

LÍVIA TAVARES COLOMBO

**CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE *Kluyveromyces lactis* $\Delta ku80$ HOSPEDEIRAS
PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES: ANÁLISE DA
EXPRESSÃO DA FUSÃO ESTREPTAVIDINA-PECTINA LIASE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C718c
2011
Colombo, Livia Tavares, 1985-
Construção de linhagens de *Kluyveromyces lactis* $\Delta Ku80$
hospedeiras para produção de proteínas recombinantes :
análise da expressão da fusão estreptavidina-pectina liase /
Livia Tavares Colombo
– Viçosa, MG, 2011.
xiv, 50f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Flávia Maria Lopes Passos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 44-50.

1. *Kluyveromyces lactis*. 2. Leveduras (Fungos).
3. Recombinação (Genética). 4. Pectinase. 5. Mutação
(Biologia). I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 576.549

LÍVIA TAVARES COLOMBO

**CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE *Kluyveromyces lactis* $\Delta ku80$ HOSPEDEIRAS
PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES: ANÁLISE DA
EXPRESSÃO DA FUSÃO ESTREPTAVIDINA-PECTINA LIASE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2011

Prof^a Denise Mara Soares Bazzolli
(Coorientadora)

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Coorientadora)

Prof. Wendel Batista da Silveira

Prof^a Juliana Lopes Rangel Fietto

Prof^a Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

*A Deus.
A minha querida Família.
E ao Marcelo.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em quem confio e deposito minha vida. “Quando tudo diz que não, sua voz me encoraja a prosseguir”.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pelo acolhimento e pelas oportunidades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Prof^a Flávia Maria Lopes Passos, pelos valiosos ensinamentos, pela confiança e apoio sempre.

Às minhas co-orientadoras, Prof^a Denise Mara Soares Bazzolli e Prof^a Marisa Vieira de Queiroz, pela dedicação e sugestões imprescindíveis para conclusão deste trabalho.

À Prof^a Juliana Lopes Rangel Fietto, pelo interesse e disposição em participar da minha banca de tese.

Ao meu pai, Robson, que mesmo em meio a fortes “tribulações” me apoiou em tudo e não poupou esforços para que nada me faltasse na minha vida acadêmica.

À minha amada mãe, Eunice, que consegue fazer a distância em quilômetros se tornar inexistente e estar sempre presente. Que me ama e me apóia tanto que é impossível querer desistir.

Aos meus irmãos, Priscila, Victor e Gina Carla, pelo imenso amor, torcida e incentivo.

Ao meu noivo, Marcelo, pelo apoio, carinho, paciência e pela ajuda também. Se hoje concluo esse trabalho, sei que sem seu amor e companheirismo teria sido muito difícil. Você faz parte dessa conquista.

Às minhas amigas, Izadora, Sara e Talita, que acompanharam cada momento me fazendo feliz e motivada, por acreditarem tanto em mim. Obrigada pela força que vocês me deram nesses dois anos.

Às minhas amigas, Thamy e Monalessa, pela convivência e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, por terem tornado as duras jornadas de trabalho em dias divertidos e satisfatórios. Especialmente Lygia, Júlio e Val, obrigada pelas risadas, pelas belas músicas que nunca esquecerei (né Dona Lygia?) e pelos ensinamentos e sugestões para meu trabalho. Rafa, sua alegria e seu carinho são contagiosos. Caio, as brincadeiras, amizade e comentários divertem meu dia.

Aos meus amigos dos Laboratórios de Microbiologia Industrial, Ecologia e Genética.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários do departamento de microbiologia, especialmente Danilo, Sr. Paulo e Nilcéa, pelo carinho e amizade.

Obrigada.

BIOGRAFIA

LIVIA TAVARES COLOMBO, filha de Robson de Souza Colombo e Eunice Tavares da Silva Colombo, nasceu em 13 de fevereiro de 1985 em Manhuaçu – MG. Em 2009, graduou-se no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. No mesmo ano, iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa. Defendeu sua dissertação em fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Micro-organismos e plasmídeos.....	12
3.2. Condições de cultivo e manutenção	14
3.3. Inativação do gene <i>KU80</i> das linhagens de <i>K. lactis</i> JA6 e HP108.....	14
3.3.1. Confirmação das linhagens de <i>K. lactis</i> $\Delta ku80$	17
3.3.2. Análise da estabilidade mitótica das linhagens recombinantes.....	17
3.3.3. Teste de sensibilidade das linhagens mutantes de <i>K. lactis</i> à radiação ultra-violeta.....	18
3.4. Clonagem do gene da pectina liase (<i>plg1</i>) nos vetores pKLAC1 e pKLAC1/cStp18	
3.4.1 Confirmação da clonagem do gene <i>plg1</i> nos plasmídeos pKLAC1 e pKLAC1/cStp.....	19
3.5. Transformação das linhagens de <i>K. lactis</i> selvagens JA6 e HP108 e $\Delta ku80$ com os plasmídeos pKLAC1/Plg1 e pKLAC1/cStp-Plg1.....	20
3.6. Indução da expressão do gene da pectina liase e da fusão <i>core</i> estreptavidina - pectina liase	20
3.7. Análise da expressão da proteína heteróloga.....	21
3.7.1. Obtenção do extrato livre de células.....	21
3.7.2. Determinação da atividade enzimática específica da pectina liase (PL)	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Deleção do gene <i>KU80</i> de linhagens de <i>K. lactis</i> e identificação dos mutantes	22

4.1.1 Estabilidade dos transformantes.....	25
4.1.2 Sensibilidade de <i>K. lactis</i> JA6 Δ KU80 e HP108 Δ KU80 à radiação ultravioleta.....	26
4.2. Clonagem do gene da pectina liase (<i>plg1</i>) nos vetores pKLAC1 e pKLAC1/cStp.....	27
4.2.1 Confirmação da clonagem do gene <i>plg1</i> nos vetores pKLAC1 e pKLAC1/cStp.....	28
4.3. Transformação e eficiência de integração gene-específica das linhagens JA6 e HP108 parentais e $\Delta ku80$ com os vetores pKLAC1/cStp-Plg1 e pKLAC1/Plg1	34
4.4. Análise da expressão do gene <i>plg1</i> e da fusão cStp-Plg1 pela atividade de PL38	
5. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema da via de junção de extremidades não-homólogas no evento de recombinação em eucariotos, especificamente *Sacchromyces cerevisiae* e mamíferos..... 13
- Figura 2: Mapa físico do plasmídeo pKLAC1 (Fonte: New England Biolabs).....7
- Figura 3: Esquema representativo da técnica *Split-Marker*..... 15
- Figura 4: Confirmação dos fragmentos de DNA obtidos pela técnica “*Split-Marker*” utilizando PCR.....23
- Figura 5: Produtos da amplificação do gene *KU80* do DNA genômico de *K. lactis* com oligonucleotídeos externos à região codificante (KU80FT5F2-F e KU80FT5F2-R) e oligonucleotídeos das extremidades da região interna, usados no *Split-Marker* (KU8055FFP1-F e KU8055FRP1-R)..... 25
- Figura 6: Curva de sobrevivência de linhagens de *K. lactis* selvagens JA6 e HP108 e transformantes JA6ΔKU80 e HP108ΔKU80 submetidas à radiação *uv*. 27
- Figura 7: Confirmação da amplificação por PCR do cDNA que corresponde à sequência aberta de leitura do gene da pectina liase, por eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) em tampão TBE 1X..... 28
- Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 0,8 % p/v em tampão TBE 1X da reação de hidrólise dos vetores pKLAC1/cStp-Plg1 e pKLAC1/Plg1 com endonucleases *XhoI* e *BglII* e do vetor pKLAC1/cStp-Plg1 com endonucleases *BglII* e *KpnI*, e *XhoI* e *KpnI*.. 29

Figura 9: Alinhamento da sequência *plg1* contida no vetor pKLAC1/Plg1 (A) (*GeneBank* n° AF502279.1), e da sequência do fragmento cStp (B) (*GenBank* n° X03591) ligado à *plg1* contida no vetor pKLAC1/cStp-Plg1 utilizando o programa BlastT online.....32

Figura 10: Sequência de aminoácidos deduzida a partir do fragmento de DNA amplificado que corresponde ao gene da pectina liase (A) e ao *core* da estreptavidina (1 a 355 pb em box cinza) ligado ao gene da pectina liase (B).....33

Figura 11: Esquema indicando a integração do cassete de expressão linearizado no promotor do gene *LAC4*..... 35

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 0,8 % p/v em tampão TBE 1X mostrando a integração dos cassetes de expressão contendo o gene *plg1* e a fusão cStp-Plg1 nas diferentes linhagens transformantes. 37

Figura 13: Atividade de pectina liase (PL) de *K. lactis* recombinantes em meio YNB + 2 % (p/v) galactose..... 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens de <i>K. lactis</i> utilizadas neste trabalho.....	12
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	16
Tabela 3: Eficiência de transformação das linhagens de <i>K. lactis</i>	36
Tabela 4: Atividade da pectina liase (PL) em U.mg ⁻¹ de proteína após indução por 72 horas em meio YNB + 2 % galactose.....	40

RESUMO

COLOMBO, Livia Tavares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Construção de linhagens de *Kluyveromyces lactis* $\Delta ku80$ hospedeiras para produção de proteínas recombinantes: Análise da expressão da fusão estreptavidina-pectina liase.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Co-orientadoras: Denise Mara Soares Bazzolli, Marisa Vieira de Queiroz e Luciano Gomes Fietto.

A recombinação homóloga em *Kluyveromyces lactis* não é a via preferencial usada como mecanismo de reparo de quebra de fita dupla de DNA, o que pode ser indesejado em construções de expressão de proteínas dependentes de integração gene-específico. Para obter linhagens de *K. lactis* hospedeiras para a expressão de proteínas recombinantes eficientes na via de recombinação homóloga realizou-se a mutação do gene *KU80*. Este gene é essencial para perfeito funcionamento da via de junções de extremidades não-homólogas (NHEJ), responsável pela integração aleatória do DNA exógeno no genoma hospedeiro. A deleção do gene *KU80* foi feita utilizando a técnica *Split-Marker*. Dois fragmentos foram obtidos por fusão por PCR, cada um contendo uma sequência flanqueadora da região codificante do gene *KU80* (extremidades 5' e 3') e uma parte do gene de resistência a geneticina (*KanMX*). O cassete de deleção resultante da recombinação *in vivo* dos dois fragmentos gerados continha o gene *KanMX* flanqueado pelas extremidades da região codificante do gene *KU80*, e foi utilizado para deleção do gene *KU80* por recombinação homóloga no genoma de duas linhagens de *K. lactis*, JA6 e HP108. O fragmento de 3,7 Kb obtido por amplificação por PCR com oligonucleotídeos externos à região codificante do gene *KU80* confirmou a integração do cassete de deleção no gene alvo. A eficiência de integração com os fragmentos resultantes do *Split-Marker* foi de 100 %. Os vetores pKLAC1, e pKLAC1/cStp contendo o domínio de afinidade da estreptavidina pela biotina, foram usados para determinar a eficiência de recombinação homóloga das linhagens mutantes *KU80* (JA6 Δ KU80 e HP108 Δ KU80). O gene da pectina liase (*plg1*)

de *Penicillium griseoroseum* foi clonado nesses vetores para avaliar a capacidade de linhagens de *K. lactis* em produzir e secretar a proteína recombinante. A eficiência de transformação (transformantes/ μg de DNA) dos mutantes JA6 Δ KU80 e HP108 Δ KU80 com os vetores pKLAC1/Plg1 e pKLAC1/cStp-Plg1, foi superior à das linhagens parentais JA6 e HP108. A eficiência de integração no gene alvo foi de 100% para maioria das linhagens, com exceção das linhagens JA6/Plg1 e HP108 Δ KU80/Plg1 que apresentaram, respectivamente, eficiência de 80 e 70 % de integração gene-específico. Apesar da eficiência de integração por recombinação homóloga, não houve secreção de PL e da fusão cStp-Plg1 como esperado ao se utilizar o vetor pKLAC1. A atividade intracelular de pectina liase (PL) só foi significativa em relação à parental para a cepa HP108/Plg1, que demonstrou atividade específica de 9,525 U.mg⁻¹ proteína.

ABSTRACT

COLOMBO, Livia Tavares, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, February, 2011.
Construction of *Kluyveromyces lactis* $\Delta ku80$ host strain for recombinant proteins production: Expression analysis of the fusion streptavidin-pectin lyase.
Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co-Advisers: Denise Mara Soares Bazzolli, Marisa Vieira de Queiroz and Luciano Gomes Fietto.

The homologue recombination in *Kluyveromyces lactis* is not the preferential way used as repair mechanism of DNA double strand, desirable in proteins expression construction dependent on gene-specific integration. In order to obtain *K. lactis* strains to recombinant protein expression efficient in homologue recombination way, *KU80* gene was interrupted. The perfect running of non-homologue ends junctions (NHEJ) way depends on that gene and is responsible by exogenous DNA random integration in the host genome. *KU80* gene deletion was made by *Split-Marker*. Two fragments were generated by PCR fusion, each one with a flanker sequence of *KU80* coding region (5' and 3' ends) and part of geneticin resistance gene (*KanMX*). Deletion cassette resulting from *in vivo* recombination of two fragments had *KanMX* gene flanked by *KU80* coding regions end and was used for *KU80* deletion by homologue recombination in the genome in two *K. lactis* strains, JA6 and HP108. The 3.7 Kb fragment obtained by PCR amplification with external primers to *KU80* coding region confirmed deletion cassette integration in the target gene. Integration efficiency with *Split-Marker* resulting fragments was 100 %. pKLAC1 and pKLAC1/cStp vectors with streptavidin affinity domain by biotin were used to determine homologue recombination efficiency of *KU80* (JA6 Δ KU80 and HP108 Δ KU80) mutant strains. Pectin lyase coding gene (*plg1*) from *Penicillium griseoroseum* was cloned in those vectors to evaluate the capacity of *K. lactis* strains to produce and secrete the recombinant protein. The transformation efficiency (transformants/ μ g of DNA) of mutants JA6 Δ KU80 and HP108 Δ KU80 with pKLAC1/Plg1 and pKLAC1/cStp-Plg1 vectors was higher than to parental strains JA6 and HP108. Target gene integration efficiency was 100 % in most

strains, except to strains JA6/Plg1 and HP108 Δ KU80/Plg1 that showed an integration efficiency of 80 and 70 %, respectively. Although the high efficiency of specific-gene integration there was no pectin lyase (PL) or cStp-Plg1 secretion as expected for pKLAC1 vector. PL intracellular activity was significant when compared with parental strain HP108/Plg1, that presented specific activity of 9,525 U.mg⁻¹ protein.

1. INTRODUÇÃO

Leveduras são hospedeiras potenciais para expressão e secreção de proteínas recombinantes. Propriedades industriais aliadas à sistemas eficientes de crescimento, processamento pós-traducional e secreção próprios de células eucarióticas contribuem para o estabelecimento desses organismos como uma microfábrica de biomoléculas de interesse biotecnológico. No entanto, as condições que favorecem a expressão e secreção de proteínas de interesse dependem da espécie de levedura. Algumas leveduras apresentam baixa frequência de recombinação homóloga, o que é indesejável em sistemas de expressão dependentes de integração gene-específico.

Leveduras do gênero *Kluyveromyces* são atraentes em processos biotecnológicos pelo *status* GRAS e diversidade metabólica, sendo capazes de assimilar diferentes açúcares não metabolizados por *Saccharomyces cerevisiae*, tais como lactose, celobiose e xilose, com metabolismo simultaneamente oxidativo e oxirredutivo, isto é, com baixa repressão por glicose. Essa propriedade potencialmente favorece maior rendimento de biomassa e conseqüentemente de proteínas recombinantes. A capacidade de secreção para o meio extracelular concorre para tornar essa levedura propícia à produção de proteínas heterólogas.

A existência de vetores integrativos amplia a utilização de *Kluyveromyces lactis* em processos biotecnológicos. Como *K. lactis* apresenta promotores nativos fortes, como o do gene que codifica a álcool desidrogenase (*KLADH4*) e o do gene da β -galactosidase (*LAC4*), estes são empregados na expressão de genes heterólogos utilizando vários vetores, inclusive os derivados do vetor pKD1 de *Kluyveromyces drosophilarum*.

O vetor comercialmente disponível pKLAC1, é um vetor integrativo de expressão e secreção de proteínas heterólogas em *K. lactis*. O processo de transformação com pKLAC1 requer integração do cassete na região promotora do

gene da β -galactosidase (*LAC4*), o qual dirige a expressão. Trabalhos anteriores utilizaram o plasmídeo pKLAC1 para expressão e secreção do *core* da proteína estreptavidina (cStp). A forte interação da estreptavidina pela molécula de biotina constitui um sistema interessante para separação e/ou imobilização de proteínas e de enzimas de interesse industrial em suportes biotinilados.

Apesar das características promissoras para hospedar genes heterólogos, *K. lactis*, possui na via de junções de extremidades não-homólogas (NHEJ), um mecanismo de reparo de quebra de dupla fita que causa a integração aleatória do DNA exógeno no genoma hospedeiro. Essa via é normalmente mais ativa nessa levedura do que a via de recombinação homóloga. O desenvolvimento de *K. lactis* com alta eficiência de transformação por recombinação homóloga é importante para ampliar seu uso na expressão de proteínas recombinantes utilizando vetores tais como o pKLAC1. A deleção do gene *KU80*, gene essencial para perfeito funcionamento da via NHEJ, aumentou a eficiência de integração no gene alvo em diversos fungos filamentosos e algumas leveduras.

Em fungos, a deleção de genes tem sido conduzida transformando os mesmos com dois fragmentos obtidos por fusão por PCR, cada um contendo uma região de um gene marcador ligado a uma pequena sequência de DNA da extremidade do gene a ser deletado. *In vivo*, esses fragmentos se recombinam e dão origem a um cassete de DNA linear, contendo um gene marcador inteiro, flanqueado por uma pequena sequência de DNA das extremidades do gene a ser deletado. Essa estratégia, denominada *Split-marker*, que em leveduras foi mais explorada em *S. cerevisiae* e algumas espécies de *Candida*, permite uma montagem rápida das construções para deleção de genes.

