

**ANCÉLY FERREIRA DOS SANTOS**

**CONSTRUÇÃO DE CASSETES DE EXPRESSÃO LINEARES E  
TRANSFORMAÇÃO DE *Kluyveromyces marxianus* PARA EXPRESSÃO DE  
PROTEÍNAS HETERÓLOGAS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

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

T

S237c  
2012

Santos, Ancély Ferreira dos, 1984-  
Construção de cassetes de expressão lineares e  
transformação de *Kluyveromyces marxianus* para expressão  
de proteínas heterólogas / Ancély Ferreira dos Santos. –  
Viçosa, MG, 2012.  
ix, 61f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 54-60

1. *Kluyveromyces marxianus*. 2. Biocombustíveis.  
3. Enzimas. 4. Biotecnologia. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.562

**ANCÉLY FERREIRA DOS SANTOS**

**Construção de cassetes de expressão lineares e transformação de *Kluyveromyces marxianus* para expressão de proteínas heterólogas**

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

APROVADA: 15 de fevereiro de 2012.

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

---

Prof. Ieso de Miranda Castro

---

Prof. Luciano Gomes Fietto

(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meus passos nessa caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola pelo apoio acadêmico e institucional.

Ao CNPq pelo fomento à pesquisa e pela bolsa concedida.

À FAPEMIG pelo fomento à pesquisa.

Aos meus pais Antônio e Célia e ao meu irmão Clayton pelo apoio, carinho, amor e incentivo incondicionais.

Ao Professor Dr. Luciano Gomes Fietto pela orientação, apoio e amizade.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Andréa Barros Ribon pela amizade e pelos conselhos, críticas e sugestões.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelos ensinamentos.

Aos professores Dr. Sérgio Oliveira de Paula e Dr. Ieso de Miranda Castro que aceitaram participar da banca examinadora.

Ao amigo Eduardo pela amizade e pelo suporte nas questões burocráticas do Programa.

Às amigas-irmãs Lívia, Michelle, Natália e Lana por terem sido minha família em Viçosa e por tornar essa caminhada mais agradável.

À Mariana e Marina pela amizade e por compartilharem desde o início as alegrias e dificuldades dessa jornada.

À Aline pela amizade e auxílio nos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular cuja amizade, suporte e compreensão também tornaram possível a realização desse trabalho: Ananda, Aline, Carlos, Daiane, Daniela, Danielle, Glauco, Héllida, Mary, Marina, Mário, Murilo, Patrícia, Priscilla, Raphael, Silvana e Zamira.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em especial aos “vizinhos” do LBM pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, em especial ao Júlio e Talita por fazerem parte do início dessa trajetória.

A todos os meus amigos e familiares pela torcida e incentivo.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
2.1. Etanol de segunda geração.....	2
2.2. Engenharia genética em micro-organismos para aplicação em bioprocessos consolidados.....	4
2.3. A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	5
2.4. Produção de proteínas recombinantes em <i>K. marxianus</i> .....	7
2.5. Sistemas de expressão e transformação .....	10
2.6. Construção de cassetes de expressão por <i>overlap</i> PCR .....	11
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
3.1. Objetivo.....	14
3.2. Metas específicas .....	14
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
4.1. Plasmídeos e micro-organismos .....	15
4.2. Meios de cultura e condições de cultivo dos micro-organismos.....	15
4.3. Obtenção, amplificação e clonagem dos genes <i>cbhA</i> e <i>eng1</i> .....	16
4.3.1. Obtenção da seqüência codificadora da celobiohidrolase e da endo- $\beta$ -1,4-glucanase e desenho dos primers.....	16
4.3.2. Extração de RNA total de <i>Aspergillus niger</i> .....	17
4.3.3. Síntese do cDNA.....	18
4.3.4. Amplificação dos genes <i>cbhA</i> e <i>eng1</i> a partir do cDNA .....	18
4.3.5. Clonagem dos genes <i>cbhA</i> e <i>eng1</i> .....	18
4.4. Construção dos cassetes de expressão lineares com diferentes promotores para os genes <i>cbhA</i> e <i>eng1</i> com a técnica de PCR de fusão .....	19
4.4.1. Desenho dos primers para construção dos cassetes .....	19
4.4.2. Amplificação dos fragmentos a partir do pKLAC1 .....	27
4.4.3. Amplificação das regiões promotoras .....	27
4.4.4. Amplificação do KanMX.....	28

4.4.5. Overlap PCR.....	28
4.5. Transformação de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	31
4.5.1. Comparação entre os métodos de acetato de lítio e eletroporação .....	31
4.5.2. Análise de da influência de diferentes parâmetros na eficiência de transformação de <i>K. marxianus</i> UFV-3 .....	32
4.6. Seleção de <i>Kluyveromyces marxianus</i> transformantes.....	32
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
5.1. Obtenção dos genes <i>cbhA</i> e <i>eng1</i> .....	33
5.2. Clonagem dos genes <i>cbhA</i> e <i>eng1</i> .....	33
5.3. Construção dos cassetes de expressão lineares .....	35
5.3.1. Amplificação dos fragmentos intermediários .....	35
5.3.2. Padronização da reação de overlap PCR.....	37
5.3.3. Overlap PCR com os diferentes promotores .....	39
5.3.4. PCR de confirmação das construções.....	40
5.3.5. Sequenciamento .....	41
5.4. Transformação de <i>K. marxianus</i> UFV-3 e seleção de transformantes.....	44
5.4.1. Eficiência de transformação de <i>K. marxianus</i> UFV-3 pelos métodos de acetato de lítio e eletroporação .....	44
5.4.2. Avaliação da influência de diferentes parâmetros na eficiência de transformação de <i>K. marxianus</i> UFV-3 .....	47
5.4.3. Seleção de transformantes .....	51
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

KmINU1p: promotor do gene INU1 de *K. marxianus*

KmPCPL3p: promotor do gene PCPL3 de *K. marxianus*

ScPGKp: promotor do gene PGK de *S. cerevisiae*

ScHXT1: promotor do gene HXT1 de *S. cerevisiae*

ScTDH3: promotor do gene TDH3 de *S. cerevisiae*

*cbhA*: gene da celobiohidrolase A de *A. niger*

*eng1*: gene da endoglucanase A de *A. niger*

*KanMX*: gene que confere resistência ao antibiótico geneticina

Ov: *overlap* PCR

PEK: construção ScPGKp + *eng1* + *KanMX*

PE: construção ScPGKp + *eng1*

EK: construção *eng1* + *KanMX*

YEP: meio extrato de levedura 1% e glicose 2%.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do mecanismo de hidrólise da fibra de celulose.....	3
Figura 2: Esquema do método de <i>overlap</i> PCR.....	13
Figura 3: Estratégias da padronização da <i>overlap</i> PCR .....	21
Figura 4: Esquema do método de <i>overlap</i> PCR utilizado nesse trabalho.....	22
Figura 5: Fracionamento em gel de agarose do RNA e do produto de amplificação do cDNA.....	33
Figura 6: Fracionamento do produto da digestão do DNA plasmidial (pGEM-eng e pGEM-cbhA).....	34
Figura 7: Fracionamento do produto da digestão do DNA plasmidial (pKLAC1-eng e pKLAC1-cbhA).....	34
Figura 8: Fracionamento do produto de amplificação do <i>cbhA</i> .....	36
Figura 9: Fracionamento do produto das ampliações dos fragmentos intermediários .....	37
Figura 10: Fracionamento do produto da <i>overlap</i> PCR com a estratégia de 3 megaprimers.....	38
Figura 11: Fracionamento do produto da <i>overlap</i> PCR com a estratégia de 2 megaprimers.....	39
Figura 12: Fracionamento do produto da <i>overlap</i> PCR com todos os promotores.....	40
Figura 13. Fracionamento em gel de agarose 0,9% da confirmação das construções.	41
Figura 14: Resultado da análise no SIXPRAME.....	43
Figura 15: Viabilidade da levedura UFV-3 representada pelo número de UFC resultante após transformação.....	46
Figura 16: Avaliação da concentração do DNA na transformação.....	47
Figura 17: Avaliação da concentração de antibiótico na transformação.....	50
Figura 18: Resultado da seleção.....	52
Figura 19: PCR de confirmação.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistemas de expressão heteróloga para <i>K. marxianus</i> .....	09
Tabela 2: Lista de <i>primers</i> para amplificação dos genes <i>cbhA</i> e <i>eng1</i> .....	17
Tabela 3: Lista de <i>primers</i> utilizados para construção dos cassetes.....	23
Tabela 4: Cassetes de expressão construídos nesse trabalho.....	30
Tabela 5: Resultado do sequenciamento.....	42
Tabela 6: Eficiência de transformação de <i>K. marxianus</i> UFV-3 com os métodos de acetato de lítio e eletroporação.....	45
Tabela 7: Eficiência de transformação com os diferentes cassetes de expressão.....	48
Tabela 8: Eficiência de transformação com o cassete PEK e a combinação dos insertos PE e EK.....	51

## RESUMO

SANTOS, Ancély Ferreira dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Construção de cassetes de expressão lineares e transformação de *Kluyveromyces marxianus* para expressão de proteínas heterólogas.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientadores: Juliana Lopes Rangel Fietto e Andréa de Oliveira Barros Ribon.

A escolha da levedura hospedeira para produção de uma proteína heteróloga é fundamental para o sucesso de um processo biotecnológico, porém, apesar da diversidade de trabalhos com expressão de proteínas em leveduras, os níveis de secreção nesses organismos ainda são considerados baixos quando comparadas aos fungos filamentosos. A levedura *K. marxianus* possui grande potencial biotecnológico para fermentação e produção de proteínas. Apesar desse potencial existem poucos trabalhos relatando a expressão heteróloga de proteínas nessa levedura. Este quadro demonstra a necessidade de mais estudos para padronização de um sistema fácil e eficiente para obtenção de *K. marxianus* recombinantes para produção de proteínas de interesse. O objetivo deste trabalho foi padronizar a construção de cassetes lineares para expressão de proteínas heterólogas em *K. marxianus*. Os cassetes de expressão foram construídos pela técnica de PCR de fusão. Para tanto foi realizado um primeiro ciclo de reação na qual foi amplificado individualmente cada fragmento integrante do cassete (o promotor, o gene de interesse e a marca de seleção). Os promotores escolhidos, ScHXT1p, ScPGKp, ScTDH3p, KmINU1p e KmPCPL3p, foram amplificados do genoma de *S. cerevisiae* ou *K. marxianus*. Os genes das enzimas endoglucanase e celobiohidrolase de *Aspergillus niger* (*eng1e cbhA*) foram clonados no vetor pKLAC1 e este foi utilizado como molde para amplificação da sequência dos genes flanqueados pelas sequências do peptídeo sinal  *$\alpha$ -mating factor* de *Kluyveromyces lactis* e do terminador do gene *lac4* de *Kluyveromyces lactis*. A sequência codificadora do gene KanMX, marca de seleção que confere resistência em eucariotos para o antibiótico geneticina (G418), foi amplificado do DNA genômico de uma linhagem mutante de *S. cerevisiae*. O segundo passo consistiu da reação de fusão dos fragmentos de cada promotor com os fragmentos  $\alpha$ MF-gene-TT e KanMX por PCR. Esse tipo de construção se mostrou eficiente, reprodutível e passível de ser realizada em tempo muito inferior àquele de métodos de clonagem tradicionais. Os cassetes construídos foram utilizados na transformação de leveduras *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 por dois métodos, acetato de lítio e eletroporação. O protocolo de acetato de lítio foi mais eficiente e as colônias obtidas foram selecionadas por resistência às concentrações crescentes de G418.

