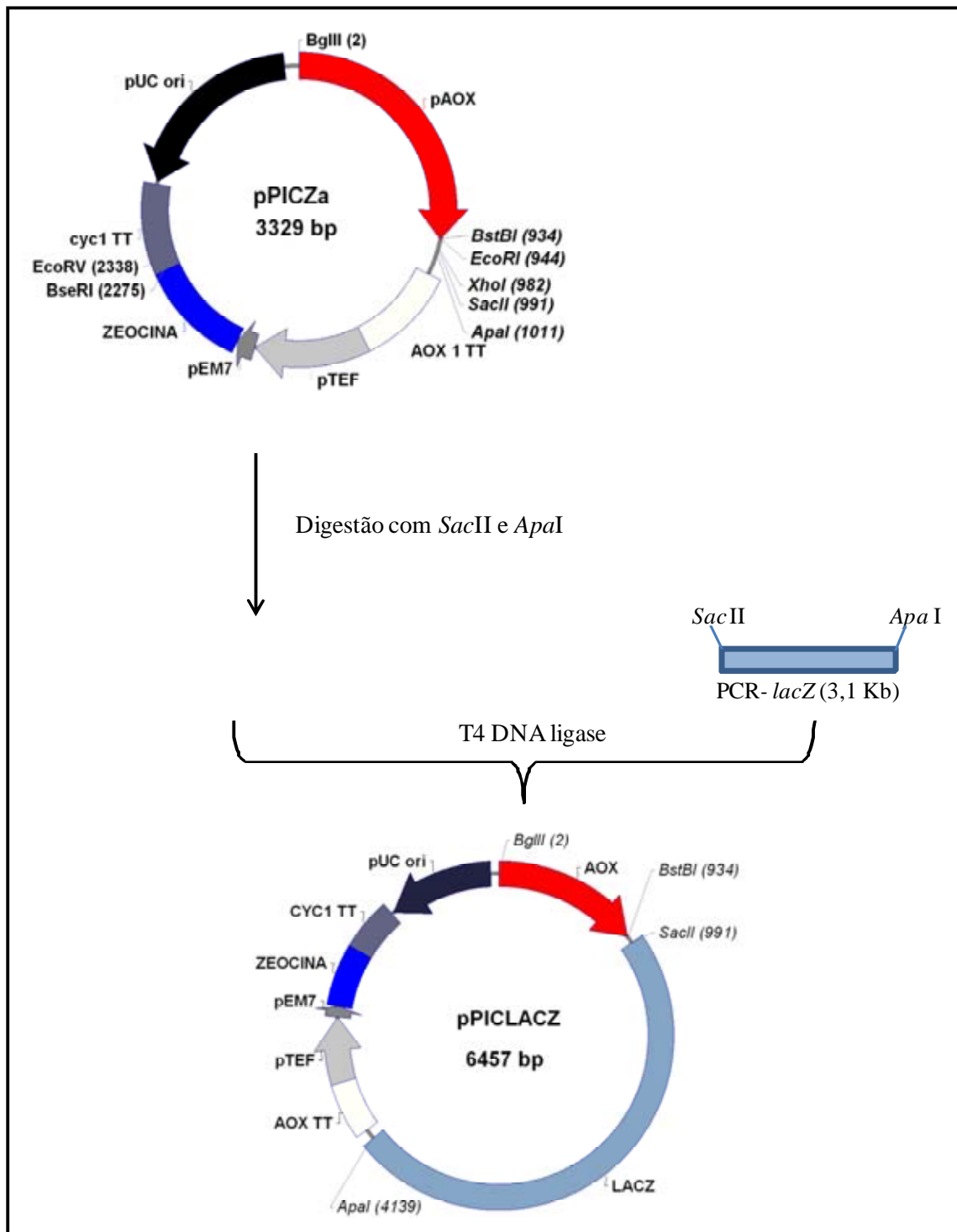
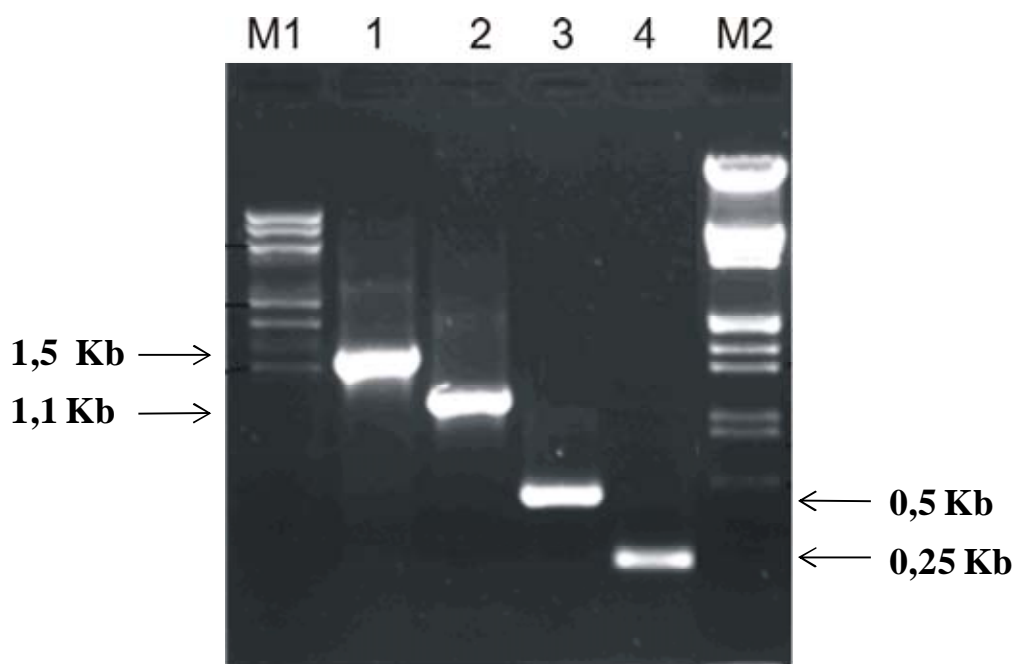


Figura 25. Estratégia de construção do vetor pPICLACZ.

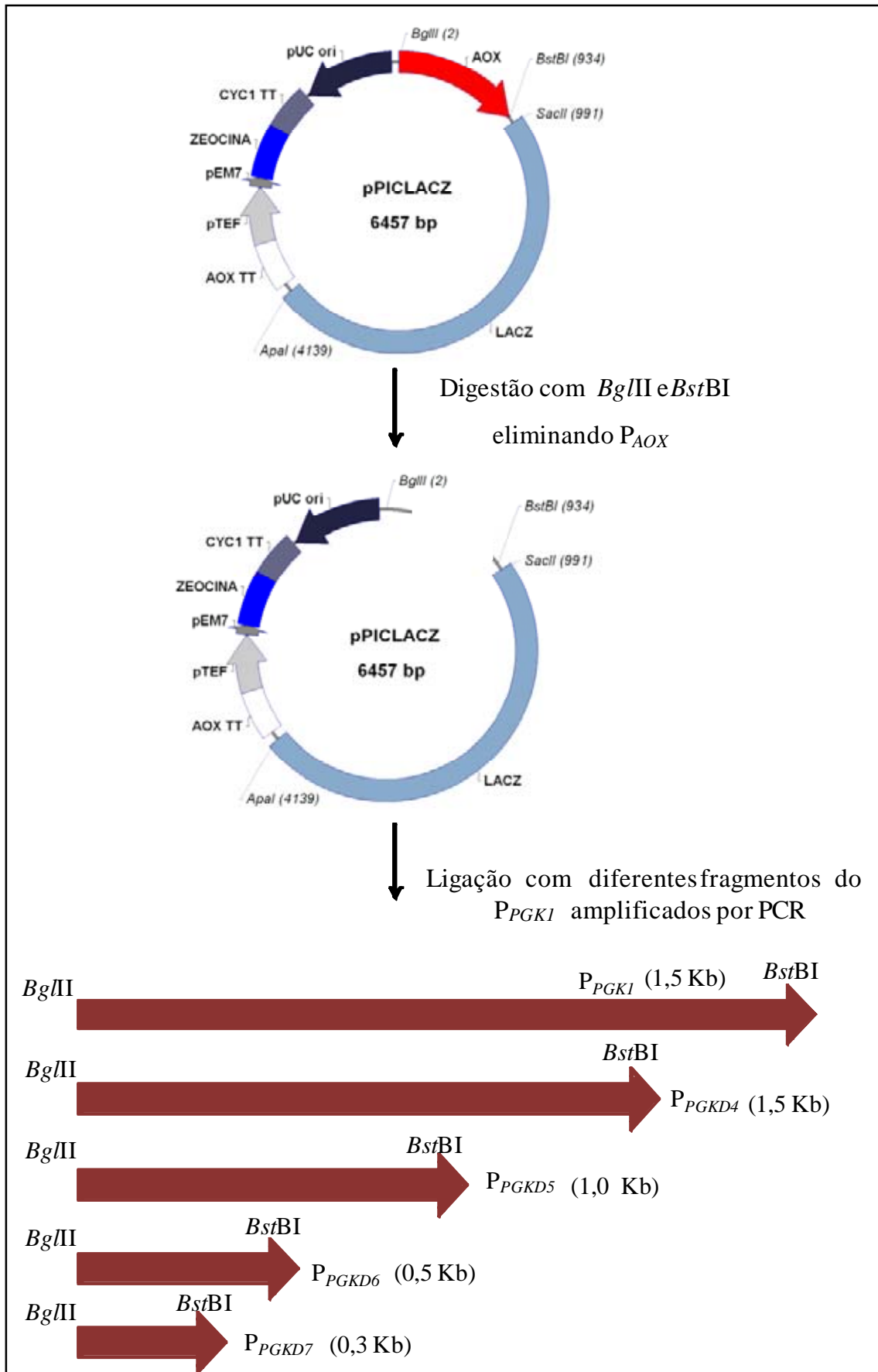


**Figura 26.** Amplificação de fragmentos do promotor PGK analisados em gel de agarose 1 %. M1) Marcador  $\lambda$  *BstEII*; 1) Fragmento amplificado com os *primers* PGK-D4 e PGKRZ; 2) Fragmento amplificado com os *primers* PGK-D5 e PGKRZ; 3) Fragmento amplificado com os *primers* PGK-D6 e PGKRZ; 4) Fragmento amplificado com os *primers* PGK-D7 e PGKRZ; 5) Marcador  $\lambda$  *EcoRI/HindIII*