O presente trabalho avaliou o aumento da eficiência de transformação, associada à recombinação homóloga, de linhagens de *K. lactis* com o vetor de expressão pKLAC1 após a deleção do gene *KU80* no genoma da levedura. Essa mutação foi feita utilizando-se a técnica de deleção gênica *Split-Marker*. Para isso, a construção de ambos os vetores pKLAC1 e pKLAC1/cStp contendo o gene da pectina liase foram usados para verificar a eficiência na integração homóloga, expressão e secreção na linhagem mutante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Leveduras são hospedeiras potenciais para expressão e secreção de proteínas recombinantes importantes do ponto de vista biotecnológico. Além da via secretória eucariótica que assegura o enovelamento, dobramento, montagem e processamento pós-traducionais requeridos para bioatividade protéica, esses micro-organismos são unicelulares e combinam características de crescimento de organismos procariotos com a facilidade de manipulação genética (Wolf, 1996). *S. cerevisiae* foi a opção inicial nas construções genéticas para a produção de proteínas recombinantes (Merico *et al.*, 2004). No entanto, *S. cerevisiae* não atendeu às expectativas por várias razões dentre as quais o metabolismo predominante fermentativo, com alta repressão por glicose, baixo rendimento de biomassa, além de baixa produtividade e secreção com hiperglicosilação protéica (Wolf, 1996; Aylon & Kupiec, 2004; Raimondi *et al.*, 2008).

Outras leveduras não-*Saccharomyces* como *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis* e *Yarrowia lipolytica*, tornaram-se então alternativas à *S. cerevisiae* na produção de polipeptídeos recombinantes (Buckholz, & Gleeson, 1991; Bartkvičiute & Sasnauskas, 2003). A levedura *K. lactis*, com um histórico bem conhecido de uso na indústria de alimentos – com *status* GRAS (*Generally Regarded as Safe*) (Van Ooyen *et al.*, 2006), foi uma das primeiras leveduras não-*Saccharomyces* cujo sistema de transformação foi investigado com a intenção de estabelecê-la como hospedeira para expressão de proteínas heterólogas (Das & Hollenberg, 1982). A capacidade de *K. lactis* assimilar diferentes fontes de carbono utilizando metabolismo tanto oxidativo quanto oxirredutivo, favorece a produção de proteínas recombinantes não só pela possibilidade de utilizar diferentes promotores, mas também pelo direcionamento do metabolismo para produção de biomassa em diversos substratos (Wolf, 1996).

Apesar de filogeneticamente próximas, *K. lactis* e *S. cerevisiae* apresentam diferenças fisiológicas não só quanto ao metabolismo energético, que em *S. cerevisiae* é predominantemente oxirredutivo, mas também quanto a assimilação de diferentes fontes de carbono. Ao contrário de *S. cerevisiae*, *K. lactis* é capaz de crescer num maior espectro de fontes de carbono tais como lactose, celobiose e xilose, o que possibilita o aproveitamento de subprodutos abundantes na indústria agropecuária como é o caso do soro de queijo e biomassa lignocelulósica (Maullu *et al.*, 1999; Rosa, 2007).

Estudos apontam que *K. lactis* apresenta também maior eficiência de secreção de proteínas quando comparado à *S. cerevisiae*, pois não apresenta problemas relacionados à hiperglicosilação e retenção do produto dentro da célula ou espaço periplasmático (Buckholz & Gleeson, 1991; Romanos *et al.*, 1992). Além disso, linhagens de *K. lactis* já foram modificadas para aumentar a produção e secreção de proteínas recombinantes, como a linhagem HP108, que apresenta duplicação do gene da enzima dissulfeto isomerase (PDI) envolvida no dobramento de proteínas no retículo endoplasmático rugoso. Foi verificado que a duplicação desse gene contribuiu significativamente para um aumento na produção e secreção de soroalbumina humana (Bao, *et al.*, 2000). A produção de soroalbumina humana também já foi obtida em outras linhagens de *K. lactis* em diferentes estudos (Fleer *et al.*, 1991b; Bloundeal *et al.* 1994b; Saliola *et al.*, 1999). Outros exemplos de secreção de proteínas recombinantes nessa levedura são o da proteína de interesse terapêutico Interleucina 1- β (Fleer *et al.*, 1991a; Saliola *et al.*, 1999; Bartkvičiute & Sasnauskas, 2003), e de proteínas com atividade enzimática como a enzima bovina quimosina (Van De Berg *et al.*, 1990). Esta última proteína foi a primeira enzima heteróloga originada de um eucarioto superior produzido a baixo custo em um micro-organismo (Van Ooyen *et al.*, 2006).

Uma enzima importante produzida naturalmente por *K. lactis* é a β -galactosidase. Em vista da utilização de lactose por essa levedura, da produção da enzima β -galactosidase e da utilização do forte promotor do gene *LAC4* para expressão de proteínas heterólogas, o regulon LAC/GAL de *K. lactis* foi extensivamente estudado (Van Ooyen *et al.*, 2006)..

A enzima β -galactosidase é induzida tanto por lactose quanto por galactose e é parte essencial para funcionamento do regulon LAC/GAL de *K. lactis* (Gödecke *et al.*, 1991). Esse regulon é similar ao regulon GAL/MEL de *S. cerevisiae*, sendo a diferença entre o regulon dessas leveduras, a evolução no sistema de internalização e hidrólise das diferentes fontes de galactose presentes no meio (Sreerikshna & Dickson, 1985; Gödecke *et al.*, 1991).

O gene *LAC4*, que codifica para β -galactosidase, e o gene *LAC12*, que codifica para lactose permease, não estão presentes em *S. cerevisiae*, e são divergentemente transcritos a partir de uma região intergênica de 2,6 Kb, que contém uma sequência ativadora *upstream* (UAS), na qual se liga o ativador transcricional Lac9/KIGal4 (Gödecke *et al.*, 1991). A proteína KIGal1 age como uma galactoquinase e também se liga a KIGal80p na presença de ATP e lactose/galactose, reduzindo os níveis intranucleares de KIGal80p, e, assim, diminuindo a inibição de KIGal4p, que irá promover a transcrição do regulon LAC/GAL (Diep *et al.*, 2006). O promotor *LAC4* (P_{LAC4}) de *K. lactis* regula a expressão do gene *LAC4* e é frequentemente usado devido a sua expressão induzível (Colussi & Taron, 2005).

A expressão de genes heterólogos em *K. lactis* já foi alcançada utilizando promotores nativos dessa levedura e promotores originados de *S. cerevisiae* (Van Ooyen *et al.*, 2006). A existência de integrativos amplia a utilização de *K. lactis* em processos biotecnológicos. Os vetores episomais mais comuns são derivados do vetor pKD1 de *K. drosophilum* (Chen *et al.*, 1986; Falcone *et al.*, 1986). Promotores nativos de *K. lactis* como o do gene que codifica a álcool desidrogenase (*KLADH4*) e o do gene da β -galactosidase (*LAC4*) são empregados na expressão de genes heterólogos, contudo, o promotor do gene *LAC4* é mais investigado e continua sendo amplamente explorado em *Kluyveromyces* (Swinkels *et al.*, 1993; Panuwatsuk & Da Silva, 2003; Van Ooyen *et al.*, 2006). O vetor comercialmente disponível pKLAC1, é um vetor integrativo de expressão e secreção de proteínas heterólogas em *K. lactis*, e utiliza o promotor do gene *LAC4* para dirigir a expressão do gene de interesse e direcionar a inserção do vetor no genoma no *locus LAC4* (Van den Berg *et al.*, 1990; Swinkels *et al.*, 1993).

O plasmídeo pKLAC1 foi desenvolvido por Colussi & Taron (2005) e apresenta mutações na sequência do P_{LAC4} introduzidas para impedir sua atividade em *Escherichia coli* evitando eventual toxidez na montagem e amplificação na etapa anterior a transformação de leveduras. A alteração inibiu a atividade transcricional do P_{LAC4} em *E. coli*, mas garante expressão e secreção em *K. lactis*. O vetor pKLAC1 apresenta além do gene de resistência a ampicilina em *E. coli*, o gene *amdS* de *Aspergillus nidulans*, que codifica para acetamidase. Esta enzima permite a seleção de leveduras transformantes por adquirirem a propriedade de crescer em acetamida como única fonte de nitrogênio, uma vez que *K. lactis* apresenta habilidade limitada de processar acetamida (Van Ooyen *et al.*, 2006).

A transformação de *K. lactis* com pKLAC1 requer a linearização do plasmídeo para que haja integração do cassete, contendo o gene de interesse, na região promotora do gene da β -galactosidase (*LAC4*), o qual dirigirá a expressão (Colussi &

Taron, 2005). Mas para que haja correta expressão e secreção da proteína, como ocorreu nos experimentos de Rosa (2007) utilizando o vetor modificado pKLAC1/cStp, é preciso que haja reconstituição do promotor LAC4, via recombinação homóloga.

A integração de um fragmento de DNA exógeno no genoma hospedeiro envolve a ação de um mecanismo de reparo de quebra de dupla fita (DSB). O mecanismo, em eucariotos, pode ocorrer por duas vias. A via de recombinação homóloga (HR) resulta na integração dirigida, e depende do grupo de genes *RAD52*. Já a via de junções de extremidades não-homólogas (NHEJ) (Figura 1) resulta na integração aleatória, e os genes chave são *KU70* e *KU80* (Kooistra *et al.*, 2004; Kegel *et al.*, 2006).

Na via HR, a proteína Rad52 forma um anel heptamérico que interage com o DNA fita simples facilitando a invasão dessa fita. Outra importante proteína dessa via, Rad51, é similar à RecA bacteriana, facilitando a reação de troca entre a fita danificada e o DNA exógeno não danificado (Kegel *et al.*, 2006). Em *S. cerevisiae*, mutantes Rad52 mostraram ser incapazes de realizar recombinação homóloga. Segundo Takahashi e colaboradores (2006), essa proteína se liga à extremidade do DNA transformante para ativar a maquinaria da HR na procura por regiões de homologia facilitando a integração do fragmento no local desejado.

A via de NHEJ ao contrário da HR praticamente não necessita de homologia entre as fitas para que haja a recombinação não-homóloga. O heterodímero Ku70/Ku80 apresenta alta afinidade pelas extremidades livres de DNA (Kooistra *et al.*, 2004). Após a ligação do complexo Ku70/Ku80, que protege a extremidade da fita da degradação, ocorre o recrutamento do complexo MRX e de ligases (Lig4 e Lif1), sendo uma necessária à atividade da outra (Kegel *et al.*, 2006). Em *S. cerevisiae* um terceiro complexo é ainda necessário para o completo funcionamento da via NHEJ (Figura 1).

As proteínas chaves de cada via, Rad52 e o heterodímero Ku (Ku70p/Ku80p), competem pela ligação à extremidade do DNA exógeno a ser integrado (Takahashi *et al.*, 2006). Ocorrerá a integração via HR quando Rad52p se ligar a extremidade do DNA exógeno, e via NHEJ se o heterodímero Ku estiver presente e remover Rad52p dessa posição

Existe uma diferença entre os diversos organismos quanto à eficiência de integração de um fragmento de DNA no gene alvo. Em organismos proximalmente relacionados essa diferença pode ser atribuída à maior atividade e eficiência de uma das vias envolvidas nos mecanismos de DSB que a outra via (Kooistra *et al.*, 2004).

A eficiência de integração no gene alvo *S. cerevisiae* revela um mecanismo de recombinação homóloga com quase 100 % de integração mesmo quando o fragmento de DNA introduzido na célula apresenta apenas 40 pb de homologia em cada

extremidade com o gene alvo (Kooistra *et al.*, 2004). Até mesmo a ausência de componentes da via HR não proporciona maior atividade da via NHEJ nessa levedura (Kegel *et al.*, 2006). Mas a regulação da utilização de uma ou outra via ocorre pelo tipo celular, pois em linhagens diplóides o repressor $a1/\alpha2$ inibe a transcrição de um gene importante para eficiência da via NHEJ em *S. cerevisiae* (*NEJ1*, que faz parte do terceiro complexo e interage com *Lif1p*), enquanto que em células haplóides, não ocorre essa repressão e a via NHEJ ocorre normalmente (Kegel *et al.*, 2006).

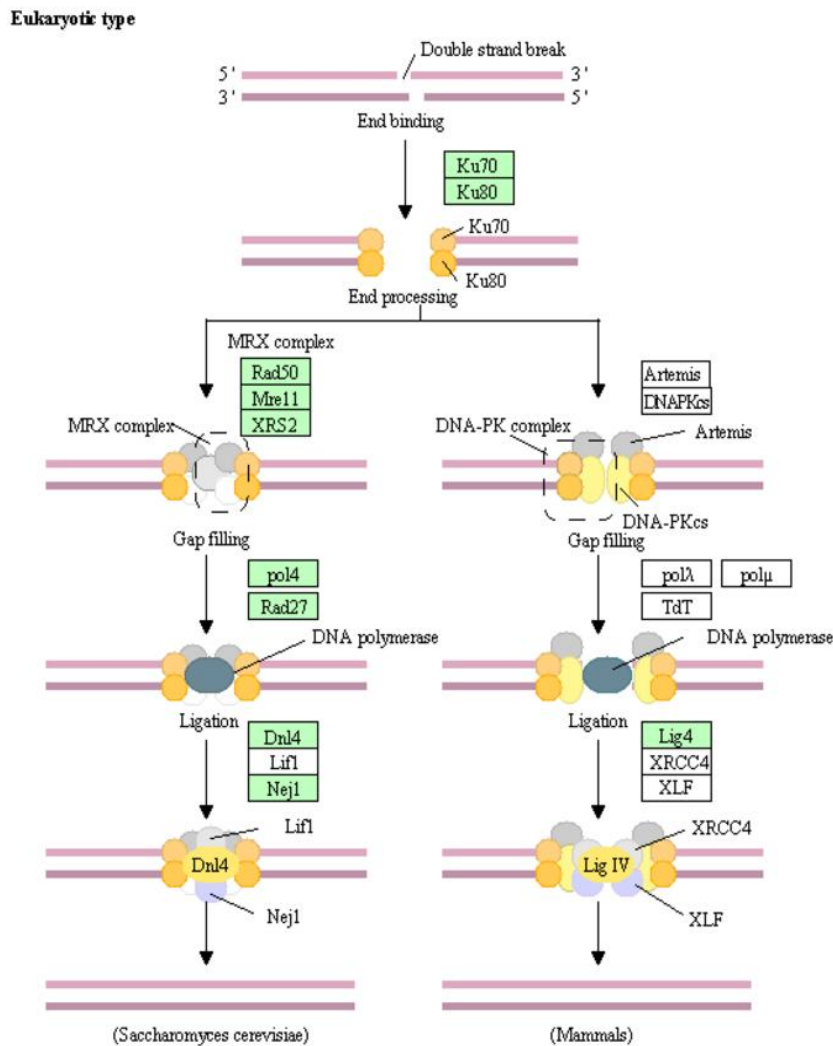


Figura 1: Esquema da via de junção de extremidades não-homólogas no evento de recombinação em eucariotos, especificamente *S. cerevisiae* e mamíferos. As enzimas presentes na mesma via em *K. lactis* estão destacadas em verde. Fonte: <http://www.genoma.jp/kegg/> (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomas)

Em algumas outras espécies de leveduras e espécies de *Plasmodium*, a integração homóloga é também eficiente (Kooistra *et al.*, 2004). No entanto, apesar da alta conservação molecular das vias NHEJ e HR nos diferentes reinos do domínio Eukarya durante o processo evolucionário, o que ocorre em *S. cerevisiae* é pouco comum em plantas, mamíferos e na maioria dos fungos filamentosos (Kooistra *et al.*, 2004). Nesses organismos o sistema de integração homólogo apresenta baixa atividade, chegando a frequências de 0,1 – 20 % de ocorrência em fungos filamentosos utilizando fragmentos com mais de 2000 pb de homologia com o gene alvo (Boulton & Jackson, 1996; Kooistra *et al.*, 2004).

A levedura *K. lactis* exibe uma eficiência intermediária de integração por recombinação homóloga, dependendo da extensão de sequências homólogas ao gene alvo que flanqueiam o DNA transformante. Foi demonstrado em uma linhagem selvagem de *K. lactis* que a eficiência de integração no gene alvo varia de 0 % com 50pb a 88 % com 600 pb (Kooistra *et al.*, 2004). Esses resultados evidenciam a ocorrência natural de eventos de recombinação via NHEJ quando a quantidade de pares de bases de homologia do DNA exógeno ao gene alvo é pequena, denotando a atividade dessa via em *K. lactis*. Portanto, o balanço natural e a regulação entre as vias HR e NHEJ nessa levedura, assim como ocorre em fungos filamentosos, dependem da extensão da sequência de homologia com o gene alvo do DNA transformante, e não do tipo celular (haplóide ou diplóide), como ocorre em *S. cerevisiae* (Kooistra *et al.*, 2004; Kegel *et al.*, 2006).

Alguns organismos que apresentam uma via NHEJ mais ativa que a via HR, podem ter a eficiência de integração por recombinação homóloga aumentada quando alguns genes que codificam proteínas importantes da via NHEJ são deletados. Takahashi e colaboradores (2006) obtiveram uma linhagem do fungo filamentoso *Aspergillus sojae* mutante para o gene *ku70* e *ku80*, e este apresentou um aumento significativo de 75 % de integração no gene alvo. A inativação da via NHEJ em *Kluyveromyces marxianus* pela deleção do gene *KU70*, também mostrou prejudicar o processo de integração gênica aleatória aumentando a eficiência de integração no gene alvo para 82 – 95 % com sequências flanqueadoras, de homologia ao gene alvo, contendo 40 – 1000 pb no DNA transformante (Abdel-Banat *et al.*, 2009). Em *K. lactis*, Kooistra e colaboradores (2004) obtiveram uma eficiência ainda maior do que em *K. marxianus*, acima de 97 %, utilizando linhagens mutantes para o gene *KU80*, independentemente do tamanho de homologia flanqueando o DNA transformante. Portanto, a mutação de genes *KU70* e/ou *KU80* tem mostrado resultar em mais atividade da via de recombinação homóloga.