## ABSTRACT

SANTOS, Ancély Ferreira dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Construction of linear expression cassettes na transformation of *Kluyveromyces marxianus* for heterologous protein expression.** Advisor: Luciano Gomes Fietto. Co-advisors: Juliana Lopes Rangel Fietto and Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Selection of the most suitable yeast host for heterologous protein expression is important for the success of a biotechnological process. However despite the diversity of works with protein expression in yeasts the secretion level in these organisms are still low when compared with filamentous fungi. The yeast *Kluyveromyces marxianus* has a great potential for fermentation and protein production. Although, there are few studies reporting heterologous expression in this yeast. It shows the need for more studies to develop an efficient system for the recombinant protein production in this yeast. The aim of this work was the construction of linear cassettes for expression heterologous proteins in *K. marxianus*. The cassettes were constructed by fusion PCR. For this purpose we performed a first reaction cycle in which each fragment was amplified individually (the promoter, the gene of interest and the selection mark). The promoters (ScHXT1p, ScPGKp, ScTDH3p, KmINU1p and KmPCPL3p) were amplified from the genome of *S. cerevisiae* and *K. marxianus*. The endoglucanase and celobiohidrolase genes from *A. niger* (*eng1* and *cbhA*) were cloned in pKLAC1 vector that was then used as template to amplify the sequence of genes flanked by the sequences of the *Kluyveromyces lactis* signal peptide  $\alpha$ -mating factor and LAC4 gene terminator. The gene *KanMX*, which confers resistance to geneticin (G418) in eukaryotes, was amplified from genome of a *S. cerevisiae* mutant. The second step was a fusion PCR reaction of the fragments: the promoter desired,  $\alpha$ -MF-gene of interest-TT and the *KanMX*. This construction was efficient, reproducible and capable of being held in a shorter time than traditional cloning methods. The constructions were used in *K. marxianus* UFV-3 transformation by two different methods, the lithium acetate and electroporation. The lithium acetate protocol was more efficient and the transformants were selected by resistance to increased G418 concentrations.

## 1 INTRODUÇÃO

A levedura *Kluyveromyces marxianus* possui características fisiológicas importantes que lhe conferem potencial para aplicação industrial na produção de proteínas. Dentre elas estão a utilização de um amplo espectro de substratos (Nonklang et al, 2009), alto fator de conversão de substratos em produtos, alta velocidade específica de crescimento relativa a outros organismos eucariotos (Rocha et al, 2011), termotolerância, *status* GRAS, alta capacidade fermentativa, diferente de leveduras do gênero *Pichia*, e eficiência de secreção de proteínas de alto peso molecular, diferente da *Saccharomyces cerevisiae* (Fonseca et al, 2008).

O objetivo do grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa é a produção de celulases recombinantes pela levedura *K. marxianus*, com o interesse no emprego desse organismo em bioprocessos consolidados para produção de etanol celulósico. No entanto, apesar das propriedades vantajosas para aplicação em bioprocessos, o uso da *K. marxianus* como hospedeira para produção de proteínas heterólogas é limitado (Rocha et al, 2010). Os trabalhos da literatura sobre este tema apresentam sistemas com características heterogêneas, várias linhagens diferentes foram descritas na literatura, muitas não disponíveis em coleções de culturas internacionais, e diferentes genes têm sido expressos utilizando-se cassetes de expressão com promotores e sinais de secreção distintos. Essa escassez de informações objetivas sobre aspectos básicos do sistema de expressão e secreção de proteínas dessa espécie é o maior entrave para sua exploração em processos biotecnológicos. Diante desse fato, este trabalho teve como objetivo padronizar um protocolo de transformação e desenvolver um sistema de expressão eficiente para a *K. marxianus*, começando por avaliar a eficiência de diferentes promotores, endógenos ou não, na expressão heteróloga de proteínas nessa levedura.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Etanol de segunda geração

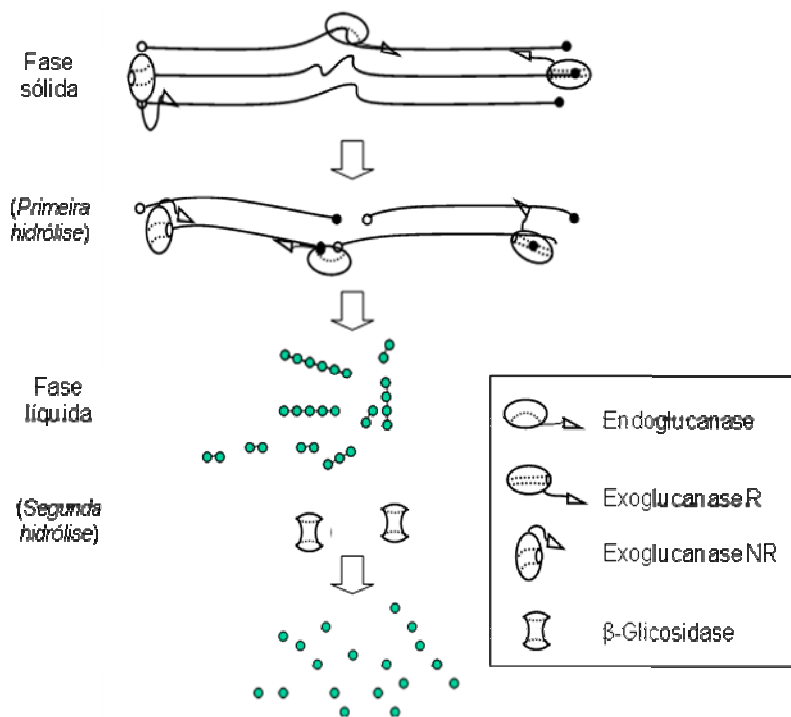
Uma das alternativas ambientalmente sustentáveis de substituição dos combustíveis fósseis é a utilização de resíduos agroindustriais para produção de energia. No caso do Brasil, a produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço e da palha de cana é uma estratégia promissora. Estimulados por políticas públicas de incentivo voltadas para ampliar a produtividade do etanol brasileiro, existe um volume substancial de instituições envolvidas na pesquisa e no desenvolvimento de processos para conversão direta do material lignocelulósico em etanol (Cortez, 2010).

A biomassa lignocelulósica contém cerca de 35 a 50% de celulose, até 35% de hemicelulose e de 5 a 30% de lignina. A celulose é um homopolissacarídeo linear, não ramificado, composto por resíduos de D-glicose, unidos por ligações  $\beta(1-4)$ . Na natureza a celulose forma uma estrutura parcialmente cristalina na qual as cadeias individuais do polissacarídeo formam um rearranjo compacto estabilizado por ligações de hidrogênio. A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por xilana, manana, beta-glucano e xiloglucano. A lignina é um polímero complexo formado de unidades de fenilpropanóides, com estrutura variável dependendo da espécie de planta (Mäki-Arvela et al, 2010).

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é realizada por um processo de quatro etapas: (1) pré-tratamento químico e físico da biomassa; (2) hidrólise das fibras de celulose e da hemicelulose; (3) fermentação; (4) destilação do produto final (Hasunuma e Kondo, 2011). O pré-tratamento visa reduzir a cristalinidade da celulose a fim de tornar as fibras acessíveis para sua degradação. Nesse passo, as fibras de celulose e hemicelulose são hidrolisadas por um processo catalisado por enzimas ou ácidos gerando os carboidratos fermentescíveis (hexoses e pentoses). Estes açúcares provenientes das frações de celulose e hemicelulose da biomassa podem ser fermentados, posteriormente, por micro-organismos e a porção de lignina, o principal sólido remanescente, pode ser queimada para gerar calor e eletricidade para o processo (Hahn-Hagerdal et al., 2006).

Na etapa da hidrólise, as enzimas responsáveis pela sacarificação da celulose são as celulases. As celulases são um subgrupo de glicosil hidrolases (EC 3.2.1.x) que catalisam a clivagem específica das ligações  $\beta(1-4)$  da celulose e representam a principal barreira econômica na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. O mecanismo mais aceito para a hidrólise completa da estrutura da

celulose envolve um complexo enzimático atuante, constituído por endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21). As endoglucanases catalisam a hidrólise, em regiões amorfas, das ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  intramoleculares acessíveis na cadeia da celulose, gerando novas terminações redutoras e não redutoras. As exoglucanases catalisam a clivagem das extremidades da cadeia, liberando celobiose ou glicose. As  $\beta$ -glicosidases catalisam a hidrólise da celobiose em glicose, eliminando o efeito inibidor da celobiose sobre as endo e exoglucanases. Esses três processos de hidrólise ocorrem simultaneamente, sendo a hidrólise primária realizada na superfície dos substratos sólidos, promovendo a despolimerização e liberação de açúcares solúveis. Essa etapa de despolimerização enzimática é resultado do sinergismo entre endoglucanases e exoglucanases e é o passo limitante de todo o processo de hidrólise. A hidrólise secundária ocorre na fase líquida e envolve a quebra da celobiose catalisada pelas  $\beta$ -glicosidases (Zhang et al., 2006). Esse mecanismo está ilustrado na figura 1.



**Figura 1:** Esquema do mecanismo de hidrólise da fibra de celulose pelas enzimas endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase. R: clivagem pela extremidade redutora; NR: clivagem pela extremidade não redutora (Adaptado de Zhang et al, 2006).

A hidrólise enzimática da fibra de celulose ainda constitui o principal impasse econômico para a utilização da biomassa para produção de etanol, uma vez que a produção das enzimas ainda não apresenta uma relação de custo e benefício favorável. Uma estratégia econômica e eficiente para produção do bioetanol em escala industrial é o bioprocessamento consolidado. Nessa estratégia, a produção das enzimas, a hidrólise e a fermentação são conduzidas por um único micro-organismo modificado geneticamente ou por um consórcio de micro-organismos com essas habilidades (Jeon et al, 2009). Porém, a aplicação dessa tecnologia na indústria ainda não foi possível devido à indisponibilidade de micro-organismos capazes de produzir todas as enzimas necessárias e ainda fermentar eficientemente (Hasunuma e Kondo, 2011). Por esse motivo, a prospecção desses micro-organismos na natureza e a engenharia genética de leveduras fermentadoras tradicionalmente utilizadas nas indústrias, para a produção de celulasas recombinantes, são o foco de alguns trabalhos engajados na utilização de resíduos agrícolas para produção de etanol.

## **2.2. Engenharia genética em micro-organismos para aplicação em bioprocessamento consolidado**

O bioprocessamento consolidado requer o desenvolvimento de um micro-organismo capaz de atender as seguintes especificações: produção de enzimas para a hidrólise dos polissacarídeos em carboidratos que possam ser fermentados; produção eficiente de etanol; utilização de hexoses e pentoses; resistência a etanol, a inibidores da fermentação e a baixa disponibilidade de nutrientes; e resistência a estresses físicos do ambiente como alta pressão osmótica, baixo pH e alta temperatura (Hasunuma e Kondo, 2011).

Esse organismo ideal pode ser obtido de duas maneiras, a primeira seria com o aprimoramento de organismos com habilidade natural de degradação da celulose. Nesse caso, o objetivo principal é a engenharia metabólica no organismo para produção de etanol, para a eliminação da síntese de subprodutos ou para o aumento da tolerância aos estresses do processo (Xu et al., 2010). A segunda maneira é a modificação genética de organismos que apresentam alta capacidade fermentativa para expressão heteróloga de celulasas, a fim de torná-los capazes de utilizar a celulose.

A levedura *S. cerevisiae*, por apresentar vantagens como alto potencial fermentativo em glicose, alta taxa de crescimento, maior resistência a compostos presentes nos hidrolisados de material lignocelulósico, são geralmente a primeira

escolha para produção industrial de etanol. Além disso, ela apresenta também facilidade de manipulação genética, genoma seqüenciado e disponível, um grande volume de informações sobre fisiologia e genética e *status* GRAS (*Generally Regarded As Safe*) de segurança. Diante dessas características, a produção heteróloga de celulases por essa levedura tem sido objeto de estudos, porém, sem resultados satisfatórios na secreção e fermentação simultânea de substratos complexos (Khramtsov et al, 2011).

Como alternativa à *S. cerevisiae*, e buscando explorar a grande biodiversidade existente, estão as leveduras não *Saccharomyces*, também chamadas de leveduras não convencionais. Essas leveduras apresentam uma capacidade de utilização de diversos substratos, propriedades fisiológicas particulares e rotas metabólicas não usuais, como por exemplo, a utilização e fermentação de lactose e galactose por leveduras do gênero *Kluyveromyces* (Jeffries e Cregg, 2010). Além disso, pelo fato já relatado de algumas *K. marxianus* serem capazes de utilizar xilose e celobiose e apresentar alto teor fermentativo em glicose (Nonklang et al, 2008), esse grupo tem sido estudado e caracterizado quanto à sua fisiologia e genética para utilização como hospedeiras na produção de proteínas recombinantes, visando sua aplicação em bioprocessos consolidados.