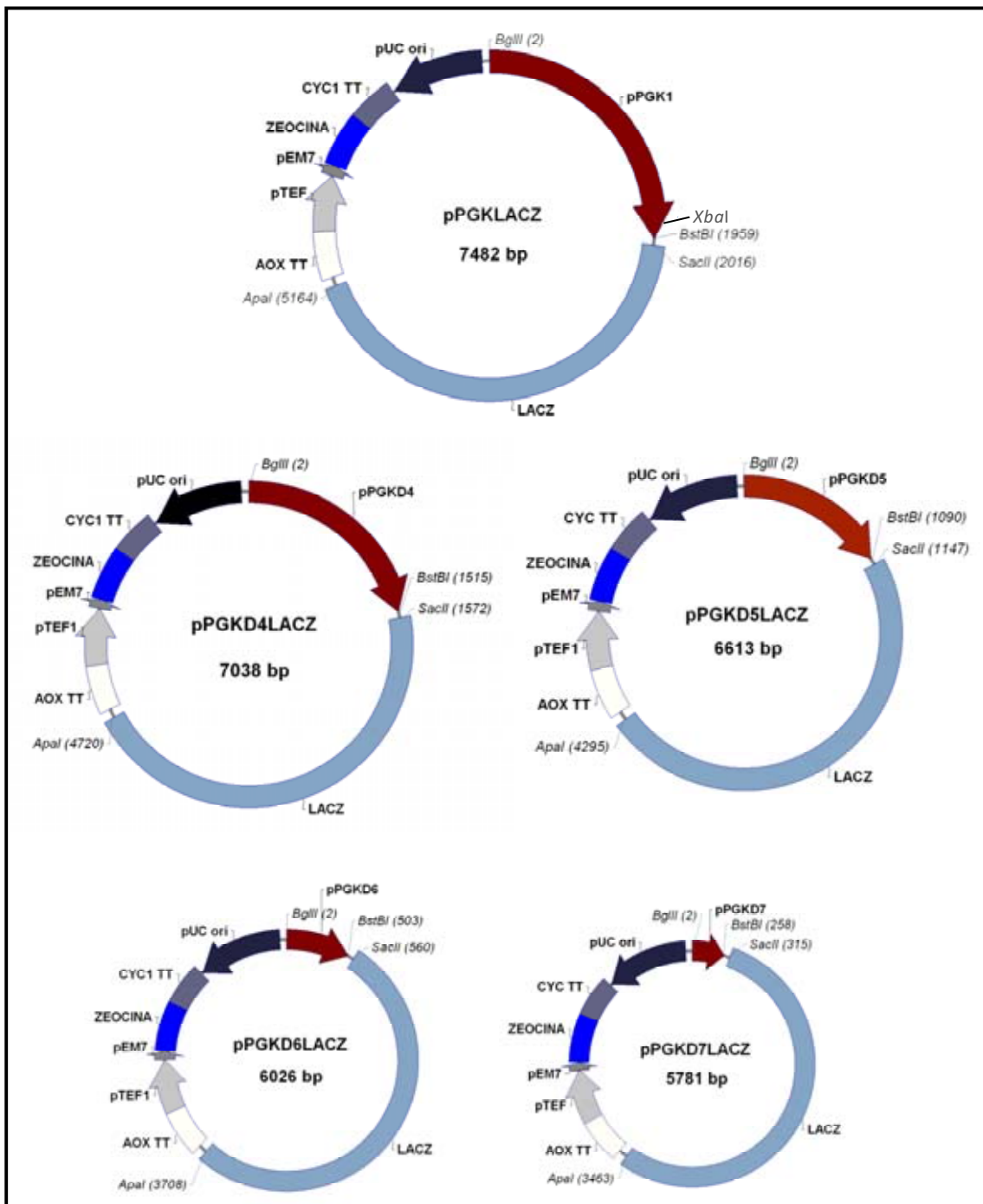
Também foi realizada a clonagem do promotor  $P_{PGK1}$  de 2 Kb originado diretamente do vetor pPZ $\alpha$ AMY após digestão com as enzimas *BglIII* e *BstBI*. Todas estas clonagens resultaram em 5 vetores para expressão intracelular com o gene repórter *lacZ*: pPGKLACZ, pPGKD4LACZ, pPGKD5LACZ, pPGKD6LACZ e pPGKD7LACZ, em ordem decrescente do tamanho do promotor PGK (Figuras 28 e 29).

Os vetores resultantes foram digeridos com a enzima *XbaI* e usados para transformação de *P. pastoris* linhagem GS115. Clones resistentes a zeocina foram selecionados, crescidos em YPD ágar e submetidos a testes para verificação da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidade. Para os testes, foi utilizado como controle positivo um clone de *S. cerevisiae* RE1006 transformado com o vetor pFAPXPGK (Reis, 2003) que expressa  $\beta$ -galactosidade sob o controle do promotor PGK de *S. cerevisiae*.

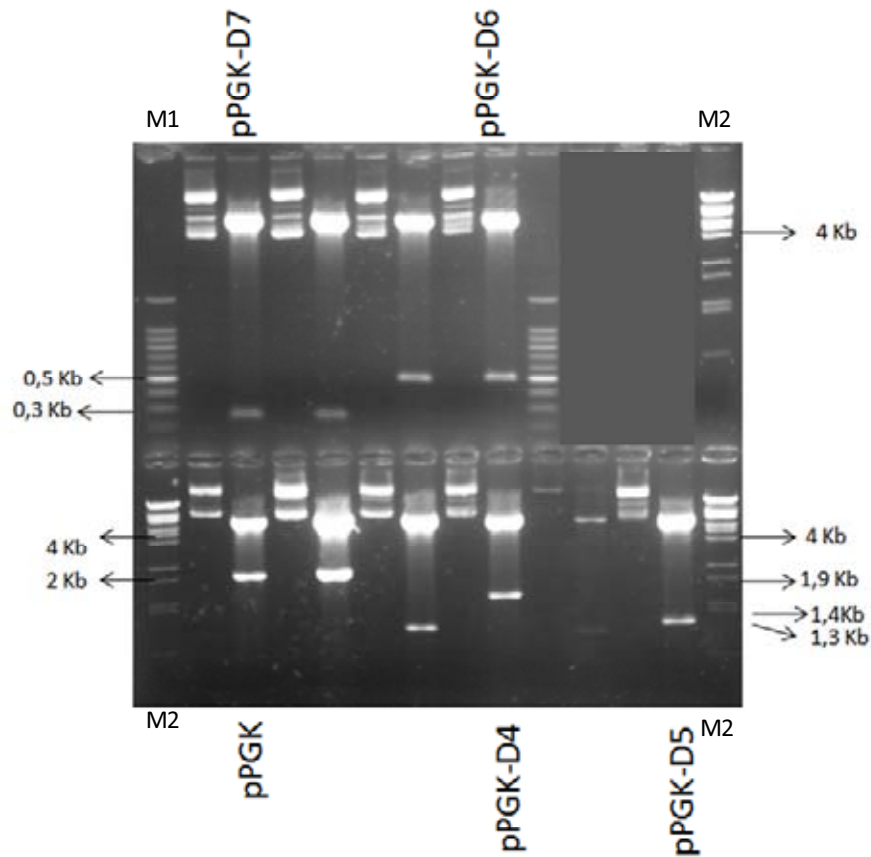
Em nenhum dos clones selecionados de *P. pastoris* foi possível detectar a expressão de  $\beta$ -galactosidade em testes de placa. Nas diferentes metodologias utilizadas foi possível apenas detectar a expressão do gene *lacZ* no controle positivo (*S. cerevisiae*) (Figuras 30 e 31).



**Figura 27.** Estratégia de construção dos vetores pPGKLACZ, pPGKD4LACZ, pPGKD5LACZ, pPGKD6LACZ e pPGKD7LACZ.



**Figura 28.** Mapa físico dos vetores: pPGKLACZ, pPGKD4LACZ, pPGKD5LACZ, pPGKD6LACZ e pPGKD7LACZ.



**Figura 29.** Análise de restrição dos vetores pPGKLACZ, pPGKD4LACZ, pPGKD5LACZ, pPGKD6LACZ e pPGKD7LACZ em gel de agarose 0,8 %. Os vetores foram digeridos com as enzimas *Bgl*III e *Bst*BI para liberação dos diferentes fragmentos do promotor PGK. M1-Marcador 100 pb Ladder (Promega), M2-Marcador  $\lambda$ *Eco/Hind*. As amostras foram analisadas em duplicata. A disposição das amostras no gel é de vetores intactos seguidos de vetores digeridos.



**Figura 30.** Teste de atividade de  $\beta$ -galactosidade em placa. Clones em azul são o controle positivo (*S. cerevisiae* transformada com o vetor pFAPXPGK). A placa da esquerda mostra clones de *P. pastoris* crescidos em YPD + X-gal. A placa da direita mostra clones de *P. pastoris* crescidos em YPD nos quais foi adicionado X-gal 4% sobre as colônias.



**Figura 31.** Teste de atividade de  $\beta$ -galactosidase em papel de filtro. Após a transferência das colônias para o papel de filtro, o mesmo foi embebido em Tampão Z e X-gal. As manchas azuis correspondem ao controle positivo.