A deleção gênica em fungos tem sido comumente efetuada usando métodos de introdução de DNA linear no genoma hospedeiro, consistindo de dois fragmentos obtidos por fusão por PCR, cada um contendo uma região de um gene marcador ligado a uma pequena sequência de DNA da extremidade do gene a ser deletado (Catlett *et al.*, 2002). Essa estratégia, denominada “*Split-marker*”, foi primeiramente desenvolvida em *S. cerevisiae*, porém, utilizando-se construções baseadas em plasmídeos (Fairhead *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2006). Em fungos filamentosos o método de fusão por PCR tem sido mais utilizado. Neste método, são feitas duas rodadas de PCR, onde quatro primers universais para o marcador de seleção e quatro primers específicos para o gene de interesse são requeridos para cada deleção (Catlett *et al.*, 2002). A recombinação homóloga *in vivo* entre as regiões sobrepostas do gene marcador de seleção formam um fragmento inteiro contendo o gene marcador de resistência flanqueado por sequências das extremidades do gene a ser deletado. Outra recombinação *in vivo* ocorre entre essas regiões flanqueadores do gene e seu homólogo no genoma, provocando a substituição do gene alvo pelo marcador intacto. Dessa forma, uma alta eficiência de deleção gênica pode ser alcançada, como demonstrado por You *et al.* (2009) ao realizar a inativação gene-específica no fungo filamentoso *Cercospora nicotianae* usando a técnica “*Split-marker*”. Esse método baseado em fusão por PCR é simples e permite uma montagem rápida das construções para deleção.

Esta técnica de deleção gênica poderá ser usada em *K. lactis* para deleção do gene *KU80*. Dessa forma, o aumento da eficiência de integração no gene alvo pode ser útil ao se utilizar o plasmídeo pKLAC1.

Rosa (2007) modificou o vetor pKLAC1 pela adição do gene que codifica o *core* da estreptavidina (cStp) na região de clonagem imediatamente após a sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo líder do fator α de *K. lactis* (*Mating- α -factor*). O autor construiu esse vetor (pKLAC1/cStp) com intuito de obter um sistema para produção e separação de proteínas por adsorção biosseletiva. Neste caso as proteínas devem ser recuperadas em colunas biotiniladas, devido a propriedade da estreptavidina de se ligar a biotina. Em sistemas de produção e obtenção de proteínas e peptídeos recombinantes, a detecção e separação da proteína de interesse podem ser facilitadas pela fusão de genes que codificam proteínas quiméricas, contendo domínios de afinidade que facilitam o processo de separação.

Estreptavidina é uma proteína de 60 kDa produzida por *Streptomyces avidinii* (Sano *et al.*, 1998). Essa proteína se liga fortemente à molécula de biotina numa constante de afinidade de 10^{-15} M, uma das interações não-covalentes mais fortes já

conhecidas, sendo maior esta interação que a de ligantes com seus anticorpos (Diamandis & Christopoulos, 1991; Sano *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005).

A estreptavidina ativa é homotetramérica e cada monômero apresenta massa molecular de 15 kDa e um sítio ativo para biotina (Sano *et al.*, 1998). A proteína secretada por *S. avidinii* sofre clivagem pós-secretória nas regiões terminais, e dessa proteólise resultam peptídeos com cerca de 13,3 kDa, que correspondem ao *core* da estreptavidina (Weber *et al.*, 1989; Swaisgood *et al.*, 1994). Já a biotina é uma vitamina relativamente pequena (244,31 Da), que ao ser associada a macromoléculas não afetam a atividade biológica destas (Diamandis & Christopoulos, 1991). A alta afinidade se dá pela formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre a biotina e os resíduos de triptofano presentes na proteína estreptavidina. A forte interação biotina-estreptavidina constitui um sistema para detecção, separação e/ou imobilização de proteínas e de enzimas de interesse científico e tem sido muito explorado em aplicações tanto *in vitro* como *in vivo* (Wu & Wong, 2002b). A produção de β -galactosidase, assim como outras enzimas como tripsina, transglutaminase e lipases ligadas à estreptavidina já foram demonstrada em *E. coli* (Lee & Swaisgood, 1998; Clare *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002; Wilcox *et al.*, 2002; Walsh & Swaisgood, 2004). Portanto, a fusão de genes que codificam enzimas de interesse biotecnológico e industrial à sequência codificadora do domínio da estreptavidina, pode viabilizar a imobilização dessas enzimas em colunas biotiniladas, o que pode ser útil em linhas de produção industrial.

Fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são importantes produtores de complexos enzimáticos (pectinases) envolvidos na degradação de pectina (Silva *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2008). Substâncias pécicas são complexos de polissacarídeos ácidos que constituem o principal polissacarídeo da lamela média e parede celular de células de plantas (Kashyap *et al.*, 2000). Pectinases têm, portanto, diversas aplicações na indústria de alimentos, particularmente em sucos de frutas e vegetais processados, apresentando extensivas aplicações na extração, clarificação de sucos e estabilização/amadurecimento durante a estocagem (Sieiro *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2010). Adicionadas ao suco extraído contribuem também para redução da viscosidade e facilita a filtração e concentração do suco (Uenojo & Pastore, 2007). As pectinases são classificadas de acordo com a especificidade pelo substrato e modo de ação (Yadav *et al.*, 2009). Dentre as enzimas pécicas, a pectina liase, PNL (EC 4.2.2.10), destaca-se pela capacidade intrínseca de usar pectina altamente esterificada como substrato (Silva *et al.*, 2005; Bazzolli *et al.*, 2008).

Vários estudos relacionados à pectinases já foram desenvolvidos no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. Bazzolli e

colaboradores (2006) isolou e caracterizou dois genes de pectina liase no genoma de *Penicillium griseoroseum* – *plg1* e *plg2*. O gene *plg1* mostrou propriedades interessantes, como a indução por pectina cítrica, o que pode ser útil na hidrólise de pectina na indústria de frutas (Bazzolli *et al.*, 2008). A fusão do gene da pectina liase à sequência do domínio de afinidade da estreptavidina pela biotina pode ser interessante para futura imobilização/separação dessa enzima hidrolítica.

Leveduras apresentam-se como fonte alternativa para produção de pectinases (Sieiro *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2010). Em várias espécies de leveduras foi observada a presença de atividade de enzimas pécticas, como em *Kluyveromyces fragilis* e *K. marxianus*, e espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida* e *Zigosaccharomyces* (Blanco *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2005). No entanto, a maioria das espécies de leveduras apresenta atividade de poligalactorunases (PG), e em apenas algumas espécies foram relatadas a atividade de PL (Silva *et al.*, 2005). Investigar o uso de *K. lactis* como sistema de expressão para proteína pectina liase torna-se atrativo devido às características favoráveis para produção de proteínas heterólogas por essa levedura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Microorganismos e no Laboratório de Genética Molecular e de Microorganismos, ambos do Departamento de Microbiologia, instalados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Micro-organismos e plasmídeos

A levedura *Kluyveromyces lactis* linhagens JA6 e HP108, cujos genótipos são descritos na Tabela 1, foram utilizadas neste trabalho para obtenção de células mutante para o gene *KUB0* e como células hospedeiras para expressão do gene da pectina liase, e expressão do *core* da estreptavidina ligado ao gene da pectina liase.

Tabela 1: Linhagens de *K. lactis* utilizadas neste trabalho.

Linhagens	Genótipo	Fonte
JA6	<i>MATa ade1-600 adeT600 ura3-12 trp1-11 LAC9-2</i>	Breunig & Kuger, 1987
HP108	<i>MATa argA1 lysA1 Rag⁻ K⁺ pKD10</i>	Bao, W. <i>et al.</i> , 2000

O plasmídeo pGEM-T Easy (Promega, Madison, EUA), com gene da pectina liase (pGEM/plg1) clonado no sítio *EcoRI*, foi obtido a partir do cDNA do fungo *Penicillium griseoroseum*, cedido por Denise M. S. Bazzolli *et al.* (2006) do Laboratório

de Genética Molecular de Micro-organismos da Universidade Federal de Viçosa. Este plasmídeo foi utilizado para amplificação do gene da pectina liase.

O plasmídeo pKLAC1 (New England Biolabs) (Figura 2), e o pKLAC1 contendo a sequência de nucleotídeos referente ao *core* da estreptavidina (pKLAC1/cStp) (Rosa, 2007), foram utilizados para subclonagem do gene da pectina liase e sua ligação ao *core* da estreptavidina. O vetor de expressão pKLAC1 contém as sequências referentes às extremidades 5' e 3' do promotor do gene *LAC4*, e o peptídeo sinal "Mating alpha factor" de *K. lactis*, que direciona a proteína expressa para via de secreção. Este vetor também apresenta o promotor do gene que codifica álcool desidrogenase (*ADH2*) de *Saccharomyces cerevisiae* dirigindo a expressão do gene *amdS* de *Aspergillus nidulans*, que codifica acetamidase.

Os plasmídeos foram propagados em células de *Escherichia coli* DH5 α TM.

O vetor pUG6 (Guldener *et al.*, 1996) foi utilizado para amplificação do gene de resistência a geneticina (*KanMX*).

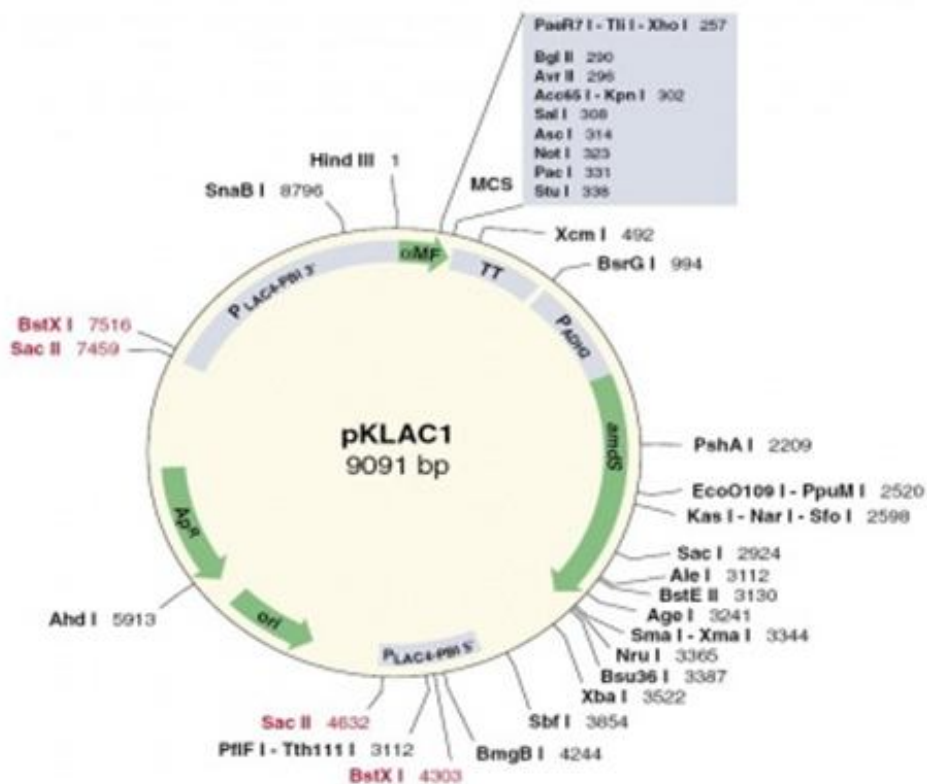


Figura 2: Mapa físico do plasmídeo pKLAC1 (Fonte: New England Biolabs).

3.2. Condições de cultivo e manutenção

As linhagens de *K. lactis* $\Delta ku80$ foram selecionadas em meio YPD [1 % (p/v) extrato de levedura, 2 % (p/v) peptona e 2 % (p/v) dextrose] suplementado com 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de geneticina (G418 - SIGMA). As linhagens selvagens e mutantes $\Delta ku80$ transformadas com os vetores pKLAC1/Plg1 e pKLAC1/cStpPlg1 foram selecionadas em meio YCB (*Yeast Carbon Base*) contendo 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio.

O cultivo das linhagens de *K. lactis* para obtenção de biomassa foi realizado em meio YPD mantido a 30 °C sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 14 horas. A indução da síntese da proteína heteróloga foi feita em meio mínimo YNB (*Yeast Nitrogen Base*, Laboratórios Difco, Detroit, EUA) suplementado com uma solução de aminoácidos e da fonte de carbono galactose. Para as culturas em meio sólido foram adicionados 2 % (p/v) de ágar ao meio líquido.

Células de *E. coli* DH5 α TM foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (10 g.L⁻¹ bactotripton, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ cloreto de sódio) sob agitação de 200 rpm a 37 °C. Células transformadas com os plasmídeos pGEM/plg1, pKLAC1/Plg1 e pKLAC1/cStp-Plg1 foram cultivadas sob as mesmas condições em meio LB suplementado com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina.

3.3. Inativação do gene *KU80* das linhagens de *K. lactis* JA6 e HP108

Os mutantes *K. lactis* para o gene *KU80* foram obtidos de acordo com o protocolo descrito por Catlett *et al.* (2002) utilizando-se a técnica *Split-Marker*, baseado em fusão por PCR. Os oligonucleotídeos usados estão listados na Tabela 2.

A partir da sequência da região codificante do gene *KU80* (Kooistra *et al.*, 2004) depositada em bancos de dados (*GenBank* n^o AY239586.1), foram desenhados e sintetizados quatro oligonucleotídeos para amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de regiões da extremidade 5' e 3' do gene. Para extremidade 5' foi usado o par de oligonucleotídeos KU8055FFP1-F e KU8035FRP1-R, e para extremidade 3' foi usado o par de oligonucleotídeos KU8053FP2-F e KU8033RP2-R (Figura 3).

O gene marcador de seleção usado foi o gene de resistência a geneticina (*KanMX*) amplificados por PCR a partir do vetor pUG6. Esse gene foi amplificado utilizando-se quatro oligonucleotídeos desenhados e sintetizados para amplificação do

gene em duas metades. Para o primeiro fragmento, foram utilizados os oligonucleotídeos PUG6KamM13R-F e PUG6KamNLC37-R, e para o segundo fragmento, PUG6KamNLC38-F e PUGKamM13f-R.

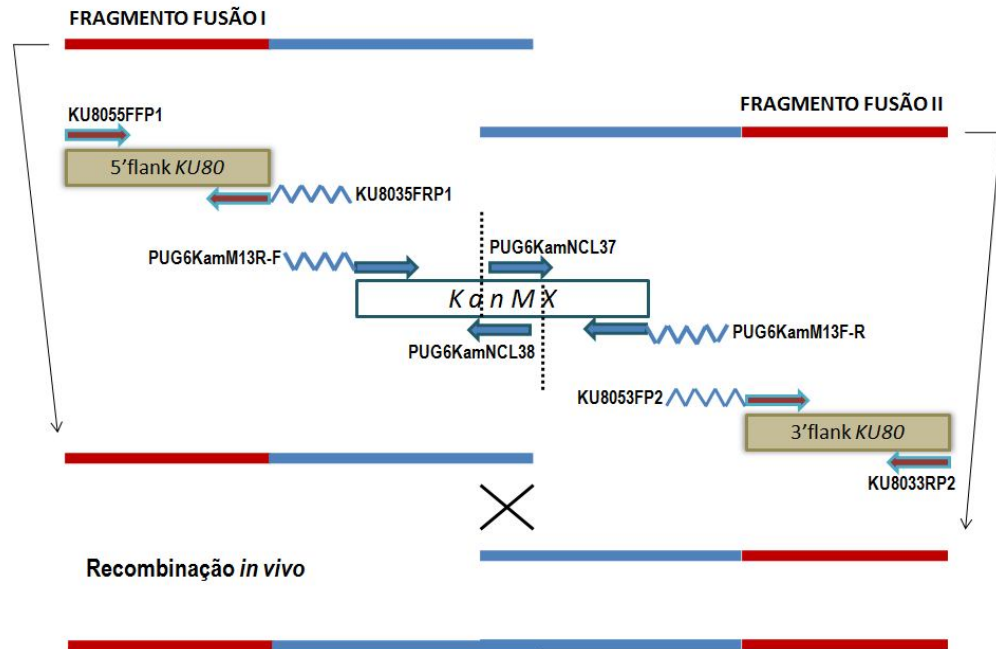


Figura 3: Esquema representativo da técnica *Split-Marker*. Adaptado de Catlett *et al.* (2002) e Sharon *et al.* (2010).

Os oligonucleotídeos KU8035FRP1-R e PUG6KamM13R-F, assim como PUGKamM13f-R e KU8053FP2-F apresentam regiões de homologia entre si para posterior reação de fusão por PCR para obtenção dos fragmentos I e II (Figura 3).

Esta técnica consiste em duas rodadas de PCR. Na primeira, foram amplificados os fragmentos das extremidades 5' e 3' do gene *KU80* e os dois fragmentos do gene *KanMX*. Os parâmetros do ciclo utilizado foram: 95 °C por 2 min (para desnaturação inicial); 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 61 °C por 45 seg e 72 °C por 1 min; 72 °C por 5 min (para extensão final).

Na segunda rodada, o produto de PCR da extremidade 5' foi ligado ao fragmento da parte inicial do gene *KanMX*, e produto de PCR da extremidade 3' foi ligado ao fragmento da parte final do gene *KanMX*. Os parâmetros do ciclo utilizado foram: 95 °C por 2 min (para desnaturação inicial); 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 62 °C por 45 seg e 72 °C por 1 min; 72 °C por 5 min (para extensão final).

