

PILAR XIMENA LIZARAZO MEDINA

**CÉLULA HOSPEDEIRA *ura3* PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES EM *Kluyveromyces lactis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

PILAR XIMENA LIZARAZO MEDINA

**CÉLULA HOSPEDEIRA *ura3* PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES EM *Kluyveromyces lactis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 21 de Setembro de 2001.

Prof.^a. Marisa Vieira de Queiroz
(Conselheira)

Prof.^a. Elizabeth Pacheco B. Fontes
(Conselheira)

Prof.^a. Célia Alencar de Moraes

Prof. Jorge Luiz C. Coelho

Prof.^a. Flávia Maria L. Passos
(Orientadora)

A Deus,

Ao amor e à força:

Meus pais, Luis Alfredo e Ana Teresa

Minhas irmãs, Jenny Paola e Edna Julie

AGRADECIMIENTO

A Deus. pela vida, por todas suas bênçãos, por seu amor.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos, como estudante estrangeiro PEG/PG.

Aos meus familiares, em especial a meus pais e irmãs, pelo amor, pelo apoio, pelo exemplo e pela força.

À minha tia Miriam, pelo amor, pelo apoio e incentivo na realização da viagem e deste mestrado.

À Professora Flávia Maria Lopes Passos, pela confiança, pelo espaço a mim concedido em seu laboratório, pela orientação e amizade.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pelo interesse neste trabalho, pelas interessantes aulas de genética, e por ensinar-me a gostar ainda mais da microbiologia e da genética.

À Professora Elizabeth Pacheco Fontes, pelas interessantes e enriquecedoras discussões durante a realização deste trabalho e na estratégia da construção do futuro vetor para *Kluyveromyces lactis*.

Ào Professor Daison Olzany Silva, pela amizade, pelo sorriso amável, pelo exemplo de trabalho e humildade.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia pelos ensinamentos.

Ao Professor Fernando Araripe Gonçalves, por ceder o plasmídeo PTG802 usado neste trabalho

Às secretárias do Departamento de Microbiologia, Nilcéia, Laura e Aparecida, pela eficiência e dedicação para com os estudantes.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, que contribuíram na execução deste trabalho especialmente Cesário, Antônio, Paulo, Danilo, Evandro e Arlindo.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos Cássia, Leózinho, Daniel, Alexandra, Ricardo, Ann, Pollyanna, Gilzeane, Gislene, Evandro, Ana Paula, Lízia, Cláudia, Juliana, André, Greice, Fábria, Wendel, Cláudio, Otávio, Elizama, Marcelo, Sônia e Leonardo, pela amizade e convivência agradável.

Aos funcionários da vigilância de Universidade Federal de Viçosa, pelas inúmeras caronas, por ocasião de minhas saídas tardias do laboratório.

Aos meus amigos e colegas brasileiros, cuja listagem é grande demais para constar nesta folha, e que estão todos no meu coração, pela amizade e carinho.

Aos meus amigos “chibchombianos” em Viçosa pela amizade e por convívio para matar as saudades.

Aos meus amigos na Colômbia, pelo carinho, pelo incentivo, pelos “e-mails”, pelas lembranças, que estando longe, são mais valiosas.

A todos os amigos e pessoas que, de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

PILAR XIMENA LIZARAZO MEDINA, filha de Luis Alfredo Lizarazo Guerrero e Ana Teresa Medina de L., nasceu em 7 de março de 1974 em Tunja - Boyacá – Colômbia.

Em 1991, iniciou o curso de Bacteriologia na Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colômbia, vindo a graduar-se em agosto de 1996.

Em agosto de 1999, ingressou no curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo tese de mestrado em Setembro de 2001.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Microrganismos e plasmídeo	14
3.2. Meios de cultura e condições de cultivo.....	14
3.3. Isolamento de mutantes auxotróficos para uracila.....	15
3.4. Caracterização dos mutantes de <i>K. lactis</i> auxotróficos para uracila	16
3.5. Análise de estabilidade dos mutantes.....	16
3.6. Transformação de <i>Kluyveromyces lactis</i> auxotrófica para uracila com o gene <i>URA3</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.7. Análise do DNA genômico dos transformantes por “Southern-Blot.”	18
3.8. Caracterização do crescimento dos transformantes em soro de queijo ultrafiltrado.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Isolamento de <i>Kluyveromyces lactis</i> mutantes auxotróficos para uracila	19
4.2. Caracterização dos mutantes de <i>K. lactis</i> auxotróficos para uracila.	19
4.3. Estabilidade da auxotrofia dos mutantes de <i>K. lactis</i>	24

4.4. Transformação de <i>K. lactis</i> auxotrófica para uracila.	25
4.5. Análise do DNA genômico, estabilidade e cinética de crescimento em SUF dos transformantes.	26
5. RESUMO E CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

MEDINA, Pilar Ximena L, M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2001. **Célula hospedeira *ura3* para a produção de proteínas recombinantes em *Kluyveromyces lactis*.** Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Conselheiras: Marisa Vieira de Queiroz e Elizabeth P. Batista Fontes.

Foi isolado um mutante auxotrófico para uracila de *Kluyveromyces lactis* com potencial para ser hospedeiro em sistemas de expressão heteróloga de proteínas recombinantes. Uma população selvagem de *K. lactis* foi irradiada com luz ultravioleta e selecionada na presença de ácido 5 fluoro orótico (5FOA). Dez colônias auxotróficas para uracila e resistentes a 5FOA foram selecionadas. Todas cresceram em meio utilizando lactose como única fonte de carbono e exibiram atividade de β galactosidase normal em relação à célula selvagem. Os mutantes apresentaram velocidades específicas de crescimento inferiores a da célula selvagem em soro de queijo ultrafiltrado (SUF), o que indicou ser o soro de queijo um meio limitante em uracila, afetando o crescimento dos mutantes. O mutante M7 foi selecionado por apresentar uma frequência de reversão baixa ($1,7 \times 10^{-10}$). A complementação da auxotrofia na linhagem M7 mediante transformação com o plasmídeo PTG802 contendo o gene *URA3* de *S. cerevisiae* foi analisada. Melhor eficiência de transformação de *K. lactis* foi obtida com o método de choque térmico com acetato de lítio, polietilenoglicol e DNA carreador fita simples. Um transformante mostrou

integração do plasmídeo em um fragmento de 6,0 Kb. A velocidade de crescimento da célula mutante ($0,04 \text{ h}^{-1}$) em SUF foi inferior a da célula selvagem ($0,26 \text{ h}^{-1}$). Estes resultados sugerem que o SUF é limitante em uracila. Conseqüentemente a transformação dos mutantes, com o gene *URA3*, fisiologicamente causou aumento na velocidade específica de crescimento ($0,22-0,25 \text{ h}^{-1}$) quando cultivadas em SUF, atingindo os níveis da célula selvagem e evidenciando a complementação da auxotrofia.

ABSTRACT

MEDINA, Pilar Ximena L, M.S., Universidade Federal de Viçosa, September 2001. **Host cell *ura3* for production of recombinant proteins in *Kluyveromyces lactis*.** Adviser Professor: Flávia Maria Lopes Passos. Committee Members: Marisa Vieira de Queiroz and Elizabeth P. Batista Fontes.

A *Kluyveromyces lactis* uracil auxotrophic mutant was isolated with potential as host for heterologous recombinant protein expression systems. A wild-type *K. lactis* population was irradiated with ultraviolet light and mutants selected in the presence of 5-fluoroorotic acid (5FOA). Ten uracil auxotrophic colonies resistant to 5FOA were selected. All grew in medium with lactose as sole carbon source and exhibited β -galactosidase activity comparable to that of the wild-type cell. The mutants presented specific growth rates lower than the wild-type cell when grown in ultrafiltered cheese whey (SUF), indicating that cheese whey is uracil limited, thereby affecting mutant growth. Mutant M7 was selected since it presented a low reversion frequency (1.7×10^{-10}). Auxotrophic complementation of the M7 lineage, through transformation with the PTG802 plasmid containing the *URA3* gene from *S. cerevisiae* was analyzed. Better *K. lactis* transformation efficiency was obtained with the thermal shock method with lithium acetate, polyethylene glycol and single stranded DNA carrier. One transformed cell presented a 6.0 kb fragment integrated into the plasmid. Transformed cells grown in SUF presented specific growth rates (0,22-0,25 h⁻¹)

similar to that of the wild-type cell. ($0,26 \text{ h}^{-1}$) and superior to that of the untransformed mutant cell ($0,04 \text{ h}^{-1}$). Consistent with this observation, transformation of the mutants with the *URA3* gene physiologically causes an increase in specific growth, when grown in SUF, reaching levels of the wild-type cell and exhibiting auxotrophic complementation.

1. INTRODUÇÃO

Um sistema de expressão gênica e produção de proteínas recombinantes é constituído por dois componentes, o vetor de transferência que contém o gene de interesse e a célula hospedeira que recebe o gene, expressa e processa a proteína recombinante. *Escherichia coli* tem sido a célula hospedeira mais investigada; entretanto a deficiência no processamento pós-traducional de proteínas de origem eucariótica, entre outras desvantagens, tem estimulado o desenvolvimento de sistemas de expressão em células hospedeiras alternativas, dentre estas, as leveduras. No início dos anos 80, *Saccharomyces cerevisiae* foi a primeira levedura investigada para este fim em razão de sua fisiologia e genética serem bem conhecidas. Contudo, *S. cerevisiae* também possui limitações como hospedeira, ou seja, secreção e produtividade ineficientes, hiperglicosilação, instabilidade de linhagens recombinantes e baixo rendimento protéico. Atualmente, uma variedade de leveduras vem sendo testada como uma alternativa a *S. cerevisiae*: *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces lactis*.

A levedura do leite, *Kluyveromyces lactis*, destaca-se pela sua propriedade como microrganismo GRAS (“Generally Recognized as Safe”), o que permite seu uso na produção de proteínas para uso na indústria farmacêutica e de alimentos. Possui metabolismo oxidativo, permitindo maior rendimento em biomassa e proteínas, ausência de hiperglicosilação, baixa

secreção de proteínas nativas, e crescimento em substrato de baixo custo. Ao contrário de *S. cerevisiae*, *K. lactis* é capaz de assimilar lactose e ser cultivada em soro de queijo, um subproduto gerado pela indústria de queijo, geralmente mal aproveitado e poluente. Várias proteínas de importância médica e industrial foram produzidas com sucesso em *K. lactis*, tais como a albumina humana, interleucina 1 β e quimosina. Em todos os casos, a secreção e o processamento pós-traducional das proteínas foram superiores quando comparados a *S. cerevisiae*.