---

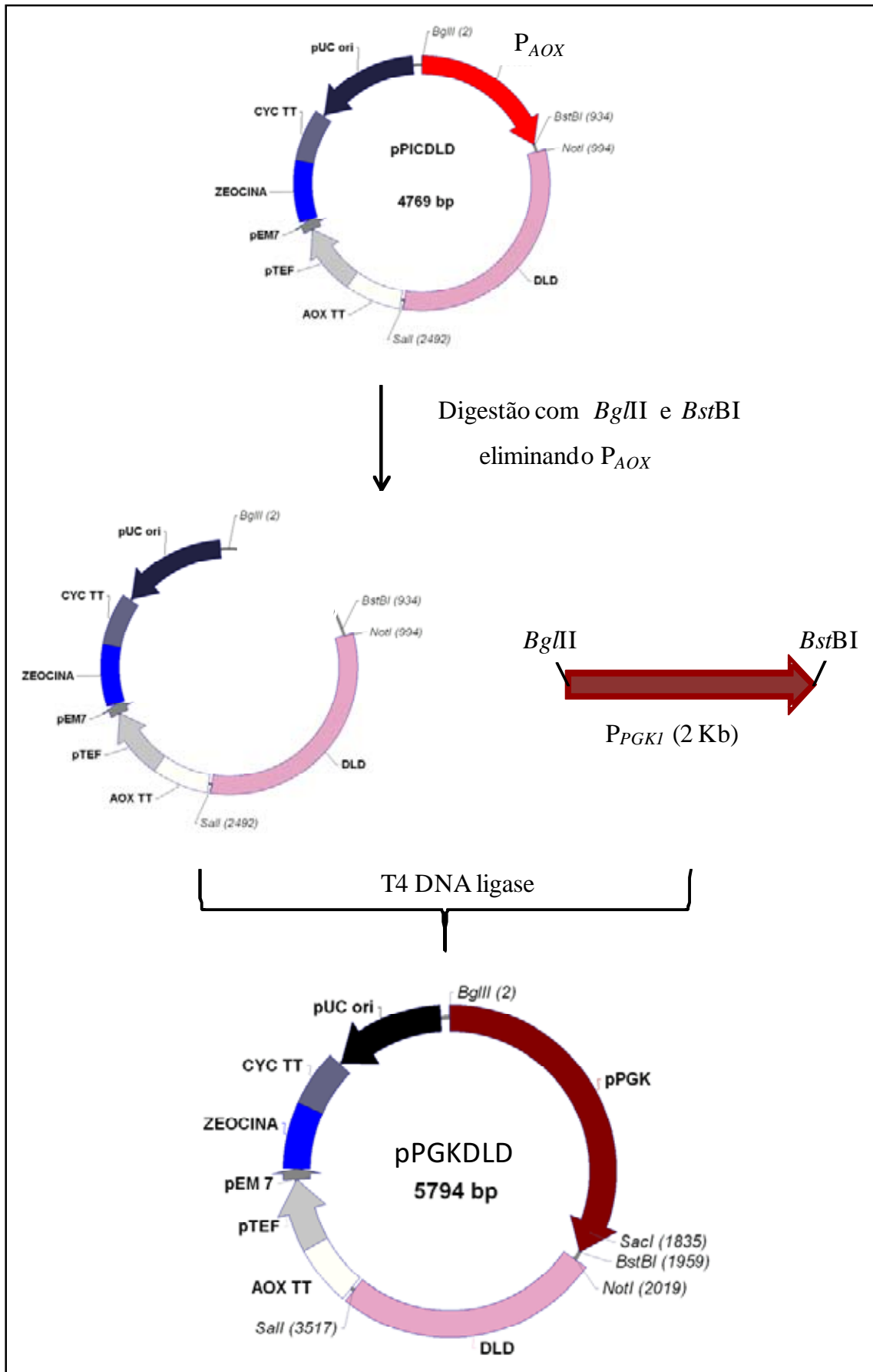
### 5.3. Construção dos vetores para expressão intracelular de D-lactato desidrogenase

Uma vez que não fora possível analisar a expressão intracelular com o gene *lacZ*, decidimos clonar um outro gene, *DLD3*, cujo produto, a D-lactato desidrogenase, é uma enzima reconhecidamente intracelular, como a  $\beta$ -glicosidase. Para esta construção foi utilizado o vetor pPICDLD construído em nosso laboratório por Viviane Castelo Branco Reis. Este vetor possui o gene *DLD3* de *S. cerevisiae* clonado no vetor pPICZA de *P. pastoris* sob o controle do promotor AOX. Este promotor foi substituído pelo promotor  $P_{PGKI}$  após digestão com as enzimas *Bgl*III e *Bst*BI, como descrito anteriormente. Após análise de restrição, um clone foi selecionado sendo chamado pPGKDLDD (Figura 34). Também foi construído um controle negativo para utilização nos testes de expressão intracelular com a substituição do promotor AOX do vetor comercial pPICZA pelo promotor  $P_{PGKI}$ . A estratégia para a construção destes dois vetores pode ser visualizada nas figuras 32 e 33 respectivamente.

O vetor pPGKDLDD foi linearizado com a enzima de restrição *Sac*I e utilizado para transformar *P. pastoris* X-33. Foram obtidos cerca de 70 clones e 12 destes foram selecionados para expressão em meio líquido para detecção da enzima D-lactato desidrogenase. Para tal, foi realizado o crescimento de alguns transformantes em 2 mL de YPD e os *pellets* foram analisados em SDS-PAGE (dados não mostrados) mas não foram observadas banda de expressão (~55 KDa) mesmo após 72 h de cultivo. Foi então realizado um PCR de colônia como *s primers* DLD3 e DLD5 (Tabela 5) para verificar se houve integração do gene *DLD3* no genoma de *P. pastoris*. Em todos os clones testados foi possível obter um amplicon consistente com o tamanho do gene *DLD3* (1491 pb)( Figura 35).

Como os clones transformantes foram resistentes a zeocina e houve amplificação do gene integrado, é bem provável que tenha havido integração do gene *DLD3*, mas não foi possível detectar a proteína com os métodos utilizados.





**Figura 32.** Estratégia de construção do vetor pPGKDL D

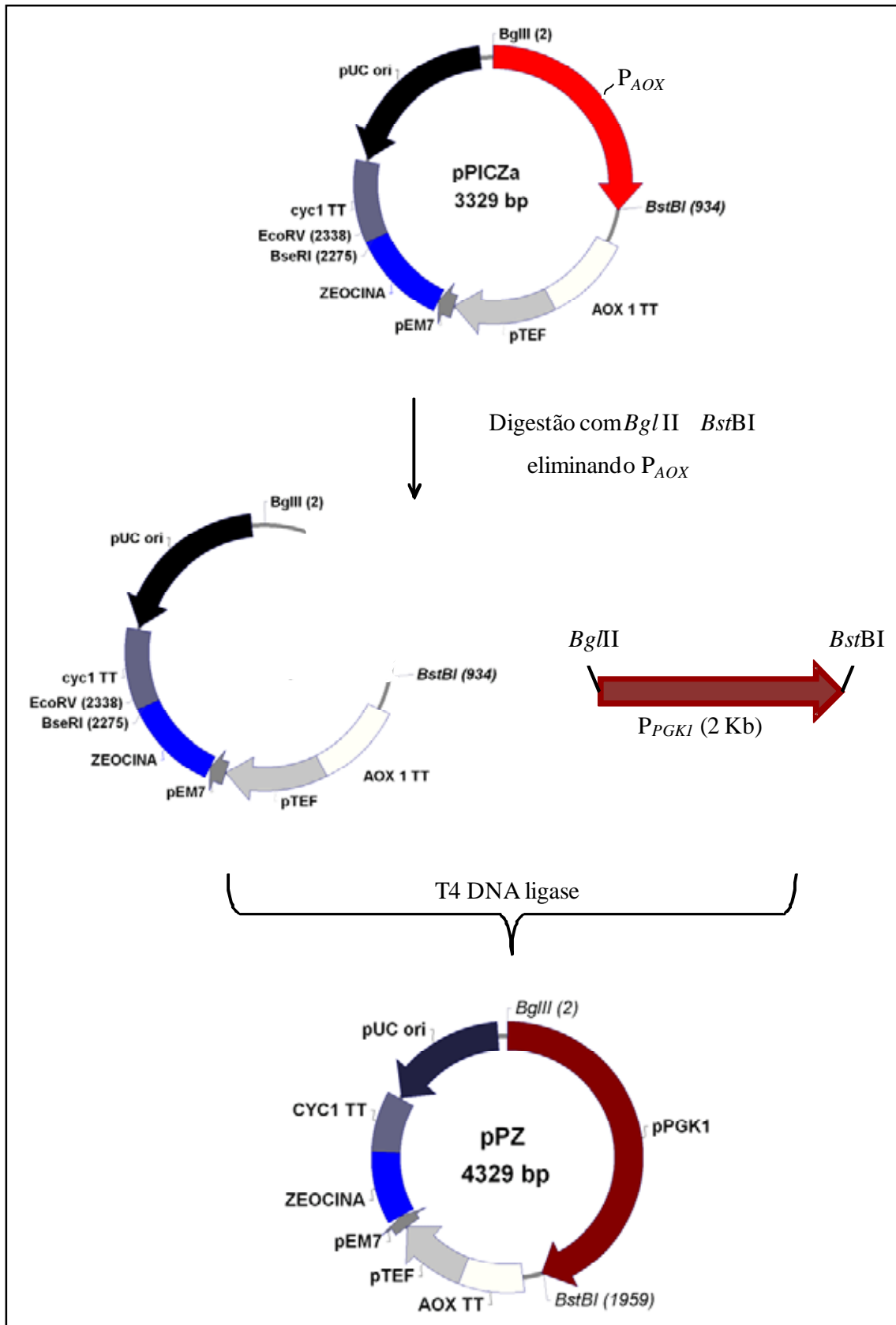
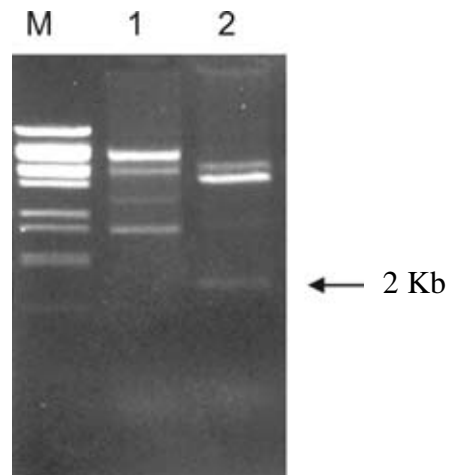
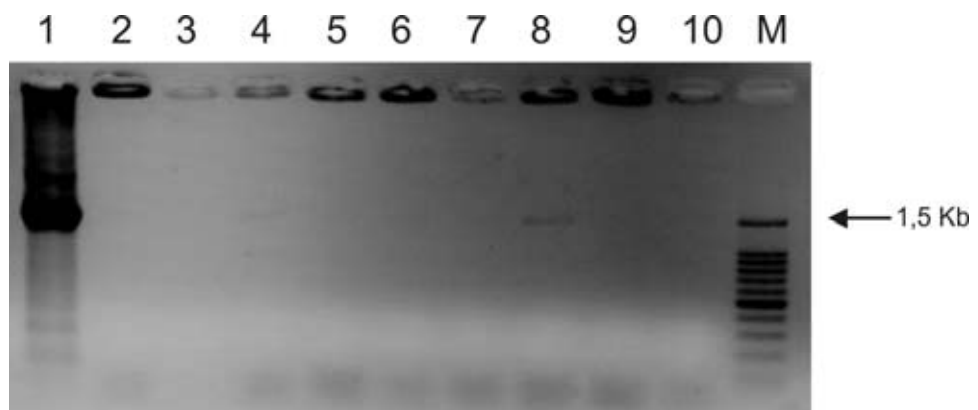


Figura 33. Estratégia de construção do vetor pPZ



**Figura 34.** Foto de gel de agarose 1 % mostrando a confirmação da clonagem do  $P_{PGKI}$  no vetor pPGKDLD após digestão com *Bgl*II e *Bst*BI para liberação do promotor. M) Marcador  $\lambda$  *Eco*RI/*Hind*III; 1) pPGKDLD intacto; 2) pPGKDLD digerido com *Bgl*II e *Bst*BI. A seta indica a posição do promotor  $P_{PGKI}$ .