Os dois fragmentos obtidos por fusão por PCR foram usados para transformar as linhagens de *K. lactis* JA6 e HP108 na expectativa de que, *in vivo* ocorresse a recombinação homóloga entre as regiões sobrepostas do gene marcador de seleção. Dessa forma, o cassete de deleção contendo a sequência inteira do gene *KanMX* flanqueada pelas extremidades 5' e 3' da região codificante do gene *KU80*, por recombinação homóloga com o genoma, promoveria a deleção do gene *KU80* nas linhagens de *K. lactis*.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
KU8055FFP1 – F KU8035FRP1 - R	CAGCGATGAGTCGTTGCCCGT RAAGGGTTGTCGACCTGCAGCTCAACTGGCCCTGGAACGTCCT
KU8053FP2 – F KU8033RP2 – R	TAGTGGCCTATGCGGCCGCACAGATGTGCTCTCTTTTCCCCGT CGACAGAGAAACGTCAGCGTTGT
PUGKamM13R – F PUG6KamNLC37 – R	GCTGCAGGTCGACAACCCTT TCGTGATTGCGCCTGAGCGA
PUG6KamNLC38 – F PUG6KamM13F – R	AGGATACAGTTCTCACATCACATCCGA GCGGCCGCATAGGCCACTA
KU80FT5F2 – F KU80FT5F2 – R	CGTCGTGGCTCCCGTGTTCA ATGGGCAAAAAGGCAGGTTTGCGG
INTEG Primer 1 – F INTEG Primer 2 – R	ACACACGTAAACGCGCTCGGT ATCATCCTTGTCAGCGAAAGC
PIg1 – F PIg1 – R	CTCGAGAAAAGA ATGAAGATCGCCGCTATC AGATCTTTAAAGCTTACCCTGACCAGCGTT
cStpPIg1 – F cStpPIg1 – R	AGATCTATGAAGATCGCCGCTATCTTTGCAGCA GGTACCTTAAAGCTTACCCTGACCAGCGTT

F: forward; R: reverse

A transformação das linhagens de leveduras com os fragmentos obtidos por PCR foi realizada segundo Kooistra *et al.* (2004), com adaptações. As células foram inoculadas em dois mL de meio YPD e incubadas a 30 °C *overnight* sob agitação de 200 rpm. As culturas foram então inoculadas em 50 mL de meio YPD para $DO_{600}=0,1$ por mL, e incubadas sob as mesmas condições do inóculo inicial até atingirem DO_{600} de aproximadamente 1,0. Em seguida as células foram centrifugadas por cinco

minutos a 3000 rpm e lavadas com 25 mL de tampão de eletroporação (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 270 mM Sacarose e 1 mM MgCl₂) a 4 °C. O sedimento celular foi ressuspendido em 25 mL de YPD contendo 25 mM DTT e 20 mM HEPES, pH 8.0, e incubadas por 30 minutos a 30 °C sem agitação. Após nova lavagem com 10 mL do tampão de eletroporação, o sedimento celular foi ressuspendido em 0,2 mL do tampão de eletroporação. Foi retirada uma alíquota de 60 µL da suspensão de células e adicionado dois µg de cada fragmento obtido por fusão por PCR (Fragmento I e II Figura 3) e 50 µg de DNA de esperma de Salmon (Invitrogen). Após incubação no gelo por 15 minutos, a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (2 mm). A eletroporação foi realizada no aparelho BIORAD Gene Pulser a 1 KV, 25 µF e 400 Ohm, e imediatamente após o pulso foi adicionado um mL de meio YPD a temperatura ambiente. As células foram transferidas para tubos de ensaio estéreis e incubadas a 30 °C por três horas sob agitação de 200 rpm. Após esse período o sedimento celular foi lavado com água estéril e alíquotas de diluições seriadas foram plaqueadas em meio YPD sólido contendo 200 µg.mL⁻¹ de geneticina e incubadas por três dias a 30°C.

3.3.1. Confirmação das linhagens de *K. lactis* $\Delta ku80$

As células *K. lactis* JA6 Δ KU80 e HP108 Δ KU80 foram cultivadas em meio sólido YPD suplementado com 200 µg.mL⁻¹ de geneticina. A confirmação da mutação foi feita por PCR, com oligonucleotídeos externos à região codificante do gene *KU80* (KU80FT5F2-F e R). Fragmentos das extremidades 5' e 3' do gene *KU80* e os dois fragmentos do gene *KanMX*.

Os parâmetros do ciclo utilizado foram: 98 °C por 2 min (para desnaturação inicial); 35 ciclos de 98 °C por 10 seg, 63 °C por 45 seg e 72 °C por 1 min e 30 seg; 72 °C por 5 min (para extensão final). Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1 % (p/v) em tampão TBE (0,8 g.L⁻¹ Tris Base, 5,5 g.L⁻¹ ácido bórico e 4 mL EDTA 0,5 M pH 8,0) 1X a 80 Volts.

3.3.2. Análise da estabilidade mitótica das linhagens recombinantes

As células mutantes foram retiradas do meio YPD suplementado com 200 µg.mL⁻¹ de geneticina e repicadas três vezes em meio YPD não seletivo para avaliar a estabilidade dos transformantes. Após cada repicagem, as placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas. Ao final das repicagens em meio não seletivo, os clones foram

novamente cultivados em meio YPD suplementado com 200 µg.mL⁻¹ de genética e submetidos às mesmas condições de incubação.

3.3.3. Teste de sensibilidade das linhagens mutantes de *K. lactis* à radiação ultra-violeta

As linhagens mutantes JA6ΔKU80 e HP108ΔKU80 e respectivas linhagens parentais, foram submetidas à radiação *uv* usando o aparelho Short Wave UVS-11.

Inicialmente foi feito um pré-inóculo das linhagens em YPD e incubado sob agitação de 200 rpm a 30 °C *overnight*. A Densidade Óptica (A_{600nm}) inicial foi padronizada para 0,2 em 10 mL do mesmo meio e novamente incubada sob as mesmas condições por 3 horas. As células foram centrifugadas a 12.000 rpm por cinco minutos e ressuspensas em 10 mL de solução salina 0,9 % (p/v). Dessa solução, foi retirada uma alíquota para proceder a contagem de células em câmara de Neubauer. O restante da solução foi submetida à radiação *uv* por 10 minutos. Durante o tratamento, alíquotas de 0,1 mL foram retiradas a cada dois minutos, e diluições seriadas foram plaqueadas em meio YPD sólido e incubadas a 30 °C. Após três dias de incubação, as colônias foram contadas e a sobrevivência calculada por comparação às células não submetidas à radiação ultra-violeta (alíquota do tempo zero). O experimento foi feito com em triplicata com repetição. Para montagem dos gráficos foram calculados os desvios padrões.

3.4. Clonagem do gene da pectina liase (*plg1*) nos vetores pKLAC1 e pKLAC1/cStp

A sequência de nucleotídeos do cDNA do gene que codifica pectina liase foi amplificada por PCR a partir do plasmídeo pGEM/plg1 com os oligonucleotídeos cStpPlg1-F e cStpPlg1-R (Tabela 2), responsáveis pela adição, respectivamente, das sequências dos sítios de restrição para as endonucleases *Bgl*III e *Kpn*I. Os parâmetros do ciclo utilizado foram: 95 °C por 2 min (para desnaturação inicial); 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 62 °C por 45 seg e 72 °C por 1 min; 72 °C por 5 min (para extensão final). O produto da amplificação foi fracionado em gel de agarose 1 % (p/v) em tampão TBE 1X para visualização do fragmento de DNA de aproximadamente 1,1 Kb correspondente ao cDNA do gene *plg1* de *P. griseoroseum* (Bazzolli *et al.*, 2006).

A purificação da reação foi feita utilizando kit apropriado Wizard®Plus SV (Promega) para produtos de PCR e o fragmento purificado foi subclonado no vetor pKLAC1/cStp (Rosa, 2007), seguido da transformação de células *E. coli* DH5α™ ultracompetentes (Inoue *et al.* 1990). O mesmo procedimento foi efetuado para amplificação do cDNA do gene *plg1* a partir do plasmídeo pGEM/plg1, mas com os oligonucleotídeos Plg1-F e Plg1-R (Tabela 2), que adicionam sequências dos sítios de restrição para as endonucleases de restrição *XhoI* e *BglII*, para posterior subclonagem no vetor pKLAC1.

As células transformantes foram selecionadas em meio LB ágar [10 g.L⁻¹ bactotripton, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ cloreto de sódio, 1,75 % (p/v) ágar bacteriológico] suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de ampicilina. Colônias isoladas foram inoculadas em 10 mL de meio LB seletivo (50 µg.mL⁻¹ de ampicilina) e incubadas a 37 °C sob agitação de 200 rpm por cerca de 14 horas. Os transformantes foram estocados em meio LB e 30 % (v/v) de glicerol, e armazenados a -80 °C.

A extração do DNA plasmidial (pKLAC1/Plg1 e pKLAC1/cStp-Plg1) foi feita como descrito por Sambrook *et al.* (2001).

3.4.1 Confirmação da clonagem do gene *plg1* nos plasmídeos pKLAC1 e pKLAC1/cStp

O plasmídeo pKLAC1/cStp-Plg1 foi submetido à reação de clivagem com as endonucleases de restrição *XhoI* e *KpnI*, *XhoI* e *BglII*, e *BglII* e *KpnI*, que liberam respectivamente, os fragmentos referente à fusão pectina liase-estreptavidina (cStp-Plg1), o *core* da estreptavidina (cStp), e o gene *plg1*. O plasmídeo pKLAC1/Plg1 também foi submetido a clivagem com as endonucleases de restrição *XhoI* e *BglII* para liberação do fragmento referente ao gene *plg1*. Posteriormente, todos os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v), em tampão TBE 1X a 80 Volts.

A confirmação também foi feita pelo seqüenciamento dos plasmídeos utilizando os oligonucleotídeos pKLAC1 *Reverse* e *Mating-α-factor* (Invitrogen) pela empresa MacroGen Inc., em Seoul na Korea. O programa utilizado para alinhamento das sequências foi o BlastT *on line*.

3.5. Transformação das linhagens de *K. lactis* selvagens JA6 e HP108 e $\Delta ku80$ com os plasmídeos pKLAC1/Plg1 e pKLAC1/cStp-Plg1

Os mutantes JA6 Δ KU80, HP108 Δ KU80 e respectivos selvagens, foram transformados com os plasmídeos pKLAC1/cStp-Plg1 e pKLAC1/Plg1 previamente linearizados. A linearização do vetor pKLAC1/cStp-Plg1 foi realizada com as endonucleases *Bgl*I (Promega) e *Tth*111I (New England Biolabs) de acordo com as recomendações dos fabricantes, acrescentando-se à reação 100 μ g.mL⁻¹ de BSA. Para linearização do vetor pKLAC1/Plg1 foi utilizada a endonuclease de restrição *Sac*II (New England Biolabs).

A transformação das linhagens de leveduras foi realizada segundo Kooistra *et al.* (2004), com adaptações, da mesma forma como realizado no item 3.3. No entanto, à alíquota de 60 μ L da suspensão de células, foi adicionado dois μ g do plasmídeo (pKLAC1/Plg1 ou pKLAC1/cStp-Plg1) previamente linearizado e 50 μ g de DNA de esperma de Salmon (Invitrogen). Após incubação no gelo por 15 minutos, a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (2 mm). A eletroporação foi realizada no aparelho BIORAD de acordo como descrito para o item 3.3. e imediatamente após o pulso foi adicionado um mL de meio YPD a temperatura ambiente. As células foram transferidas para tubos de ensaio estéreis e incubadas a 30 °C por três horas sob agitação de 200 rpm. Após esse período o sedimento celular foi lavado com água estéril e alíquotas de diluições seriadas foram plaqueadas em meio seletivo YCB ágar contendo cinco mM de acetamida como única fonte de nitrogênio e incubadas por três dias a 30 °C.

A confirmação da integração dos vetores foi realizada por PCR utilizando os oligonucleotídeos INTEG Primer 1 – F e INTEG Primer 2 – R (Tabela 2). Os parâmetros do ciclo utilizado foram: 98 °C por 2 min (para desnaturação inicial); 35 ciclos de 98 °C por 10 seg, 60 °C por 45 seg e 72 °C por 1 min e 30 seg; 72 °C por 5 min (para extensão final).

3.6. Indução da expressão do gene da pectina liase e da fusão *core* estreptavidina - pectina liase

Para indução da expressão do gene *plg1* e da fusão com o *core* da estreptavidina (cStp), inicialmente foi feito um pré-inóculo dos transformantes em 20 mL de meio YNB suplementado com 2 % (p/v) de galactose. Após centrifugação da biomassa obtida a 12.000 rpm por cinco minutos, o sedimento foi lavado com água peptonada 0,01 % (p/v) e ressuscitado em 100 mL do mesmo meio. As culturas

foram incubadas a 30 °C sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 72 horas. Após esse período, as células foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos. Tanto o sobrenadante como o sedimento celular foram utilizados para análise da expressão, no entanto, somente o sedimento celular após lise celular e filtração, apresentou resultados sugerindo a expressão de *plg1*.

3.7. Análise da expressão da proteína heteróloga

3.7.1. Obtenção do extrato livre de células

As linhagens JA6ΔKU80, HP108ΔKU80 e respectivos selvagens transformadas com os plasmídeos pKLAC1/cStp-Plg1 e pKLAC1/Plg1 foram cultivadas em 100 mL de meio YNB suplementado com 2 % (p/v) de galactose por 72 horas, e centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 10 mL de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mmol.L⁻¹, pH 6,8, submetidas a uma pressão de 20.000lb/in² por três vezes no aparelho French Pressure Cell (SLM AMINCO®, Urbana, Illinois, USA). O extrato livre de células foi obtido pela centrifugação do lisado e a filtração do sobrenadante resultante em filtro MilliPore (Scheleicher & Schuell, Alemanha) com poros de 0,2 μm.

3.7.2. Determinação da atividade enzimática específica da pectina liase (PL)

A atividade de PL foi determinada por método espectrofotométrico a 235 nm, conforme descrito por Albersheim e Killias (1962).

O volume de reação era constituído de um mL de pectina cítrica P-9135 (Sigma®) a 2,5 % (p/v) em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mmol.L⁻¹, pH 6,8, adicionado de um mL e meio do filtrado da cultura. A mistura de reação foi mantida a 40 °C e alíquotas de 0,5 mL foram retiradas nos tempos zero e 30 minutos de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 N, para interrupção da reação. Uma unidade de atividade de PL foi definida como nanomoles de $\Delta^{4,5}$ galacturonídeo por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar 5550 mol⁻¹L.cm⁻¹ para o cálculo (Albersheim, 1966). O experimento foi feito com repetição e em triplicata.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

Os dados coletados da atividade de PL foram submetidos à análise estatística ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F e pelo teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Deleção do gene *KU80* de linhagens de *K. lactis* e identificação dos mutantes

Baseado na sequência do gene *KU80* de *K. lactis* CBS 2359, uma região de 476 pb da extremidade 5' e 487 pb da extremidade 3' foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico da linhagem JA6. O gene de resistência a geneticina (*KanMX*) foi amplificado a partir do pUG6 utilizando quatro oligonucleotídeos, um par desenhado para amplificar a primeira metade deste gene e um par para amplificar a segunda metade (Figura 3). Dois fragmentos foram gerados por fusão por PCR, cada um contendo uma sequência flanqueadora da região codificante do gene *KU80* e parte do gene de resistência a geneticina.

Os dois fragmentos construídos foram em seguida utilizados para transformação das linhagens JA6 e HP108 de *Kluyveromyces lactis*, com o objetivo de se deletar o gene *KU80*. Essa técnica denominada “*Split-Marker*” (Figura 3) é comumente empregada na deleção gênica em fungos filamentosos (Colot *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2006; B.-J. You *et al.*, 2009; Wanget *al.*, 2010), mas em leveduras os trabalhos relatados se restringem mais a experimentos com *S. cerevisiae* e algumas espécies de *Candida* (Llorente *et al.*, 2002; Walther & Wendland, 2008).

O interesse em deletar o gene *KU80* é justificado pelo papel que o mesmo exerce como heterodímero (Ku70/Ku80) na via de junções de extremidades não-homólogas (NHEJ). No evento de recombinação, esse complexo se liga à extremidade da fita dupla do DNA interrompida, protegendo-a contra degradação constante e favorecendo uma configuração adequada para posterior processamento e ligação de outros complexos importantes (Kegel *et al.*, 2006).

Os tamanhos esperados dos fragmentos de DNA resultantes da amplificação *in vitro* das extremidades da região codificante do gene *KU80* eram de 487 pb para extremidade 3' e 476 pb para a extremidade 5'. Já os tamanhos esperados para a amplificação do gene de resistência a geneticina (*KanMX*) eram de 914 e 1186 pb. Os dois fragmentos gerados a partir desse gene contêm uma região central de sobreposição (homologia). Após a fusão por PCR dos fragmentos da extremidade 5' (487 pb) com o fragmento da primeira parte do gene *KanMX* (914 pb), e do fragmento da extremidade 3' com a segunda parte do gene *KanMX* (1186 pb), foram gerados dois fragmentos maiores, um de 1390 pb e outro de 1672 pb. A Figura 4 mostra a confirmação desses fragmentos, obtidos pela técnica "Split-Marker" utilizando reações de PCR, por eletroforese em gel de agarose.

Os dois fragmentos obtidos por fusão por PCR foram usados para transformar as linhagens de *K. lactis* na expectativa de que *in vivo*, ocorresse a recombinação homóloga entre as regiões sobrepostas do gene marcador de seleção. Dessa forma, um único fragmento resultante dessa primeira recombinação *in vivo* contém a sequência inteira do gene *KanMX* flanqueada pelas extremidade 5' e 3' da região codificante do gene *KU80*. Outra recombinação homóloga é esperada entre essas regiões flangeadoras do gene *KU80* e seu homólogo no genoma, resultando na deleção do gene alvo e sua completa substituição pelo marcador *KanMX* intacto.