### **2.3. A levedura *Kluyveromyces marxianus***

A *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura filogeneticamente relacionada com as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, mas apresenta características particulares que são o seu diferencial para aplicação biotecnológica. A maior característica em comum entre *K. Lactis* e *K. marxianus* é a capacidade de assimilar lactose e usar esse carboidrato como fonte de carbono. Essa qualidade, que é ausente em *S. cerevisiae*, possibilita encontrar espécies a partir de fontes de leite, como leites fermentados, iogurtes e queijos (Lane e Morrissey, 2010). Linhagens pertencentes às espécies de levedura *K. marxianus* têm sido isoladas a partir de uma grande variedade de habitat, o que resulta em uma alta diversidade metabólica e um substancial grau de polimorfismo intra-espécie. Como consequência dessa grande diversidade e de apresentar o *status* GRAS, essa levedura tem sido estudada para aplicação em diferentes áreas do setor biotecnológico (Fonseca et al, 2008).

Uma das principais características de *K. marxianus* é a termotolerância. As linhagens pertencentes a essa espécie são capazes de crescer em temperaturas entre 45 e 49°C (Nonklang, 2008). Quando consideramos o metabolismo, a *K. marxianus* possui a capacidade de crescer em um amplo espectro de substratos e apresenta uma

das maiores taxas de crescimento entre os organismos eucariotos, com um tempo de geração de 70 minutos. Embora *K. marxianus* seja classificada como *Crabtree*-negativa, alguns autores a consideram como sendo respiro-fermentativa e, sob certas condições, pode adotar o estilo de vida fermentativo (Lane e Morrissey, 2010). Essa versatilidade pode explicar porque algumas e não todas as linhagens de *K. marxianus* são eficazes na produção de etanol (Hong et al., 2007; Nonklang et al., 2008). Além disso, algumas linhagens apresentam dimorfismo, podendo se apresentar na forma de filamentos ou leveduriforme, sendo esta última a morfologia dominante e que é afetada pela taxa específica de crescimento. Essa é uma característica que pode ser explorada industrialmente para a secreção de proteínas, uma vez que os organismos filamentosos são conhecidos por sua propriedade de secreção eficiente (Rocha et al., 2011).

Em termos de estudos bioquímicos de interesse industrial, *K. marxianus* tem sido usada como produtoras de enzimas endógenas como inulinase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glicosidase, endopoligalacturonases e outras proteínas com potenciais aplicações biotecnológicas, tais como proteínas fosfatases, carboxipeptidases e aminopeptidases. Devido a *K. marxianus* ser capaz de secretar uma proteína de alto peso molecular como a inulinase, é suposto que essa seja uma característica favorável para sua aplicação em produção de proteínas heterólogas. (Zhang et al., 2003). Alguns exemplos mostrando a produção heteróloga de proteínas nesta levedura foram relatados na literatura (Bergkamp et al., 1993; Zhang et al., 2003; Pecota et al., 2007; Hong et al., 2007; Nonklang et al., 2008; Rocha et al., 2010; Yanase et al., 2010). Estes estudos demonstram uma grande variedade na capacidade de expressão heteróloga de proteínas entre as linhagens de *K. marxianus*, e ainda apresentam pouca informação consistente sobre a capacidade dessa levedura de secretar eficientemente e realizar modificações pós-traducionais.

Como acontece com qualquer organismo com potencial aplicação industrial, a manipulação genética racional é uma das maneiras mais eficientes de estudo e de aperfeiçoamento do processo de produção e produtividade. Porém, a escassez de estudos em nível molecular nessa levedura e o polimorfismo genético entre as linhagens é uma desvantagem para sua aplicação biotecnológica. Faz-se necessário, portanto, a caracterização fisiológica e molecular de cada linhagem a ser utilizada.

A linhagem de *K. marxianus* utilizada nesse trabalho, a *K. marxianus* UFV-3, foi isolada na Universidade Federal de Viçosa pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, a partir de soro de queijo. Essa levedura vem sendo caracterizada quanto ao seu potencial fisiológico e de produção de etanol (Silveira et al., 2005; Diniz et al., 2011; Souza et al., 2012) e também estão

sendo realizadas a caracterização e o melhoramento de *K. marxianus* UFV-3 para produção de etanol celulósico objetivando o emprego dessa levedura em bioprocessos consolidados. O trabalho de Souza e colaboradores (2012) demonstrou o potencial da *K. marxianus* UFV-3 para utilização em sistema de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) do bagaço de cana de açúcar. Lopes (2011) comprovou a existência nessa levedura de uma  $\beta$ -glicosidase extracelular com atividade de hidrólise de celobiose, o que lhe confere uma vantagem na fermentação de substratos celulósicos. Este trabalho é uma contribuição para a caracterização do potencial da linhagem UFV-3 para produção de proteínas recombinantes.

#### **2.4. Produção de proteínas recombinantes em *K. marxianus***

Em contraste com *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris* e *K. lactis*, *K. marxianus* não tem sido alvo de investigações sistemáticas, dessa forma, existem poucas informações públicas a seu respeito sobre a sequência de seu genoma, nenhum sistema de clonagem comercial e nenhuma linhagem de referência para estudos com propósitos de pesquisa sobre aspectos básicos dessa espécie. Apesar disso, devido a algumas de suas propriedades fisiológicas já descritas, *K. marxianus* são constantemente indicadas como uma atrativa candidata a várias aplicações biotecnológicas (Rocha et al, 2010). Nesse trabalho, a escolha dessa espécie é uma alternativa de contornar as limitações das leveduras *Saccharomyces* e *Scheffersomyces* (*Pichia*) na produção de proteínas recombinantes e na capacidade fermentativa, respectivamente.

Alguns trabalhos têm publicado a clonagem e expressão em *K. marxianus* e a Tabela 1 resume os sistemas de expressão heteróloga empregados até o momento para essa levedura. Bergkamp et al (1993) foram os pioneiros nos trabalhos de expressão em *K. marxianus*. Eles expressaram uma  $\alpha$ -galactosidase com os promotores PGK e GAL1 e o sinal de secreção *SUC2* de *S. cerevisiae* e identificaram e testaram um promotor homólogo e seu peptídeo sinal, o INU1. Os resultados desse grupo mostram que o promotor endógeno foi mais eficiente, mas a comparação foi baseada em construções com sinais de secreção diferentes. Outro fato observado foi que o vetor episomal construído com base no plasmídeo pKD1 mostrou baixo número de cópias em *K. marxianus* e pouca estabilidade em meio não seletivo. Em 1999, Ball e colaboradores publicaram a expressão heteróloga de uma beta-glucuronidase com os promotores PGK, GAL1, HSP26 e ADH1 de *S. cerevisiae* e identificaram e caracterizaram o promotor endógeno PCPL3. O sistema empregado nesse trabalho,

diferente do primeiro, mostrou a eficiência do promotor PGK, e também do PCPL3, mas a secreção não foi avaliada. Pecota e colaboradores (2005) avaliaram o sistema de expressão utilizando o promotor da tetraciclina de *S. cerevisiae* com produção intracelular de beta-glucuronidase. Em 2007, o mesmo grupo foi o primeiro a usar o método de integração em *K. marxianus* com o sistema de integração seqüencial, abrindo novas possibilidades de sistemas de expressão mais estáveis. No trabalho de Nonklang e colaboradores (2008) a comparação dos sistemas com plasmídeo replicativo e integrativo demonstrou maior eficiência de transformação no segundo caso e também que a transformação com DNA linear favorece o fenômeno de integração. Rocha e colaboradores em 2010 e 2011 expressaram uma glicose oxidase e uma esterase e observaram menor potencial de produção frente a *K. lactis*, utilizando elementos genéticos de *S. cerevisiae* para dirigir a expressão e a secreção.

Uma vez que muitas linhagens de *K. marxianus* vêm demonstrando sucesso em processos fermentativos, estudos inseridos no contexto de produção de bioetanol buscam aliar essa capacidade com a produção de proteínas heterólogas para geração de etanol celulósico por bioprocessos consolidados. Dois trabalhos já foram publicados com essa finalidade: Hong e colaboradores (2007) construíram uma linhagem co-expressando genes de celulases, sendo o transformante capaz de fermentar celobiose, porém, incapaz de hidrolisar material celulósico mais complexo como a carboximetil celulose (CMC). Nesse trabalho também foi demonstrado que o peptídeo sinal  $\alpha$ -mating factor de *S. cerevisiae* é reconhecido para secreção em *K. marxianus*. Em outro trabalho também foi feita a co-expressão de duas enzimas em *K. marxianus*, endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase. Esses transformantes foram capazes de hidrolisar o substrato  $\beta$ -glucano e fermentar os açúcares resultantes (Yanase et al., 2010), porém esses resultados não podem ser extrapolados para a hidrólise de biomassa, uma vez que *in natura* esses materiais lignocelulósicos são muito mais recalcitrantes. Diante da diversidade entre linhagens de *K. marxianus*, das diferentes estratégias adotadas para obtenção de transformantes e escassez de informações objetivas sobre elas e da sua não reprodutibilidade, faz-se necessário um estudo mais sistemático para melhor exploração dessa espécie em processos biotecnológicos.

**Tabela 1: sistemas de expressão heteróloga para *K. marxianus***

Proteína	Fonte	Vetor	Promotor	Sinal de secreção	Referência
$\alpha$ -galactosidase	<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	pKMGAL3 (episomal)	KmINU1	KmINU1 pre-pro	Bergkamp et al. (1993)
$\beta$ -glucuronidase	<i>E. coli</i>	pKM2/GUS	ScPGK Km PCPL	Intracelular	Ball et al. (1999)
$\beta$ -glucuronidase	<i>K. marxianus</i>	pTetGus	tet-off	Intracelular	Pecota et al. (2005)
Lactato desidrogenase	<i>Bacillus megaterium</i>	pUB-LDH (integrativo)	ScPGK	Intracelular	Pecota et al. (2007)
Endo- $\beta$ -1,4-glucanase e $\beta$ -glicosidase	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	pBGL pKmUI/KmG AP- $\alpha$ -eng1	KmGAPDH	Sc $\alpha$ -factor	Hong et al. (2007)
$\alpha$ -amilase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Cassette linear	ScTDH3	Não informado	Nonklang et al. (2008)
Endo- $\beta$ -1,4-glucanase e $\beta$ -glicosidase	<i>Trichoderma reesei</i> e <i>A. aculeatus</i>	pUAGI	ScPGK	$\delta$ -seq	Yanase et al. (2010)
Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	pSP pIN	ScPGK KmINU1	KI k1 Km INU1	Rocha et al. (2010)
Esterase	<i>Thermus thermophilus</i>	pSP pIN	ScPGK KmINU1	KI k1 Km INU1	Rocha et al. (2011)

## 2.5. Sistemas de expressão e transformação

As etapas para expressão heteróloga em levedura consistem em clonagem da sequência codificadora da proteína de interesse um cassete contendo um promotor, uma sequência de terminação de transcrição e uma marca de seleção, seguida de transformação e manutenção desse DNA na hospedeira. A seleção dos transformantes pode ser obtida com marcas de seleção dominantes, baseadas em resistência a antibiótico, ou por auxotrofia, baseada em complementação nutricional de deficiências genéticas. As marcas auxotróficas são muito comuns em leveduras, mas duas marcas de resistência são também populares: os genes que codificam amonoglicosídeo-3-fosfotransferases, que conferem resistência aos antibióticos geneticina (G418) e kanamicina. A concentração típica de uso desses antibióticos é de 50µg/ml, mas para ser efetiva, o organismo deve ser sensível a essa concentração e capaz de expressar o gene em um nível basal para garantir sua sobrevivência (Jeffries e Cregg, 2010). A escolha do promotor para o desenvolvimento de um sistema de expressão é fundamental para o sucesso do processo, uma vez que o reconhecimento e o tipo de regulação que esse promotor no organismo hospedeiro é determinante para sua atividade. Logo, promotores endógenos têm a probabilidade de serem mais funcionais do que os de outras espécies, porém, tem sido demonstrada a compatibilidade entre alguns promotores de *S. cerevisiae* em outras leveduras. A vantagem de se utilizar promotores de *S. cerevisiae* é a disponibilidade e o nível de informações sobre eles. Neste trabalho, a fim de comparar a eficiência de expressão em *K. marxianus*, escolhemos dois promotores endógenos, o INU1 e o PCPL3 e os promotores de *S. cerevisiae* PGK, TDH3, já descritos na literatura para expressão em *K. marxianus*, e o HXT1, ainda não utilizado. O diferencial desse para os outros trabalhos é que todos os cassetes de expressão foram padronizados com o mesmo gene e o mesmo sinal de secreção, podendo-se fazer uma melhor comparação entre eles.