**Figura 35.** Foto de PCR de colônia em gel de agarose 1 % avaliando a integração do vetor pPGKDLD no genoma de *Pichia pastoris*. 1) controle positivo; 2-10) amplicons derivados de colônias diferentes; M) 100 pb Ladder (Promega).

---

# Discussão

*A natureza não faz nada em vão.*

Thomas Browne

1605-1682

---

---

## 6. Discussão

O conceito de promotor em eucariotos pode ser entendido como a região na qual estão localizados os sítios para a ligação dos diversos fatores de transcrição necessários para promover eficiente expressão de um determinado gene. Estes fatores direcionados à região promotora podem promover a iniciação da transcrição por interações diretas ou indiretas com as RNA polimerases. Promotores que são constitutivamente expressos, como aqueles que controlam a expressão de “*housekeeping genes*”, possuem elementos nas regiões *upstream* que são reconhecidos por serem ativadores ubíquos, enquanto que promotores que tem sua ativação em condições específicas, possuem elementos ativadores aparentemente específicos para as classes ou famílias de genes a que pertencem (Lewin, 2004).

Os genes da via glicolítica são conhecidos como altamente expressos e as enzimas codificadas por eles podem corresponder a até 30 a 40% do total de proteínas solúveis da célula (Fraenkel, 1982). Muitos fatores de transcrição são comuns ao grupo dos genes da via glicolítica e são co-regulados por um conjunto de proteínas ativadoras trabalhando em cada UAS (*Upsteam Activation Sequence*), como os motivos de ligação para a proteína Gcr1 (proteína ativadora de genes da via glicolítica) (Henry *et al.*, 1994). Como os genes da via glicolítica são altamente expressos constitutivamente, esta família de genes tem sido amplamente estudada para o isolamento de promotores fortes a fim de construir vetores para expressão heteróloga. Em *P. pastoris*, o promotor glicolítico mais usado é o do gene *GAP* (Invitrogen) que tem sido utilizado com sucesso para a expressão de diversas proteínas como tripsinas (CAFTs) (Macouzet *et al.*, 2005), endoquitinase ech42 (Pérez-Martínez *et al.*, 2007) e endo- $\beta$ -1,4-xilanase (Cao *et al.*, 2007).

Neste trabalho, propusemos investigar a utilização do promotor constitutivo do gene *PGK1* de *P. pastoris* como alternativa ao promotor comercial GAP. Tendo em vista as semelhanças entre os dois sistemas, já que controlam genes pertencentes à mesma família (genes da via glicolítica), é bem provável que as vantagens e experiência adquirida pelo uso do sistema GAP possam também ser aproveitadas e melhoradas na utilização do sistema baseado no promotor PGK.

O promotor P<sub>PGK1</sub>, isolado em nosso laboratório (Almeida *et al.*, 2005), possui um tamanho de ~2 Kb que poderia comprometer o desenvolvimento de novos vetores baseados neste sistema devido ao grande tamanho que o vetor final poderia ter. Neste

---

trabalho procurou-se determinar a região mínima com atividade promotora do  $P_{PGK1}$  por meio de deleções controladas que foram geradas por digestão com enzimas de restrição e por PCR.

O primeiro passo neste estudo, porém, foi testar se as seqüências do promotor PGK poderiam direcionar a integração de um vetor para o *locus PGK1* (região homóloga entre o vetor utilizado e o genoma da levedura) sem afetar a viabilidade da célula, uma vez que o gene *PGK1* em leveduras é vital e, em *P. pastoris*, está presente em apenas uma cópia no genoma (Almeida *et al.*, 2005). Quando o promotor PGK de *P. pastoris* foi testado pela primeira vez (Almeida *et al.*, 2005), a integração foi direcionada para o *locus AOX1* já que havia a preocupação de que a integração do vetor no *locus PGK1* pudesse afetar a viabilidade celular.

Para testar a integração mediada pelo promotor PGK foi utilizado o vetor de expressão pPZ $\alpha$ AMY que contém a região promotora PGK original de 2 Kb ( $P_{PGK1}$ ), identificada por Almeida *et al.* (2005) clonada *upstream* do gene repórter AMY, que codifica a  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis*. Este gene já fora utilizado com sucesso como gene repórter em *P. pastoris* quando expresso sob o controle do promotor AOX (Amaral, 2003).

A integração do vetor pPZ $\alpha$ AMY pôde ser confirmada por meio de teste enzimático em placa para  $\alpha$ -amilase já que *P. pastoris* não possui atividade amilolítica endógena. A hipótese a ser testada era de a linearização do vetor com as enzimas de restrição *KpnI* e *SacI*, que clivam uma única vez dentro da seqüência promotora PGK, poderiam favorecer a integração por recombinação homóloga na região 5' do *locus PGK1* no genoma. A clivagem em um único sítio de restrição favorece a integração homóloga por inserção de todo o vetor que pode estar em cópia única ou em múltiplas cópias dependendo de quantos eventos ocorrerem. Este padrão de integração é observado com os vetores da série pGAP (Invitrogen) cuja integração é direcionada para o *locus GAP* no genoma de *P. pastoris* (Figuras 36 e 37).

Os clones resultantes da transformação do vetor pPZ $\alpha$ AMY clivado com a enzima *KpnI* foram abundantes (mais de 100) e todos apresentaram atividade amilolítica (Figura 3A). Já os clones oriundos da transformação do vetor pPZ $\alpha$ AMY clivados com a enzima *SacI* foram menos abundantes (11) sendo que 72 % apresentaram atividade amilolítica (Figura 3B). Em trabalho recente em nosso laboratório, o gene da pró-quimosina bovina foi clonado no vetor pPZ $\alpha$ AMY no lugar do gene AMY e a integração foi obtida após linearização do vetor com *KpnI* (Araújo, 2008). Análises por

---

---

*Southern Blotting* confirmaram que o gene da pró-quimosina havia se integrado no *locus PGK1*. É bem provável que, no caso do vetor pPZ $\alpha$ AMY linearizado com *KpnI* ou *SacI*, o mesmo também tenha ocorrido já que as únicas seqüências do vetor com homologia com o genoma de *P. pastoris* são aquelas do promotor P<sub>PGK1</sub>.

No vetor pPGK $\Delta$ 1AMY foram retirados 1021 pb da porção 5' da região promotora PGK, restando ~980 pb para dirigir a expressão do gene repórter. Nesta construção, o promotor resultante (P<sub>PGK $\Delta$ 1</sub>) possui a maior parte dos elementos regulatórios *cis* identificados por Almeida *et al.* (2005). O vetor foi linearizado com a enzima *SacI* para dirigir a integração para o *locus PGK1*. Foram obtidos apenas 8 clones transformantes, sendo 50 % com atividade amilolítica. Clones resistentes a zeocina podem ter o cassete de expressão integrado, mas eventos de conversão gênica, que são comuns em *S. cerevisiae*, podem favorecer a perda de seqüências que não são necessárias para a manutenção do microrganismo (Bethke & Golin, 1994).

O vetor pPGK $\Delta$ 2AMY possui um promotor com cerca de 730 pb (P<sub>PGK $\Delta$ 2</sub>) e a transformação de *P. pastoris* com este plasmídeo resultou em apenas 9 clones, sendo que todos mostraram expressão da enzima (Figura 8). Esta construção não foi analisada em maiores detalhes neste trabalho por apresentar um tamanho semelhante ao promotor P<sub>PGK $\Delta$ 1</sub>.

No vetor pPGK $\Delta$ 3AMY foram retirados aproximadamente 1600 pb do promotor (região entre os sítios *BglIII* e *PvuI*) restando ~400 pb (P<sub>PGK $\Delta$ 3</sub>) para dirigir a expressão da  $\alpha$ -amilase. Com esta deleção foi retirada a seqüência do suposto elemento HSE proposto por Almeida *et al.* (2005) e que se encontra entre as posições -425 e -440 (Anexo 1). Todavia, a remoção deste elemento *cis* não afetou a função promotora nas condições testadas (Figura 11). Em *S. cerevisiae*, a regulação da transcrição do gene *PGK1* é mediada por seqüências UAS. Nestas construções, foram preservadas as seqüências UAS que potencialmente podem ser alvo para a proteína Gcr1 (localizadas entre as regiões -378 e -383) e que são essenciais para alcançar altos níveis de ativação de genes da via glicolítica em *S. cerevisiae* (Baker, 1991; Henry *et al.*, 1994). Para verificar a importância do HSE no contexto do promotor *PGK1* de *P. pastoris* seria importante testar e comparar a atividade da  $\alpha$ -amilase em temperaturas diferentes, 30 e 37 °C, pois este elemento é responsável ao choque térmico. Almeida (2003) analisou o comportamento do promotor P<sub>PGK1</sub> em diferentes temperaturas e notou um discreto aumento de expressão do gene repórter (AMY) em placas cultivadas a 37 °C.