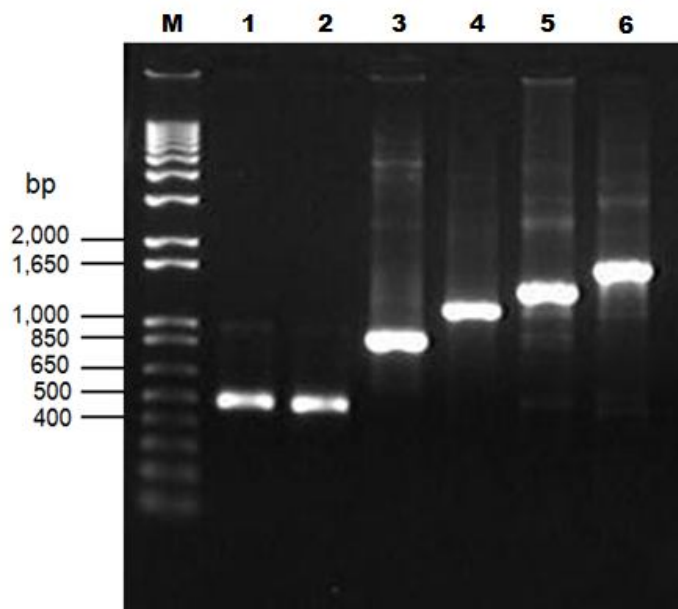


Figura 4: Confirmação dos fragmentos de DNA obtidos pela técnica "Split-Marker" utilizando PCR. **M**, marcador 1 Kb DNA *ladder plus* (Invitrogen). **1** e **2**, produto da amplificação das extremidades 3' (487 pb) e 5' (476 pb), respectivamente,

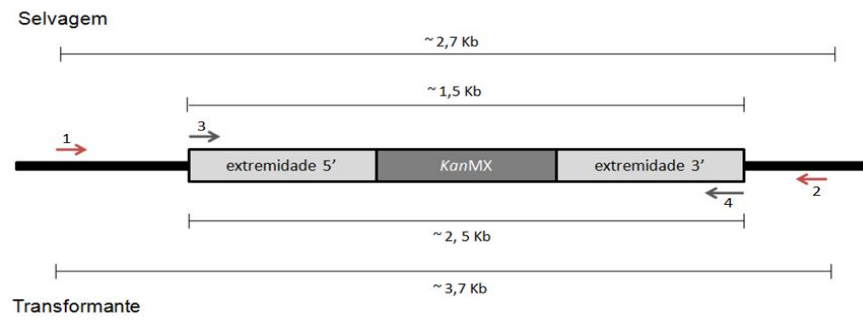
flanqueadoras do gene *KU80*, a partir do DNA genômico da linhagem JA6 de *K. lactis*. **3 e 4**, produto da amplificação do gene de resistência a geneticina (G418) a partir do pUG6, contendo cada fragmento uma região central de sobreposição (914 e 1186 pb, respectivamente). **5 e 6**, fragmentos resultantes da fusão por PCR dos fragmentos **2 e 3** (1390 pb), e **1 e 4** (1672 pb), respectivamente.

A transformação das linhagens de *K. lactis* foi conduzida por eletroporação. Sánchez e colaboradores (1993) estudaram os melhores parâmetros físicos e biológicos envolvendo esse tipo de transformação em células de *K. lactis*, como efeito da concentração de DNA transformante e de células de *K. lactis*, da voltagem e do tempo de pulso.

O procedimento de transformação por eletroporação resultou em 5×10^2 e 3×10^2 transformantes/ μg de DNA nas linhagens JA6 e HP108, respectivamente. Apesar de adotar as melhores condições para transformação proposto por Sánchez e colaboradores (1993), a eficiência de transformação foi baixa. Por outro lado, dos 10 transformantes testados para cada linhagem, todos apresentaram uma frequência de 100% de eficiência de integração gene-específico. Esse resultado foi confirmado por PCR por meio de oligonucleotídeos específicos externos à região codificante do gene *KU80* desenhados a partir da sequência depositada em bancos de dados (Figura 5).

O tamanho do gene *KU80* na linhagem parental é de 2.959 pb. Os oligonucleotídeos desenhados para confirmação da inserção da construção de deleção são externos à região codificante, e amplificam na linhagem parental um fragmento de aproximadamente 2,7 Kb. A construção de deleção contendo o gene *KanMX* e as extremidades da região codificante do gene *KU80* apresenta um tamanho de 2.5 Kb, resultando na amplificação de um fragmento de cerca de 3,7 Kb ao se utilizar, para os transformantes os mesmos oligonucleotídeos externos (Figura 5). Esse resultado confirmou, portanto, a integração gene-específica e a deleção do gene *KU80*.

A confirmação dos transformantes $\Delta ku80$ também foi realizada com os oligonucleotídeos KU8055FFP1-F e KU8033RP2-R (Tabela 2). Esses oligonucleotídeos, usados na reação de *Split-Marker*, amplificam na linhagem parental JA6 um fragmento de aproximadamente 1,5 Kb. Nos transformantes que tiveram o gene *KU80* interrompido com a construção de deleção, os mesmos oligonucleotídeos geraram fragmentos maiores, confirmando mais uma vez a integração gene-específica e a consequente deleção do gene *KU80*.



1. KU80FT5F2 - F	+	-	+	-	+	-	+
2. KU80FT5F2 - R	+	-	+	-	+	-	+
3. KU8055FFP1 - F	-	+	-	+	-	+	-
4. KU8035FRP1 - R	-	+	-	+	-	+	-

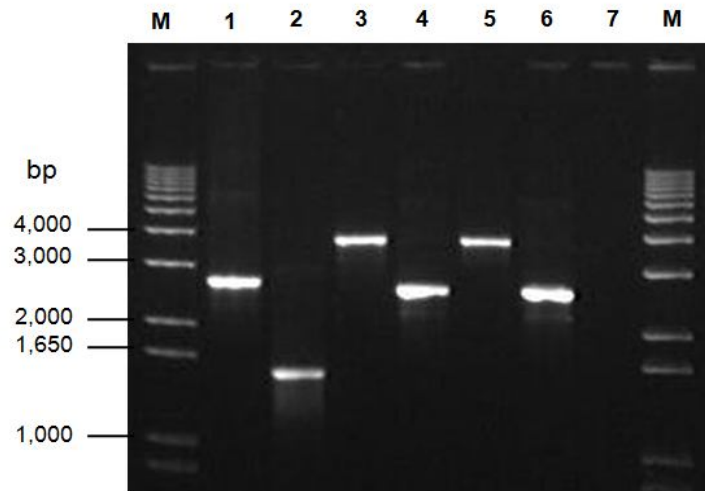


Figura 5: Produtos da amplificação do gene *KU80* do DNA genômico de *K. lactis* com oligonucleotídeos externos à região codificante (KU80FT5F2-F e KU80FT5F2-R) e oligonucleotídeos das extremidades da região interna, usados no *Split-Marker* (KU8055FFP1-F e KU8035FRP1-R). **M**, marcador 1 Kb DNA *ladder plus* (Invitrogen). **1** e **2**, linhagem JA6 parental. **3** e **4**, linhagem transformante JA6Δ*KU80*. **5** e **6**, linhagem transformante HP108Δ*KU80*. **7**, controle negativo.

4.1.1 Estabilidade dos transformantes

Após três repicagens em meio sólido não seletivo, as linhagens de *K. lactis* Δ*ku80* foram capazes de crescer em meio seletivo contendo 200 μg.mL⁻¹ de geneticina. Esse fenótipo indica a capacidade das linhagens em manter o cassete no genoma ao longo de várias gerações.

4.1.2 Sensibilidade de *K. lactis* JA6ΔKU80 e HP108ΔKU80 à radiação ultra-violeta

As linhagens de *K. lactis* mutantes JA6ΔKU80 e HP108ΔKU80, e suas respectivas linhagens parentais, foram submetidas a intervalos de 2-10 minutos de intensa radiação *uv*. O número de colônias após três dias de crescimento foi usado para calcular a porcentagem de sobrevivência em relação às amostras não submetidas à luz *uv*. Os resultados estão apresentados na Figura 6.

A exposição à radiação ultra-violeta das linhagens de *K. lactis* mostrou que as linhagens mutantes (JA6ΔKU80 e HP108ΔKU80) foram, de forma geral, mais sensíveis à luz *uv* nos intervalos de 2-6 minutos do que as respectivas cepas parentais. Em particular a linhagem JA6 e seu mutante *KU80*, mostrou uma queda expressiva na sobrevivência no intervalo de 2-4 minutos (Figura 6). Nos intervalos posteriores, a porcentagem de sobrevivência diminuiu de maneira similar nas linhagens mutantes e parentais. Nota-se, no entanto, que as linhagens HP108 e HP108ΔKU80, são mais resistentes à radiação ultra-violeta que a linhagem JA6 e seu mutante *KU80*. Esse resultado não era esperado.

É bem estabelecido que a luz *uv* causa danos ao DNA principalmente pela formação de dímeros de timina (Sinha & Häder, 2002). A tentativa de reparar os dímeros de timina formados pode levar à mutação no DNA. Caso a polimerase não transpasse o erro, pode ocorrer também o bloqueio da replicação e da transcrição (Snyder & Champness, 2007). O aumento na incidência de luz *uv* pode causar acúmulo de danos elevar à lesões mais severas no DNA, como a quebra da fita dupla (Sinha & Häder, 2002). Se estiver ocorrendo o processo de replicação, por exemplo, e esse processo for bloqueado, a dupla fita de DNA poderá estar aberta na região onde está ocorrendo a replicação, e essa região do DNA que se encontra sob a forma de DNA fita simples pode sofrer quebra. Portanto, o acúmulo de danos pode levar a quebras na fita dupla de DNA. As vias de recombinação homóloga (HR) e de junções de extremidades não-homólogas (NHEJ) estão envolvidas no reparo da quebra de fita dupla (Kegel *et al.*, 2006).

Em *K. lactis*, a via NHEJ parece ser preferencialmente usada para o reparo de quebra de fita dupla de DNA (Kooistra *et al.*, 2004; Kegel *et al.*, 2006). Como as linhagens JA6ΔKU80 e HP108ΔKU80 são deficientes para formação do heterodímero Ku70/Ku80, é esperado que essas linhagens sejam mais sensíveis a radiação. Isso parece ocorrer nos primeiros minutos de exposição à *uv* (Figura 6). Entretanto, observa-se que na medida em que a exposição continua, há uma redução na sensibilidade, possivelmente devido a uma indução da via HR. Resultados semelhantes foram obtidos quando linhagens *K. lactis* CBSΔKU80 foram submetidas à

irradiação ionizante (Raio-X) (Kooistra *et al.*, 2004). A menor sensibilidade à radiação *uv* apresentada pela linhagem HP108 e HP108 Δ KU80 em relação às JA6 e JA6 Δ KU80 pode sugerir uma indução mais rápida da via HR.

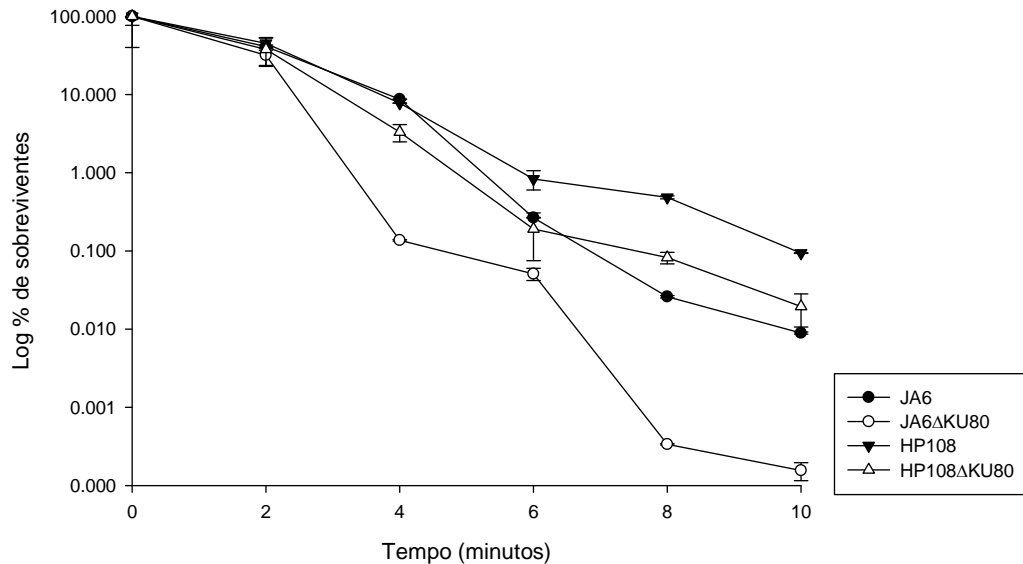


Figura 6: Curva de sobrevivência de linhagens *K. lactis* selvagens JA6 e HP108 e transformantes JA6 Δ KU80 e HP108 Δ KU80 submetidas à radiação *uv*.

4.2. Clonagem do gene da pectina liase (*plg1*) nos vetores pKLAC1 e pKLAC1/cStp

A amplificação *in vitro* do gene que codifica a pectina liase a partir do vetor pGEM/*plg1* resultou em um fragmento de aproximadamente 1,1 Kb, conforme apresentado na Figura 7.

O gene foi amplificado com oligonucleotídeos que adicionam sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição *XhoI* e *BglII* para posterior clonagem no vetor pKLAC1. Para a clonagem no vetor pKLAC1/cStp, isto é, pKLAC1 contendo o *core* da estreptavidina, foram usados os oligonucleotídeos que adicionam sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição *BglII* e *KpnI*.

O fragmento de aproximadamente 1,1 Kb liberado e separado em gel de agarose 0,8 % (p/v), foi purificado e submetido à reação de ligação com os plasmídeos pKLAC1 e pKLAC1/cStp, hidrolisado com as mesmas endonucleases usadas para a

hidrólise do fragmento. Para obter os vetores com os respectivos genes de interesse, a mistura da reação de ligação foi utilizada para transformar células de *E. coli* DH5 α .

Após transformação de células de *E. coli* com os vetores pKLAC1/Plg1 e pKLAC1/cStp-Plg1, as colônias transformantes foram submetidas a extração de DNA plasmidial e análise de restrição para confirmar a inserção do gene *plg1* nos vetores pKLAC1 e pKLAC1/cStp.

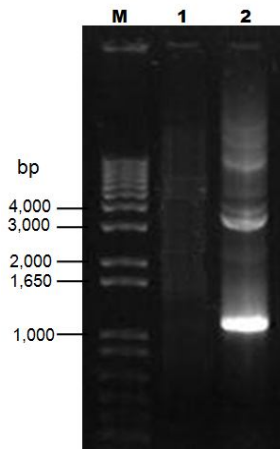


Figura 7: Confirmação da amplificação por PCR do cDNA que corresponde à sequência aberta de leitura do gene da pectina liase por eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v) em tampão TBE 1X. **M**, marcador 1 Kb DNA *ladder plus* (Invitrogen). **1**, controle negativo. **2**, produto de amplificação do gene *plg1* (1,073Kb).

4.2.1 Confirmação da clonagem do gene *plg1* nos vetores pKLAC1 e pKLAC1/cStp

A análise de restrição dos vetores extraídos de células de *E. coli* transformantes pode ser observada na Figura 8. A hidrólise do vetor pKLAC1/Plg1 com as endonucleases *XhoI* e *BglII* liberou um fragmento de cerca de 1,1 Kb, referente ao gene da pectina liase (*plg1*) (Figura 8, canaleta 4).

A hidrólise do vetor pKLAC1/cStp-Plg1 com as enzimas *XhoI* e *KpnI* resultou na liberação da fusão cStp-Plg1, de aproximadamente 1,5 Kb (Figura 8, canaleta 3).

Além da análise do padrão de restrição, os vetores construídos foram sequenciados para confirmação da clonagem. A Figura 9 mostra o alinhamento da sequência obtida do vetor pKLAC1/Plg1 com a sequência de nucleotídeos do gene da pectina liase de *P. griseoroseum* depositada no *GenBank*, e o alinhamento da sequência obtida do vetor pKLAC1/cStp-Plg1, contendo ambas sequências do domínio

de afinidade da estreptavidina pela biotina (cStp) de *S. avidinii* e do gene da pectina liase.

Após a análise dos cromatogramas das reações de sequenciamento foi verificado que uma pequena parte central dos fragmentos clonados não foi seqüenciada. Mas o alinhamento da região seqüenciada com a seqüência de nucleotídeos dos genes *plg1* de *P. griseoroseum* e *core* estreptavidina de *S. avidinii* correspondentes apresentou 100 % de identidade.

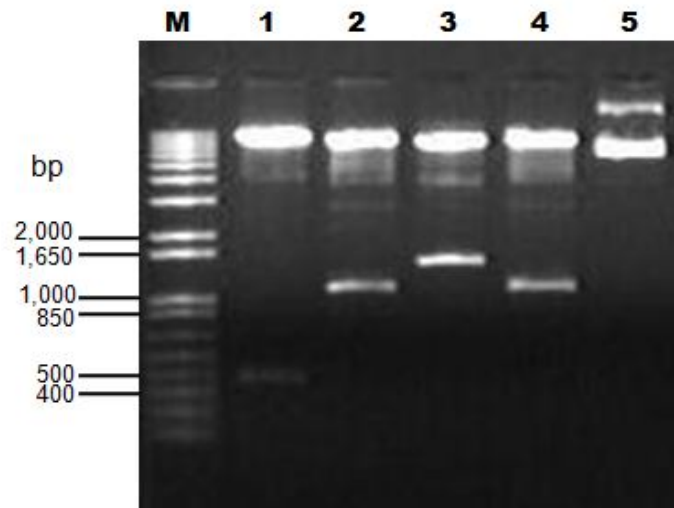


Figura 8: Padrão de restrição dos vetores pKLAC1/cStp-Plg1 e pKLAC1/Plg1 com: **1**, *XhoI* e *BglII*, (fragmento de DNA de cerca de 355 pb referente ao core da estreptavidina - cStp). **2**, *BglII* e *KpnI*, (fragmento de DNA de cerca de 1,1 Kb referente ao gene da pectina liase – *plg1*). **3**, *XhoI* e *KpnI*, (fragmento de DNA de cerca de 1,5 Kb referente a fusão cStp-Plg1). **4**, pKLAC1/Plg1 hidrolisado com as endonucleases de restrição *XhoI* e *BglII* mostrando o fragmento de DNA de cerca de 1,1 Kb referente ao gene *plg1*. **5**, pKLAC1/cStp-Plg1 sem clivar, como controle positivo. **M**, marcador 1 Kb DNA ladder plus (Invitrogen).