Considerando o potencial de *Kluyveromyces lactis* como hospedeira de um sistema de expressão de genes e produção de proteínas recombinantes, os objetivos deste trabalho foram: isolar mutantes de *K. lactis* auxotróficos para uracila (*ura3*); selecionar e caracterizar os mutantes de ordem com o crescimento em lactose como única fonte de carbono e produção da enzima β galactosidase; caracterizar a cinética de crescimento dos mutantes em soro de queijo ultrafiltrado; estabelecer a frequência de reversão dos mutantes para seleção de uma célula hospedeira estável; e analisar a complementação do fenótipo mutante da célula selecionada pela transformação com o gene *URA3* de *S. cerevisiae*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Desde que a tecnologia de DNA recombinante emergiu, em meados dos anos 70, *Escherichia coli* tem sido o organismo mais explorado na expressão de genes heterólogos e produção de proteínas recombinantes para a indústria bioquímica e farmacêutica (HADFIELD et al., 1993). Entretanto, apesar dos exemplos em que apreciáveis níveis de proteínas recombinantes foram alcançados, isto é, 10 a 20% do total das proteínas celulares, o potencial da *E. coli* como hospedeira de sistemas de expressão possui limitações. A dificuldade mais reconhecida é que muitas das proteínas recombinantes acumulam-se insolúveis e inativas em corpos de inclusão no citoplasma da *E. coli*, exigindo procedimentos complexos e drásticos na extração e posterior renaturação da proteína. Outro problema é a ausência natural de modificações pós-transcricional e pós-traducional na *E. coli*, o que limita a produção de proteínas de origem eucariótica (RATNER, 1989). Essas limitações levaram à investigação de outras células capazes de expressar genes codificando proteínas de interesse industrial. Neste sentido, leveduras (SWINKELS et al., 1993) e fungos filamentosos surgiram como opções promissoras (HADFIELD et al., 1993). No final dos anos 70, as leveduras já eram consideradas hospedeiras alternativas para clonagem e expressão de genes. Como eucariontes unicelulares, as leveduras, em particular *S. cerevisiae*, despertaram interesse por serem consideradas microrganismos GRAS (“generally recognized as safe”) já empregados na indústria de alimentos,

potencializando seu uso na produção de proteínas recombinantes para uso humano e animal. Como microrganismos eucariotas unicelulares, as leveduras possuem estruturas celulares similares a outros eucariontes superiores (HADFIELD et al., 1993). Assim, possuem mecanismos que permitem processar pós-transcricional e pós-traducionalmente as proteínas produzidas, como formação de ligações dissulfeto, clivagem endoproteolítica, glicosilação e montagem de proteínas (SWINKELS et al., 1993). Leveduras secretam poucas proteínas para o meio extracelular, mas, quando o fazem, os processos são semelhantes àqueles que ocorrem em animais superiores e células vegetais (RATNER, 1989). Podem ser cultivadas em substratos de baixo custo, segundo uma tecnologia de fermentação bem conhecida e estabelecida (SWINKELS et al., 1993, TOKUNAGA et al., 1997) exibindo alta velocidade de crescimento e atingindo altas densidades populacionais em biorreatores (GOEDDEL et al., 1990).

O estabelecimento da biologia molecular, que permitiu o desenvolvimento de sistemas de expressão heteróloga de genes em leveduras, iniciou-se com *S. cerevisiae*. Diferentes peptídeos de interesse clínico, como o interferon, a β -endorfina, o fator de crescimento epidérmico e a gonadotrofina coriônica, todos de origem humana, tiveram seus genes clonados e expressos naquela levedura (OLAVO, 1987, HADFIELD et al., 1993). Porém, o sistema de expressão em *S. cerevisiae* nunca atendeu às expectativas, em razão da ineficiência de secreção e produtividade, da hiperglicosilação, da instabilidade das cepas produtoras, das dificuldades em manter altas velocidades de crescimento e altas densidades populacionais das células recombinantes (SWINKELS et al., 1993). Assim, outras leveduras começaram a ser investigadas como alternativas. Estas incluem cepas oxidativas e metilotróficas, como *Hansenula polymorfa*, *Pichia pastoris*, *Candida boidinii*, além de *Yarrowia lipolitica* e *Kluyveromyces lactis* (TOKUNAGA et al., 1997). Essas leveduras mostraram, na maioria dos casos, rendimentos superiores de proteínas recombinantes, comparados aos obtidos com *S. cerevisiae* (MÜLLER et al., 1998).

Kluyveromyces lactis, cujo habitat natural é o leite, é uma levedura bem conhecida na produção de β -galactosidase, para indústria farmacêutica e de alimentos, assim como, na produção de biomassa como suplemento alimentar

e humano (DICKSON e SHEETZ, 1981). O conhecimento adquirido sobre seu uso em escala industrial facilita seu uso como hospedeiro na produção de proteínas. Ao contrário de outras, como *Pichia pastoris* ou *Hansenula polymorpha*, é reconhecida como GRAS, pela FDA, o que aumenta o interesse como hospedeira na expressão de proteínas recombinantes para consumo humano (ROMANOS et al., 1992).

Kluyveromyces lactis possui vantagens adicionais, que a qualificam como hospedeira ideal de expressão heteróloga. Seu crescimento em diferentes fontes de carbono significa a possibilidade de escolher a melhor fonte de carbono a ser empregada no meio de cultura, de acordo com a proteína a ser produzida e o sistema de expressão. TOKUNAGA et al., (1997), estudando a produção de α -amilase de rato em *K. lactis*, sob o controle do promotor da fosfoglicerato cinase (PGK) de *S. cerevisiae*, avaliaram o uso de diferentes fontes de carbono em relação ao rendimento da proteína secretada. Quando foram empregadas glicose, lactose ou galactose, como fontes de carbono, os níveis da enzima secretada foram maiores. Quando glicerol, etanol ou lisina foram usados, a secreção decresceu gradualmente, e os níveis da proteína foram mínimos na presença de L-sorbose. O uso de diferentes fontes de carbono por *K. lactis* é um fator econômico favorável. *K. lactis* possui a capacidade exclusiva, entre as leveduras convencionais, de crescer em lactose como única fonte de carbono (DICKSON e SHEETZ, 1981), sendo possível empregar um meio de baixo custo como o soro de queijo, em que 5 a 7% dos sólidos totais é lactose. A lactose é transportada por uma permease, codificada pelo gene *LAC12*, e hidrolisada a glicose e galactose pela enzima intracelular β galactosidase codificada pelo gene *LAC4*. O promotor do gene *LAC4* tem mostrado ser um promotor forte para indução da expressão de proteínas recombinantes, como o antígeno de superfície da hepatite B (MARTINEZ et al., 1992). *K. lactis* possui uma fisiologia distinta da *S. cerevisiae*, pois, exibe um metabolismo predominantemente oxidativo, com alto rendimento em biomassa mesmo em altas concentrações de açúcar (Crabtree negativo) (HSIEH e DA SILVA, 1998). Em leveduras Crabtree positivas, como *S. cerevisiae*, o rendimento de ATP e biomassa são mais baixos (BREUNING et al., 2000). Outra vantagem no uso de *K. lactis* como hospedeira, na produção de proteínas recombinantes, é a secreção de baixa concentração de

proteínas nativas no meio de cultura aliada à ausência de proteases no sobrenadante (WESOLOWSKI-LOUVEL et al., em WOLF, 1996), o que facilita a purificação e favorece o rendimento da proteína recombinante (GELLISEN e HOLLENBERG, 1997).

Vários pesquisadores utilizaram *K. lactis* para expressão de genes heterólogos. Dentre esses, estão o gene da quimosina bovina (VAN DER BERG et al., 1990), interleucina 1 β (FLEER et al., 1991a), albumina humana (FLEER et al., 1991b), α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* (BERGKAMP et al., 1992) e glucoamilase de *Arxula adenivorans* (BUI et al., 1996), entre outros.

VAN DER BERG et al., (1990) desenvolveram o primeiro vetor integrativo no locus do gene *LAC4*. Neste caso, para a expressão do gene da quimosina bovina, foi utilizado o promotor do *LAC4* e o terminador do mesmo gene. Para direcionar a secreção, foi empregada a seqüência do peptídeo sinal da toxina “killer” de *K. lactis* e, como marca de seleção, a resistência à geneticina. A quimosina bovina foi secretada em forma solúvel e ativa em *K. lactis*, 10% mais que em *S. cerevisiae*, o que ocorreu porque, em *S. cerevisiae*, a quimosina foi retida na parede celular em forma insolúvel. Até hoje a quimosina produzida em *K. lactis* (MaxirenTM) é a única proteína heteróloga, comercialmente produzida nesta levedura que tem sido comercializada (VAN DER BERG et al., 1990).

A albumina humana foi produzida em *K. lactis*, usando um vetor de replicação autônoma. No cassete de expressão, foi inserido o gene da albumina humana contendo o próprio peptídeo sinal entre o promotor da *ORF1* do plasmídeo “killer” de *K. lactis* (PGKL1) e o terminador do gene da fosfoglicerato cinase de *S. cerevisiae* (*ScPGK*). A marca de seleção foi auxotrofia para uracila. Os níveis de secreção, neste sistema, estiveram em torno de 400 mg/L, um valor quase cinco vezes mais alto que os obtidos em *S. cerevisiae* transformante (85 mg/L) e, aproximadamente, duas vezes maior com o mesmo transformante após vários ciclos de mutagênese (150 mg/L) (FLEER et al., 1991b). Com este mesmo sistema, a produção extracelular de interleucina 1 β (IL1 β) foi em torno de 95% com o peptídeo sinal da toxina “killer” de *K. lactis*. Os níveis de proteína recuperada no sobrenadante foram de

80 a 100 vezes superiores que em *S. cerevisiae*. Além disso, *K. lactis* produziu a proteína não glicosilada, que exibe atividade biológica comparável a IL1B humana.