---

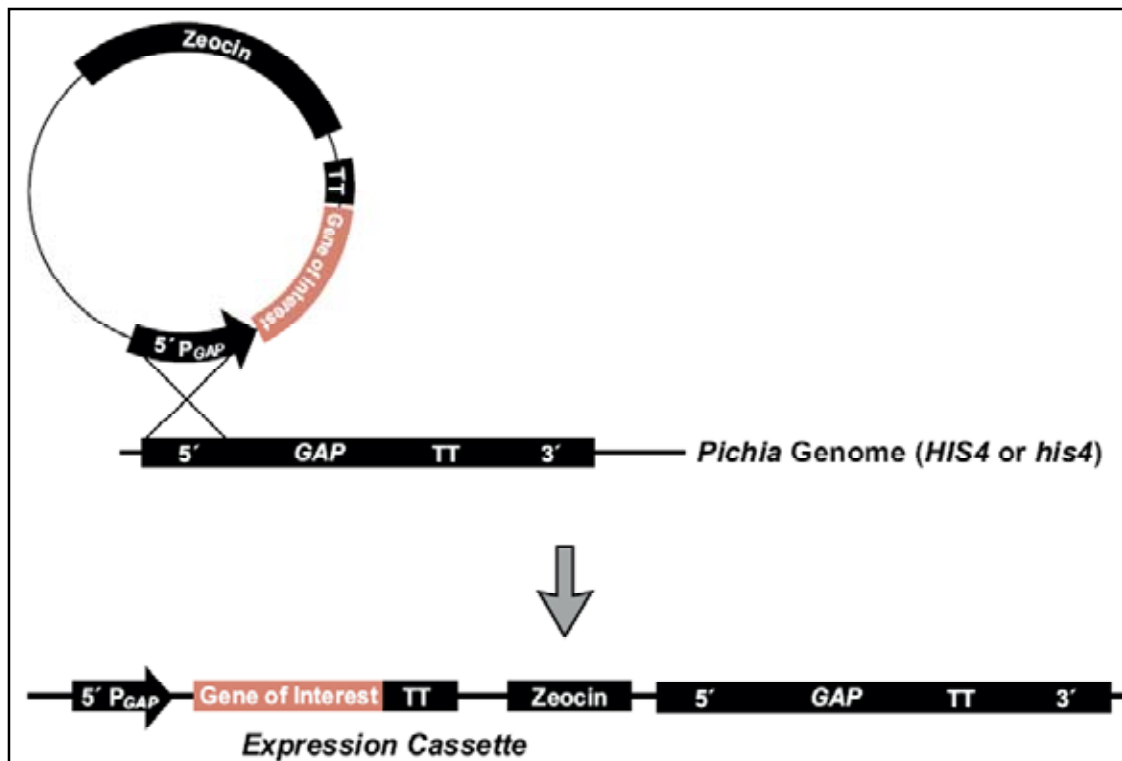


Figura 36. Representação de integração com única cópia no *locus GAP*

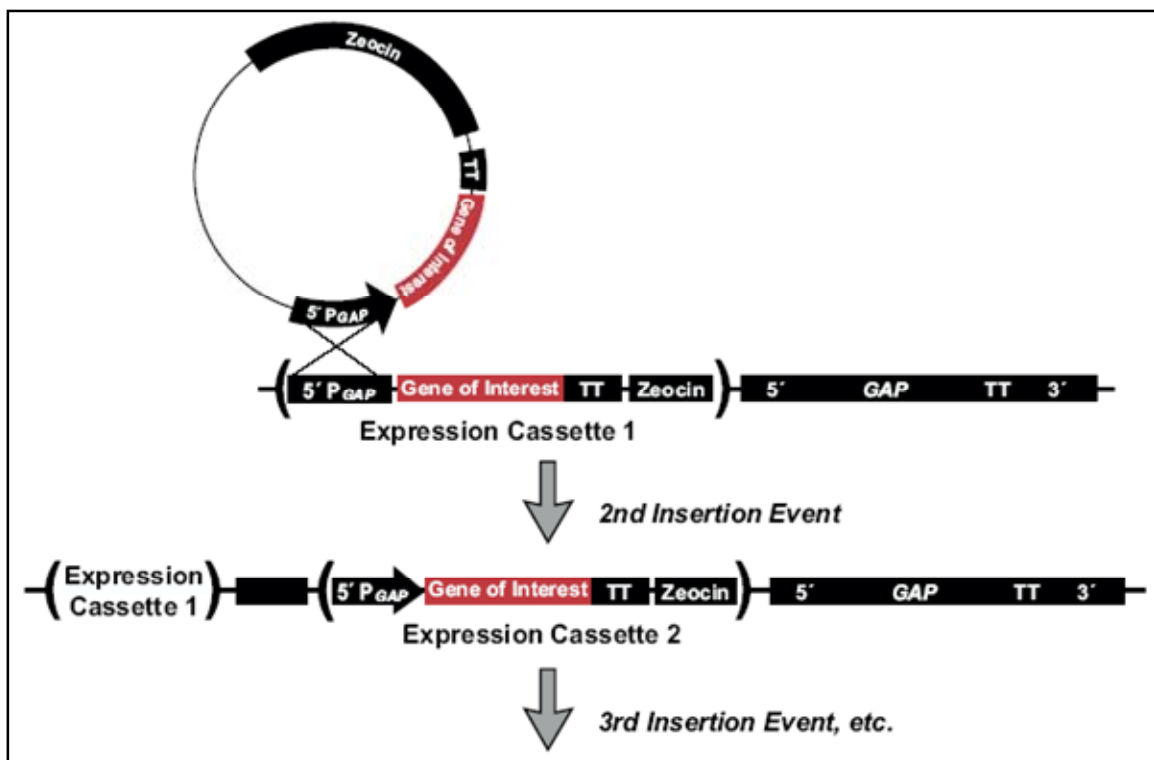


Figura 37. Representação de integração com múltiplas inserções no *locus GAP*.



Da transformação realizada com o vetor pPGK $\Delta$ 3AMY foram obtidos 39 clones sendo que a 95 % apresentaram atividade amilolítica (Figura 11). Nesta transformação pode-se observar diferentes tamanhos dos halos de hidrólise o que sugere diferenças na quantidade de proteína expressa. Isto pode ser devido a um número diferente de cópias integradas no genoma ou a um efeito de posição. A maioria dos clones apresentou grandes halos de hidrólise com apenas 20 horas de crescimento. Níveis de expressão podem ser aumentados drasticamente pelo uso de clones contendo múltiplas cópias integradas de um dado gene (Clare *et al.*, 1991).

No teste enzimático em placa utilizando clones aleatórios de cada construção – pPZ $\alpha$ AMY pPGK $\Delta$ 1AMY, pPGK $\Delta$ 3AMY e o controle negativo, pPZ $\alpha$  – pôde-se observar que o clone com o vetor pPGK $\Delta$ 2AMY apresentou uma relação *diâmetro do halo/diâmetro da colônia* maior que os outros clones (Figura 15). Neste caso específico, um maior tamanho no halo de hidrólise pode ser explicado por maiores números de cópias integradas do vetor, ou a deleção controlada do promotor pode ter retirado alguma região repressora ainda desconhecida.

Para uma comparação mais refinada foi realizado crescimento celular em meio líquido de cada um dos quatro clones e a atividade amilolítica foi medida pelo teste de Fuwa. No teste de atividade enzimática em meio líquido a atividade do clone pPGK $\Delta$ 3AMY foi quatro vezes maior que a atividade dos clones pPZ $\alpha$ AMY e pPGK $\Delta$ 1AMY (Figuras 17, 18 ,19 e 20) confirmando os dados obtidos em ensaios em placa. O crescimento celular foi muito semelhante entre os clones, o sugere que a integração de um gene heterólogo no *locus PGK1* aparentemente não causa efeitos deletérios à célula.

A atividade de  $\alpha$ -amilase obtida a partir do promotor P<sub>PGK $\Delta$ 3</sub> chegou a 250 U/mL, enquanto que o mesmo gene, quando expresso em *S. cerevisiae* a partir do promotor PGK endógeno, só atingiu 48 U/mL (Moraes *et al.*, 1995). Em outro estudo no qual o gene da  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis* foi expresso em *E. coli* sob o controle do promotor P<sub>LAC</sub> foi obtida atividade de 1,2 U /mL (Marco *et al.*, 1996). A análise dos sobrenadantes das culturas de *P. pastoris* revelou uma banda correspondente a uma massa molecular aparente de ~60 KDa que só é visível nos clones que expressavam  $\alpha$ -amilase. O tamanho desta espécie protéica é um pouco maior que a massa molecular teórica da  $\alpha$ -amilase de *B. subtilis* (~54 KDa) mas é provável que a proteína tenha sofrido glicosilação, um evento pós-traducional que comumente ocorre em proteínas secretadas

---

por fungo. Para confirmação de que esta banda de ~60 KDa é de fato uma  $\alpha$ -amilase glicosilada é necessária a realização de zimograma, seguindo um teste de deglicosilação com PNGase F. Se a banda de ~60 KDa for, de fato,  $\alpha$ -amilase, a sua intensidade nos diferentes géis é consistente com o fato de que o clone pPGK $\Delta$ 3AMY está super-expressando esta enzima pois a banda é mais intensa nos sobrenadantes desta cultura.

A forte atividade enzimática apresentada pelo clone pPGK $\Delta$ 3AMY despertou o interesse em se investigar se este clone possuía múltiplas cópias integradas do gene AMY no genoma. Para verificar o número de cópias dos 4 clones submetidos a indução foi realizado um teste em placa para avaliar a resistência a zeocina. Vassileva *et al.* (2001a) observaram que a habilidade de clones transformantes em tolerar um aumento na concentração de zeocina tem correlação direta com o aumento do número de cópias presentes na célula. Verificou, ainda, que cada cópia do cassete de expressão contribuiu igualmente para os níveis globais da proteína expressa. Vassileva *et al.* (2001a) conclui que clones que crescem somente na concentração de 100  $\mu$ g/mL de zeocina possuem apenas uma cópia integrada. Clones que crescem em concentrações de 500, 1000 e 2000  $\mu$ g/mL possuem 2, 3 e 4 cópias integradas do gene *Sh ble* integradas no genoma, fato este que foi confirmado por análises quantitativas de *Southern Blotting*. No nosso estudo, utilizamos somente duas concentrações de zeocina, 100 e 500  $\mu$ g/mL, e foi possível avaliar que o vetor pPGK $\Delta$ 3AMY possui um número maior de cópias que os clones pPZ $\alpha$ AMY e pPGK $\Delta$ 1AMY e que deve possuir mais de uma cópia integrada do gene AMY. Para verificar se há um maior número de cópias integradas é necessário realizar o teste com maiores concentrações de zeocina ou, ainda, realizar um *Southern Blot* ou um *Real Time PCR*.

Dentre as 4 construções de promotor estudadas neste trabalho, P<sub>PGK1</sub>, P<sub>PGK $\Delta$ 1</sub>, P<sub>PGK $\Delta$ 2</sub>, e P<sub>PGK $\Delta$ 3</sub>, a última se mostrou a mais promissora para ser usada no desenvolvimento de vetores para expressão constitutiva em *P. pastoris*. O vetor pPGK $\Delta$ 3AMY foi o segundo em número de clones transformantes resistentes a zeocina (39) com 95 % destes expressando a enzima. Esta característica é importante, pois reduz o número de clones que devem ser analisados para o *screening* de expressão. O tamanho reduzido do promotor P<sub>PGK $\Delta$ 3</sub> (~400 pb) é bem perto do tamanho do promotor comercial GAP (~500 pb) e oferece a vantagem de reduzir o tamanho final do vetor de expressão. Deve-se também destacar a característica apresentada pelo vetor pPGK $\Delta$ 3AMY de gerar transformantes com múltiplas cópias do vetor. Quando vários transformantes desta construção foram analisados em placas com diferentes concentrações de zeocina, foi

---

observado que apenas 4 % dos clones testados tinham uma única cópia e ainda mantinham atividade amilásica enquanto 51 % apresentaram mais de uma cópia integrada (Tabela 7). Como eventos de integrações múltipla cópia ocorrem espontaneamente com baixas frequências (1-10 %) (Vassileva *et al.*, 2001a), ainda não está bem claro a razão pela qual o vetor pPGK $\Delta$ 3AMY tenha demonstrado uma alta eficiência de integração no genoma de *P. pastoris*.

Outro objetivo deste trabalho foi o de investigar o uso do promotor PGK para expressão intracelular em *P. pastoris*, pois em alguns casos em que proteínas podem não ser secretadas facilmente ou, ainda não ser recomendável que ela seja glicosilada (por exemplo, proteínas heterólogas utilizadas como biofármaco) é desejável realizar a expressão intracelular, levando em consideração que varias proteínas secretadas são glicosiladas.