Como o seqüenciamento dos nucleotídeos iniciais não apresentou boa resolução dos picos no cromatograma, não foi possível confirmar a posição do gene *plg1* clonado no pKLAC1, isto é, se o códon inicial de leitura estava em fase com o domínio *Mating- α -factor* de *K. lactis*, presente neste vetor. Este domínio é um peptídeo sinal, que fusionado à proteína, direciona a mesma à via secretória (Colussi & Taron, 2005). Para a construção pKLAC1/cStp essa clonagem em fase já havia sido confirmada (Rosa, 2007).

A

```
Query 1 ATGAAGATCGCCGCTATCTTTGCAGCACTCGCTGTGCGAGCTGCCGCCGTGGTGTCAACC 60
      |||
Sbjct 1 ATGAAGATCGCCGCTATCTTTGCAGCACTCGCTGTGCGAGCTGCCGCCGTGGTGTCAACC 60

Query 61 GGCGCCGACAGAGGGTTTCGCCAAGGGCGTCACTGGTGGTGGCTCTGCCACCCCTGTCTAC 120
      |||
Sbjct 61 GGCGCCGACAGAGGGTTTCGCCAAGGGCGTCACTGGTGGTGGCTCTGCCACCCCTGTCTAC 120

Query 121 CCCAGCACACAGCCGAGCTGGTCTCGTACCTGGGTGACTCTTCCCCTCGTGTCAATTATT 180
      |||
Sbjct 121 CCCAGCACACAGCCGAGCTGGTCTCGTACCTGGGTGACTCTTCCCCTCGTGTCAATTATT 180

Query 181 CTCACCAAGACCTTCGACTTCACCGGTACTGAGGGAACCTACCTCCGCCACTGGCTGCGCT 240
      |||
Sbjct 181 CTCACCAAGACCTTCGACTTCACCGGTACTGAGGGAACCTACCTCCGCCACTGGCTGCGCT 240

Query 241 CTTGGGGTACTGCCTCGCTTGTGAGGTTGCCATCAACCAGAACAACCTGGTGCAGAACTA 300
      |||
Sbjct 241 CTTGGGGTACTGCCTCGCTTGTGAGGTTGCCATCAACCAGAACAACCTGGTGCAGAACTA 300

Query 301 CGAGCCGAACGCGCCCTCACCT 322
      |||
Sbjct 301 CGAGCCGAACGCGCCCTCACCT 322

Query 323 CCTCCAAGCGTGTCACTATCTCCAACAGCTTCATCAACGGTGCCAGCGACTACTCCGCCA 382
      |||
Sbjct 611 CCTCCAAGCGTGTCACTATCTCCAACAGCTTCATCAACGGTGCCAGCGACTACTCCGCCA 670

Query 383 CCTGCAACGGATACCACTACTGGGGTGTCTACCTTGATGGATCCAGCGATCTCGTTACCA 442
      |||
Sbjct 671 CCTGCAACGGATACCACTACTGGGGTGTCTACCTTGATGGATCCAGCGATCTCGTTACCA 730

Query 443 TGAAGGGCAACTACATCTACCACACCAAGTGGACGTGCCCCCAAGGTTAGGGCAACACCC 502
      |||
Sbjct 731 TGAAGGGCAACTACATCTACCACACCAAGTGGACGTGCCCCCAAGGTTAGGGCAACACCC 790

Query 503 TTCTCCACGCTGTCAACAACACTACTGGTTCAGAACTCCGGCCACGCTTCGAGATCGGCG 562
      |||
Sbjct 791 TTCTCCACGCTGTCAACAACACTACTGGTTCAGAACTCCGGCCACGCTTCGAGATCGGCG 850

Query 563 CTGGTGGCTACGTCCTCGCTGAGGGTAACGTGTTCAGAACATGTTGCTTCTGTGAGAGA 622
      |||
Sbjct 851 CTGGTGGCTACGTCCTCGCTGAGGGTAACGTGTTCAGAACATGTTGCTTCTGTGAGAGA 910

Query 623 CTCCTATTGCTGGACAGTTGTTCTCCTCCCCGATAGCACCACCAACGCTGTCTGCAGCT 682
      |||
Sbjct 911 CTCCTATTGCTGGACAGTTGTTCTCCTCCCCGATAGCACCACCAACGCTGTCTGCAGCT 970

Query 683 CTCACCTCGGCCGTGCCTGCCAGCTCAATGGATTTCGGATCTTCCGGAACCTTCGATGGCC 742
      |||
Sbjct 971 CTCACCTCGGCCGTGCCTGCCAGCTCAATGGATTTCGGATCTTCCGGAACCTTCGATGGCC 1030

Query 743 GTGCTGATACTGCATTCTTGGCCAACCTTGTGCTGGAAGAACATGCTTCTGCTTCCGCTT 802
      |||
Sbjct 1031 GTGCTGATACTGCATTCTTGGCCAACCTTGTGCTGGAAGAACATGCTTCTGCTTCCGCTT 1090

Query 803 ACACTTCCGTTGTTGCCAGTGTAAACGCTAACGCTGGTCAGGGTAAGCTTTGA 855
      |||
Sbjct 1091 ACACTTCCGTTGTTGCCAGTGTAAACGCTAACGCTGGTCAGGGTAAGCTTTGA 1143
```

B

```

Query 1 GGCATCACCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCTGACCGGGGCGCC 60
      |||
Sbjct 1 GGCATCACCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCTGACCGGGGCGCC 60

Query 61 GACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTC 120
      |||
Sbjct 61 GACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTC 120

Query 121 CTGACCGGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGG 180
      |||
Sbjct 121 CTGACCGGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGG 180

Query 181 ACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAG 240
      |||
Sbjct 181 ACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAG 240

Query 241 TACGTCGGCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGCTGACCTCCGGCACCACC 300
      |||
Sbjct 241 TACGTCGGCGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGCTGACCTCCGGCACCACC 300

Query 301 GAGGCCAACGCCTGGAAGTCCACGCTGGTCGGCCACGACACCTTCACCAAGGTGAGATCT 360
      |||
Sbjct 301 GAGGCCAACGCCTGGAAGTCCACGCTGGTCGGCCACGACACCTTCACCAAGGTG----- 354

Query 361 ATGAAGATCGCCGCTATCTTTGCAGCACTCGCTGTGCGAGCTGCCGCCGTCGGTGTACC 420
      |||
Sbjct 355 ATGAAGATCGCCGCTATCTTTGCAGCACTCGCTGTGCGAGCTGCCGCCGTCGGTGTACC 414

Query 421 GGCGCCGAGAGGGTTTCGCCAAGGGCGTCACTGGTGGTGGCTCTGCCACCCCTGTCTAC 480
      |||
Sbjct 415 GGCGCCGAGAGGGTTTCGCCAAGGGCGTCACTGGTGGTGGCTCTGCCACCCCTGTCTAC 474

Query 481 CCCAGCACACAGCCGAGCTGGTCTCGTACCTGGGTGACTCTTCCCTCGTGTCTATTATT 540
      |||
Sbjct 475 CCCAGCACACAGCCGAGCTGGTCTCGTACCTGGGTGACTCTTCCCTCGTGTCTATTATT 534

Query 541 CTCACCAAGACCTTCGACTTCACCGTACTGAGGGAACCTCCTCCGCCACTGGCTGCGCT 600
      |||
Sbjct 535 CTCACCAAGACCTTCGACTTCACCGTACTGAGGGAACCTCCTCCGCCACTGGCTGCGCT 594

Query 601 CTTGGGGTACTGCCTCGCTTGTGAGTTGCCATCAACCAGAACAACCTGGTGCCAGAACTA 660
      |||
Sbjct 595 CTTGGGGTACTGCCTCGCTTGTGAGTTGCCATCAACCAGAACAACCTGGTGCCAGAACTA 654

Query 661 CGAGCCGAACGCGCCCTC 678
      |||
Sbjct 655 CGAGCCGAACGCGCCCTC 672

Query 678 CTCCAAGCGTGTCACTATCTCCAACAGCTTCATCAACGGTGCCAGCGACTACTCCGCCAC 737
      |||
Sbjct 966 CTCCAAGCGTGTCACTATCTCCAACAGCTTCATCAACGGTGCCAGCGACTACTCCGCCAC 1025

Query 738 CTGCAACGGATACCACTACTGGGGTGTCTACCTTGATGGATCCAGCGATCTCGTTACCAT 797
      |||
Sbjct 1026 CTGCAACGGATACCACTACTGGGGTGTCTACCTTGATGGATCCAGCGATCTCGTTACCAT 1085

Query 798 GAAGGGCAACTACATCTACCACACCACTGAGCGTGCACCGGTCAGGGCAACACCCT 857
      |||
Sbjct 1086 GAAGGGCAACTACATCTACCACACCACTGAGCGTGCACCGGTCAGGGCAACACCCT 1145

Query 858 TCTCCACGCTGTCAACAACCTACTGGTTCCAGAACTCCGGCCACGCCTTCGAGATCGGGCGC 917
      |||
Sbjct 1146 TCTCCACGCTGTCAACAACCTACTGGTTCCAGAACTCCGGCCACGCCTTCGAGATCGGGCGC 1205

Query 918 TGGTGGCTACGTCTCGCTGAGGGTAACGTGTTCCAGAACATTGTTGCTTCTGTGCGAGAC 977
      |||
Sbjct 1206 TGGTGGCTACGTCTCGCTGAGGGTAACGTGTTCCAGAACATTGTTGCTTCTGTGCGAGAC 1265

```

```

Query 978 TCCTATTGCTGGACAGTTGTTCTCTCCCCGATAGCACCACCAACGCTGTCTGCAGCTC 1037
          |||
Sbjct 1266 TCCTATTGCTGGACAGTTGTTCTCTCCCCGATAGCACCACCAACGCTGTCTGCAGCTC 1325

Query 1038 TCACCTCGGCCGTGCCTGCCAGCTCAATGGATTTCGGATCTTCCGGAACCTTCGATGGCCG 1097
          |||
Sbjct 1326 TCACCTCGGCCGTGCCTGCCAGCTCAATGGATTTCGGATCTTCCGGAACCTTCGATGGCCG 1385

Query 1098 TGCTGATACTGCATTCTTGGCCAACCTTGGCTGAAAGAACATTGCTTCTGCTTCCGCTTA 1157
          |||
Sbjct 1386 TGCTGATACTGCATTCTTGGCCAACCTTGGCTGAAAGAACATTGCTTCTGCTTCCGCTTA 1445

Query 1158 CACTTCCGTTGTTGCCAGTGTAAACGCTAACGCTGGTCAGGGTAAGCTTTGA 1209
          |||
Sbjct 1446 CACTTCCGTTGTTGCCAGTGTAAACGCTAACGCTGGTCAGGGTAAGCTTTGA 1497

```

Figura 9: Alinhamento da sequência do fragmento contido no vetor pKLAC1/Plg1 (A) utilizando o programa BlastT. *Query*: Fragmento sequenciado. *Subjct*: Sequência da pectina liase (*GenBank* n^o AF502279.1). Alinhamento da sequência do fragmento contido no vetor pKLAC1/cStp-Plg1 (B). *Query*: Fragmento sequenciado. *Subjct*: Sequência da estreptavidina (1 a 355 pb, em box cinza) (*GenBank* n^o X03591) e da pectina liase.

A Figura 10 mostra a sequência de aminoácidos deduzida dos fragmentos sequenciados dos vetores pKLAC1/Plg1 e pKLAC1/cStp-Plg1 utilizando o programa BioEdit (Fonte: <http://mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

A

```

1      ATGAAGATCGCCGCTATCTTTGCGAGCACTCGCTGTGCGAGCTGCCGCCGTGGTGTCCACC
1      M K I A A I F A A L A V R A A A V G V T

61     GCGCCGCGAGAGGGTTTCGCCAAGGGCGTCACTGGTGGTGGCTCTGCCACCCCTGTCTAC
21     G A A E G F A K G V T G G G S A T P V Y

121    CCCAGCACACAGCCGAGCTGGTCTCGTACCTGGGTGACTCTTCCCCTCGTGTCAATTATT
41     P S T T A E L V S Y L G D S S P R V I I

181    CTCACCAAGACCTTTCGACTTTCACCGGTACTGAGGGAACCTCCGCCACTGGCTGCGCT
61     L T K T F D F T G T E G T T S A T G C A

241    CTTGGGGTACTGCCTCGCTTGTGTCAGGTTGCCATCAACCAGAACAACCTGGTGCCAGAACTA
81     L G V L P R L S G C H Q P E Q L V P E L

301    CGAGCCGAACGCGCCCTCACCT
101    R A E R A L T

321    TCCAAGCGTGTCACTATCTCCAACAGCTTCATCAACGGTGCCAGCGACTACTCCGCCACC
1     S K R V T I S N S F I N G A S D Y S A T

381    TGCAACGGATACTACTGTTGGGTGTCTACCTTGATGGATCCAGCGATCTCGTTACCATG
21    C N G Y H Y W G V Y L D G S S D L V T M

441    AAGGGCAACTACATCTACCACACCAGTGGACGTGCCCCCAAGGTTTCAGGGCAACACCCTT
41    K G N Y I Y H T S G R A P K V Q G N T L

```


501 CTCCACGCTGTCAACAACACTACTGGTTCCAGAACTCCGGCCACGCCTTCGAGATCGGCGCT
 61 L H A V N N Y W F Q N S G H A F E I G A

 561 GGTGGCTACGTCTCGCTGAGGGTAACGTGTTCAGAACATTGTTGCTTCTGTGAGACT
 81 G G Y V L A E G N V F Q N I V A S V E T

 621 CCTATTGCTGGACAGTTGTTCTCCTCCCCGATAGCACCACCAACGCTGTCTGCAGCTCT
 101 P I A G Q L F S S P D S T T N A V C S S

 681 CACCTCGGCCGTGCCTGCCAGCTCAATGGATTCCGATCTTCCGGAACCTTCGATGGCCGT
 121 H L G R A C Q L N G F G S S G T F D G R

 741 GCTGATACTGCATTCTTGGCCAACTTTGCTGGAAAAGAACATTGCTTCTGCTTCCGCTTAC
 141 A D T A F L A N F A G K N I A S A S A Y

 801 ACTTCCGTTGTTGCCAGTGTTAACGCTAACGCTGGTCAGGGTAAGCTTTGA
 161 T S V V A S V N A N A G Q G K L *

B

1 GGCATCACCGGCACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGGGGCGCC
 1 G I T G T W Y N Q L G S T F I V T A G A

 61 GACGGCGCCCTGACCGGAACCTACGAGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTC
 21 D G A L T G T Y E S A V G N A E S R Y V

 121 CTGACCGGTCGTTACGACAGCGCCCCGGCCACCGACGGCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGG
 41 L T G R Y D S A P A T D G S G T A L G W

 181 ACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACGTGGAGCGGCCAG
 61 T V A W K N N Y R N A H S A T T W S G Q

 241 TACGTCGGCGGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTGCTGACCTCCGGCACCACC
 81 Y V G G A E A R I N T Q W L L T S G T T

 301 GAGGCCAACGCCTGGAAGTCCACGCTGGTTCGGCCACGACACCTTCACCAAGGTGAGATCT
 101 E A N A W K S T L V G H D T F T K V R S

 361 ATGAAGATCGCCGCTATCTTTGACGACTCGCTGTGCGAGCTGCCGCCGTCGGTGTCCACC
 121 M K I A A I F A A L A V R A A A V G V T

 421 GGCGCCGAGAGGGTTTCGCCAAGGGCGTCACTGGTGGTGGCTCTGCCACCCTGTCTAC
 141 G A A E G F A K G V T G G G S A T P V Y

 481 CCCAGCACACAGCCGAGCTGGTCTCGTACCTGGGTGACTCTTCCCCTCGTGTATTATT
 161 P S T T A E L V S Y L G D S S P R V I I

 541 CTCACCAAGACCTTCGACTTCACCGGTACTGAGGGAACCTCCGCCACTGGCTGCGCT
 181 L T K T F D F T G T E G T T S A T G C A

 601 CTTGGGGTACTGCCTCGCTTGTGAGGTTGCCATCAACCAGAACAACCTGGTGCCAGAACTA
 201 L G V L P R L S G C H Q P E Q L V P E L

 661 CGAGCCGAACGCGCCCTC
 221 R A E R A L

 681 TCCAAGCGTGTCACTATCTCCAACAGCTTCATCAACGGTGCCAGCGACTACTCCGCCACC
 1 S K R V T I S N S F I N G A S D Y S A T

```

741      TGCAACGGATACCACTACTGGGGTGTCTACCTTGATGGATCCAGCGATCTCGTTACCATG
21      C N G Y H Y W G V Y L D G S S D L V T M

801      AAGGGCAACTACATCTACCACACCAGTGGACGTGCCCCCAAGGTTTCAGGGCAACACCCTT
41      K G N Y I Y H T S G R A P K V Q G N T L

861      CTCCACGCTGTCAACAACACTACTGGTTCCAGAACTCCGGCCACGCCTTCGAGATCGGGCGCT
61      L H A V N N Y W F Q N S G H A F E I G A

921      GGTGGCTACGTCCCTCGCTGAGGGTAACGTGTTCCAGAACATTGTTGCTTCTGTTCGAGACT
81      G G Y V L A E G N V F Q N I V A S V E T

981      CCTATTGCTGGACAGTTGTTCTCTCCTCCCCGATAGCACCACCAACGCTGTCTGCAGCTCT
101     P I A G Q L F S S P D S T T N A V C S S

1041     CACCTCGGCCGTGCCCTGCCAGCTCAATGGATTCCGATCTTCCGGAACCTTCGATGGCCGT
121     H L G R A C Q L N G F G S S G T F D G R

1101     GCTGATACTGCATTCTTGCCAACTTTGCTGGAAGAACATTGCTTCTGCTTCCGCTTAC
141     A D T A F L A N F A G K N I A S A S A Y

1161     ACTTCCGTTGTTGCCAGTGTAAACGCTAACGCTGGTCAGGGTAAGCTTTGA
161     T S V V A S V N A N A G Q G K L *

```

Figura 10: Sequência de aminoácidos deduzida a partir do fragmento de DNA amplificado que corresponde ao gene da pectina liase (A) e ao *core* da estreptavidina (1 a 355 pb em box cinza) ligado ao gene da pectina liase (B).