No estabelecimento de uma tecnologia para manipulação e construção de um sistema de expressão gênica, é importante transferir eficientemente e manter as seqüências de DNA de interesse na célula hospedeira. Os vetores episomais descritos em *K. lactis* são plasmídeos contendo seqüências de replicação autônoma (ARS) e que, assim como em *S. cerevisiae*, são freqüentemente instáveis (DAS e HOLLENBERG, 1982). Alguns vetores de multicópias estáveis foram obtidos a partir do plasmídeo circular de fita dupla isolado de *Kluyveromyces drosophilum*, plasmídeo pKD1 cuja organização é similar ao plasmídeo de 2µm de *S. cerevisiae*, (HSIEH e DA SILVA, 1998). Esse plasmídeo, pKD1 foi, posteriormente, transferido para *K. lactis*, onde foi mantido estável com alto número de cópias (70-100 por célula). Dois plasmídeos lineares de DNA de fita dupla, encontrados em *K. lactis* k1 (pGKL1) e k2 (pGKL2), são mantidos estáveis com 100-200 cópias por célula, mas são dificilmente manipulados devido à presença de proteínas ligadas à extremidade 5' da seqüência do DNA (CHEN et al., 1988, STARK et al., 1990). Diferentemente dos vetores autônomos, os vetores integrativos, que não possuem origem de replicação e não podem ser propagados independentemente, são forçados a integrarem no genoma para serem mantidos. Em *K. lactis*, alguns desses vetores foram construídos para integrar no locus do gene *LAC4* (VAN DER BERG et al., 1990) ou do *TRP1* (MUSTILLI et al., 1999) ou no DNA ribossomal (rDNA), (BERKGAMP et al., 1992, HENSING et al., 1995).

Para sinalizar a transferência do gene de interesse do vetor para a célula hospedeira, é necessário que o vetor também contenha um gene que funcione como agente de seleção, isto é, que ao ser introduzido na célula permita identificar, fenotipicamente, a célula que foi transformada com o vetor. Existem dois tipos de seleção: dominante, que envolve a aquisição de uma propriedade fenotípica, como resistência a antimicrobianos, e a seleção recessiva que envolve a perda de uma propriedade, tal como auxotrofia, isto é, mutações em genes que codificam enzimas de vias biossintéticas. Esses marcadores, ao serem introduzidos, no mutante hospedeiro, complementam a auxotrofia e a

tornam prototrófica. Os marcadores dominantes, reportados em *K. lactis*, incluem genes de resistência a geneticina (G418), bleomicina (BLE) e aureobasidina A (AIR1) (SHAFFRATH e BREUNING, 2000). A sensibilidade de *K. lactis* à geneticina (DAS e HOLLENBERG, 1982,) tem sido explorada como marca de seleção nos sistemas de transformação em *K. lactis*, usando o transposon Tn903, isolado de *E. coli*, que codifica para uma 3-aminoglicosídeo fosfotransferase (WALSH e BERGQUIST, 1997; BLONDEAU et al., 1994). Como marcadores auxotróficos, em *K. lactis* já foram utilizados com sucesso genes isolados de *S. cerevisiae*, como os genes *URA3*, *TRP1*, *HIS3*, *LEU2*, que complementam mutantes auxotróficos para uracila, triptofano, histidina e leucina, respectivamente (SHAFFRATH e BREUNING, 2000). Atualmente, os genes correspondentes em *K. lactis* já foram clonados e seqüenciados como o *KIURA3* (SHUSTER et al., 1987), o *KITRP1* (STARK e MILNER, 1989), o *KILEU2* (ZHANG et al., 1992) e mais recentemente, o *KIURA5* (BAI et al., 1999).

As estratégias mais comuns na obtenção de mutantes auxotróficos são mutagênese clássica e interrupção direcionada do gene de interesse. Na mutagênese clássica com agentes físicos, é freqüente o uso de irradiação ultravioleta (UV), que causa substituições no DNA, além de induzir elevada freqüência de mutações “frameshift”. Outros mutagênicos, como os agentes alquilantes nitrosoguanidina (NTG) e o etil metano sulfato (EMS), que causam transições ou transversões (LAWRENCE, 1991), são freqüentemente citados (GLEENSON et al., 1990; e BASABE et al., 1996). Em *K. lactis*, DAS e HOLLENBERG (1982) relataram a obtenção de mutantes auxotróficos para triptofano, usando EMS. Outros estudos indicam o uso de enriquecimento de mutantes auxotróficos com nistatina (GLEENSON et al., 1990). A obtenção de mutantes auxotróficos, pela mutagênese clássica, é um procedimento laborioso em razão do número de colônias a serem analisadas. Recentemente, o uso de análogos metabólicos tem auxiliado na obtenção deste tipo de mutantes. Estas substâncias, análogas a um intermediário da via biossintética, são metabolizadas formando um composto tóxico para a célula. Mutantes auxotróficos não formam o composto tóxico e, conseqüentemente, são resistentes ao análogo (HIGGINS e CREGG, 1998). Entre os análogos metabólicos empregados, encontram-se o ácido 5 fluoro antranílico (5FAA) e o

ácido 5 fluoro orótico (5FOA), para obtenção de mutantes auxotróficos para triptofano e uracila, respectivamente (TOYN et al., 2000). A presença de 5FOA, no meio de isolamento de mutantes auxotróficos em leveduras, pressiona a seleção de células resistentes a 5FOA com mutação no gene *URA3*, que codifica a enzima orotidina monofosfato descarboxilase, (OMPDase) EC4.1.1.23 (BOEKE et al., 1984). Esta enzima, normalmente, participa na descarboxilação de orotidina 5'-monofosfato em uridina 5'-monofosfato. Na presença de 5FOA, a enzima OMPDase funcional produz 5'-fluoracil monofosfato, que é tóxico para a célula.

Para a obtenção de mutantes auxotróficos para uracila de *Candida tropicalis*, foi reportado o uso de NTG e nistatina, mas estes só foram obtidos após tratamento, quando as células foram selecionadas em placas contendo 5FOA (GLEENSON et al., 1990). RODRIGUEZ et al., (1998) reportaram o isolamento de mutantes *ura3* de *Candida utilis* usando NTG e seleção em placas contendo 5FOA. Mutantes *ura3* de *C. boidinii* também foram isolados, pela combinação de UV ou NTG com isolamento em meio contendo 5FOA. Nesse caso, de $2,4 \times 10^3$ células viáveis, 29 colônias foram isoladas no meio contendo 5FOA, sendo que, destas, somente 9 foram resistentes a 5FOA, quando reinoculadas nesse meio e auxotróficas para uracila, (SAKAI et al., 1991).

Usando unicamente o cultivo em meio contendo 5FOA, é possível o isolamento de mutantes espontâneos. A partir de uma população de 10^7 células de *Pichia stipitis*, 36 colônias foram isoladas em meio 5FOA, dentre as quais 8 cresceram bem em meio contendo 5FOA e em meio contendo uracila, mas não em meio sem uracila (YANG et al., 1994). NGAN et al., (2000) isolaram mutantes espontâneos *ura3* da levedura *Endomyces fibuliger*, utilizada na China para produção de vinho de arroz. Neste caso, a partir de uma população de 10^8 células, foram isoladas 9 colônias resistentes a 5FOA, e 3 foram auxotróficas para uracila. A caracterização de um dos mutantes de *E. fibuliger* obtidos, indicou uma substituição de um único nucleotídeo na ORF *ura3*, em que o códon TCA que codifica o aminoácido serina foi alterado para um códon de terminação "ocre" TAA.

Em *K. lactis*, LOUVENCOURT (1983) relatou o isolamento de mutantes auxotróficos para uracila mediante irradiação U.V. Embora não sejam

reportados mais relatos sobre o isolamento de mutantes de *K. lactis* auxotróficos para uracila, existe uma variedade de cepas *ura3⁻* usadas na expressão de proteínas heterólogas, sendo esta a marca de seleção auxotrófica mais usada nesta levedura. Todas as experiências documentadas informam que estes mutantes são eficientemente complementados, quando transformados com o gene *URA3* de *S. cerevisiae*. As seqüências destes genes em *K. lactis* e *S. cerevisiae* apresentam uma homologia de 68% (GOLDSTEIN et al., 1999).

A obtenção de mutantes auxotróficos mediante interrupção direcionada é possível, quando a seqüência do gene a ser mutado é conhecida. Esta metodologia fundamenta-se na propriedade “recombinogênica” das terminações de DNA livres, que interagem com seqüências homólogas no genoma. Assim, a transformação com DNA linear permite direcionar o DNA a um locus específico no genoma, e substituir o gene selvagem com a cópia mutada (RHOTHSTEIN, 1983). KITADA et al., (1995) empregaram esta metodologia no isolamento de mutantes *ura3⁻*. Assim, após o isolamento da seqüência do gene *URA3* de *C. albicans*, foi construído um cassete contendo um fragmento de 360 pb da seqüência do PUC18, flanqueado por 51 pb correspondentes à seqüência do gene *URA3*. Após transformação da célula selvagem, os transformantes que apresentaram interrupção do gene *URA3* foram selecionados em meio contendo 5FOA.

No isolamento de mutantes, que possam constituir eficientes hospedeiros no desenvolvimento de sistemas de expressão, é importante que a freqüência de reversão natural seja mínima, isto é, que o número de células da população mutante que recuperam o fenótipo original espontaneamente seja negligenciável. Gleenson et al., citado em HIGGINS e CREGG (1998), recomendam que a freqüência de reversão ideal seja menor que 1×10^{-8} . Leveduras mutantes isoladas como hospedeiros, para procedimentos de transformação e seleção, mostram freqüência de reversão em torno desse valor. Por exemplo, para *C. utilis* foi reportado 1×10^{-8} (RODRIGUEZ et al., 1998), para *E. fibuliger* menor que 5×10^{-9} (NGAN et al., 2000), para *C. albicans* 5×10^{-9} (KELLY et al., 1987) para *P. stipitis* $1,5 \times 10^{-8}$ (YANG et al., 1994) e para *C. boidinii* $1,0 \times 10^{-9}$ (SAKAI et al., 1991)

Além de estabelecerem a marca de seleção para permitir a seleção posterior na transformação, as seqüências homólogas do gene mutado podem contribuir para os eventos de recombinação que levam à integração dos genes de interesse no genoma da levedura. Trabalhos avaliando a forma do DNA em processos de transformação, indicam que os plasmídeos circulares, contendo seqüências homólogas a seqüências presentes no hospedeiro, são integrados a uma baixa freqüência, como resultado de um único “crossing over” (ORR-WEAVER et al., 1981). Apesar de outras leveduras evidenciarem freqüentes eventos de recombinação entre seqüências homólogas, Stark e Milner, citados em MARTINEZ et al., (1992), observaram baixa freqüência de recombinação homóloga em *K. lactis*. O uso de plasmídeos lineares aumenta a freqüência de transformação de 10 a 1000 vezes, já que as terminações são altamente “recombinogênicas” e interagem com seqüências homólogas no cromossomo, levando à integração (ORR-WEAVER et al., 1981).