Para estudar a expressão intracelular, usamos o gene *lacZ* ( $\beta$ -glicosidase) de *E. coli* como gene repórter. O sistema *lacZ* é largamente utilizado em leveduras e em outros sistemas para análise de promotores pois permite fácil detecção (coloração azul) e quantificação da atividade enzimática intracelular. A detecção de atividade de  $\beta$ -galactosidase em *P. pastoris* já foi realizada por meio de permeabilização da parede celular com SDS e clorofórmio (Rezaee, 2003).

Na construção de clones para expressão intracelular expressando *lacZ* houve pelo menos 50 clones transformantes para cada construção, que cresceram em zeocina, mas em nenhum deles foi detectada atividade enzimática com as diferentes metodologias adotadas (Figuras 30 e 31). É possível que durante a PCR para amplificar o gene *lacZ*, um gene relativamente grande (~3 Kb), tenha ocorrido alguma mutação deletéria que possa ter afetado a atividade enzimática. Outra hipótese é que o gene pode ter sido fracamente expresso, mas os métodos para detecção podem não ter sido adequados. Para testar esta última hipótese, pode-se realizar um teste mais sensível de atividade enzimática com o substrato ONPG, o mais utilizado para detecção de atividade  $\beta$ -galactosidásica em meio líquido. Porém, os testes em placa que são mais simples e rápidos, foram eficientes para detectar a expressão de *lacZ* em *S. cerevisiae* e *Histoplasma capsulatum*. Duas diferentes metodologias para detecção da expressão de  $\beta$ -galactosidase em placa foram bem sucedidas com *Histoplasma capsulatum*: a adição direta de X-gal por sobre a colônia da levedura, e crescimento da levedura em meio YPD ágar contendo X-gal, como realizado rotineiramente em bactéria (Woods *et al.*,

---

---

1998). As duas metodologias foram testadas neste trabalho, mas somente foi possível detectar atividade no controle positivo (*S. cerevisiae*).

A transformação das construções para expressão intracelular foi precedida da digestão dos vetores com *Xba*I (ver Anexo 1) já que o gene *lacZ* possui sítios para *Kpn*I e *Sac*I. Não foi possível determinar se o uso deste sítio para linearizar o vetor poderia comprometer a integração no *locus PGK1* já que o vetor pPZ $\alpha$ AMY possui 2 sítios para esta enzima. Contudo, esta hipótese não pode ser descartada apesar de o sítio de *Xba*I estar bem próximo do sítio para *Sac*I (Anexo 1) que já fora usado para direcionar a integração dos vetores de secreção baseados no promotor PGK.

Também foi testada a expressão intracelular da enzima D-lactato desidrogenase (LDH), codificada pelo gene *DLD3* de *S. cerevisiae*, também sem sucesso. Em gel SDS-PAGE não foi observada nenhuma banda adicional que não estivesse presente no controle negativo. Várias explicações são possíveis: o gene pode não estar sendo expresso, a proteína intracelular pode não estar sendo liberada com a tentativa de lise celular, ou ainda a proteína está sendo expressa em níveis muito baixos que não puderam ser detectados.

Os ensaios de expressão foram feitos em apenas 2 mL de cultura. A expressão de volumes maiores de cultura poderia favorecer a visualização de bandas protéicas correspondentes à LDH em géis SDS-PAGE. Alternativamente, ensaios mais sensíveis, como *Western blot* poderiam facilitar a detecção do produto gênico.

Para investigar se a integração do gene *DLD3* havia ocorrido, foi feita uma PCR de colônia com *primers* específicos e que resultou em uma banda do tamanho esperado nos 9 clones analisados (Figura 35). Todavia, a presença do gene integrado não necessariamente implica na expressão do mesmo. Vassileva *et al.* (2001a) também utilizaram PCR de colônia para selecionar clones positivos. Por algum motivo que não foi determinado, a proteína não foi detectada.

Neste estudo, apesar de não termos tido sucesso com a expressão intracelular a partir do promotor PGK, os resultados da expressão/secreção de  $\alpha$ -amilase dirigida por várias construções promotoras são animadores e devem levar ao desenvolvimento de novos vetores para expressão constitutiva em *P. pastoris*.

---

# Conclusão

*A vida só pode ser  
compreendida olhando  
para trás; mas só pode ser  
vivida olhando para frente.*

Soren Kierkegaard

1813-1855

---

## 7. Conclusão

Neste trabalho, foi demonstrado que as seqüências do promotor PGK de *P. pastoris* podem ser usadas para dirigir a integração de um cassete de expressão após digestão com enzimas de restrição *KpnI* ou *SacI*.

O menor fragmento de DNA do promotor PGK identificado neste trabalho, que manteve atividade promotora, possui ~400 pb ( $P_{PGK\Delta 3}$ ). Em 51 % dos clones transformados com o vetor de expressão pPGK $\Delta$ 3AMY (que possui o promotor  $P_{PGK\Delta 3}$  dirigindo a expressão de  $\alpha$ -amilase) foram obtidos mais de uma cópia integrada do cassete de expressão conforme teste de resistência a zeocina.

Foram construídos vetores para expressão intracelular com diferentes tamanhos do promotor PGK utilizando o gene *lacZ* como repórter, mas não foi detectada a expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase nestes sistemas. Da mesma forma, não foi possível verificar a expressão do gene *DLD3* (D-Lactato desidrogenase) em sistema de expressão intracelular sob o controle do promotor PGK.

Em seu conjunto, os resultados obtidos neste trabalho mostram o potencial que o promotor PGK de *P. pastoris* pode representar para a produção em grande escala de  $\alpha$ -amilase assim como de outras enzimas industriais.

---

# Perspectivas

*Descansar em demasia é oxidar-se.*

Sir Walter Scott

1771-1832

---

## 8. Perspectivas

A partir do promotor  $P_{PGK\Delta 3}$  um novo vetor de expressão deverá ser construído. Trabalho em andamento deverá resultar na clonagem de um novo *polylinker* no vetor pPGK $\Delta$ 3AMY e de uma nova região sinalizadora de secreção ( região pré-pró do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*) com códons otimizados preferenciais de *P. pastoris*. Este novo vetor deverá ser objeto de patenteamento.

Também se propõe utilizar os diferentes vetores construídos neste trabalho e que foram integrados em apenas 1 cópia no genoma para avaliar se há diferenças na expressão da enzima  $\alpha$ -amilase com a redução do tamanho do promotor.

O promotor  $P_{PGK\Delta 3}$  deverá ser comparado com os promotores GAP e AOX para avaliar sua força relativa frente a estes outros promotores. Além disto, os sobrenadantes das culturas de *P. pastoris* transformada com o vetor pPGK $\Delta$ 3AMY devem ser analisadas por meio de testes de zimograma a fim de confirmar a identidade da proteína de ~60 KDa observada.



---

# Referências Bibliográficas

*O que sabemos é uma gota, o  
que ignoramos é um oceano.*

Isaac Newton

1642-1727

---

## 9. Referências Bibliográficas

- Almeida, J.R.M. (2003). Isolamento e Caracterização do gene *PGK1* (3-fosfoglicerato quinase) da levedura *Pichia pastoris*: Regulação e uso do seu promotor. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília. 94 pp.
- Almeida, J.R.M.; Moraes, L.M.P.; Torres, F.A.G. (2005). Molecular characterization of the phosphoglycerate kinase (*PGK1*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 22:725-737.
- Araújo, J. A. (2008). Produção de quimosina B de *Bos taurus* em *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília. 135 pp.
- Amaral, F.M.R. (2003). Construção de novos vetores para expressão heteróloga na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 138 pp.
- Baker, H.V. (1991). GCR1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 9443–9447.
- Barr, K.A.; Hopkins, S.A.; Sreekrishna, K. (1992). Protocol for efficient secretion of HAS developed from *Pichia pastoris*. *Pharm.eng*, 12: 48-51.
- Beggs, J. D. (1978) Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature*, 275: 104–108.
- Bethke, B. D.; Golin. J. (1994) Long-Tract Mitotic Gene Conversion in Yeast: Evidence for a Triparental Contribution During Spontaneous Recombination. *Genetics*, 137: 439-453

- Cao, Y.; Qiao, J.; Li, Y.; Lu, W. (2007). De novo synthesis, constitutive expression of *Aspergillus sulphureus*  $\beta$ -xylanase gene in *Pichia pastoris* and partial enzymic characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76: 3-12
- Cereghino, G.P.L.; Cregg, J.M. (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 422-427.
- Cereghino, J.L.; Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology – Reviews*, 24: 45-66.
- Cereghino, G.P.L.; Godfrey, L.; De La Cruz, B.; Johnson, S.; Khuongsathiene, S.; Tolstorukov, I.; Yan, M.; Cereghino, J.L.; Veenhuis, M.; Subramani, S.; Cregg, J.M. (2006). Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Molecular Cellular Biology*, 26(3): 883–897.
- Clare, J.J.; Romanos, M.A.; Rayment, F.B.; Rowedder, J.E.; Smit, M.A.; Payne, M.M.; Sreekrishna, K.; Henwood, C.A. (1991). Production of mouse epidermal factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 205-212.
- Colao, M.C.; Lupino, S.; Garzillo, A.M.; Buonocores, V.; Ruzzi, M. (2006). Heterologous expression of lcc1 gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial Cell Factories*, 5(31): 1-11
- Couderc, R.; Baratti, J. (1980). Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agricultural and biological chemistry*, 44: 2279-2289.
- Cregg, J.M.; Shens, S.; Johnson, M.; Waterham, H.R. (1998). Classical genetic manipulation. *Methods in Molecular Biology*, 103: 17-26.
- Cregg, J.M.; Vedvick, T.S.; Raschke, W.C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 11: 905-910.
-

- Cregg, J.M.; Cereghino, J.L.; Shi, J.; Higgins, D.R. (2000). Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16: 1-23
- Dall, M.T.L.; Nicaud, J.M.; Treton, B.Y.; Gaillardin, C.M. (1996). The 3-phosphoglycerate kinase gene of the yeast *Yarrowa lipolytica* de-represses on gluconeogenic substrates. *Current Genetics*, 29: 446-456.
- Daly, R.; Hearn, T. W. (2004). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular Recognition*, 18: 119-138
- Deminoff, S.J.; Santangelo, G.M. (2001). Rap1p requires Gcr1p and Gcr2p homodimers to activate ribosomal protein and glycolytic genes, respectively. *Genetics*, 158: 133-143.
- Fraenkel, D.G. (1982). Carbohydrate metabolism. *In: The molecular Biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, Strathern Jn, Jones E.W.(eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Harbor, NY; 1-37.
- Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *Journal of Biochemistry*, 4: 583-603.
- Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, S. G. Oliver. (1996): Life with 6000 Genes. *Science*, 274 (5287): 546-567.
- Gould, S.J.; McCollum, D.; Spong, A.P.; Heyman, J.A.; Subramani, S. (1992). Development of the yeast *Pichia pastoris* as a model organism for a genetic and molecular analysis of peroxisome assembly. *Yeast*, 8: 613-628.