4.3. Transformação e eficiência de integração gene-específica das linhagens JA6 e HP108 parentais e $\Delta ku80$ com os vetores pKLAC1/cStp-Plg1 e pKLAC1/Plg1

Os plasmídeos pKLAC1/Plg1 e pKLAC1/cStp-Plg1 foram linearizados para transformação das linhagens selvagens JA6 e HP108, e mutantes JA6 Δ KU80 e HP1 Δ KU80. O vetor de expressão pKLAC1 foi linearizado de forma que o cassete resultante contivesse o gene de interesse, seguido pelo gene *amdS* de *Aspergillus nidulans*, flanqueados pelas regiões 3'_{LAC4} e 5'_{LAC4}. Essas regiões direcionam a integração do cassete de expressão por recombinação homóloga na região promotora do gene *LAC4*. A recombinação homóloga nessa região é imprescindível para a reconstituição do promotor e a expressão do gene de interesse.

Para linearização do pKLAC1/Plg1 usou-se inicialmente a endonuclease de restrição SacI. Entretanto ao verificar que esta enzima hidrolisa a sequência do *core* da estreptavidina (cStp), foi necessário utilizar duas endonucleases de restrição para linearização do pKLAC1/cStp-Plg1. Inicialmente o vetor foi linearizado com *Bgl*I, e posteriormente, com *Tth*1111. A Figura 11 é uma representação esquemática da integração do cassete de expressão linearizado no promotor do gene *LAC4*.

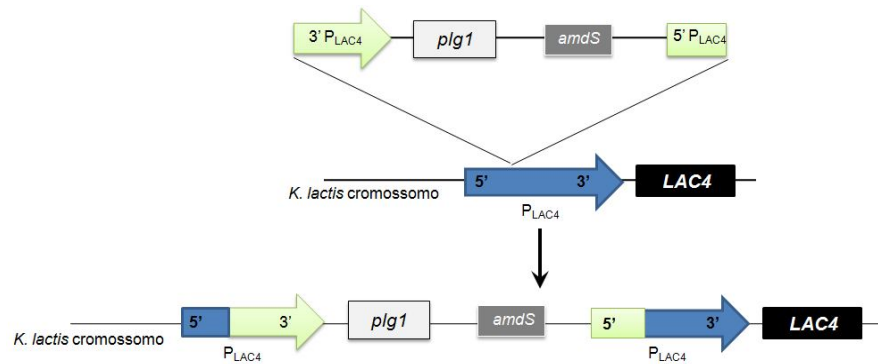


Figura 11: Esquema indicando a integração do cassete de expressão linearizado no promotor do gene *LAC4*. (*amdS* – gene marcador; *plg1* – gene da pectina liase; *LAC4* – gene da β -galactosidase). Adaptado de Manual de Instruções, New England Biolabs (2009).

O procedimento de transformação por eletroporação das cepas de *K. lactis* foi o mesmo utilizado para deleção do gene *KU80* pela técnica *Split-Marker*. As leveduras transformantes foram selecionadas em placas de meio YCB sólido contendo acetamida como única fonte de nitrogênio. O gene da acetamidase fúngica (*amdS*) presente no cassete de expressão permite que os transformantes hidrolisem a acetamida liberando amônia que pode então ser usada como fonte de nitrogênio. Apenas transformantes expressando o gene da acetamidase são capazes de crescer nesse meio seletivo. No entanto, para evitar seleção de células crescendo em traços residuais de amônia do meio sintético e garantir que as colônias analisadas eram de fato transformantes, apenas as colônias maiores foram repicadas em nova placa contendo o mesmo meio suplementado com acetamida. As colônias menores presentes na placa de transformação foram descartadas.

A eficiência de transformação nas cepas $\Delta ku80$ foi maior em relação às respectivas cepas selvagens, como mostra a Tabela 3. Esse resultado sugere maior eficiência de integração gene-específico, visto ser necessário ocorrer a integração correta do cassete de integração para que haja expressão do gene da acetamidase, necessária ao crescimento no meio seletivo YCB.

Para avaliar a eficiência de integração no gene alvo, de cada linhagem transformante foram repicadas 10 colônias em nova placa contendo meio YCB suplementado com 5 mM de acetamida. A confirmação da integração do cassete de expressão foi feita por PCR a partir do DNA genômico dos transformantes (Figura 12), utilizando-se o par de oligonucleotídeos INTEG Primer 1 – F e INTEG Primer 2 – R

(Tabela 2). O fragmento resultante da amplificação usando esses oligonucleotídeos deveria ser de aproximadamente 2,4 Kb de acordo com o manual do fabricante do sistema de expressão de proteínas em *K. lactis*. Porém o fragmento obtido ao se utilizar esses oligonucleotídeos foi de aproximadamente 2,9 Kb. Apenas os transformantes apresentaram o referido fragmento, não houve amplificação utilizando o mesmo par de oligonucleotídeos com o DNA das linhagens parentais (Figura 12).

Tabela 3: Eficiência de transformação das linhagens de *K. lactis*

Linhagens de <i>K. lactis</i>	Número de transformantes (UFC/μg de DNA)
JA6/Plg1	4×10^2
JA6 Δ KU80/Plg1	$1,8 \times 10^3$
JA6/cStp-Plg1	50
JA61 Δ KU80/cStp-Plg1	$2,3 \times 10^3$
HP108/Plg1	5×10^2
HP108 Δ KU80/Plg1	$1,9 \times 10^3$
HP108/cStp-Plg1	3×10^2
HP108 Δ KU80/cStp-Plg1	$2,2 \times 10^3$

As colônias transformantes apresentaram 100 % de eficiência de integração no gene alvo, com exceção da cepa JA6/Plg1e HP108 Δ KU80/Plg1 que apresentaram respectivamente eficiência de 80 e 70 % de integração gene-específico. Portanto, como a eficiência de integração foi semelhante nas células analisadas, o que diferenciou as linhagens transformantes das parentais foi a eficiência de transformação (nº de transformantes/ μ g de DNA), que mostrou ser maior nas cepas mutantes *KU80*.

Em experimentos com *K. lactis* CBS2359 a eficiência de recombinação homóloga mostrou-se dependente do número, em pares de bases, de identidade entre a sequência flanqueadora do DNA exógeno e o genoma da célula hospedeira, alcançando 88 % com 600 pb de homologia (Kooistra *et al.*, 2004).

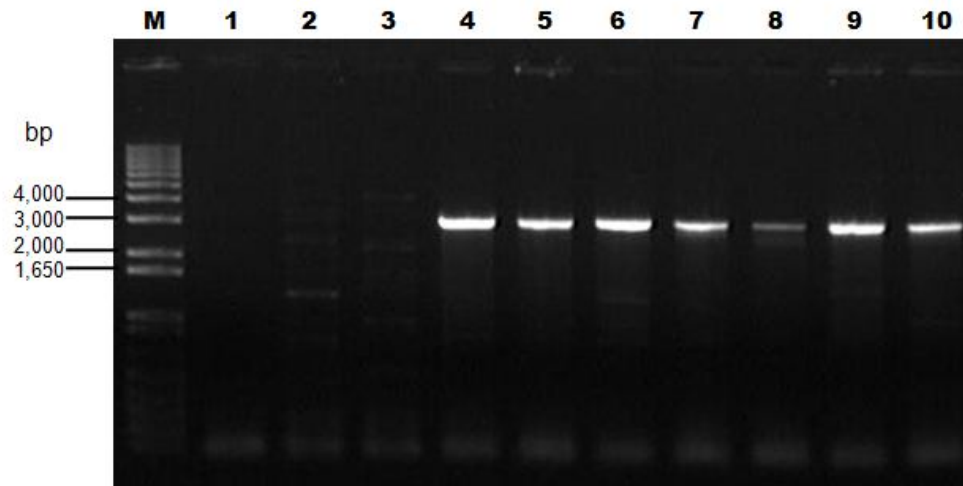


Figura 12: Integração dos cassetes de expressão contendo o gene *plg1* e a fusão cStp-Plg1 nas diferentes linhagens transformantes. **M**, marcador 1 Kb DNA *ladder plus* (Invitrogen). **1**, controle negativo sem DNA. **2 e 3**, controles negativo utilizando o DNA total das linhagens selvagens JA6 e HP108. Produtos da amplificação utilizando DNA total das linhagens transformantes JA6/Plg1 e JA6/cStp-Plg1 (**4 e 5**), JA6ΔKU80/Plg1 e JA6ΔKU80/cStp-Plg1 (**5 e 6**), HP108/Plg1 (**8**) e HP108ΔKU80/Plg1 e HP108ΔKU80/cStp-Plg1 (**9 e 10**).

Os cassetes de expressão resultantes da linearização dos vetores usados para transformação das linhagens selvagens e $\Delta ku80$, apresentam regiões de homologia com o promotor do gene *LAC4* no qual irão se recombinar. Para o cassete resultante da linearização do plasmídeo pKLAC1/Plg1, a sequência de homologia nas extremidades é de 1629 pb para 3'P_{LAC4} e 580 pb para 5'P_{LAC4}. Já a linearização do vetor pKLAC1/cStp-Plg1 resulta numa sequência de homologia de 998 e 269 pb respectivamente. O tamanho da sequência de homologia flanqueadora nos dois cassetes utilizados contribui para uma maior eficiência de integração no gene alvo. No entanto, a ausência de atividade da via NHEJ em mutantes *KU80* deve ter contribuído para aumentar essa eficiência de integração do pKLAC1. Isso explica a razão pela qual quase todos os transformantes analisados apresentaram 100 % de eficiência de integração gene-específica. Se não fosse a ausência da atividade da via NHEJ, a diferença presente na sequência de homologia que flanqueia ambas extremidades de um mesmo cassete, poderia resultar em diferenças na eficiência de integração ao se utilizar um ou outro cassete. Sequências menores de homologia devem ser testadas para avaliar se o efeito da maior eficiência de integração é decorrente apenas da ausência da via NHEJ ou do somatório dessa mutação com a extensão da sequência

de homologia. Essa avaliação é importante no estabelecimento das linhagens de *K. lactis* hospedeiras capazes de expressar em alto nível os genes de interesse.

4.4. Análise da expressão do gene *plg1* e da fusão cStp-Plg1 pela atividade de PL

Para analisar a expressão do gene *plg1* e da fusão cStp-Plg1 clonados nas linhagens de *K. lactis* parentais JA6 e HP108 e transformantes JA6 Δ KU80 e HP108 Δ KU80, a atividade de PL foi determinada tanto no meio de cultura livre de células (sobrenadante) quanto no lisado celular (sedimento após lise), de culturas conduzidas em meio de indução. No sobrenadante não foi detectada atividade de PL. A ausência de atividade no meio extracelular pode estar relacionada com expressão do gene e/ou baixa secreção da proteína devido a posição de clonagem do gene nos vetores pKLAC1. O resultado do seqüenciamento desse vetor não confirmou a clonagem em fase com o domínio *Mating- α -factor* de *K. lactis* (α -MF), presente no vetor pKLAC1. A proteína é expressa fusionada ao α -MF, que irá direcioná-la à via secretória, ocorrendo o processamento por peptidases sinal no retículo endoplasmático e por proteases no complexo de Golgi, resultando na secreção da forma nativa da proteína (*K. lactis* Protein Expression Kit – New England Biolabs, 2009).

Uma colônia de cada placa de transformação das linhagens de *K. lactis* com os vetores pKLAC1/Plg1 e pKLAC1/cStp-Plg1 (JA6/plg1, JA6/cStp-Plg1, HP108/Plg1, HP108/cStp-Plg1, JA6 Δ KU80/plg1, JA6 Δ KU80/cStp-Plg1, HP108 Δ KU80/Plg1 e HP108 Δ KU80/cStp-Plg1) foram escolhidas para indução da expressão e determinação da atividade de PL. Células submetidas à lise celular foram analisadas quanto à atividade de PL.

A Figura 13 mostra as atividades de PL das linhagens HP108/Plg1 e HP108 Δ KU80/cStp-Plg1 em relação a parental HP108 após 72 horas de incubação em meio de indução (YNB + 2 % galactose) do promotor do gene *LAC4*, onde houve a integração do cassete de expressão.

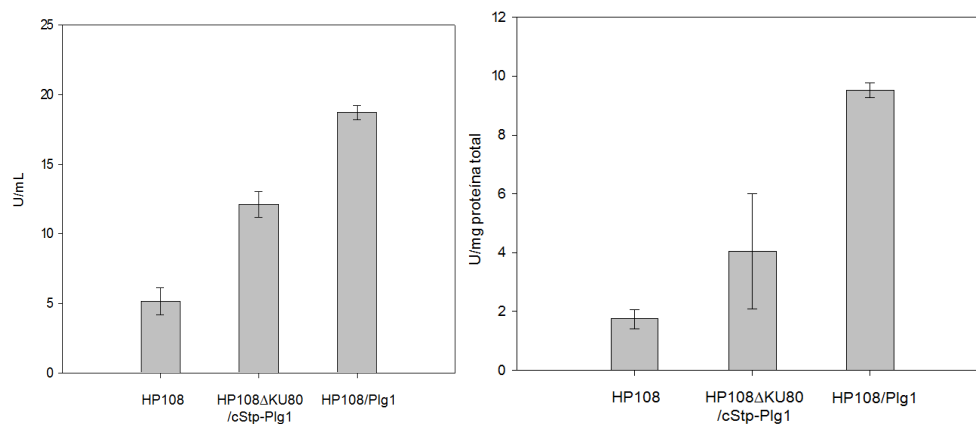


Figura 13: Atividade de pectina liase (PL) de *K. lactis* recombinantes em meio YNB + 2% (p/v) galactose.

Os clones das linhagens transformantes JA6/Plg1 e JA6/cStp-Plg1, bem como JA6ΔKU80/plg1, JA6ΔKU80/cStp-Plg1, não apresentaram atividade de PL significativamente diferente da linhagem parental JA6 pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. Das linhagens HP108/Plg1, HP108/cStp-Plg1, HP108ΔKU80/Plg1 e HP108ΔKU80/cStp-Plg1, apenas HP108/Plg1 e HP108ΔKU80/cStp-Plg1 apresentaram atividade de PL. O clone HP108/Plg1 apresentou valores estatisticamente diferentes dos valores obtidos para linhagem parental HP108 ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F e pelo teste de Tukey. Este clone apresentou atividade específica de PL de 9,525 U.mg⁻¹ de proteína. Esse valor equivale a 18,719 U.mL⁻¹, comparável a de fungos filamentosos produtores desta enzima. Relatos na literatura demonstram a obtenção de 16 U.mL⁻¹ de atividade de pectina liase por *P. griseoroseum* após 48 horas de fermentação (Piccoli-Valle *et al.*, 2001). O clone HP108ΔKU80/cStp-Plg1 no entanto, não é significativamente diferente do parental. Isso pode ser resultante da alta variabilidade entre as repetições dos ensaios de atividade enzimática (Tabela 4).

A baixa atividade ou ausência de atividade de PL na maioria dos transformantes analisados pode ser em decorrência da não-expressão do gene ou de uma forma inativa da enzima. O fato de o resultado da integração do cassete utilizando oligonucleotídeos específicos para análise da integração (Item 4.3) ter apresentado um fragmento de 2,9 Kb ao invés de 2,4 Kb, pode ser uma justificativa da não-expressão do gene. Isso porque a possível ocorrência de erro no evento de recombinação homóloga na região promotora do gene *LAC4* pode ter gerado esse fragmento de 2,9 Kb. No entanto, como o clone HP108/Plg1 mostrou atividade de PL

mesmo apresentando um produto de PCR de 2,9 Kb, a hipótese de reconstituição errônea do promotor durante a recombinação do cassete de expressão não deve ser aplicável a todos os transformantes. Vale ressaltar que a linhagem HP108 é uma linhagem modificada que apresenta uma duplicação gênica da enzima dissulfeto isomerase, envolvida no dobramento de proteínas no retículo endoplasmático. Essa mutação foi demonstrada provocar aumento significativo de produção e secreção de soroalbumina humana (Bao *et al.*, 2000). Neste trabalho, não foi detectado atividade de PL no sobrenadante das culturas, mas atividade intracelular de PL foi detectada em transformantes da linhagem HP108 (HP108/PIg1 e HP108 Δ KU80/cStp-PIg1), indicando produção da enzima nessas linhagens. Já em linhagens derivadas da JA6 o mesmo não foi observado, o que pode ser relacionado ao potencial de produção de linhagens derivadas da HP108. No entanto, mesmo HP108 sendo uma linhagem melhorada não houve detecção de atividade de PL extracelularmente.

Tabela 4: Atividade da pectina liase (PL) em U.mg⁻¹ de proteína após indução por 72 horas em meio YNB + 2 % galactose.

	Repetição		Média ²	Desvio Padrão
	1	2		
HP108	1,980	1,517	1,749 a	0,327
HP108 Δ KU80/cStp-PIg1	5,432	2,663	4,048 a	1,958
HP108/PIg1	9,703	9,347	9,525 b	0,252

¹ U/mg – Unidade de atividade de PL por miligrama de proteínas totais

² Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, a 5%, pelo teste Tukey

Apesar da atividade de enzimas pécnicas serem observadas em várias espécies de leveduras, como em *Kluyveromyces marxianus* ou *Kluyveromyces fragilis*, e espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida* e *Zigosaccharomyces* (Blanco *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2005), a maioria das espécies de leveduras, apresentam apenas atividade de poligalactorunases (PG) (Blanco *et al.* 1999). Somente em algumas espécies foram relatadas a atividade de PL (Silva *et al.*, 2005). Uma pesquisa feita no genoma de *K. lactis* revelou a inexistência de genes anotados relacionados à sequência do gene da pectina liase. Construir linhagens de *K. lactis* capazes de produzir PL contendo domínio de afinidade da estreptavidina pela biotina é uma tecnologia promissora para simultâneo isolamento e imobilização dessa enzima em colunas biotiniladas destinadas ao processamento de sucos na indústria de alimentos. Uma vez obtido células hospedeiras com alta eficiência de transformação e

integração como as linhagens JA6 Δ KU80 e HP108 Δ KU80, melhores resultados de expressão podem ser alcançados não somente com pectina liase, mas com outros genes de enzimas de interesse biotecnológico.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho consistiu na construção de linhagens mutantes para o gene *KU80* de *K. lactis*, com maior eficiência de recombinação homóloga visando melhorar as propriedades dessa levedura como hospedeira para produção de proteínas heterólogas.