Segundo Porro e colaboradores (2005), para espécies de leveduras homotáticas como a *K. marxianus*, técnicas de manipulação genética desenvolvidas para heterotáticas como a *S. cerevisiae* podem ser aplicadas com eficiência satisfatória. Diferentes protocolos de transformação de *S. cerevisiae* e *K. lactis* já foram utilizados em *K. marxianus*. Entre eles encontramos o método de acetato de lítio ou de eletroporação, com eficiência de transformação na ordem de  $10^2$  ou  $10^3$  UFC/µg de DNA, utilizando plasmídeos replicativo ou epissomal (Fonseca et al, 2008). Em

2008, Nonklang e colaboradores obtiveram uma eficiência de transformação de *K. marxianus* DMKU3-1042 com fragmento linear muito maior do que com um plasmídeo replicativo, de 90 para  $4,2 \times 10^3$  UFC/ $\mu$ g de DNA. Em 2010, Abdel-Banat e colaboradores padronizaram um método específico para transformação de *K. marxianus*, com método integrativo, e obtiveram uma eficiência da ordem de  $10^6$  UFC/ $\mu$ g de DNA para a linhagem DMKU3-1042, de  $10^4$  para a IFO0273 e de  $10^3$  para as linhagens IFO0277 e NCYC587, confirmando a suposição de Gietz e Schiestl (2007) de que a eficiência de transformação varia de acordo com a linhagem utilizada. Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa observamos baixa eficiência de transformação da linhagem *K. marxianus* UFV-3 com o vetor pKLAC1, com o método de acetato de lítio indicado no protocolo do *K. lactis Protein Expression Kit* (New England BioLabs), e com o protocolo de Hill e colaboradores (1991), também desenvolvido para *K. lactis*. A fim de padronizar um sistema de transformação e expressão em *K. marxianus*, neste trabalho avaliamos técnicas de transformação para a linhagem UFV-3 e os fatores que influenciam sua eficiência, além disso, construímos diferentes sistemas de expressão empregando a simplicidade e rapidez da técnica de PCR.

## 2.6. Construção de cassetes de expressão por *overlap* PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se tornado cada vez mais uma ferramenta de uso generalizado com diferentes aplicações em biologia molecular. O método desenvolvido ainda no final dos anos 80 por Yon e Fried (1989) que possibilita a fusão de fragmentos de DNA por PCR, representa uma alternativa mais rápida e econômica de construir fragmentos de DNA híbridos em detrimento do uso de reações de clivagem e ligação (figura 2a). Essa estratégia apresenta diversas aplicações como: introduzir substituições de nucleotídeo, inserções ou deleções; mutagênese sítio-dirigida; construção de moléculas quiméricas e clonagem. Diferentes técnicas já foram descritas com base na estratégia de ligação de fragmentos de DNA mediada por PCR e são conhecidas como PCR de fusão, *overlap-extension* PCR ou *megaprimer* PCR (Chem et al, 2008, Bryksin e Matsumura 2010, Nelson e Fitch 2011).

De forma geral, o método de PCR de fusão compreende uma reação inicial que gera fragmentos intermediários de DNA que se sobrepõem. Os *primers* que geram esses fragmentos iniciais apresentam duas porções, uma que é complementar ao fragmento a ser amplificado e outra de sobreposição a outro fragmento. Em uma reação de PCR subsequente, as extremidades de sobreposição dos fragmentos intermediários anelam-se e o fragmento completo é amplificado por *primers* que

flanqueiam o início e o final da sequência desejada. À esse último conjunto de *primers* podem ser adicionados sítios de restrição para endonucleases a fim de inserir o produto amplificado em um vetor para o propósito de clonagem (Heckman et al, 2007).

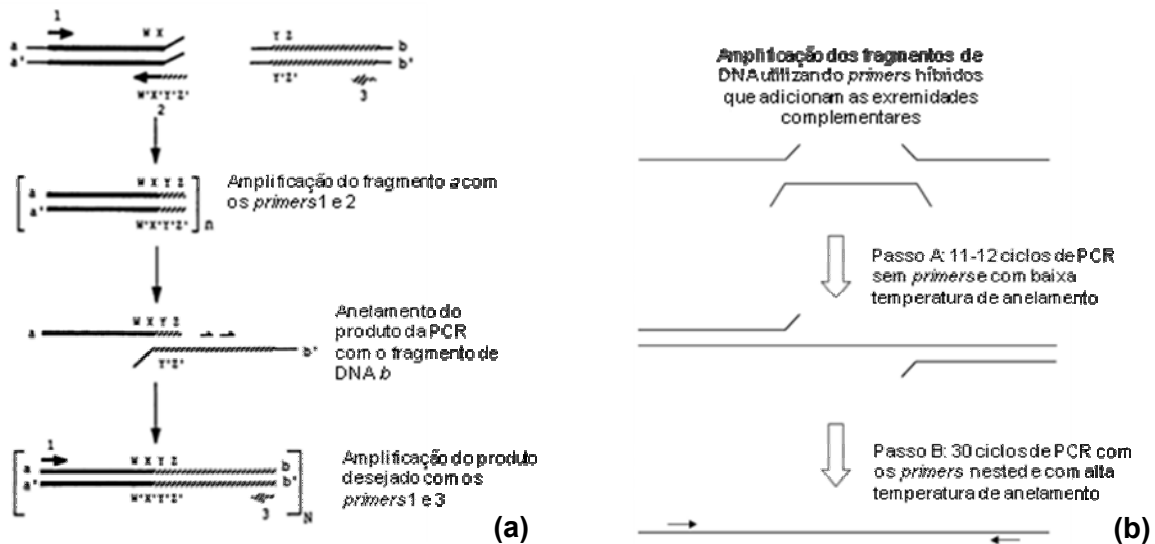
Apesar da aparente simplicidade do método, ele apresenta alguns requerimentos técnicos de ajuste das condições da reação que fazem com que ele ainda não seja amplamente utilizado se comparado à técnica clássica de construção de plasmídeos recombinantes (Cha-aim et al, 2009). Entretanto, quando há a necessidade de ligação de dois ou mais fragmentos de DNA sem a introdução de sequências não desejadas nas junções, o método de PCR de fusão pode ser empregado e seria uma ferramenta muito útil para análises e manipulação de um grande número de fragmentos de DNA (Cha-aim et al, 2009). Os limitantes da *overlap* PCR são os reagentes utilizados e o grau de pureza do DNA a ser amplificado.

A limitação primária para a ligação dos fragmentos e correta amplificação do produto final é a eficiência da DNA polimerase utilizada (Heckman e Pease, 2007). Os fragmentos iniciais devem ser produzidos com uma enzima que apresente atividade de correção 3'→5', como a Pfu polimerase. As polimerases do tipo Taq de alta fidelidade não são indicadas para o primeiro passo de amplificação devido à característica inerente dessas enzimas de adição de adenina nas extremidades do amplificado. Segundo Shevchuk e colaboradores (2004), a presença de uma base não complementar na extremidade do fragmento pode impedir a correta sobreposição ou resultar uma mutação não desejada.

Outro limitante da técnica é a pureza dos produtos intermediários e do DNA utilizado como molde para as amplificações. A qualidade do DNA molde é uma limitação para atividade da Pfu polimerase, já a purificação dos produtos intermediários, por métodos de dessalinização, lavagem com Kits específicos para produtos de PCR ou purificação direta do gel de agarose, é um requerimento da técnica para que a amplificação específica do produto final seja favorecida (Heckman e Pease, 2007). A especificidade pode também ser obtida fazendo uso de softwares para o desenho dos *primers* e seleção de sequências com concentração de CG de 50% no mínimo e temperatura de *melting* na faixa de 65-68°C, quando possível, ou suficientemente altas para evitar produtos secundários ou formação de estruturas secundárias entre eles (Chem et al, 2008).

Existem diferentes protocolos para PCR de fusão, no entanto todos são limitados a fusão de dois fragmentos com sequências pequenas ou fazem necessárias modificações não triviais para fusão de fragmentos maiores que 3 Kb ou com mais de dois fragmentos na mesma reação. Em 2004, Shevchuk e colaboradores descreveram um protocolo adaptado com o qual foi possível construir moléculas de DNA de até

20kb, usando *primers* híbridos com caudas de sobreposição complementares contendo de 40 a 70 nucleotídeos e uma reação de PCR em dois passos (figura 2b).



**Figura 2:** Esquema do método de PCR de fusão: (a) segundo Yon e Fried (1989) para ligação de 2 fragmentos e (b) segundo Shevchuk e colaboradores (2004) para a ligação de 3 fragmentos. Os procedimentos têm início com a amplificação dos fragmentos utilizando *primers* híbridos que introduzem extremidades para sobreposição. Em seguida as extremidades complementares se sobrepõem. Finalmente a uma nova reação são adicionados *primers* das extremidades, (a) 1 e 3 e (b) *nested* com o objetivo de amplificar todo o cassete.

Heckman e Pease, em 2007, propuseram que a sequência de sobreposição no *primer* deve ter um mínimo de 10 nucleotídeos. Em 2009, Cha-aim e colaboradores observaram que, quanto maior a sequência de sobreposição menor é a eficiência de amplificação e que reações de *overlap* PCR com sequências autênticas às presentes nos fragmentos pode ocasionar menor eficiência de amplificação, uma vez que dependendo da sequência, a qualidade do *primer* pode ser comprometida. O grupo demonstrou, entretanto, que pequenas sequências de 15 nucleotídeos ricos em guanina e citosina ( $G_{15}/C_{15}$ ) ou uma combinação desses (poli GC) mostram alta eficiência de amplificação, podendo ser usada para fundir sequências de DNA sem comprometer a integridade do gene e mantendo o quadro correto de leitura.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo

Obter transformantes de *Kluyveromyces marxianus* com diferentes cassetes de expressão para genes de celulases

#### 3.2. Metas específicas

- Clonar o gene que codifica a endo- $\beta$ -1,4-glucanase (*eng1*) e celobiohidrolase (*cbhA*) de *Aspergillus niger* no vetor pKLAC1;
- Padronizar a técnica de PCR para sobreposição dos fragmentos constituintes de um cassete de expressão;
- Construir cassetes de expressão lineares para os genes *eng1* e *cbhA* de *Aspergillus niger* com diferentes promotores utilizando a técnica de PCR de fusão;
- Avaliar metodologias de transformação para a levedura *Kluyveromyces marxianus* UFV-3;
- Selecionar *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 recombinantes expressando genes de celulases.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### 4.1. Plasmídeos e micro-organismos

O plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega) foi usado no processo de clonagem dos genes *cbhA* e *eng1*.

O plasmídeo pKLAC1 (New England Biolabs®) foi usado nos processos de clonagem dos genes *cbhA* e *eng1* e transformação da levedura *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. Esse vetor é integrativo, contém a sequência de secreção *alpha mating factor* ( $\alpha$ MF) de *Kluyveromyces lactis*, o sítio múltiplo de clonagem (MCS), e o gene AMDS de *Aspergillus nidulans*, que codifica uma acetamidase utilizada como marca de seleção dos transformantes.

O fungo *Aspergillus niger*, cedido pelo Laboratório de Genética de Micro-organismos - BIOAGRO/DMB/UFV, foi utilizado como fonte de RNA para obtenção e amplificação dos genes das enzimas celobiohidrolase e endo- $\beta$ -1,4-glucanase.

A bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , proveniente da coleção de micro-organismos do LBM, foi a propagadora dos plasmídeos usados nas clonagens.

A levedura *Kuyveromyces marxianus* UFV-3, selvagem, cedida pelo Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos DMB/UFV, foi usada como hospedeira em todos os experimentos de transformação e como doadora do DNA para amplificação dos promotores KmINU1p e KmPCPL3p.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* LBM-1, selvagem, isolada pelo grupo de pesquisadores do LBM, foi usada como doadora do DNA para amplificação dos promotores ScHXT1p, ScPGKp e ScTDH3p.

A levedura *S. cerevisiae* BY4742 (Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR016c::kanMX4), proveniente do estoque de micro-organismos do LBM, foi usada como doadora do DNA para amplificação da marca de seleção *KanMX*.

### 4.2. Meios de cultura e condições de cultivo dos micro-organismos

O fungo *Aspergillus niger*, retirado do estoque em óleo mineral, foi ativado em meio BDA (batata, dextrose e ágar - VETEC). Para indução da expressão de genes de enzimas celulolíticas, os esporos ativados foram inoculados em meio líquido mineral

(0,03% p/v NH<sub>4</sub>Cl; 0,05% p/v NaNO<sub>3</sub>; 0,1% p/v K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,03% p/v MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01% p/v CaCl<sub>2</sub> e 0,005% p/v FeCl<sub>2</sub>), acrescido de 1% de celulose microcristalina (p/v) como única fonte de carbono a 28°C e 180 rpm.