No processo de transformação de leveduras, podem ser utilizadas células intactas ou protoplastos (HIGGINS e CREGG, 1998). Os protoplastos mostram maior eficiência do que quando são empregadas células intactas (KLEBE et al., 1983). DAS e HOLLENBERG, (1982) descreveram um procedimento de transformação de protoplastos de *K. lactis* com ajuda de polietilenoglicol (PEG) e CaCl_2 . Eles observaram uma baixa freqüência de transformação devido a uma ineficiente regeneração dos protoplastos (10% menor quando comparada a *S. cerevisiae*). O estudo indica aumento no número de transformantes, em um fator de 3, quando o estabilizador osmótico sorbitol foi substituído por KCl.

Em 1983, ITO et al., estudaram o uso de cátions e PEG para obtenção de células permeabilizadas de *S. cerevisiae*, como alternativa às dificuldades na preparação e subsequente regeneração de protoplastos. Os autores observaram que cátions monovalentes como Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+ e Rb^+ são efetivos na indução de competência em levedura. Em *K. lactis*, o uso de acetato de lítio resultou em maior eficiência de transformação (SANCHEZ et al., 1993), enquanto que, em *Pichia pastoris*, o cloreto de lítio foi mais recomendado (HIGGINS e CREGG, 1998). O uso de PEG parece aumentar, indiscriminadamente, a eficiência de transformação de leveduras. Relatos indicam sucesso na aplicação de PEG e acetato de lítio, tanto em *K. fragilis*

como em *K. lactis* (DAS et al., 1984). Isso explica porque atualmente, em leveduras, o procedimento mais comum é a transformação, em que as células são permeabilizadas com acetato de lítio, incubadas com o vetor na presença de PEG e DNA carreador de fita simples (ssDNA). Após incubação, a mistura é submetida a choque térmico e plaqueada em meio mínimo seletivo (SHIESTL et al., 1993). O procedimento de PEG, acetato de lítio e DNA carreador fita simples é adotado na obtenção de transformantes no protocolo do sistema “two hybrid” destinado a estudos de interação de proteínas em regulação gênica de *S. cerevisiae*.

A transformação por eletroporação, em que as células são permeabilizadas pela exposição a campos elétricos, tem sido amplamente testada para introduzir DNA em uma variedade de células microbianas e animais. Embora a transformação de *K. lactis* por eletroporação tenha sido estabelecida (SANCHEZ et al., 1993), os protocolos com acetato de lítio e PEG são mais citados na literatura (ROCHA et al., 1996; TOKUNAGA et al., 1997; WALSH e BERGQUIST, 1997; e BARTKEVIEIUTÉ et al., 2000).

A eficiência de transformação também depende de fatores que aumentam a absorção do DNA pela célula. Estudos feitos em relação à concentração de DNA empregada na mistura de transformação, indicam que a eficiência de transformação aumenta, proporcionalmente, com a quantidade de DNA. De acordo com SCHIESTL et al., (1993), uma desvantagem da eletroporação é que somente pequenas quantidades de DNA são eficientemente eletroporadas, o que limita o número de transformantes por eletroporação. Estudos realizados com *K. lactis* indicam que a eficiência de transformação aumenta, linearmente, até aproximadamente 300 ng de DNA. Outros relatos indicam que em transformações utilizando acetato de lítio, PEG e DNA carreador fita simples, até 10 µg de DNA podem ser usados, com correspondente aumento no número de transformantes. O estado fisiológico da população de células a ser transformada, também, é fator importante. Maior eficiência de transformação é observada, quando as células encontram-se na fase logarítmica de crescimento (ITO et al., 1983). Em *K.lactis*, foi observado que a concentração celular aumenta, linearmente, o número de transformantes. Uma análise sobre todos os procedimentos de transformação disponíveis revela que nem todos os protocolos de transformação são igualmente

eficientes para todas as leveduras, sendo importante o estabelecimento de protocolos para cada levedura em particular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos e plasmídeo

Leveduras mutantes foram isoladas a partir da linhagem selvagem de *Kluyveromyces lactis* X proveniente da Universidade de Califórnia, Davis, e mantida em glicerol 20% a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, no laboratório de Fisiologia de Microrganismos, BIOAGRO. No experimento de complementação da levedura mutante, foi usado o plasmídeo PTG802 (Figura 1) que contem o gene *URA3* de *S. cerevisiae*, cedido pelo professor Fernando Torres da Universidade de Brasília. A linhagem de *Escherichia coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-I* *relA1*) foi usada para amplificação do plasmídeo PTG802.

3.2. Meios de cultura e condições de cultivo

E. coli DH5 α foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) (triptona 20 gL $^{-1}$ extrato de levedura 10 gL $^{-1}$ e cloreto de sódio 10 gL $^{-1}$). Para seleção e manutenção dos plasmídeos e manipulações de DNA, o cultivo foi feito em meio LB suplementado com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. A temperatura de cultivo foi sempre 37 $^{\circ}\text{C}$.

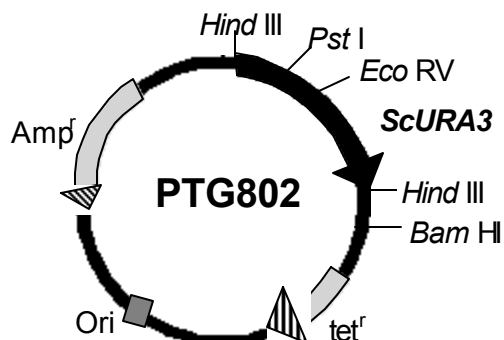


Figura 1 - Esquema do plasmídeo PTG802.

A ativação e a manutenção da linhagem selvagem de *K. lactis* X e das células mutantes foram conduzidas em meio completo YPD (extrato de levedura 10 gL⁻¹, peptona 20 gL⁻¹ e glicose 20 gL⁻¹). A caracterização das colônias mutantes foi efetuada em meio mínimo YNBG (base nitrogenada para leveduras sem aminoácidos, Difco®, 6,7 gL⁻¹, e glicose 20 gL⁻¹) ou meio YNBGU, quando uracila foi acrescentada à concentração de 30 mgL⁻¹. Quando necessário, foi adicionado ágar 15 gL⁻¹.

3.3. Isolamento de mutantes auxotróficos para uracila

Células de *K. lactis* foram cultivadas em Erlenmeyer de 250 mL com 125 mL de meio YPD, incubadas a 30 °C sob agitação de 200 rpm em shaker. Células em crescimento exponencial foram coletadas, e lavadas duas vezes com solução salina mediante centrifugação a 1500g durante 6 minutos. O sedimento foi ressuscitado em 1 mL da solução salina. Uma concentração de 10⁸ células/mL (medida por contagem em câmara de Neubauer) foi submetida a mutagênese por irradiação ultravioleta (UV), a 14 cm de distancia, durante 6 minutos, que corresponde a uma porcentagem de sobrevivência de 3.5%, segundo BARRETO et al., (1998). Da suspensão de leveduras irradiadas, 200 µL foram plaqueados em meio YNBG contendo ácido 5 fluoro orótico (5-FOA) 1 gL⁻¹ e uracila 50 mgL⁻¹. As placas foram incubadas por 5 dias a 30 °C, protegidas contra luz. As leveduras mutantes, que cresceram, foram repicadas

em meio YNBGU e mantidas em glicerol 30%, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior caracterização.

3.4. Caracterização dos mutantes de *K. lactis* auxotróficos para uracila

As colônias resistentes a 5-FOA foram cultivadas em placas réplicas, suplementadas (YNBGU) ou não (YNBG) com uracila. As colônias mutantes foram reinoculadas em meio contendo 5-FOA, e novamente caracterizadas pela ausência de crescimento em meio mínimo e meio mínimo sem uracila (YNBG), a fim de evitar falsos positivos. As células mutantes foram caracterizadas pela produção da enzima β -galactosidase em placas contendo YNBL (base nitrogenada para leveduras com aminoácidos Difco[®], $6,7\text{ gL}^{-1}$, lactose 20 gL^{-1} e uracila 30 mgL^{-1}). Antes da inoculação, em cada placa foram espalhadas $0,8\text{ mg}$ de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosideo). Foi estabelecida a cinética de crescimento das culturas mutantes, em soro de queijo ultrafiltrado. As colônias mutantes foram inoculadas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YPD, soro de queijo ultrafiltrado ou soro de queijo ultrafiltrado suplementado com uracila (30 mgL^{-1}). Após 12 horas de cultivo, foram retiradas amostras a intervalos de uma hora. A densidade ótica a 600 nm dessas amostras foi medida. A partir dessas medidas, foi estabelecida a velocidade máxima de crescimento pela regressão linear dos dados da fase logarítmica de crescimento para cada um dos mutantes. As colônias mutantes também foram caracterizadas pela produção de proteases extracelulares, pela formação de halo de hidrólise em ágar leite-caseína (leite em pó desnatado 100 gL^{-1} , peptona 20 gL^{-1} , extrato de levedura 10 gL^{-1} e agar 15 gL^{-1}).

3.5. Análise de estabilidade dos mutantes

Os mutantes selecionados foram submetidos à análise de estabilidade quanto à auxotrofia. Os mutantes foram cultivados a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 a 20 gerações (~ 24 horas), em Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio YPD. As culturas foram centrifugadas a 1500g , lavadas duas vezes com água destilada e ressuspensas em 1 mL de água destilada. A concentração de células por mL foi estabelecida por contagem em câmara de Neubauer. Da suspensão contendo 10^{12} cel/mL, alíquotas de $200\text{ }\mu\text{L}$ foram plaqueadas em

meio mínimo YNBG para contagem de colônias revertentes. A contagem de UFC/mL totais testadas foi efetuada por plaqueamento em meio YNBGU. A frequência de reversão foi determinada pela fórmula:

$$\text{(UFC revertentes / UFC totais testadas)}$$

3.6. Transformação de *Kluyveromyces lactis* auxotrófica para uracila com o gene *URA3* de *Saccharomyces cerevisiae*

As células mutantes foram cultivadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 mL de meio YPD. As células foram incubadas a 30 °C, 200 rpm em shaker, até uma concentração de 1×10^8 cel/mL. A partir dessa cultura, foram inoculados 50 mL de meio YPD com uma concentração de 5×10^6 células/mL. A cultura foi incubada a 30°C e 200 rpm em shaker. Quando a concentração de células alcançou um título de 2×10^7 células/mL, a cultura foi lavada duas vezes com água destilada estéril, mediante centrifugação a 1500 g. Inicialmente, foi testou-se a eletroporação baseada em HIGGINS e CREGG, (1998). Neste procedimento, as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1M. A uma suspensão contendo $2,4 \times 10^8$ células, foram adicionadas 3 µg de DNA plasmidial PTG802 circular ou 3 µg do plasmídeo linearizado com a enzima *Bam* HI e 320 µL de sorbitol 1M. Em seguida, a suspensão foi submetida à eletroporação. A eletroporação foi conduzida em eletroporador “GenePulser” (BIORAD), no qual foi aplicado um pulso de 1000V, resistência de 400Ω e capacitância de 25 µF. Após eletroporação, foi adicionado à mistura 1 mL de sorbitol 1M, e alíquotas de 200 µL foram espalhadas em meio mínimo YNBG e incubadas a 30 °C. Alternativamente, foi utilizado o método de transformação proposto por SHIESTL et al., (1993). Células lavadas, previamente, com água foram ressuspensas em 1 mL de água esterilizada. Uma população em torno de 8×10^7 células foi submetida à transformação. As células foram, previamente, ressuspensas em acetato de lítio 100 mM para um volume final de 500 µL, e em seguida foram incubadas a 30 °C durante 15 minutos. A suspensão foi centrifugada e as células foram, então, misturadas com 240 µL de polietilenoglicol-4000 50%, 36 µL de acetato de lítio 1M, 50 µL de DNA carreador fita simples (1mg/mL) e 3µg de DNA plasmidial PTG802

circular ou linearizado com a enzima *Bam* HI. As células transformadas foram plaqueadas em meio mínimo YNBG sem uracila. As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias. Como controle, o processo de transformação com células na ausência de DNA plasmidial foi realizado.