- Grange, D.C.; Petronius, I.S.; Van Zyl, W.H. (1996). Expression of a *Trichoderma reesei* xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 1036-1044.
- Grinna, L.S.; Tschopp J.F. (1989). Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*, 5: 107-115.
- Guarente, L.; Mason, T. (1983). Heme regulates transcription of the CYC1 gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell*, 32: 1279-1286.
- Gurkan, C.; Ellar, D.J. (2005). Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 4(33): 1-8.
- Henry, Y. A. L.; López, M. C.; Gibbs, J. M.; Chambers, A.; Kingsman, S. M.; Baker H. V.; Sanway, C.A. (1994). The yeast protein Gcr1p binds to the *PGK UAS* and contributes to the activation of transcription of the *PGK* gene. *Mol. Gen. Genet*, 245: 506-511.
- Higgins, R.H.; Busser, K.; Comiskey, J.; Whittier, P.S.; Purcell, T.J.; Hoeffler, P.J. 1998. Small Vectors for Expression Based on Dominant Drug Resistance With Direct Multicopy Selection. In: Higgins, D.R. e Cregg, J.M. (eds.) (1998). *Pichia protocols*, n° 103. Series: *Methods in molecular biology*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Higgins, R.H.; Cregg, J.M. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. In: Higgins, D.R. e Cregg, J.M. (eds.) (1998). *Pichia protocols*, n° 103. Series: *Methods in molecular biology*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Holland, M.J.; Holland, J.P. (1978). Isolation and characterization of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, 17: 4900-4907.

- Hong, I.; Stephen, A.; Shin, G.C. (2006). Evaluation of a New Episomal Vector based on the GAP Promoter for Structural Genomics in *Pichia pastoris*. *Journal Microbiology Biotechnology*, 16(9): 1362-1368.
- Innis, M.A. (1989). Glycosylation of heterologous protein in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Barr, P.J.; Braske, A.J. e Valenzuela, P. (Eds). (1989). *Yeast Genetic Engineering*. Butterworths: Boston. 233-246 pp.
- Kingsman, S.M.; Kingsman, A.J.; Dobson, M.J.; Roberts, N.A. (1985). Heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 3: 377- 416.
- Kingsman, S.M.; Kingsman, A.J. (1988). *Genetic engineering*. Oxford: Blackwell Scientific Publication.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lewin, B. (2004). *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall. Londres.
- Lueking, A.; Holtz, C.; Gotthold, C.; Lehrach, H.; Cahill, D. (2000). A system for dual protein expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif*, 20(3): 372-378.
- Lueking, A.; Horn, S.; Lehrach, H.; Cahill, D. (2003). A dual-expression vector allowing expression in *E. coli* and *P. pastoris*, including new modifications. *Methods in Molecular Biology*. 205: 31-42.
- Macauley-Patrick, S.; Fazenda, M.L.; McNeil, B.; Harvey, L.M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22: 249-270.
- Maranhão, A.Q.; Moraes, L.M.P. (2003). Extração e purificação de DNA. In: Azevedo, M.O.; Felipe, M.S.S.; Brígido, M.M.; Maranhão, A.Q. e De-Souza, M.T. (Orgs.).
-

2003. *Técnicas Básicas em Biologia molecular*. Brasília: Editora Universidade de Brasília. 49-72 pp.

Marco, J. L.; Bataus, L. A.; Valencia, F. F.; Ullhoa, C. J.; Astolfi-Filho, S.; Felix, C. R. (1996). Purification and characterization of a truncated *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amilase produced by *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotchnology*, 44: 746-752.

Masuda, Y.; Patk, S.M.; Ohkuma, M.; Ohta, A.; Takagi, M. (1994). Expression of an endogenous and a heterologous gene in *Candida maltosa* by using a promoter of a new-isolated phosphoglycerate kinase (PGK) gene. *Current Genetics*, 25: 412-417.

Macouzet, M.; Benjamin K. S., Byong H. L.(2005) Expression of a cold-adapted fish trypsin in *Pichia pastoris* . *FEMS Yeast Research*, 5(9): 851–857

Moraes, L.M.P.; Astolfi-Filho, S., Oliver, S.O. (1995). Development of yeast strains for the efficient utilization of starch: evaluation of constructs that express  $\alpha$ -amylase and glucoamylase separately or a functional fusion protein. *Applied Microbiology Biotechnology*, 43: 1067–1076.

Pérez-Martínez, AS; De León-Rodríguez, A.; Harris, L.J., Herrera-Estrella, A, Barba de la Rosa, A.P. (2007) Overexpression, purification and characterization of the *Trichoderma atroviride* endochitinase, Ech42, in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*. 55(1):183-188.

Piper, P.; Curran, B.; Davies, M.; Lockheart, A., Reid, G. (1988). A heat shock element in the phosphoglycerate kinase gene promoter of yeast. *Nucleic Acid Research*, 16: 1333-1348.

Ratner, M. (1989). Protein expression in yeast. *Biotechnology*, 7(11): 1129-1133.

Reis, V. C. B. (2003). *Caracterização da ORF YGR161c da levedura Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília.

- Rezaee, A. (2003). A rapid and sensitive assay of  $\beta$ -galactosidase in yeast cells. *Annals of microbiology*, 53(3): 343-347.
- Romanos, M.A., Scorer, C. A.; Clare, J.J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8: 423-488.
- Romanos, M. (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level expression. *Current opinion Biotechnology*, 6: 527-533.
- Rossanese, O.W.; Soderholm, J.; Bevis, B.J.; Sears, I.B.; O'Connor, J.; Williamson, E.K.; Glick, B.S. Golgi Structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 145(1):69-81.
- Sambrook, J.; Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning – a laboratory manual*. 3<sup>a</sup> edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scorer, C.A.; Buckholz, R.G.; Clare, J.J.; Romanos, M.A. (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelop protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 136: 111-119.
- Scorer, C.A.; Clare, J.J.; McCombie, W.R.; Romanos, M.A.; Sreekrishna, K. (1994). Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression . *Bio/Technology*, 12: 181-184.
- Sears, I.B.; O'Connor,J.; Rossanese, O. W.; Glick, B.S. (1998). A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris* *Yeast*,14: 783-790.
- Shen, S.; Sulter, G.; Jeffries, T.W.; Cregg, J.M. (1998). A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 216: 93-102.



- Sreekrishna, K.; Brankamp, R.G; Kropp, D.E; Blankenship, D.T.; Tsay, J.T.; Smith, P.L.; Wierschke, J.D.; Subramaniam, A. e Birkwnberger, L.A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the metylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190: 55-62.
- Takaya, N.; Yanai, K.; Horiuchi, H.; Ohta, A.; Takagi, M. (1994). Cloning and characterization of two 3-phosphoglycerate kinase genes of *Rhizopus niveus* and heterologous gene expression using their promoters. *Current Genetics*, 25: 524-530.
- Torres, F.A.G.; MORAES, L.M.P (2000). Proteínas Recombinantes Produzidas em Leveduras. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 12: 20-22.
- Tuttle, D.L.; Dun,W.A. (1995). Divergent modes of autophagy in the methyloctrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell. Sci*, 108: 25-35.
- Vanhanen, S.; Pentilla, M.; Lehtovaara, P.; Knowles, J. (1989). Isolation and chacarterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (pgk) from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Current Genetics*, 15: 181-186.
- Vanhanen, S.; Saloheimo, A.; Iilmén, M.; Know, J.; Pentilla, M.; (1991). Promoter structure and expression of the 3-phosphoglycerate kinase-encoding gene and characterization of its promoter. *Gene*, 186: 37-44.
- Vassileva, A.; Chugh, D.A.; Swaminathan, S.; Khanna, N. (2001a). Expression of hepatitis B antigen in the methylitrophic yeast *Pichia pastoris* using GAP promoter. *Journal of Biotechnology*, 88: 21-35.
- Vassileva, A.; Chugh, D.A.; Swaminathan, S.; Khanna, N. (2001b). Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression Purof*, 21(1): 71-80.

Waterham, H.R.; Digan, M.E.; Koutz, P.J.; Lair, S.V.; Cregg, J.M. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and characterization of its promoter. *Gene*, 186: 37-44.

Woo, J.H.; Liu, Mathias, A.; Stavrou, S.; Wang, Z.; Thompson, J.; Neville, D.M. jr. (2002). Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T-Cell immunotoxin in *Pichia pastoris*. *Protein Expre Purif*, 25: 270-282.

Woods, J.P.; Heinecke, E.L.; Goldman, W.E. (1998). Electrotransformation and Expression of Bacterial Genes Encoding Hygromycin Phosphotransferase and  $\beta$ -Galactosidase in the Pathogenic Fungus *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity*, 66(4): 1697-1707.

---

# Anexos

---

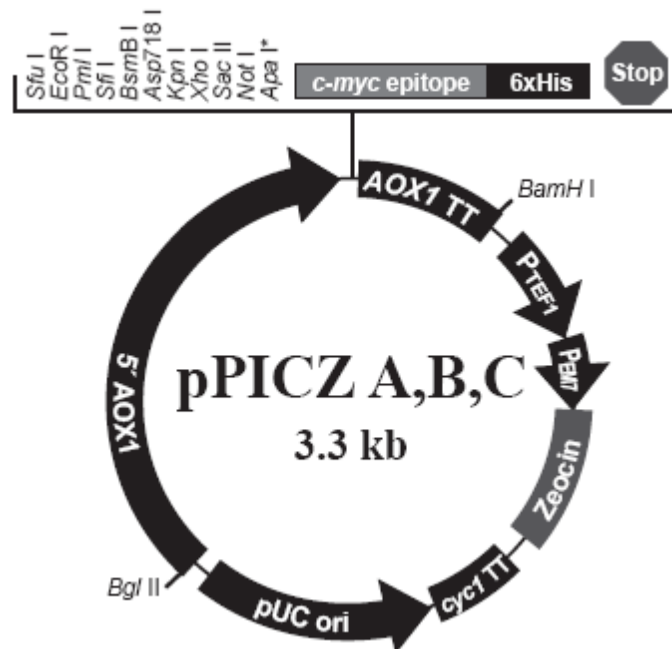
## Anexo 1. Sequência do promotor $P_{PGK1}$