Células de *E. coli* DH5α foram cultivadas em meio Luria-Bertani, LB, (1% p/v triptona, 0,5% p/v extrato de levedura e 1% p/v de NaCl) sob agitação de 180 rpm a 37°C. As células transformadas com os vetores pKLAC1 ou pGEM®-T Easy foram cultivadas sob as mesmas condições em LB acrescido de 50µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina para seleção dos transformantes.

Leveduras *K. marxianus* foram cultivadas em meio YPD (1% p/v de extrato de levedura, 2% p/v de peptona e 2% v/v de glicose) a 37°C sob agitação de 180 rpm. O meio para seleção dos transformantes foi o YPD acrescido de 2% p/v de ágar e concentrações de G418 (SIGMA) especificadas no item 4.6.

### **4.3. Obtenção, amplificação e clonagem dos genes *cbhA* e *eng1***

#### **4.3.1. Obtenção da seqüência codificadora da celobiohidrolase e da endo-β-1,4-glucanase e desenho dos primers**

As seqüências codificadoras dos genes *cbhA* (AF156268) e *eng1* (AF331518) de *A. niger* foram obtidas através de análise no banco de dados GenBank do NCBI. O software SDSC Biology Workbench foi usado para análise do sítio de restrição das seqüências e desenho dos *primers* (tabela 2). Foram adicionados os sítios de restrição para as endonucleases Sal I e Not I para o gene *cbhA* e Bgl II e Not I para o gene *eng1*, correspondentes ao sítio múltiplo de clonagem (MCS) do vetor pKLAC1.

**Tabela 2: Lista de primers para amplificação dos genes *cbhA* e *eng1***

Nome	Sequência 5'-3'	Tm	Região de anelamento	Detalhes
cbhAF	GTCGACATGCATCAACGTGCCCTTCTCTTC	67,07	1-24	Sequência em itálico representa o sítio para a enzima de restrição Sal I
cbhAR	GCGGCCGCTTATGCGGAAGCGCTGAAGGT	66,25	1338-1359	Sequência em itálico representa o sítio para a enzima de restrição NotI
eng1F	AGATCTATGAAGTTTCAGAGCACTCTGCTT	60,93	1-24	Sequência em itálico representa o sítio para a enzima de restrição BgIII
eng1R	GCGGCCGCTCAAAGATATGCCTCCAGGATATC	60,63	974-999	Sequência em itálico representa o sítio para a enzima de restrição NotI

#### **4.3.2. Extração de RNA total de *Aspergillus niger***

A extração do RNA total de *A. niger* foi realizada com o método do Trizol Reagent (Invitrogen), no tempo de crescimento em que observou-se maior atividade de produção de celulases, como descrito por Santos, 2009 e Lopes, 2011. Para indução da expressão de genes de enzimas celulolíticas, os esporos ativados foram inoculados em meio líquido mineral acrescido de 1% de celulose microcristalina (p/v) como única fonte de carbono a 28°C e 180 rpm. No quinto dia de crescimento, o micélio foi filtrado, triturado em nitrogênio líquido e dividido em alíquotas de 200mg. Cada alíquota foi tratada com 1ml de Trizol, 150µl de polivinil-pirrolidona (PVP-40 20% p/v). Após agitação a amostra foi centrifugada e o sobrenadante transferido para um novo tubo e tratado com clorofórmio. A fase aquosa foi novamente recolhida por centrifugação e foram adicionados 250µL de isopropanol e solução de precipitação (citrato de sódio 0,8M e cloreto de sódio 1,2M). Depois de 16 horas de precipitação a -20°C, as amostras foram centrifugadas e o *pellet* formado foi lavado com etanol 70% e suspenso em água *nuclease free*. A qualidade das amostras foi avaliada em gel de agarose 1,2% (p/v) e, o RNA foi quantificado pela leitura de absorvância a 260 nm em espectrofotômetro. Posteriormente, as amostras foram tratadas com DNase utilizando o RQ1 RNase-free DNase (Promega), segundo recomendações do fabricante.

#### **4.3.3. Síntese do cDNA**

A síntese do cDNA total de *A. niger* foi realizada a partir do RNA por reação de transcrição reversa utilizando o *Kit ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega), segundo recomendações do fabricante.

#### **4.3.4. Amplificação dos genes *cbhA* e *eng1* a partir do cDNA**

Para a amplificação dos genes, o cDNA total resultante foi utilizado como molde na reação em cadeia da polimerase (PCR) contendo: 1 µL do cDNA, 1 unidade da enzima *GoTaq DNA Polymerase* (Promega), 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , e 20 pmoles de cada *primer* (*cbhAF* e *cbhAR* ou *eng1F* e *eng1R* - tabela 2) seguindo o programa: (i) 94°C por 2 minutos (1 ciclo); (ii) 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto (35 ciclos); (iii) 72°C por 5 minutos (1 ciclo).

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,9% (p/v) em tampão TAE 1X, e analisado com o padrão de tamanho 1Kb *DNA Ladder* (Fermentas) como referência. Os fragmentos esperados foram purificados do gel com o *DNA Extraction Kit* (Fermentas), seguindo recomendações do fabricante e nova eletroforese em gel de agarose 0,9% foi realizada para análise da purificação.

#### **4.3.5. Clonagem dos genes *cbhA* e *eng1***

Os fragmentos purificados foram primeiro subclonados no vetor pGEM®-T Easy (Promega), segundo recomendações do fabricante. As reações de ligação foram utilizadas para transformação de células *E. coli* DH5α e a triagem dos transformantes foi realizada pelo cultivo em meio LB ágar contendo 50 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina.

O DNA plasmidial foi extraído pelo método da lise alcalina (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e submetido à clivagem para liberação dos insertos *cbhA* (com as enzimas de restrição *Sal I* e *NotI*) e *eng1* (com as enzimas de restrição *Bgl II* e *Not I*) e confirmação da clonagem. As bandas correspondentes aos genes *cbhA* e *eng1*, visualizadas em gel de agarose 0,9% (p/v), foram purificadas com o *DNA Extraction Kit* (Fermentas).

Os fragmentos purificados foram submetidos à reação de ligação com o vetor pKLAC1 (*New England Biolabs*), também clivado com as enzimas correspondentes, utilizando 1 unidade da enzima *T4 DNA ligase* (Promega), incubada à 4°C por 16 horas, seguida da transformação de *E. coli* DH5α. A triagem dos transformantes foi realizada pelo cultivo em meio LB ágar contendo 50 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina.

O DNA plasmidial foi extraído por método de lise alcalina utilizando-se fenol-clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001), e submetido à clivagem com as

endonucleases correspondentes para liberação do fragmento e confirmação da clonagem e da construção dos vetores pKLAC1-cbhA e pKLAC1-eng. O resultado das clivagens foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,9% (p/v).

#### **4.4. Construção dos cassetes de expressão lineares com diferentes promotores para o genes *cbhA* e *eng1* com a técnica de PCR de fusão**

Os cassetes de expressão construídos apresentam três fragmentos de DNA (fragmentos intermediários): uma região promotora; o fragmento  $\alpha$ MF-gene de interesse-TT amplificado do pKLAC1, cujos genes de interesse são o *cbhA* e o *eng1*, e o gene KanMX, que confere resistência para o antibiótico geneticina e, portanto, será chamado de marca de seleção. Para cada gene de interesse, *cbhA* ou *eng1*, as construções diferem entre si pela região promotora. Os promotores escolhidos foram: ScpHXT1, ScpPGK, ScpTDH3, KmpINU1 e KmpPCPL3.

A construção dos cassetes compreendeu duas etapas e um resumo do procedimento está representado nas figuras 3 e 4. Na primeira etapa, cada fragmento intermediário foi amplificado utilizando-se *megaprimers* (tabela 3) que adicionaram ao amplificado uma extremidade complementar ao fragmento ao qual se pretende fundir. A segunda etapa consiste de uma reação de PCR em dois passos: no passo A não houve adição de *primers*, as extremidades complementares fazem o papel destes, permitindo o alinhamento dos fragmentos; no passo B uma alíquota da reação do passo A foi utilizada como molde para uma segunda reação em que foram adicionados *primers nested* (tabela 3) para amplificação de todo o cassete. Cada etapa está descrita abaixo com mais detalhes.

##### **4.4.1. Desenho dos primers para construção dos cassetes pela técnica de PCR de fusão**

As sequências dos fragmentos intermediários foram obtidas por análise em banco de dados de sequência do NCBI e no Saccharomyces Genome Database (SGD). O software SDSC Biology Workbench foi usado para desenho dos *primers*. Para permitir a união dos fragmentos, foram utilizadas duas estratégias: uma com três e outra com dois *primers* híbridos (*megaprimers*), contendo sequência de fusão a outro fragmento. Um resumo das duas estratégias pode ser visualizado na figura 3.

Na estratégia com três *primers* híbridos, um deles foi o *primer* reverso usado para amplificar o promotor PGK (OvPGK R – tabela 3), que contém uma sequência de 38 nucleotídeos, complementar ao final da região promotora do gene PGK, e na extremidade 5' uma sequência híbrida de 27 nucleotídeos complementar à sequência

inicial do  *$\alpha$ -matting factor* ( $\alpha$ MF). O segundo foi o *primer* reverso (OvTT R – tabela 3) utilizado para amplificar os fragmentos  $\alpha$ MF-cbhA-TT ou  $\alpha$ MF-eng1-TT, contendo uma sequência de 29 nucleotídeos, complementar à sequência do terminador do gene LAC4 do vetor pKLAC1 (TT), e na extremidade 5' uma sequência híbrida de 15 citosinas (poliC). O terceiro foi o *primer* direto utilizado para amplificar o gene KanMX, contendo na sua extremidade 5' uma sequência híbrida de 15 guaninas (poliG) figura 3. Os outros *primers* utilizados para amplificar os fragmentos intermediários foram *primers* simples com sequência direta ou complementar à do fragmento a ser amplificado.

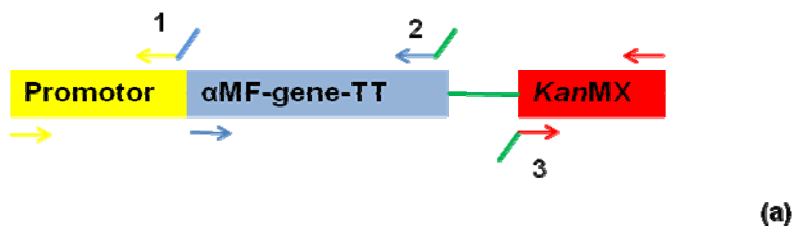
Na estratégia com dois *primers* híbridos, um deles foi o *primer* reverso OvPGK R usado para amplificar o promotor PGK (o mesmo *primer* da estratégia anterior). O segundo foi o *primer* reverso (Ovterm R – tabela 3) utilizado para amplificar os fragmentos  $\alpha$ MF-cbhA-TT ou  $\alpha$ MF-eng1-TT, contendo uma sequência de 29 nucleotídeos complementar à sequência do TT do vetor pKLAC1, e na extremidade 5' uma sequência híbrida de 28 nucleotídeos complementar à sequência inicial do gene *KanMX* figura 3. Nessa segunda estratégia, os *megaprimers* podem ser utilizados para fundir ao promotor e ao gene *KanMX* qualquer gene clonado no vetor pKLAC1. Os outros *primers* utilizados para amplificar os fragmentos intermediários foram *primers* simples com sequência direta à do fragmento a ser amplificado.

Para a construção dos cassetes foi empregada a estratégia com dois *primers* híbridos com sequência complementar a outro fragmento. Para tanto foram desenhados *megaprimers* para os demais promotores (HXT1, TDH3, PCPL3 e INU1), contendo na extremidade 5' uma sequência híbrida de 27 nucleotídeos complementar à sequência inicial do  *$\alpha$ -matting factor* ( $\alpha$ MF).

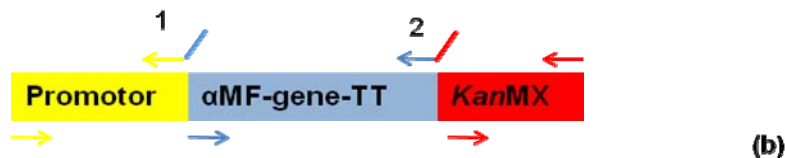
Para aumentar a frequência de amplificação do cassete completo, contendo o promotor, o gene de interesse e a marca de seleção, foram desenhados *primers* *nested* para regiões mais internas das sequências do promotor e do gene *KanMX*.