3.7. Análise do DNA genômico dos transformantes por “Southern-Blot.”

O DNA total da linhagem selvagem, bem como do mutante e das células transformadas, foi extraído de acordo com o protocolo de SPECHT et al., (1982). Do DNA total de cada levedura, aproximadamente 5 µg foram utilizadas na reação de clivagem. A enzima *Bgl* II foi escolhida para análise dos transformantes pela ausência de sítios de restrição para esta enzima no plasmídeo, ou na seqüência do gene *URA3* de *K. lactis*. Electroforese e transferência de DNA para membrana de nylon seguiram procedimentos descritos por SAMBROOK et al., (1989). A sonda, o plasmídeo PTG802 ou o fragmento correspondente à seqüência do gene *ScURA3* foi marcada utilizando-se fluorescein-dUTP (Stratagene- Prime-It® Flúor Fluorescence Labeling Kit). A hibridização foi realizada à temperatura de 65 °C, seguida de lavagens sob condições de alta estringência.

Os transformantes foram submetidos à análise de estabilidade, conforme descrito anteriormente (Item 3.5.).

3.8. Caracterização do crescimento dos transformantes em soro de queijo ultrafiltrado

Foi utilizado o soro de queijo mussarela ultrafiltrado (SUF), do Instituto Cândido Tostes, Juiz de Fora, Minas Gerais. Após a ativação dos mutantes e dos transformantes em 5 mL de SUF, 50 mL de SUF foram inoculados com uma concentração inicial de células correspondente a DO_{600} de 0,6. Após 12 horas de crescimento, amostras foram retiradas a intervalos de uma hora. A densidade ótica a 600 nm, destas amostras, foi medida. A partir dos dados DO_{600} versus tempo, foi estabelecida a velocidade máxima de crescimento por meio de regressão linear da fase logarítmica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de *Kluyveromyces lactis* mutantes auxotróficos para uracila

Mutantes de *Kluyveromyces lactis* auxotróficos para uracila foram isolados a partir de uma suspensão de 10^8 células/mL, submetida a mutagênese por irradiação com UV, e posteriormente inoculada em placas contendo ácido 5 fluoro orótico (5-FOA), que seleciona mutantes *ura3* incapazes de sintetizar uracila. A partir de uma população viável de $12,3 \times 10^6$ células/mL, foram obtidas 69 colônias auxotróficas para uracila. Quando as 69 colônias foram reinoculadas em placas contendo YNBGU5-FOA, 10 colônias continuaram resistentes a 5-FOA, (Figura 2).

4.2. Caracterização dos mutantes de *K. lactis* auxotróficos para uracila.

Na seleção da célula hospedeira de um sistema de expressão de genes para produção de proteínas recombinantes, é fundamental avaliar não apenas as propriedades genéticas, como também fisiológicas e de crescimento envolvidas no processo de expressão e produção de proteínas. Considerando possíveis alterações que poderiam ter ocorrido durante a mutagênese, as colônias mutantes isoladas foram caracterizadas quanto ao crescimento em lactose e síntese da enzima β -galactosidase essencial para assimilação de lactose. Esta propriedade é importante devido à perspectiva de se utilizar um

meio rico em lactose e de baixo custo, como o soro de queijo ultrafiltrado (SUF) para o cultivo da célula hospedeira na produção da proteína recombinante. As 10 colônias resistentes a 5-FOA, auxotróficas para uracila, cresceram no meio mínimo YNBL usando lactose como única fonte de carbono. A coloração azul intensa evidencia síntese da enzima β -galactosidase (Figura 3).

A cinética de crescimento das linhagens mutantes em SUF foi estabelecida. Os mutantes foram cultivados sob regime de batelada, em meio YPD além de SUF. A Figura 4 mostra os diferentes perfis de crescimento populacional da célula selvagem em relação aos mutantes no SUF. As células mutantes apresentaram um crescimento inferior ao crescimento da célula selvagem, quando cultivadas em YPD. Resultados semelhantes também foram observados em mutantes auxotróficos para uracila de *Pichia pastoris* (HIGGINS e CREGG, 1998). O crescimento das células mutantes em SUF foi inferior em relação ao crescimento em YPD, em quanto a célula selvagem exibiu o mesmo perfil de crescimento tanto em SUF quanto em YPD. Com a finalidade de verificar se a diferença na velocidade de crescimento do mutante em SUF é devida à limitação em uracila, foi avaliada a cinética de crescimento em SUF suplementado com uracila. Esta análise mostrou uma maior velocidade específica de crescimento dos mutantes em SUF suplementado com uracila do que em SUF não suplementado (Quadro 1).

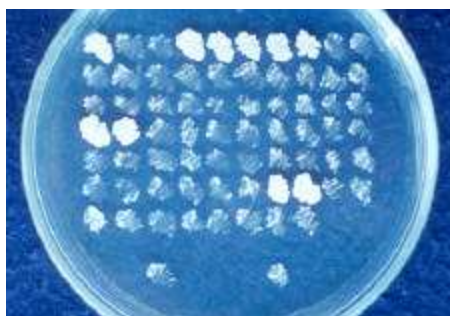


Figura 2 - *K. lactis* mutantes resistentes a ácido 5-fluoro orótico e auxotróficos para uracila, após mutagênese de uma população de 10^8 células por irradiação com UV durante 6 minutos, e selecionados em meio contendo 5FOA.

É possível inferir que o SUF atua como meio limitante seletivo no crescimento de mutantes auxotróficos para uracila. Assim, células mutantes, quando transformadas com o gene *URA3*, apresentarão uma velocidade de crescimento igual ou superior à exibida no SUF suplementado com uracila. O soro de queijo apresenta uma composição média de 93% de água e 7% de sólidos totais. Não foi encontrado nenhum relato sobre a concentração de uracila no soro. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a concentração de uracila no SUF seja limitante. Os controles, isto é, a linhagem selvagem cultivada em YPD, SUF, SUFU apresentaram o mesmo perfil de crescimento nos três meios testados.

Os mutantes também foram testados quanto à produção de proteases extracelulares. Nenhuma colônia mutante apresentou formação de halo de hidrólise em ágar leite, sugerindo serem proteases extracelulares negativas, (dado não mostrado). A caracterização de proteases é importante, pois estas podem afetar o processamento pós-traducional e, ou a degradação da proteína recombinante.

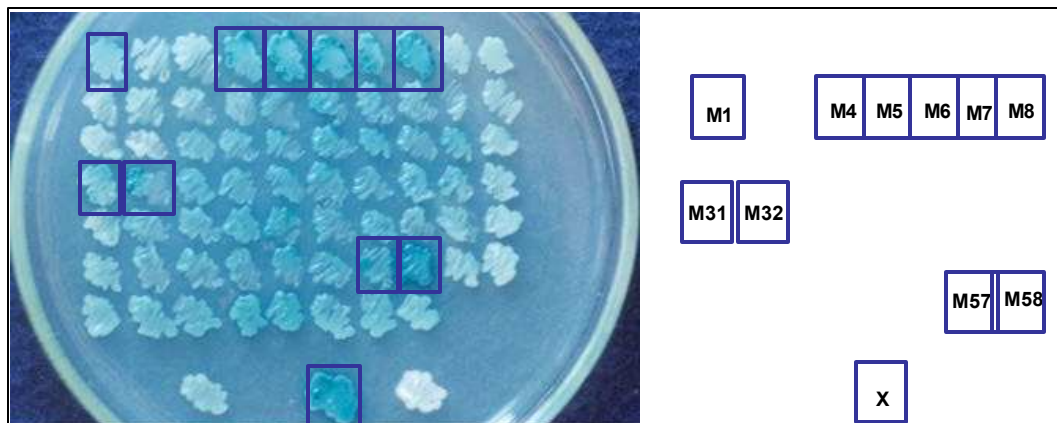


Figura 3 - Mutantes auxotróficos para uracila, de *K. lactis*, crescendo em meio YNBL na presença de X-Gal. A linhagem selvagem *Kluyveromyces lactis* X foi usada como controle.