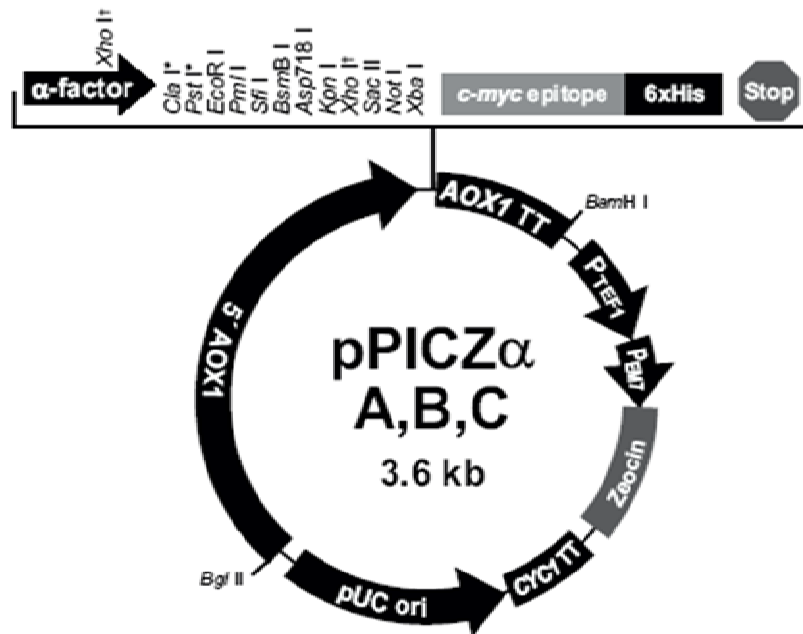
1 AGCGATATGGCACTAGTTGGGTATTCAAATAGTTGACTTTTATCAAAGGGCAAGCGAAGTT  
 61 GAGCTAAGAAAGTGTTTTGAATGAGATATTAACCTGAACCTAAGTGTTTTAAAGGGCAAATTT  
 121 CATATATAATGTACAATACCAACTCCAAATCGAGGTGCTCTCTCGACACCTCTATTATGC  
 181 GGAAGGATACAGCATGTAGACGCAATTTTGAACGCTTGCAGCTATATTTATAAAGAACGCA  
 241 TGCACTGCAGTTGCAGTAGTAAGTGTAAAGGCTCAAACCTAGGAAATTTTAGTACCCGAATG  
 301 GTCTATGTAGGTATATCATATGTCAGGCTGCATTCTCTCGACGACACGCTGGGCAAATGA  
 361 GTAGACGAACTTGACTTGAGCCAAGCCTCACTCTAGGCAGCACAACAGTTGAGTTCAAGT  
 421 TTAGAAGTTTGTAGTAAATATACGTCGAAGGAATTTTCAAGTAAACACATTTTACCCTGATG  
 481 GAATTCAGTTGAAGCACTCCTTGCAGCCCTAGATTTTGTAGTTTGTGGATGCTCTCATC  
**PGK-D4**  
 541 AATCAAATTTGAGGGTGCATGTGGGTGCTTAAAATGGTGCAGATTTACGTCTGACCAGC  
 601 ATGGTAGTCTCAAATACAATCCAAGACACAAGGATGGTGACGTATCAGAATGTGGATTCC  
 661 ATTGCGATTCTATCATATTTTATCTGGTACGTGCCCCGAATAAAACACAAACAATCTTGT  
 721 AGCCTCAAATTTGTAGCTTGTACAGTGAGGTGCATATGCTGCCGTGTACACGGTATGCATT  
 781 CCTCAGATAAGAAATGCTTGGGATTTGAATTTGAATGTGTCTCTACCCCCATCGCTCGAG  
 841 AACAGCCATTCCAGTGGGGAAAGATAGCAACCGCAACCCCTCAGACATTCAGTACGCTG  
 901 CGTTTGTGTATATGTTTGTGTTTCAAGGGGAATGTTTGTATTGTTTGTATTGTTTGTATTG  
**PGK-D5**  
 961 GATATTCGGCAAGATAGAGGTGCATCGATGATCGGCGCATGGCCAAAGTT**GGTACC**CAG  
KpnI  
 1021 CCGATCACGCCTGCTCTGAGTTTGGCTGGAGCAGCAAATCTCATGATAACCGAGGTTTAA  
 1081 ATTAAGGTACATAACAAAAATCAATGTTCAAAGACGCACATACCAAGACTTACTAATCG  
 1141 CAGAATGTTGGTGCAGTATTTGTCTGTAAGCCAAAACCATCGATGTTGACTTCCTAATTCA  
 1201 GTCTTTAAACCGCAAAGGATTTCTGATTTCGACAGATGGCCCTGATCTCCAAACTCAGGCTGG  
 1261 GGCTCTAACTCGAGCAAGTGTCTTATGCTGTAGGCCGACGCCCTTTTGGTTCGACGACGT  
**PGK-D8**  
 1321 GCGTGGTTATGAGACGCTCGGCTGTTTTGCGCTAAGCTGGCCGTATCGAGTAAATTTCTAC  
 1381 AGGCACCTGCGAGGCAAGCATCTACTAATGTTTATTTTTCTGTTCAACCTAATTGTGGTTT  
 1441 CAAAAGCGTATCAGGTGGGGGGTAAAGAGGAATGTGAGTGGAAAGCGAAAATAACTGGCAG  
 1501 CTGGGGTCAGATCCCGTGATGCCACCTCTTGTGGTATTTTGAACGCGTGTTCGATTTGG  
**PGK-D6**  
 1561 CCGCG**AGAACGGAAAGG**AATATATTTACTGCC**CGATCG**CATTTTGGCCCTCAAATAAATCTT  
PvuI  
 1621 GAG**CTTTT**GGACATAGATTATATGTT**CTTTT**TTGGAAGCT**CTTTT**CAGCTAATAGTGAAGT  
 1681 GTTCTCTACTAAGGATCGCTCCAAACGTTCCAACCTACGGGCGGAGGTTGCAAAGAAAAC  
 1741 GGGTCTCTCAGCGAATTGTTCTCATCCATGAGTGAGTCTCTCCGTC**CTTTT**CTCGCGCC  
**PGK-D7**  
 1801 TGGCAATAAAGCCT**CTTTC**GGAG**GAGCTC**CG**TCTAGA**GAATAATTGCTGC**CTTTC**TGACT  
SacI XbaI  
 1861 TTCGGACTAGCGCCAACCGCGAACCACACCACCCATCACTGTCACCCGTCATAGTT  
 1921 CATCCCTCTCTCT**TATAAA**GCATCTAATAGGTTCCACAATTGTTTGGCCACAAAAATCTC  
 1981 TTAGCATAGCCCAATTGATTACGAAA**ATG**

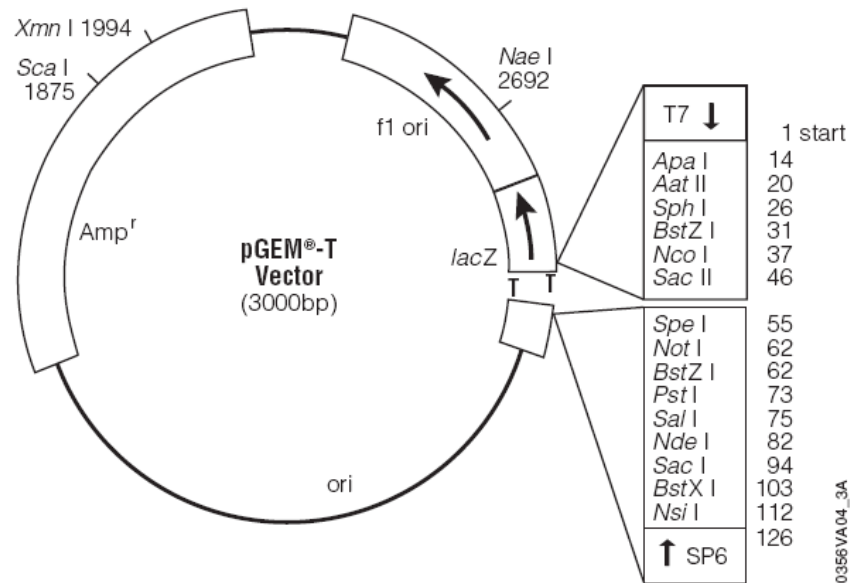
### PGK-RZ

**Anexo 1.** Sequência nucleotídica do promotor  $P_{PGK1}$  de *P. pastoris*. As sequências em preto sublinhadas são os locais de anelamento dos *primers* PGK-D4, PGK-D5, PGK-D6 e PGK-D7 e

PGK-RZ. Os sítios de restrição para as enzimas *KpnI*, *PvuI*, *SacI* e *XbaI* estão indicados em vermelho. Em verde, a seqüência responsiva a *heat shock* e o TATA Box localizados nas posições -425 e -71, respectivamente. Em azul, os possíveis sítios para ligação da proteína Gcr1. O códon de iniciação do gene está em roxo.

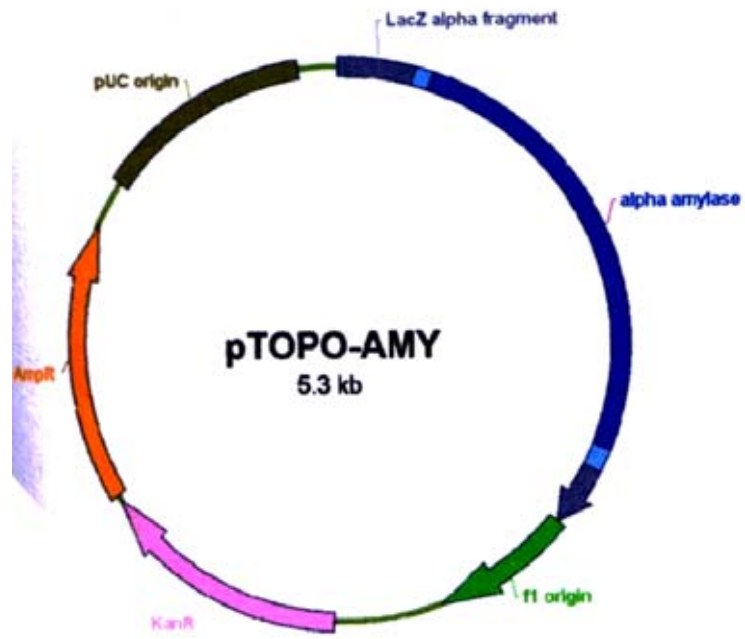
**Anexo 2.** Mapa do vetor pPICZA

**Anexo 3.** Mapa do vetor pPICZ $\alpha$ A

**Anexo 4.** Mapa do vetor pGEM-T



---

**Anexo 5.** Mapa do vetor p-TOPO-AMY

---

**Anexo 6.** Marcadores de DNA utilizados