A mutação por deleção do gene *KU80*, gene chave para o perfeito funcionamento da via responsável pela integração aleatória do DNA exógeno no genoma hospedeiro, utilizando a técnica *Split-Marker*, foi confirmada em 100 % dos transformantes analisados. Portanto, as linhagens de *K. lactis* JA6Δ*KU80* e HP108Δ*KU80* obtidas constituem potenciais hospedeiras para clonagem de genes de interesse biotecnológico.

A técnica *Split-Marker* constitui um sistema de deleção gênica capaz de funcionar na levedura *K. lactis* quando se utiliza na construção dos cassetes de deleção, contendo sequências do gene de interesse acima de 400 pb flanqueando o gene marcador de resistência. Essa mesma técnica poderá ser testada nas linhagens obtidas para integração de um fragmento contendo um gene de interesse.

A clonagem do gene da pectina liase (*plg1*) nos vetores pKLAC1 e pKLAC1 contendo o domínio de afinidade da estreptavidina pela biotina (cStp) foi confirmada por padrão de restrição e sequenciamento. O resultado do sequenciamento, no entanto, não permite concluir a posição em fase do gene *plg1* no pKLAC1, pois o sequenciamento da região inicial não apresentou bons resultados.

A eficiência de transformação dos mutantes JA6Δ*KU80* e HP108Δ*KU80* com os vetores pKLAC1/*Plg1* e pKLAC1/cStp-*Plg1* foi superior à das linhagens parentais JA6 e HP108. Como o crescimento em meio seletivo contendo acetamida como única fonte de carbono depende da integração do pKLAC1 para expressão do gene da acetamidase, conclui-se que recombinação homóloga nos mutantes *KU80* foi maior

que nas linhagens parentais. Dos transformantes obtidos, a eficiência de integração no gene alvo foi de 100 % para maioria das linhagens, com exceção da cepa JA6/Plg1 e HP108 Δ KU80/Plg1 que apresentaram respectivamente eficiência de 80 e 70 % de integração gene-específico. Como a extensão da sequência de homologia do 3' P_{LAC4} no cassete de expressão é maior que 400 pb, essa característica pode ter contribuído para elevada taxa de integração gene-específica dos transformantes que não são deficientes no gene *KU80*.

O vetor pKLAC1 deve ser linearizado com endonucleases de restrição que resultem em sequências de homologia ao promotor do gene *LAC4* menores que 400 pb flanqueando ambas as extremidades do cassete de integração, para ser testado nas linhagens JA6 Δ KU80 e HP108 Δ KU80. Assim, o efeito da mutação do gene *KU80* no processo de recombinação homóloga nessas linhagens poderá ser melhor avaliado com a integração do vetor pKLAC1.

A atividade de pectina liase (PL) intracelular só foi significativa em relação à parental HP108 para a cepa HP108/Plg1, que demonstrou obtenção de 18,719 U.mL⁻¹ de atividade de PL, com uma atividade específica de 9,525 U.mg⁻¹ proteína. Pela atividade significativa de PL intracelular conclui-se que houve expressão do gene *plg1*, mas a ausência de atividade extracelular sugere problemas na secreção da proteína. Mesmo nas linhagens HP108, melhorada para aumentar os níveis de secreção, não foi detectada atividade de PL extracelularmente.

A alta eficiência de integração gene-específica utilizando o vetor de expressão pKLAC1 em linhagens de *K. lactis* JA6 Δ KU80 e HP108 Δ KU80 não resultou em altos rendimentos de expressão e secreção de pectina liase e da fusão cStp-Plg1. Do total de oito linhagens transformantes analisadas (JA6/plg1, JA6/cStp-Plg1, JA6 Δ KU80/Plg1, JA6 Δ KU80/cStp-Plg1, HP108/Plg1, HP108/cStp-Plg1, HP108 Δ KU80/Plg1 e HP108 Δ KU80/cStp-Plg1, apenas uma apresentou resultados satisfatórios de atividade de PL assim mesmo no lisado celular e não no sobrenadante, como era esperado se a proteína fosse secretada na forma ativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Banat, B.M.A., Nonklang, S., Hoshida, H., & Akada, R. (2010). Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, **27**, 29-39.
- Albersheim, P. & Killias U. (1962). Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **97**, 107-115.
- Aylon, Y. & Kupiec, M. (2004). New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **566**, 231-248.
- Bao, W.G., Huo, K.K., LI Y.Y., & Fukuhara, H. (2000). Protein disulfide isomerase genes of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **16**, 329-341.
- Bartkevičiute, D. & Sasnauskas, K. (2003). Studies of yeast *Kluyveromyces lactis* mutations conferring super-secretion of recombinant proteins. *Yeast*, **20**, 1-11.
- Bazzolli, D.M.S., Ribon, A.O.B., Queiroz, M.V. & Araújo, E.F. (2006). Molecular characterization and expression profile of pectin-lyase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. *Canadian Journal of Microbiology*, **41**, 1070-1077.
- Bazzolli, D.M.S., Ribon, A.O.B., Reis, K.C.P., Queiroz, M.V., & Araújo, E.F. (2008). Differential expression of *plg* genes from *Penicillium griseoroseum*: *plg1* a pectinolytic gene is expressed in sucrose and yeast extract. *Journal of Applied Microbiology*, **105**, 1595-1603.
- Blanco, P., Sieiro, C. & Villa, T.G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, **175**, 1-9.

- Boulton, S.J. & Jackson, S.P. (1996). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Research*, **24**, 4639-4648.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Buckholz, R.G. & Gleeson, M.A.G. (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *BioTechnology*, **9**, 1067–1072.
- Cardoso, P.G., Ribeiro, J.B., Teixeira, J.A., Queiroz, M.V. & Araújo, E.F. (2008). Overexpression of the *plg1* gene encoding pectin lyase in *Penicillium griseoroseum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35**, 159-166.
- Catlett, N.L., Lee, B., Yoder, O.C., & Turgeon. (2002). Split-Marker Recombination for Efficient Targeted Deletion of Fungal Genes. *Fungal Genetics Newsletter*, **50**, 9-11.
- Chen, X.J., Saliola, M., Falcone, C., Biachini, M.M. & Fukuhara, H. (1986). Sequence organization of the circular plasmid pKD1 from the yeast *Kluyveromyces drosophilorum*. *Nucleic Acids Research*, **14**, 4471-4481.
- Clare, D.A., Valentine, V.W., Catignani, G.L. & Swaisgood, H.E. (2001). Molecular design, expression, and affinity immobilization of a trypsin-streptavidin fusion protein. *Enzyme and Microbial Technology*, **28**, 483-491.
- Colot, H.V., Park, G., Turner, G.E., Ringelberg, C., Crew, C.M., Litvinkova, L., Weiss, R., Borkovich, K.A. & Dunlap, J.C. (2006). A High-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 10352-10357.
- Colussi, P.A. & Taron, C.H. (2005). *Kluyveromyces lactis* LAC4 Promoter Variants That Lack Function in Bacteria but Retain Full Function in *K. lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 7092-7098.
- Das, S & Hollenberg, C.P. (1982). A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Current Genetics*, **6**, 123–128.
- Diamandis, E.P. & Christopoulos, T.K. (1991). The Biotin-(Strept) Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. *Clinical Chemistry*, **37**, 625-636.
- Dickson, R.C. & Markin, J.S. (1980). Physiological Studies of β -Galactosidase Induction in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*, **142**, 777-785.

- Dudasova, Z. Dudas, A. & Chovanec.(2004). Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews, **28**, 581-601.
- Fairhead, C., Llorente, B., Denis, F., Soler, M., & Dujon, B. (1996). New Vectors for Combinatorial Deletions in Yeast Chromosomes and for Gap-repair Cloning using "Split-marker Recombination". Yeast, **12**, 1439-1457.
- Falcone, C., Saliola, M., Chen, X.J., Frontali, L. & Fukuhara, H. (1986). Analysis of a 1.6-micron circular plasmid from the yeast *Kluyveromyces drosophilum*: structure and molecular dimorphism. Plasmid, **15**, 248-252.
- Fleer, R., Chen, X.J., Amellal, N., Yeh, P., Fournier, A., Guinet, F., Gault, N., Faucher, D., Folliard, F., Fukuhara, H., & Mayayaux, J.F. (1991a). High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 in *Kluyveromyces lactis*. Gene, **107**, 285-295.
- Fleer, R., Yeh, P., Amellal, N., Maury, I., Fournier, A., Bacchetta, F., Baduel, P., Jung, G., L'Hote, H., Becquart, J., Fukuhara, H., & Mayayaux, J.F. (1991b). Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces lactis* yeasts. BioTechnology, **9**, 968-975.
- Fu, J., Hettler, R. & Wickes, B.L. (2006). Split marker transformation increases homologous frequency in *Cryptococcus neoformans*. Fungal Genetics and Biology, **43**, 200-212.
- Gellissen G. & Hollenberg, C.P. (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review. Gene, **190**, 87-97.
- Godecke, A., Zachariae, W., Arvanitidis, A. & Breunig, K.D. (1991). Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactosidase genes is achieved by interaction of multiple *LAC9* binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. Nucleic Acids Research, **19**, 5351-5358.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., & Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Research, **24**, 2519-2524.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. Gene, **96**, 23-28.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S. & Tewari, R. (2000). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technology, **77**, 215-227.

- Kegel, A., Martinez, P. Carter, S.D., & Åström S.U. (2006). Genome wide distribution of illegitimate recombination events in *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research*, **34**, 1633-1645.
- Kim, J.H., Lee, C.S. & Kim, B.G. (2005). Spore-displayed streptavidin: A live diagnostic tool in biotechnology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **331**, 210-214.
- Kooistra, R., Hooykaas P.J.J., & Steensma H.Y. (2004). Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **21**, 781–792
- Lee, P. & Swaisgood, H.E. (1998). Cloning and expression of a streptavidin-lipase fusion gene in *Escherichia coli* and characterization of the immobilized fusion protein. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 246-254.
- Lee, T.H., Kim, M., & Seo, J. (2006). Development of Reusable Split URA3-Marked Knockout Vectors for *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Microbiology Biotechnology*, **16**, 979-982.
- Llorente, B., Fairhead, C. & Dujon, B. (1999). Genetic redundancy and gene fusion in the genome of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*: functional characterization of a three-member gene family involved in the thiamine biosynthetic pathway. *Molecular Microbiology*, **32**, 1140-1152.
- Longtine, M.S., McKenzie III, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., & Pringle, J.R. (1998). Additional Modules for Versatile and Economical PCR-based Gene Deletion and Modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-961.
- Lu, P., Vogel, C., Wang, R., Yao, X. & Marcotte, E.M. (2007). Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nature Biotechnology*, **25**, 117-124.
- Maullu, C., Lampis, G., Basile, T., Ingianni, A., Rossolini, G.M. & Pompei, R. (1999). Production of lysozyme-enriched biomass from cheese industry by-products. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 182-186.
- Merico, A., Capitanio, D., Vigentini, I., Ranzi, B.M., & Compagno, C. (2004). How physiological and cultural conditions influence heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Biotechnology*, **109**, 139-146.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 266-277.

- Müller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P., & Dalbøge, H. (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, **14**, 1267–1283.
- Nagarajan, V., Ramaley, R., Albertson, H. & Chen, M. (1993). Secretion of streptavidin from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 3894-3898.
- Nakagawa, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N. & Tomizuka, N. (2000). A Methylotrophic Pathway Participates in Pectin Utilization by *Candida boidinii*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4253-4257.
- New England Biolabs, K. lactis Protein Expression Kit, Instruction Manual. 26p. 2009.
- Panuwatsuk, W. & Da Silva, N.A. (2003). Application of a gratuitous induction system in *Kluyveromyces lactis* for the expression of intracellular and secreted proteins during fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **81**, 712-718.
- Raimondi, S., Zanni, E., Talora, C., Rossi, M., Palleschi, C. & Uccelletti, D. (2008). SOD1, a New *Kluyveromyces lactis* Helper Gene for Heterologous Protein Secretion. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 7130-7137.
- Ribeiro, D.S., Henrique, S.M.B., Oliveira, L.S., Macedo, G.A., & Fleuri, L.F. (2010). Enzymes in juice processing: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**, 635-641.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. & Clare, J.J. (1992). Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. *Yeast*, **8**, 423-488.
- Rosa, J.C.C. Obtenção de linhagens de *Kluyveromyces lactis* recombinantes produtoras de estreptavidina. Viçosa, MG. UFV, 2007. 113p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- Ruzzi, M., Breunig, K.D., Ficca, A.G. & Hollenberg, C.P. (1987). Positive Regulation of the β -Galactosidase Gene from *Kluyveromyces lactis* is Mediated by an Upstream Activation Site That Shows Homology to the GAL Upstream Activation Site of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **7**, 991-997.
- Saliola, M., Mazzoni, C., Solimando, N., Crisa, A., Falcone, C., Jung, G., & Fleer, R. (1999). Use of the KIADH4 promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, **65**, 53-60.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Sano, T., Vajda, S. & Cantor, C.R. (1998). Genetic engineering of streptavidin, a versatile affinity tag. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **715**, 85-91.
- Schaffrath, R. & Breunig, K.D. (2000). Genetics and Molecular Physiology of the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics and Biology*, **30**, 173-190.
- Sharon, A. Molecular and Cell Biology Methods for Fungi. In: Turgeon, B. G., Condon, B., Liu, J. & Zhang, N. Protoplast Transformation of Filamentous Fungi. Humana Press, 321p. 2010.
- Sinha, R.P. & Häder, D.P. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Science*. **1**, 225-236.
- Sieiro, C., Sestelo, A.B.F., & Villa, T.G. (2009). Cloning, Characterization, and Functional Analysis of the *EPG1-2* Gene: A New Allele Coding for an Endopolygalacturonase in *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 8921-8926.
- Silva, E.G., Borges, M.F., Medina, C., Piccoli, R.H. & Schwan, R.F. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, **5**, 859–865.
- Snyder, L. & Champness W. Molecular genetics of bacteria. 3ed. ASM Press, Washington, D.C. 735p. 2007.
- Swaigood, H.E. & Walsh, M.K. (1994). An *Escherichia coli* plasmid vector system for production of streptavidin fusion proteins: Expression and biosselective adsorption of streptavidin- β -galactosidase. *Biotechnology and Bioengineering*, **44**, 1348-1354.
- Swinkels, B.W., Van Ooyen, A.J.J. & Bonekamp, F.J. (1993). The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host heterologous gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **64**, 187-201.
- Takahashi, T., Masuda, T. & Koyama, Y. (2006). Enhanced gene targeting frequency in ku70 and ku80 disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *Molecular Genetics and Genomics*, **275**, 460-470.
- Uenojo, M. & Pastore, G.M. (2007). Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas. *Química Nova*, **30**, 388-394.
- Van Den Berg, J.A., Van der Laken, K.J., Ooyen, A.J.J., Renniërs, T.C.H.M., Rietveld, K., Schaap, A., Brake, A.J., Bishop, R.J., Schultz, K., Moyer, D., Richman, M., & Shuster, J.R. (1990). *Kluyveromyces* as a Host for Heterologous Gene Expression: Expression and Secretion of Prochymosin. *Biotechnology*, **8**, 138-139.

- Van Ooyen, A.J.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M.M.A., Jacobs, D.I., Colussi, P.A., & Taron, C.H. (2006). Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, **6**, 381-392.
- Walsh, M.K. & Swaisgood, H.E. (1994). An *Escherichia coli* plasmid vector system for production of streptavidin fusion proteins: Expression and bioselective adsorption of streptavidin- β -galactosidase. *Biotechnology and Bioengineering*, **44**, 1348-1354.
- Walther, A. & Wendland, J. (2008). PCR-based gene targeting in *Candida albicans*. *Nature Protocols*, **3**, 1414-1421.
- Wang, Y., DiGuistini, S., Wang, T.C.T., Bohlmann, J. & Breuil, C. (2010). *Agrobacterium*-mediated gene disruption using split-marker in *Grosmannia clavigera*, a mountain pine beetle associated pathogen. *Current Genetics*, **56**, 297-307.
- Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J. & Salemme, F.R. (1989). Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science Direct*, **243**, 85-88.
- Wilcox, C.P., Clare, D.A., Valentine, V.W. & Swaisgood, H.E. (2002). Immobilization and Utilization of the Recombinant Fusion Proteins Trypsin-Streptavidin and Streptavidin-Transglutaminase for Modification of Whey Protein Isolate Functionality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3723-3730.
- Wolf, K. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology – A Handbook*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 617p. 1996.
- Wu, S.C. & Wong, S.L. (2002b) Engineering of a *Bacillus subtilis* strain with adjustable levels of intracellular biotin for secretory production of functional streptavidin. *Applied Environmental Microbiology*, **68**, 1102-1108.
- Yadav, P.K., Singh, V.K., Yadav, S., Yadav, K.D.S. & Yadav, D. (2009). In silico Analysis of Pectin Lyase and Pectinase Sequences. *Biochemistry*, **74**, 1049-1055.
- You, B.-J., Lee, M.-H. & Chung, K.-R. Gene-specific disruption in the filamentous fungus *Cercospora nicotianae* using a split-marker approach. (2009). *Archives of Microbiology*, **191**, 615-622.
- Zhao, F., Clare, D.A., Catignani, G.L. & Swaisgood, H.E. (2002). Purification and Characterization of the Fusion Protein Trypsin-Streptavidin Expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Protein Chemistry*, **21**, 413-418.