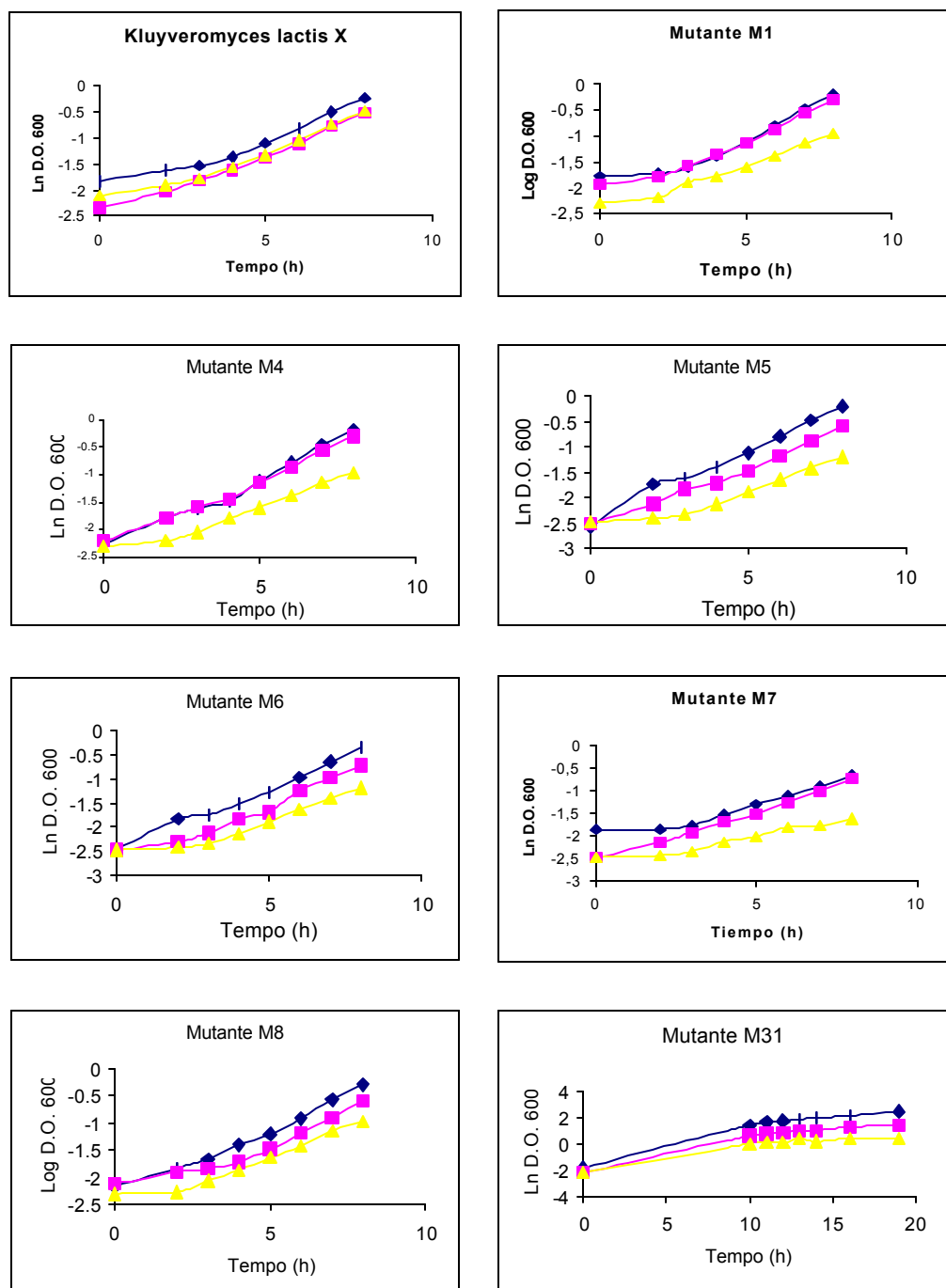


Figura 4 - Cinética de crescimento dos mutantes auxotróficos para uracila em regime de batelada em diferentes meios YPD: extrato de levedura, peptona, e dextrose (♦). SUFU: soro de queijo ultrafiltrado suplementado com uracila (■) e SUFU soro de queijo ultrafiltrado (▲). A linhagem selvagem *Kluyveromyces lactis* X foi controle.

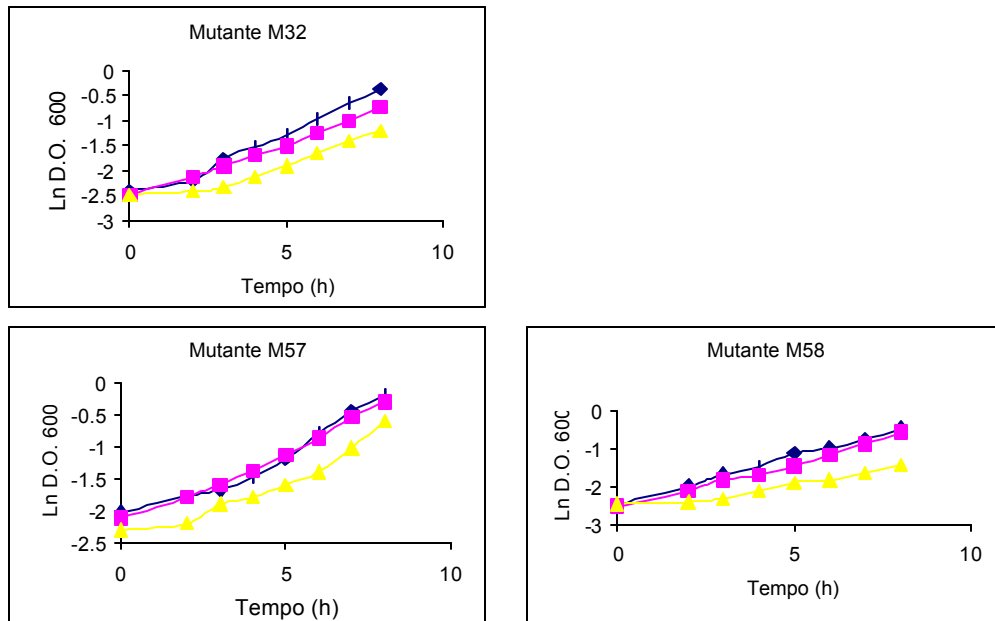


Figura 4 – (Cont.) Cinética de crescimento dos mutantes auxotróficos para uracila em regime de batelada em diferentes meios YPD: extrato de levedura, peptona, e dextrose (◆). SUFU: soro de queijo ultrafiltrado suplementado com uracila (■) e SUF soro de queijo ultrafiltrado (▲). A linhagem selvagem *Kluyveromyces lactis* X foi controle.

Quadro 1 - Velocidades específicas de crescimento (μ_{Max}) da *K. lactis* selvagem e dos mutantes em culturas sob regime de batelada. A linhagem selvagem *Kluyveromyces lactis* X foi controle.

Linhagens	μ_{max} (h ⁻¹)		
	Meio de cultura		
	YPD	SUFU	SUF
X	0,34	0,30	0,30
M1	0,22	0,18	0,07
M4	0,25	0,21	0,09
M5	0,25	0,15	0,07
M6	0,18	0,15	0,06
M7	0,25	0,16	0,04
M8	0,19	0,18	0,09
M31	0,25	0,21	0,12
M32	0,19	0,15	0,07
M57	0,19	0,18	0,13
M58	0,28	0,24	0,12

4.3. Estabilidade da auxotrofia dos mutantes de *K. lactis*

O isolamento de leveduras mutantes auxotróficas tem a perspectiva de serem úteis como hospedeiras para clonagem e expressão de genes homólogos ou heterólogos. Uma condição necessária no isolamento de possíveis hospedeiros é a obtenção de mutantes estáveis com mínima frequência de reversão. As 10 colônias mutantes auxotróficas para uracila foram submetidas à análise de estabilidade da mutação. O quadro 2 apresenta a frequência de reversão obtida para cada um dos mutantes analisados. O mutante M5 mostrou uma alta frequência de reversão $2,6 \times 10^{-2}$. A frequência de reversão dos outros 9 mutantes esteve entre $2,2 \times 10^{-5}$ e $1,7 \times 10^{-10}$. Estas frequências de reversão são similares às documentadas para outras leveduras selecionadas pela resistência a 5-FOA (NGAN et al., 2000, YANG et al., 1994 e SAKAI et al., 1991). A literatura recomenda que a frequência de reversão ideal seja menor que 1×10^{-8} (GLEESON et al., em HIGGINS e CREGG, 1998). Com base nesta recomendação, o mutante M7, que apresentou uma frequência de reversão de $1,7 \times 10^{-10}$, foi selecionado como potencial hospedeiro.

Quadro 2 - Frequências de reversão dos mutantes de *Kluyveromyces lactis* auxotróficos para uracila, isolados a partir de mutagênese por UV, seguida de seleção na presença de 5FOA.

Linhasgens	Frequência de Reversão
M1	$2,4 \times 10^{-5}$
M4	$7,3 \times 10^{-7}$
M5	$2,6 \times 10^{-2}$
M6	$4,2 \times 10^{-6}$
M7	$1,7 \times 10^{-10}$
M8	$2,2 \times 10^{-5}$
M31	$2,8 \times 10^{-7}$
M32	$3,5 \times 10^{-6}$
M57	$5,0 \times 10^{-6}$
M58	$5,4 \times 10^{-8}$

O mutante também não apresentou alteração nas propriedades cinéticas de crescimento em SUF, conforme mostrado anteriormente. Neste trabalho, a obtenção de mutantes auxotróficos para uracila foi conduzida com radiação UV, seguida pela seleção em meio contendo 5-FOA. A radiação UV é um agente mutagênico eficiente, e produz transições e transversões no DNA, além de induzir uma frequência significativa de mutações “frameshift” resultantes de deleções ou inserções de pares de bases (LAWRENCE, 1991). NGAN et al., (2000) caracterizaram, geneticamente, um mutante auxotrófico para uracila obtido espontaneamente pelo crescimento em placas contendo 5-FOA. O seqüenciamento do gene *ura3* mostrou uma única transversão, causando a formação de um códon de terminação tipo “*ocre*”. No presente trabalho, embora não tenha sido feita a caracterização genética dos mutantes, é esperado que algum destes eventos tenha ocorrido.

4.4. Transformação de *K. lactis* auxotrófica para uracila.

Este é o primeiro trabalho de transformação da levedura *Kluyveromyces lactis* X, nos laboratórios de Microbiologia da UFV. Esta metodologia foi realizada para verificar a complementação da auxotrofia para uracila com o gene *URA3* de *S. cerevisiae* na célula hospedeira. Nenhuma tentativa de transformação por eletroporação foi bem sucedida. Também não se observaram colônias nas placas controles, inoculadas com células submetidas à eletroporação na ausência do plasmídeo. Entretanto, o crescimento das células em meio contendo uracila de células eletroporadas em ausência do plasmídeo permitiu afirmar que a viabilidade das células não foi comprometida pelo procedimento de eletroporação. O procedimento de transformação utilizando PEG, acetato de lítio e DNA carreador fita simples (ssDNA) resultou na obtenção de transformantes. Como controle, células submetidas ao procedimento de transformação na ausência de plasmídeo não cresceram na ausência de uracila. A eficiência de transformação com o plasmídeo circular foi de 0,3 transformantes/ μ g de DNA. Este resultado está de acordo com os valores de transformação, observados por outros autores, utilizando plasmídeo circular (SAKAI et al., 1991; ORR-WEAVER et al., 1981). Estudos anteriores anteciparam uma baixa eficiência de transformação com plasmídeos circulares.