Todos os *primers* utilizados para construção dos cassetes estão listados na tabela 3.

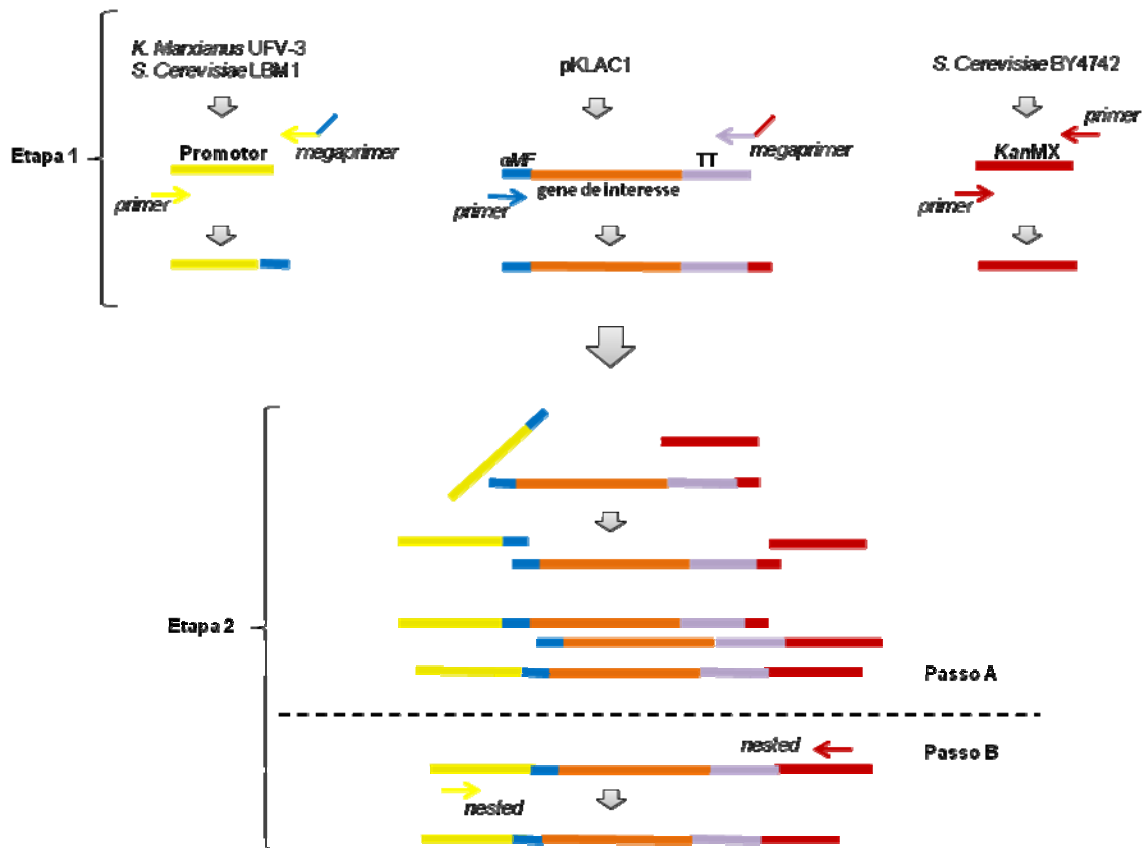
**Estratégia 1:**



**Estratégia 2:**



**Figura 3:** Estratégias da padronização da *overlap* PCR. **(a):** na estratégia 1 são utilizados 3 *megaprimers*, um para amplificação do promotor, com cauda híbrida complementar ao  $\alpha$ MF (1), outro para amplificação do  $\alpha$ MF-gene-TT, com cauda híbrida poliC (2) e o terceiro para amplificação do *KanMX*, com cauda híbrida poliG (3). **(b):** na estratégia 2 são utilizados 2 *megaprimers*, um para amplificação do promotor, com cauda híbrida complementar ao  $\alpha$ MF (1), outro para amplificação do  $\alpha$ MF-gene-TT, com cauda híbrida complementar ao gene *KanMX*.



**Figura 4:** Esquema do método de *overlap* PCR utilizado nesse trabalho. O procedimento é dividido em duas etapas, na etapa 1 os fragmentos intermediários são amplificados utilizando-se *megaprimers* que adicionam extremidades complementares ao fragmento ao qual se pretende fusionar. A etapa 2 compreende uma reação de PCR em 2 passos, no passo A, a cauda complementar dos fragmentos intermediários se anelam, organizando os fragmentos, no passo B à uma alíquota do produto de reação do passo A são adicionados *primers nested* com o objetivo de amplificar todo o cassete.

**Tabela 3: Lista de *primers* utilizados para construção dos cassetes**

Nome	Tipo	Sequência 5'-3'	Tm	Detalhes	Finalidade
$\alpha$ -MF	<i>primer</i>	ATGAAATTCTCTACTATATTAGCCGCAT	60,16	Região de anelamento: 1 – 290 no vetor pKLAC1	Amplificação dos genes do pKLAC1 como fragmento intermediário na etapa 1
OvTT R	<i>Megaprimer</i>	<u>CCCCCCCCCCCCCT</u> TATACAACATCGAAGAA GAGTCTTTCTTT	60,41	Sublinhado representa a cauda poliC para sobrepor com a sequência do gene <i>KanMX</i> ; Região de anelamento: 893 – 921 no vetor pKLAC1	Amplificação dos genes do pKLAC1 como fragmento intermediário na etapa 1, adicionando a cauda de fusão no gene <i>KanMX</i>
Ovterm R	<i>Megaprimer</i>	<u>GGCAAGCTAAACAGATCTCTAGACCTATATAC</u> AACATCGAAGAAGAGTCTTTCTTT	60,41	Sublinhado representa as bases usadas para sobrepor com a sequência do gene <i>KanMX</i> ; Região de anelamento: 893 – 921 no vetor pKLAC1	Amplificação dos genes do pKLAC1 como fragmento intermediário na etapa 1, adicionando a cauda de fusão no gene <i>KanMX</i>
PGKF	<i>Primer</i>	AGACGCGAATTTTTCGAAGAA	61,19	Região de anelamento: 1Kb <i>upstream</i> à sequência do PGK no genoma de <i>S. cerevisiae</i>	Amplificação do promotor PGK como fragmento intermediário na etapa 1
OvPGKR	<i>Megaprimer</i>	<u>ATGCGGCTAATATAGTAGAGAATTTCA</u> TTGTTT TATATTTGTTGTAAGAAAGTAGATAATTACTTCC	61,76	Sublinhado representa as bases usadas para sobrepor com a sequência do $\alpha$ - <i>mating factor</i> ; Região de anelamento: 38 pb <i>upstream</i> PGK	Amplificação do promotor PGK como fragmento intermediário na etapa 1, adicionando a cauda de fusão no $\alpha$ MF
PGKnested	<i>Primer nested</i>	CGTCGATGACTTCCCATACTG	60,52	Região de anelamento: 889Kb <i>upstream</i> à sequência do PGK	Amplificação do cassete com o promotor PGK no passo B

Continuação tabela 3

Nome	Tipo	Sequência 5'-3'	Tm	Detalhes	Finalidade
PCPL3F	Primer	GAAGGGGCTAATTGCATGG	54,2	Região de anelamento: 410 pb <i>upstream</i> à sequência do PCPL3 no genoma de <i>K. marxianus</i>	Amplificação do promotor PCPL3 como fragmento intermediário na etapa 1
OvPCPL3R	Megaprimer	<u>ATGCGGCTAATATAGTAGAGAATTTCA</u> TCTCG AGATATTATTCTGTAATCAAAAAACAAC	57,7	Sequência sublinhada representa as bases usadas para sobrepor com a sequência do $\alpha$ - <i>mating factor</i> ; Região de anelamento: 32 pb <i>upstream</i> PCPL3	Amplificação do promotor PCPL3 como fragmento intermediário na etapa 1, adicionando a cauda de fusão no $\alpha$ MF
PCPL3F nested	Primer nested	CCCTTCTTCTTCTTCTGATAGTG	57,6	Região de anelamento: 314 pb <i>upstream</i> à sequência do PCPL3	Amplificação do cassete com o promotor PCPL3 no passo B
TDH3F	Primer	CTATTTTCGAGGACCTTGTCACC	55,6	Região de anelamento: 980 pb <i>upstream</i> à sequência do TDH3 no genoma de <i>S. cerevisiae</i> .	Amplificação do promotor TDH3 como fragmento intermediário na etapa 1
OvTDH3R	Megaprimer	<u>ATGCGGCTAATATAGTAGAGAATTTCA</u> TTTTGT TTGTTTATGTGTGTTTATTCGAAAC	58,8	Sequência sublinhada representa as bases usadas para sobrepor com a sequência do $\alpha$ - <i>mating factor</i> ; Região de anelamento: 30pb <i>upstream</i> TDH3	Amplificação do promotor TDH3 como fragmento intermediário na etapa 1, adicionando a cauda de fusão no $\alpha$ MF
TDH3nested	Primer nested	GCTAATAACATGCAAGACACGTACG	56,8	Região de anelamento: 920pb <i>upstream</i> à sequência do TDH3	Amplificação do cassete com o promotor TDH3 no passo B

Continuação da tabela 3

Nome	Tipo	Sequência 5'-3'	Tm	Detalhes	Finalidade
HXT1F	Primer	CTAGGGCTTATTGGTTCAAGCAG	56,0	Região de anelamento: 862pb <i>upstream</i> à sequência do HXT1 no genoma de <i>S. cerevisiae</i>	Amplificação do promotor HXT1 como fragmento intermediário na etapa 1
OvHXT1R	Megaprimer	<u>ATGCGGCTAATATAGTAGAGAATTT</u> CATGATTT TACGTATATCAACTAGTTGACGATTATG	57,6	Sequência sublinhada representa as bases usadas para sobrepor com a sequência do $\alpha$ - <i>mating factor</i> ; Região de anelamento: 33pb <i>upstream</i> HXT1	Amplificação do promotor HXT1 como fragmento intermediário na etapa 1, adicionando a cauda de fusão no $\alpha$ MF
HXT1F nested	Primer nested	GCGGATGTAAGGAGTATTGG	54,9	Região de anelamento: 808pb <i>upstream</i> à sequência do HXT1	Amplificação do cassete com o promotor HXT1 no passo B
INU1F	Primer	GAATTCTCAAACCGAAATGGG	54,8	Região de anelamento: 737 pb <i>upstream</i> à sequência do INU1 no genoma de <i>K. marxianus</i>	Amplificação do promotor INU1 como fragmento intermediário na etapa 1
OvINU1R	Megaprimer	<u>ATGCGGCTAATATAGTAGAGAATTT</u> CATATCTA ACAAAAAAAAAATTAATGTGTCAC	55,3	Sequência sublinhada representa as bases usadas para sobrepor com a sequência do $\alpha$ - <i>mating factor</i> ; Região de anelamento: 30pb <i>upstream</i> INU1	Amplificação do promotor INU1 como fragmento intermediário na etapa 1, adicionando a cauda de fusão no $\alpha$ MF

Continuação da tabela 3

Nome	Tipo	Sequência 5'-3'	Tm	Detalhes	Finalidade
INU1nested	<i>Primer nested</i>	GATGTTGATGTTGAGTTAGTTGGG	54,1	Região de anelamento: 663 pb <i>upstream</i> à sequência do INU1	Amplificação do cassete com o promotor INU1 no passo B
KanMXF	<i>Primer</i>	TAGGTCTAGAGATCTGTTTAGCTTGCC	61,75	Região de anelamento: 398 pb <i>upstream</i> à sequência do KanMX	Amplificação do gene <i>KanMX</i> como fragmento intermediário na etapa 1
OvKan F		<u>GGGGGGGGGGGGGGGG</u> TAGGTCTAGAGATCT GTTTAGCTTGCC	61,75	Sublinhado representa a cauda poliG para sobrepôr com a sequência do gene <i>KanMX</i> ; Região de anelamento: 398 pb <i>upstream</i> à sequência do KanMX	Amplificação do gene <i>KanMX</i> como fragmento intermediário na etapa 1, adicionando a cauda de fusão no TT
SOK2DELR	<i>Primer</i>	GCGCCCATATGCGCGAACGA	73,41		Amplificação do gene <i>KanMX</i> como fragmento intermediário na etapa 1
KanMX nested	<i>Primer nested</i>	TCGAATCGACAGCAGTATAGCG	62,7	Região de anelamento: 50 pares de bases <i>upstream</i> à sequência do terminador do KanMX.	Amplificação do cassete com o promotor KanMX no passo B

OBS: as temperaturas de *melting* representadas correspondem à temperatura do *primer* sem a adição da cauda de sobreposição

#### **4.4.2. Amplificação dos fragmentos $\alpha$ MF-cbhA-TT e $\alpha$ MF-eng1-TT a partir do pKLAC1**

Os genes *cbhA* e *eng1* foram amplificados a partir dos vetores pKLAC1-cbhA e pKLAC1-eng flanqueados pelas sequências do peptídeo sinal *alpha matting factor* ( $\alpha$ MF) e de terminação de transcrição do gene LAC4 (TT) presentes no vetor pKLAC1. Os fragmentos  $\alpha$ MF-cbhA-TT e  $\alpha$ MF-eng1-TT foram amplificados com a enzima Pfu polimerase. O DNA plasmidial extraído foi utilizado como molde na reação de PCR que foi conduzida seguindo recomendação do fabricante da enzima *Pfu Polymerase* (Fermentas) em um volume final de 25 $\mu$ l. Os *primers* utilizados foram  $\alpha$ -MF e OvTT R, para a estratégia 1 e  $\alpha$ -MF e OvtermR, para a estratégia 2. O programa seguido nas duas estratégias foi: (i) 94°C por 5 minutos (1 ciclo); (ii) 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 4 minutos (35 ciclos); (iii) 72°C por 5 minutos (1 ciclo).