Em *S. cerevisiae*, e em outras leveduras, tem sido observado que plasmídeos linearizados são altamente “recombinogênicos” e integram diretamente em seqüências presentes no cromossomo (ORR–WEAVER et al., 1981). A eficiência de transformação, utilizando o plasmídeo linearizado com *Bam* HI, foi de 1,6 transformantes/ μ g de DNA. Esta eficiência é baixa em relação a dados da literatura, (SHIESTL et al., 1993). Todos os transformantes obtidos apresentaram um crescimento vigoroso, e todas as colônias reinoculadas em meio seletivo, isto é, sem uracila, foram capazes de crescer.

4.5. Análise do DNA genômico, estabilidade e cinética de crescimento em SUF dos transformantes

Cinco transformantes foram analisados no nível molecular, afim de investigar o evento de integração e complementação. Um dos transformantes analisados foi obtido, utilizando-se o plasmídeo circular, (dados não mostrados). Outros quatro transformantes, identificados como TB1, TB2, TB4 e TB5, foram obtidos utilizando-se o plasmídeo linearizado. DNA total de cada transformante, da célula mutante e da célula selvagem, foram clivados com a enzima *Bgl* II, que não possui sítio de restrição no plasmídeo e no gene *URA3* de *K. lactis*. Dos cinco possíveis transformantes analisados, o transformante TB4 evidenciou um fragmento de aproximadamente 6000 pb, quando hibridizado com o plasmídeo PTG802 utilizado como sonda (Figura 5). Nos demais transformantes, não se observou nenhum sinal de hibridização, nem com o DNA da célula selvagem nem com DNA da célula hospedeira mutante M7. O DNA plasmídial, utilizado como controle, apresentou sinal de hibridização positivo, conforme esperado.

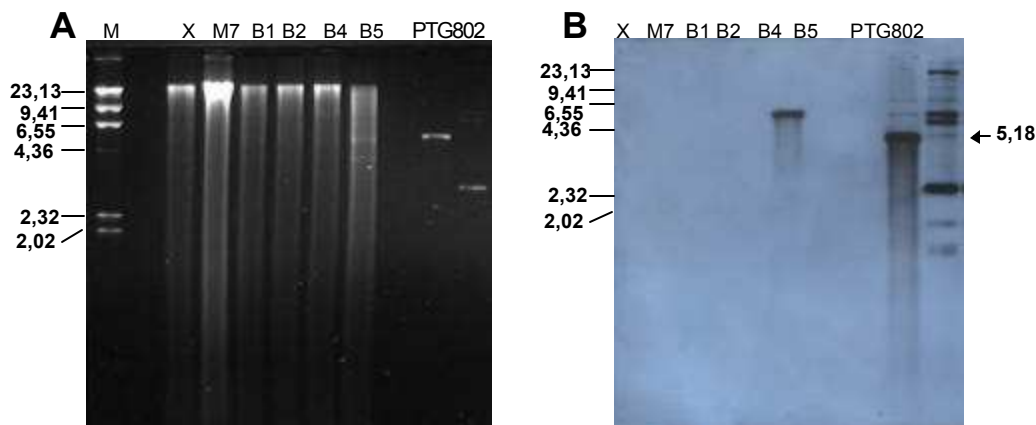


Figura 4 - Análise dos transformantes de *Kluveromyces lactis* M7. **A** Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA das linhagens selvagem (X), mutante (M7) e transformantes B1, B3, B4, B5 clivado com a enzima de restrição *Bgl* II. **B**. Auto-radiografia da hibridização com o plasmídeo PTG802.

Estes resultados indicam que, em um transformante, houve integração do plasmídeo ou somente do gene *ScURA3*, já que o fragmento hibridizado de 6 kb pode conter toda a seqüência do plasmídeo PTG802 (5,18 Kb) ou apenas o gene *URA3* de *S. cerevisiae* (1,1 Kb). Não foi possível identificar o tipo de evento de integração ocorrido, uma vez que a sonda correspondente ao gene *URA3* de *S. cerevisiae* não hibridizou com o gene *URA3* endógeno, mesmo a 45 °C (dado não mostrado). Estes resultados também não permitem esclarecer os eventos ocorridos nas outras células, possivelmente, transformadas. A possibilidade de reversão é mínima, pois, a densidade da população de células transformadas foi 100 vezes inferior àquela capaz de resultar em uma única colônia revertente, bem como as células sujeitas à transformação na ausência do plasmídeo, absolutamente não apresentaram nenhum crescimento nas placas controles. Entretanto os resultados não permitem eliminar a possibilidade de reversão, uma vez que a sonda não reconheceu seqüências homólogas no genoma dos outros possíveis transformantes. Considerando as diferenças observadas no crescimento da célula hospedeira em SUF e em SUF

suplementado com uracila, foi analisada a cinética de crescimento dos possíveis transformantes em SUF e da levedura mutante hospedeira M7. Os resultados mostram que os transformantes apresentaram velocidade específica máxima de crescimento superior à célula hospedeira e similar à da selvagem (Quadro 3). Os resultados de estabilidade e de crescimento dos transformantes em SUF indicam a restauração do fenótipo *ura3*.

Quadro 3 - Velocidades específicas máximas de crescimento (μ_{\max}) de transformantes, da célula hospedeira M7 sob regime de batelada em SUF. A linhagem selvagem *Kluyveromyces lactis* X e a levedura mutante hospedeira (M7) foram usadas como controles

Linhagens	μ_{\max} (h ⁻¹)
<i>K. lactis</i> X	0,26
M7	0,04
TPT	0,23
TB1	0,22
TB2	0,24
TB4	0,24
TB5	0,25

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho compreende o isolamento de mutantes de *Kluyveromyces lactis* auxotróficos para uracila, assim como a seleção e caracterização de um mutante com baixa frequência de reversão, para ser hospedeiro na produção de proteínas recombinantes, pela transformação com vetores contendo marca de seleção para uracila. Células selvagens de *K. lactis* foram submetidas à luz ultravioleta, seguida da seleção em meio contendo ácido 5 fluoro orótico. Foram isolados 10 mutantes resistentes a 5FOA. Nenhum dos mutantes apresentou alteração no crescimento em lactose, como única fonte de carbono, nem na atividade da enzima β galactosidase, características culturais importantes para crescimento em soro de queijo ultrafiltrado (SUF). Foi estabelecida a frequência de reversão da auxotrofia, para cada um dos mutantes. A frequência de reversão esteve entre $2,6 \times 10^{-2}$ e $1,7 \times 10^{-10}$. A levedura mutante M7 foi selecionada como potencial célula hospedeira, por apresentar uma baixa frequência de reversão na ordem de $1,7 \times 10^{-10}$.

A cinética de crescimento dos mutantes em SUF, em regime de batelada, foi estabelecida. Todos os mutantes apresentaram velocidades específicas de crescimento inferiores às da célula selvagem. Isto sugere que o SUF é limitante em uracila, podendo constituir um meio mínimo seletivo em culturas de *K. lactis* mutantes auxotróficas para uracila.

A complementação da auxotrofia da célula hospedeira potencial M7 foi analisada. Nesta análise, a população mutante foi submetida à transformação com o plasmídeo PTG802 (5,18 Kb), contendo o gene *URA3* de *S. cerevisiae*. Ao contrário da eletroporação, o choque térmico permitiu a obtenção de transformantes. A frequência de transformação com plasmídeo circular foi de 0,3 transformantes/ μ g de DNA. Com plasmídeo linearizado com *Bam* HI, a frequência foi de 1,6 transformantes/ μ g de DNA. Um transformante, analisado por hibridização com a sonda correspondente ao plasmídeo PTG802, mostrou integração do plasmídeo num fragmento de aproximadamente 6 Kb do DNA genómico clivado com *Bgl* II. A cinética de crescimento dos transformantes em SUF mostrou velocidades máximas de crescimento similares à da célula selvagem e superiores a da célula mutante, indicando reversão do fenótipo. O isolamento da célula hospedeira potencial significa o primeiro passo na construção de um sistema de expressão de proteínas recombinantes para *K. lactis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAI, X.; LAERSEN, M. e MEINHARDT, F.M. The *URA5* gene encoding orotate-phosphoribosyl transferase on the yeast *Kluyveromyces lactis*: cloning, sequencing and use as a selectable marker. **Yeast** **15**:1393-1398, 1999
- BARRETO, E.S. Atividade de β -Galactosidase e caracterização de mutantes de *Kluyveromyces lactis* resistentes a genética. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 43p., 1998 (Tese Mestrado)
- BARTKEVIEIUTÉ, D.; SIEKSTELE, R. e SASNAUSKA, K. Heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (*EPG1*) using a versatile autonomously replicating vector for a wide range of host. **Enzyme and Microbial Technology** **26**: 653-656, 2000)
- BASABE, L.; CABRERA, N.; YONG, V.; MENÉNDEZ, J.; DELGADO, J.M. e RODRÍGUEZ, L. Isolation and characterization of mutants as an approach to a transformation system in *Kluyveromyces marxianus*. **Current Genetics** **30**: 89-92, 1996.
- BERGKAMP, R.J.M.; KOOL, I.M.; KOOL, M.; GEERSE, R.H. e PLANTA, R.J. Multiple-copy integration of the α -galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*. **Current Genetics** **21**: 365-370, 1992
- BLONDEAU, K.; BOUNTOUR, O.; BOZE, H.; JUNG, G., MOULIN, G. e GALZY, P. Development of high-cell-density fermentation for heterologous interleukin 1β production in *Kluyveromyces lactis* controlled by the *PHO5* promoter. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **41**: 324-329, 1994