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,9% (p/v) em tampão TAE 1X, e analisados com o padrão de tamanho 1Kb DNA *Ladder* (Fermentas) como referência. Os fragmentos esperados foram purificados do gel com o *DNA Extraction Kit* (Fermentas), seguindo recomendações do fabricante e nova eletroforese em gel de agarose 0,9% foi realizada para análise da purificação.

#### **4.4.3. Amplificação das regiões promotoras**

Todas as amplificações foram realizadas com a enzima *Pfu polymerase* (Fermentas), seguindo recomendações do fabricante, em um volume final de 25 $\mu$ l. A reação de PCR compreendeu os seguintes passos: (i) 94°C por 5 minutos (1 ciclo); (ii) 94°C por 1 minuto, 54 ou 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos (35 ciclos); (iii) 72°C por 5 minutos (1 ciclo). A temperatura de anelamento foi de 54°C para o promotor KmpINU1 e de 56°C para os promotores ScPGK, ScHXT1, ScTDH3 e KmPCPL3.

Os promotores ScHXT1p, ScPGKp e ScTDH3p foram amplificados a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae* LBM1 e os *primers* foram: HXT1F e OvHXT1R para o ScHXT1p; PGKF e OvPGKR para o ScPGKp; e TDH3F e OvTDH3R para o ScTDH3p (listados na tabela 3).

Os promotores KmINU1p e KmPCPL3p foram amplificados do DNA genômico de *K. marxianus* UFV-3 e os *primers* foram: INU1F e OvINU1R para o KmINU1p; e PCPL3F e OvPCPL3R para o KmPCPL3p (listados na tabela 3).

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,9% (p/v) em tampão TAE 1X, e analisados com o padrão de tamanho 1Kb DNA *Ladder* (Fermentas) como referência. Os fragmentos esperados foram

purificados do gel com o *DNA Extraction Kit* (Fermentas), seguindo recomendações do fabricante e nova eletroforese em gel de agarose 0,9% foi realizada para análise da purificação.

#### **4.4.4. Amplificação do KanMX**

O gene KanMX que confere resistência ao antibiótico G418 foi amplificado do genoma da levedura *S. cerevisiae* (BY4742; Mat  $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR016c::kanMX4), com a enzima *Pfu DNA Polymerase* (Fermentas). A reação foi feita em um volume final de 25  $\mu$ l e seguiu recomendações do fabricante da enzima. Os *primers* usados foram o F Kan e OvKan R ou F Kan e SOK2DELR (listados na tabela 3), para a estratégia 1 e 2 respectivamente.

O programa seguido nas duas estratégias foi: (i) 94°C por 5 minutos (1 ciclo); (ii) 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos (35 ciclos); (iii) 72°C por 5 minutos (1 ciclo).

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,9% (p/v) em tampão TAE 1X, e analisado com o padrão de tamanho 1Kb *DNA Ladder* (Fermentas) como referência. O fragmento esperado foi purificado do gel com o *DNA Extraction Kit* (Fermentas), seguindo recomendações do fabricante e nova eletroforese em gel de agarose 0,9% foi realizada para análise da purificação.

#### **4.4.5. PCR de fusão**

A reação de fusão dos promotores com os fragmentos  $\alpha$ MF-gene de interesse-TT e a marca de seleção KanMX consistiu de dois passos, A e B (figura 4). A reação do passo A, para anelamento das regiões homólogas dos fragmentos, consistiu em uma mistura dos 3 fragmentos intermediários na proporção de 2:1:2 (promotor:  $\alpha$ MF-gene de interesse-TT: KanMX), em um volume final de 25 $\mu$ l, com a enzima *Pfu Polymerase* (Fermentas) seguindo recomendações do fabricante. O programa seguido foi: (i) 94°C por 2 minutos (1 ciclo); (ii) 94°C por 20 segundos, 54°C por 20 segundos e 72°C por 5 minutos (10 ciclos). Segundo Shevchuk e colaboradores (2004), esse passo de reação sem a adição de primers é essencial para a eficiência da fusão, uma vez que nesse momento as sequências complementares dos fragmentos se sobrepõem formando o *template* correto para a reação do segundo passo. Não é preciso muitos ciclos porque as extremidades de sobreposição, que servem como *primers*, são rapidamente consumidas.

O passo B, para amplificação do cassete completo, consistiu de uma reação utilizando o mix de enzimas *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), seguindo recomendações do fabricante, com 3µL do produto do passo A em um volume final de 50µL. Os *primer* adicionados foram o *primer foward nested* de acordo com cada promotor e o *primer reverse KanMX nested* (tabela 3). O programa seguido foi: (i) 94°C por 2 minutos (1 ciclo); (ii) 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 68°C por 5 minutos (35 ciclos); (iii) 68°C por 10 minutos (1 ciclo).

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,9% (p/v) em tampão TAE 1X, e analisados com o padrão de tamanho 1Kb *DNA Ladder* (Fermentas) como referência. Os fragmentos esperados foram purificados do gel com o *DNA Extraction Kit* (Fermentas), seguindo recomendações do fabricante e nova eletroforese em gel de agarose 0,9% foi realizada para análise da purificação. Essas construções foram quantificadas pela leitura de absorvância a 260nm em espectrofotômetro, submetidas a PCR para confirmação das construções e enviadas para seqüenciamento pelo método de Sanger, com o equipamento MegaBACE da Amersham Biosciences, no Laboratório de Genômica da UFV.

As reações de confirmação da construção dos cassetes foram realizadas com a enzima *GoTaq DNA Polymerase* (Promega), seguindo recomendações do fabricante, contendo 1µL do cassete purificado em volume final de 25µL. Para a reação de amplificação do fragmento promotor +  $\alpha$ -MF-gene de interesse-TT, os *primers* usados foram: *foward nested* de acordo com cada promotor e OvtermR). Para a reação de amplificação do fragmento  $\alpha$ -MF-gene de interesse-TT + KanMX, os *primers* usados foram:  $\alpha$ -MF e KanMX *nested*. O programa seguido foi: (i) 94°C por 2 minutos (1 ciclo); (ii) 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 68°C por 5 minutos (35 ciclos); (iii) 68°C por 10 minutos (1 ciclo).

Os 5 cassetes construídos para cada gene estão especificados na tabela 4.

**Tabela 4: Cassetes de expressão construídos nesse trabalho**

Promotor	Peptídeo sinal	Gene	Terminador transcricional	Marca de seleção	Nome	Tamanho (pb)
PGK					PCK	4655
HXT1					HCK	4573
TDH3	<i><math>\alpha</math>-matting factor de K. lactis</i>	<i>cbhA</i>	TT (do gene LAC4 de K. lactis)	<i>KanMX</i>	TCK	4695
PCPL3					PLCK	4079
INU1					ICK	4428
PGK					PEK	4295
HXT1					HEK	4213
TDH3	<i><math>\alpha</math>-matting factor de K. lactis</i>	<i>eng1</i>	TT (do gene LAC4 de K. lactis)	<i>KanMX</i>	TEK	3719
PCPL3					PLEK	4168
INU1					IEK	4425

#### **4.5. Transformação de *Kluyveromyces marxianus***

Todos os cassetes de expressão para o gene *eng1* foram submetidos à leitura de absorvância a 260nm em espectrofotômetro para determinar a concentração em ng/μl. A eficiência de transformação foi calculada como sendo número de unidades formadoras de colônias por micrograma de DNA (UFC/μg de DNA), considerando-se os volumes de células total e plaqueado.

A eficiência de transformação da linhagem UFV-3 foi avaliada com os métodos de acetato de lítio, padronizado por Abdel-Banat e colaboradores em 2010, e de eletroporação, padronizado por Sánchez e colaboradores em 1993 para *K. lactis*.

##### **4.5.1. Comparação entre os métodos de acetato de lítio e eletroporação**

Para o acetato de lítio: *K. marxianus* UFV-3 foram ativadas por crescimento em meio YPD sólido a 37°C por 48 h. Após a ativação as células foram inoculadas em 25 ml de YPD e incubadas a 28 °C sob agitação orbital de 150 rpm durante 16 h, valores de DO<sub>600</sub> entre 14 e 16. As células foram centrifugadas (4500xg/2 min) e suspensas em 1,4 ml de solução TM [PEG 3350 40% (p/v), ácido acético (200 mM) e ditiotreitol (100 mM)], sendo submetidas à nova centrifugação (4500xg/2 min). O sedimento de células foi suspenso em 0,5ml de solução TM e separado em alíquotas de 100μl. Foi então adicionado o inserto purificado na concentração de 50ng/μl . A mistura células-DNA foi incubada a 47 °C por 14 minutos com posterior adição de 900μl de YPD. A suspensão de células foi plaqueada em meio YPD sólido contendo o antibiótico G418 (50 ou 100 μg/ml) e incubada a 28 °C.

Para a eletroporação: *K. marxianus* UFV-3 foram ativadas por crescimento em meio YPD sólido a 37°C por 48 h. Após a ativação as células foram inoculadas em 10 ml de YPD e incubadas a 37°C sob agitação orbital de 180 rpm durante 16 h, valores de DO<sub>600</sub> entre 14 e 16. As células foram centrifugadas (4500g/2 min), lavadas com solução de 0,1M de sorbitol, inoculadas em 25ml de YED (extrato de levedura 1% p/v e glicose 1% p/v) com a DO<sub>600</sub> inicial de 0,4 e incubadas a 28°C sob agitação orbital de 180 rpm até atingir a DO<sub>600</sub> entre 0,9 e 1,8. As células foram centrifugadas (4500g/2 min), suspensas em 1ml de TP (YED, 25mM DTT, 20mM HEPES), inoculadas em 19ml de TP e incubadas a 28°C, sob agitação de 100 rpm por 30 minutos. As células foram centrifugadas (4500g/2 min), suspensas em 0.5ml de TE (10mM Tris-HCl, 270mM sacarose, 1mM acetato de lítio) e separadas em alíquotas de 50μl. Foram então pré-incubadas com o inserto purificado na concentração de 100ng/μl (acrescido de 500ng de DNA carreador quando desejado) por 15 minutos no gelo. As condições da eletroporação foram: cubeta de 0,2 cm; 1000 V; 25 μF e 400 Ω. Após o pulso foi

adicionado 950µl de YED gelado e as células foram incubadas por 15 minutos no gelo e 60 minutos a 28°C sob agitação orbital de 180 rpm. A suspensão de células foi plaqueada em meio YPD sólido contendo o antibiótico G418 (50 µg/ml) e incubada a 28 °C.

#### **4.5.2. Análise de da influência de diferentes parâmetros na eficiência de transformação de *K. marxianus* UFV-3**

Depois de determinado qual método é mais eficiente, foram analisados os parâmetros: concentração de DNA; homologia de sequência; concentração de antibiótico; e combinação de insertos integração.