- BOEKE, J.D.; LACROUTE, F e GERALD, F. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphato descarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. **Mol. Gen. Genet.**, **197**: 345-346, 1984.
- BREUNING, K.D.; FUKUHARA, B.M.; BIANCHI, M.M.; BOURGAREL, D.; FALCONE, C.; FERRERO, I.; FRONTALI, L.; GOFFRINI, P.; KRINJGER, J.J.; MAZZONI, C.; MILKOWSKI, C.; STEENSMA, H.Y.; WÉSOLOWSKI, M. e ZEEMAN, A.M. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. **Enzyme and microbial technology** **26**: 771-780, 2000.
- BUI, D. M.; KUNZE, I.; HORSTMA, C.; e SCHMIDT, T. Expression of the *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Kluyveromyces lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **45**: 102-106, 1996.
- CHEN, X. J., WESOLOWSKI-LOUVEL, M., TANGUY-ROUGEAU, C., BIANCHI, M., FABIANI, L., SALIOLA, M., FALCONE.C., FRONTALI, L., e FUKUHARA, H. A gene-cloning system for *Kluyveromyces lactis* and isolation of chromosomal gene requerid for killer toxin production. **J. Basic. Microbiol.**, **28**: 211-220, 1988.
- DAS, S. e HOLLENBERG, C.P. A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Current Genetics** **6**:123-128, 1982
- DAS, S., KELLERMANN, E. e HOLLENBERG, C.P. Transformation of *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Bacteriology** **158**:1165-1167, 1984.
- DICKSON, R., e SHEETZ, M. *LAC4* is the structural gene for β -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. **Genetics** **98**: 729-745, 1981
- FLEER, R, YEH, P.; AMELLAL, N., MAURY, I.; FOURNIER, A; BACCHETTA, F.; BAUDEL, P.; JUNG, G.; L'HOTE, H.; BECQUART, J.; FUKUHARA H. e MAYAUX, J.F. Stable Multicopy vectors for high level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces lactis* yeasts. **Bio/technology**, **9**:968-975,1991a.
- FLEER, R.; CHEN, X. J.; AMELLA, L N.; YEH P.; FOURNIER, A.; GUINET, F.; GAULT, N.; FAUCHER, D.; FOLLIARD, F.; FUKUHARA, H e MAYAUX, J.F. High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin- β in *Kluyveromyces lactis*. **Gene** **107**:285-295, 1991b.
- GLEENSON, M. A.; HAAS, L.O. e CREGG, J.M. Isolation of *Candida tropicalis* auxotrophic mutants. **Applied Enviromental Microbiology** **56**: 2562-2564, 1990.
- GELLISSEN, G., e HOLLENBERG, C. P. Application of yeast in gene expression studies, a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorfa* and *Kluyveromyces lactis*. A review. **Gene** **190**:87-97, 1997.

- GOEDDEL, D. **Methods in Enzymology**, **185**, Editorial Academic. Press., Inc. 1990.
- GOLDSTEIN, A.L.; PAN, X. e McCUSKER, J. H. Heterologous *URA3MX* cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** **15**: 507-511, 1999.
- HADFIELD, C., RAINA, K., SHASSHI-MENON, K. e MOUNT, C.R. The expression and performance of cloned genes in yeast. Review. **Mycol Res.**, **97**:897-944, 1993.
- HIGGINS, D. e CREGG, J.M. *Methods in molecular biology*. V 103. Humana Press. 1998.
- HSIEH, H. e DA SILVA, N. A. Partial-pKD1 plasmids provide enhances structural stability for heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **49**:411-416, 1998.
- HSIEH, H. e DA SILVA, N. An autoselection system in recombinant *Kluyveromyces lactis* enhances cloned gene stability and provides freedom in medium selection. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **49**: 147-152, 1998.
- HENSING, M.C.M.; ROUWENHORST, R.J.; HEIJNENE, J.J.; VAN DIJKEN, J.P. e PRONK, J.T. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous protein production with yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek** **67**:261-279, 1995. ITO et al, (1983)
- HENSING, M.C.M.; BANGMA, K.A. RAAMSDONK, L.L.; HULSTER, E.; VAND DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Effects of cultivation conditions on the production of heterologous α -galactosidase by *Kluyveromyces lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **34**: 58-64, 1995
- ITO H.; FUKUSUDA, Y.; MURATA, K. e KIMURA, A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. **Journal of Bacteriology** **153**: 163-168, 1983.
- KELLY, R.; MILLER, S.; KURTZ, M.B. e KIRSCH, D.R. Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one step gene disruption to isolate *ura3* mutants. **Mol. Cel. Biol.**, **7**:199-207, 1987.
- KITADA, E.; YAMAGUCHI, E. e ARISAWA, M. Cloning of the *Candida glabrata* *TRP1* and *HIS3* genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation. **Gene** **165**: 203-206, 1995.
- KLEBE, R.J., HARRIS, J.V., SHARPE, Z.D. e DOUGLAS, M.G. A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacterial and yeast. **Gene** **25**: 333-341, 1993.

- LAWRENCE, C.W. Classical mutagenesis techniques. In: GUTHIERE, C.; FINK G.R. **Methods in enzymology**. Guide to yeast genetics and molecular biology. San Diego; Academic, v. 194, 273-281, 1991
- LOUVENCOURT, L.; FUKUHARA, H.; HESLOT, H. e WESLOWSKI, M. Transformation of *Kluyveromyces lactis* by killer plasmid DNA. **Journal of Bacteriology** **154**:737-742,1983
- MARTINEZ, E.; MORALES, J.; AGUIAR, J.; PINEDA, Y.; IZQUIERDO M. e FERBEYRE, G. Cloning and expression of hepatitis B surface antigen in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters** **14**: 83-86, 1992.
- MÜLLER, S.; SANDAL, T., KAMP-HANSEN, P. e DALBOGE, H. 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**: 1267-12-83, 1998.
- MUSTILLI, A.C.; IZZO, E.; HOUGHTON, M. E GALEOTII, C.L. Comparison of secretion of a hepatitis C virus glycoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*. **Res. Microbiol.**, **150**:179-187, 1999.
- NGAN, W.Y.; NGA, B.H.; PRIDMORE, B.; MOLLER, B.; e TAN, H.M. Transformation of *Endomyces fibuliger* based on its gene for orotidine-5'-phosphato descarboxylase. **Gene** **254**: 97-103, 2000
- OLAVO, P da C, S. Genética Molecular e de Microrganismos. Os fundamentos da Engenharia Genética. Editorial Manolete. LTDA. 1987.
- ORR-WEAVER, T.L.; SZOSTAK, J.W. e ROTHSTEIN, R.J. Yeast transformation: A model system for the study of recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **78**: 6354-6358, 1981.
- RATNER, M. Protein expression in yeast. **Biotechnology** **7**: 11291133, 1989.
- RHOTHSTEIN, R.J. One-step gene disruption of yeast. **Methods Enzymol.**,**101**: 202-211, 1983
- ROCHA, T.L.; PATERSONM, G.; CRIMMINS, K.; BOYD, A.; SAWER, E FOTHERGILL-GILMORE, L.A. Expression and secretion of recombinant ovine β -lactoglobulin in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*, **Biochem. J.**, **313**: 927-932, 1996
- RODRÍGUEZ, L.; CHÁVEZ, F.P.; BASABE, L.; RIVERO, T. e DELAGADO, J.M. Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Candida utilis*. **FEMS Microbiology letters** **165**: 335-340,1998
- ROMANOS, M. A., SCORER, C. A., e CLARE, J. J. Foreign Gene Expression in Yeast, a Review. **Yeast** **8**: 423-488,1992

- SAKAI, Y.; KAZARIMOTO, T.; e TANI, Y. Transformation system for an asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii*: Cloning on the orotidine-5'-phosphato descarboxylase gene (*URA3*), isolation of uracil auxotrophic mutants and use of the mutants for integrative transformation. **Journal of Bacteriology** **173**: 7459-7463, 1991
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2. ed. Cold. spring harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory, s.n.p, 1989.
- SÁNCHEZ, M., IGLESIAS, F.J.; SANTAMARÍA, C. e DOMINGUEZ, A. Transformation of *Kluyveromyces lactis* by electroporation. **Applied Environmental Microbiology** **59**:2087-2092, 1993
- SCHAFFRATH, R. e BREUNING, K. Genetics and Molecular Physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. Review. **Fungal Genetics and Biology**, **30**:173-190. 2000.
- SHIESTL, R.H.; MANIVASAKAM, P.; WOODS, R.A. e GIETZ, R.D. Introducing DNA into yeast by transformation. **A comparison to methods in enzymology** **5**: 79-85, 1993.
- SHUSTER, J.R., MOYER, D e IRVINE, B. Sequence of *Kluyveromyces lactis* *ura3* gene. **Nucleic. Acid. Res.**, **15**: 8573, 1987.
- SPECHT, C.A.; DIRUSSO, C.C.; NOVOTNY, C.P. e ULLRICH, R.C. A method for extracting high-weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry** **119**: 158-163, 1982.
- STARK, M., BOYDI, A., MILEHAM, A. e ROMANOS, M. The plasmid-encoded Killer system of *Kluyveromyces lactis*. A Review. **Yeast** **6**:1-29, 1990.
- STARK, M.J.R. e MILNER, J.S. Cloning and analysis of the *Kluyveromyces lactis* *TRP1* gene: a chromosomal locus flanked by genes encoding inorganic pyrophosphatase and histone H3. **Yeast** **5**: 35-50, 1989.
- SWINKELS, B.W., VAN Ooyen, A. e BONEKAMP, F. The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. **Antonie Van Leeuwenhoek** **64**:187-201, 1993.
- TOYN, J.H.; GUNYUXLU, P.L.; WHITE, W.H.; THOMPSON, L.A. e HOLLIS, G.F. A counter selection for the tryptophan pathway in yeast: 5-fluoroanthranilic acid resistance. **Yeast** **16**:553-560, 2000.
- TOKUNAGA, M., ISHIBASHI, M., TATASUDA, D. e TOKUNAGA, H. Secretion of Mouse α -Amylase from *Kluyveromyces lactis*. **Yeast** **13**:699-706, 1997.
- VAN DER BERG, J. VAN DER LAKEN, K., VAN Ooyen, A. J.; RENNERS, C.H.M., RIETVELD, K.; SCHAAP, A., BRAKE, A.J.; BISHOP, R.J.; SHULTZ, K.; MOYER, D.; RICHMAN, M. e SHUSTER, J.R. *Kluyveromyces*

as a host for heterologous gene Expression: Expression and Secretion of Prochymosin. **Biotechnology 8**: 135-139, 1990.

WALSH, D.J. e BERGQUIST, P. Expression and secretion of a thermostable bacterial xylanase in *Kluyveromyces lactis*. **Applied and Environmental Microbiology 63**: 3297-3300, 1997.

WOLF, K. Non conventional yeast in biotechnology. A Handbook. 2. ed. Cold spring harbor. Germany 253p, 1996.

YANG, V.W.; MARKS, J.; DAVIS, D. e JEFFRIES, T.W. High efficiency transformation of *Pichia stipitis* based in its *URA3* gene and homologous autonomous replication sequence, *ARS2*. **Appl. Environ. Microbiol., 60**: 4245-4254, 1994.

ZHANG, Y.P.; CHEN, X.J.; LI, Y.Y e FUKUHARA, H. *LEU2* gene homology in *Kluyveromyces lactis*. **Yeast 8**:801-804, 1992.