As concentrações de DNA avaliadas foram 20, 100, 500 e 1000 ng/µl com a seleção em 100µg/ml de G418.

As transformações com cada cassete de expressão construídos para o gene *eng1* foram realizadas com a seleção em 100 µg/ml de G418, e a concentração de 100ng/µl de inserto.

As concentrações de antibiótico avaliadas foram 100, 300 e 500µg/ml e com o inserto na concentração de 100ng/µl.

Os insertos foram combinados na proporção de 100% do PEK ou 70% de PE com 30% de EK. A seleção foi feita em 100 e 300µg/ml de G418.

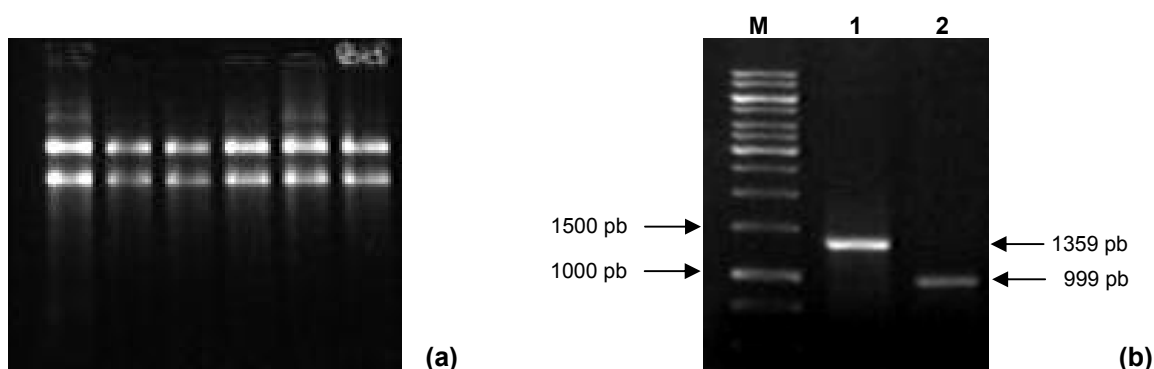
#### **4.6. Seleção de *Kluyveromyces marxianus* transformantes**

Para selecionar possíveis transformantes, foi realizada uma seleção por crescimento diferencial em placas com concentrações crescentes do antibiótico. Após a transformação, as colônias resultantes foram transferidas para uma nova placa contendo 100µg/ml. Confirmada a resistência das colônias nessa concentração, elas foram inoculadas em 5 ml de YPD líquido sem antibiótico. Depois do crescimento de 14 a 16 horas a 37°C, 180 rpm, foram inoculadas gotas de 3µl das culturas com densidade ótica ajustada para 1 e suas diluições de 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-4</sup>, em placas de YPD sem antibiótico e com concentrações de 200 e 300µg/ml.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Obtenção dos genes *cbhA* e *eng1*

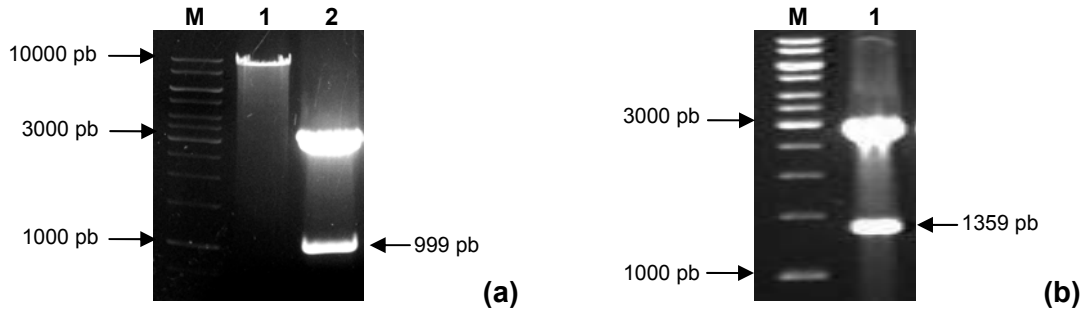
Os genes de celulases, *cbhA* e *eng1* foram obtidos por transcrição reversa seguida amplificação por PCR a partir do RNA extraído de *Aspergillus niger* cultivado em condições de indução da produção de celulases. Através da análise eletroforética, foi confirmada a integridade do RNA total extraído (figura 5a). As amplificações resultaram em fragmentos de 1400pb e 1000pb, aproximadamente, conforme apresentado na figura 5b, compatível com o tamanho esperado para o gene *cbhA* de 1359pb e *eng1* de 999pb.



**Figura 5:** Fracionamento em gel de agarose: (a) 1,2% da extração de RNA total de *A. niger*. (b) 0,9% do produto de amplificação a partir do cDNA total de *A. niger* de 1359 pb (1) e 999pb (2), correspondendo ao tamanho dos genes *cbhA* e *eng1* respectivamente. **M:** Padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder (Fermentas).

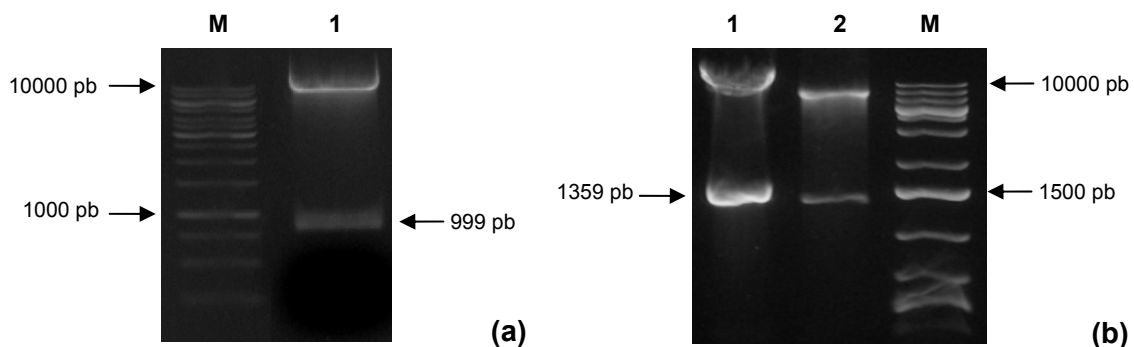
### 5.2. Clonagem dos genes *cbhA* e *eng1*

Os fragmentos de 1359pb e 999pb amplificados foram purificados do gel, clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega), seguido da transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Os transformantes foram selecionados e os plasmídeos pGEM-*cbhA* e pGEM-*eng1* foram extraídos e submetidos à clivagem com as enzimas de restrição Sal I e Not I, para liberação do *cbhA*, e com Bgl II e Not I, para liberação do *eng1*. Através da análise eletroforética em gel de agarose pôde-se observar os fragmentos esperados, cerca de 1359pb para *cbhA* e 999pb para *eng1* e cerca de 3000 pb para o pGEM, conforme mostrado na Figura 6, confirmando, assim, a clonagem dos genes no plasmídeo pGEM.



**Figura 6:** Fracionamento do produto da digestão do DNA plasmidial (pGEM-eng e pGEM-cbhA) em gel de agarose 0,9%. **M:** Padrão de tamanho molecular 1 Kb *DNA Ladder* (Fermentas), **(a)** pKLAC1 no tamanho de 9091pb, linearizado pela clivagem com as endonucleases Sal I e Not I para posterior clonagem do eng resultante da digestão do pGEM-eng (1); Clivagem do plasmídeo pGEM-eng com as enzimas Bgl II e Not I, mostrando a liberação dos fragmentos de 999 pb, referente ao gene *eng1*, e 3000 pb, referente ao pGEM (2). **(b):** Plasmídeo pGEM-cbhA clivado com as enzimas Sal I e Not I, mostrando a liberação dos fragmentos de 1359 pb, referente ao gene *cbhA*, e 3000 pb, referente ao pGEM (1) .

Para dirigir a secreção dos genes foi escolhido o peptídeo sinal  $\alpha$ -mating factor ( $\alpha$ MF) de *K. lactis* presente no vetor pKLAC1. Portanto, estes foram clonados no vetor pKLAC1 para posterior amplificação dos mesmos contendo a sequência do peptídeo sinal  $\alpha$ MF. Os fragmentos *cbhA* (1359 pb) e *eng1* (999 pb) clivados do vetor pGEM foram ligados ao vetor pKLAC1. O DNA plasmidial dos clones obtidos foi extraído e submetido à clivagem com as endonucleases Bgl II e Not I ou Sal I e Not I. As bandas esperadas de 1359pb do *cbhA*, de 999pb do *eng1* e do pKLAC1 de 9091pb foram visualizadas após eletroforese em gel de agarose, figura 7a, confirmando a clonagem do gene *eng1* e do *cbhA* no vetor pKLAC1.



**Figura 7:** Fracionamento do produto da digestão do DNA plasmidial (pKLAC1-eng e pKLAC1-cbhA) em gel de agarose 0,9%. **M:** padrão de tamanho molecular 1Kb *DNA Ladder* (Fermentas); **(a):** Plasmídeo pKLAC1-eng clivado com as enzimas Bgl II e Not I, mostrando a liberação do fragmento de 999 pb, referente ao gene *eng1*, e 9091 pb, referente ao pKLAC1, confirmando a clonagem (1); **(b):** Plasmídeos pKLAC1-cbhA clivados com as enzimas Sal I e Not I, mostrando a liberação do fragmento de 1359 pb, referente ao gene *cbhA*, e 9091 pb, referente ao pKLAC1, confirmando a clonagem (1 e 2).

### **5.3. Construção dos cassetes de expressão lineares com a técnica de PCR de fusão**

Os cassetes de expressão foram construídos pela técnica de PCR de fusão, ou *overlap PCR*, de acordo com especificações adaptadas de Shevchuk e colaboradores (2004), Heckman e Pease (2007), Chen e colaboradores (2008) e Cha-aim e colaboradores (2009). Essa técnica permite que sequências nucleotídicas de interesse sejam fusionadas de modo específico por PCR sem o uso de enzimas de restrição e ligação. As etapas de construção dos cassetes e de transformação da levedura estão apresentadas abaixo.

#### **5.3.1. Amplificação dos fragmentos intermediários para construção dos cassetes de expressão**

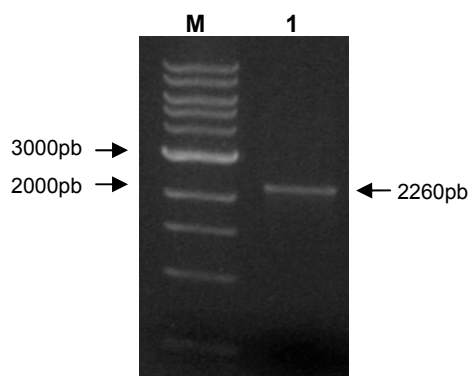
Dois fragmentos do cassete de expressão foram amplificados adicionando-se a eles uma extremidade complementar ao fragmento ao qual se pretende fusionar. Os fragmentos dos promotores escolhidos, ScHXT1p (HXT1), ScPGKp (PGK), ScTDH3p (TDH3), KmINU1p (INU1) e KmPCPL3p (PCPL3), foram amplificados a partir do DNA com os *primers* direto correspondente a cada promotor e o reverso sendo um *megaprimer* contendo uma sequência híbrida de 28 bases complementar à região inicial da sequência do  $\alpha$ MF. Esses *primers* estão especificados na tabela 3. As amplificações foram específicas e resultaram em fragmentos de tamanho esperado para cada promotor, de aproximadamente 400pb para o PCPL3 (figura 9a); 890pb para o PGK (figura 9b); 800pb para o INU1; 862pb para o HXT1 e 980pb para o TDH3 (figura 9c, colunas 1,2, e 3).

Após a confirmação da clonagem dos genes *cbhA* e *eng1* no vetor pKLAC1, os vetores pKLAC1-*cbhA* e pKLAC1-*eng* foram utilizados para amplificação dos fragmentos internos do cassete,  $\alpha$ MF-*cbhA*-TT e  $\alpha$ MF-*eng*-TT, por PCR utilizando os *primers*  $\alpha$ -MF e OvtermR (tabela 3). Nessa reação foi adicionado, também em apenas uma das extremidades dos fragmentos, uma sequência complementar à sequência do gene *KanMX*. A amplificação resultou em fragmentos de 2260pb para o *cbhA* e de 1900pb para o *eng1*, aproximadamente, conforme apresentado na figura 8 e figura 9c, coluna 4.

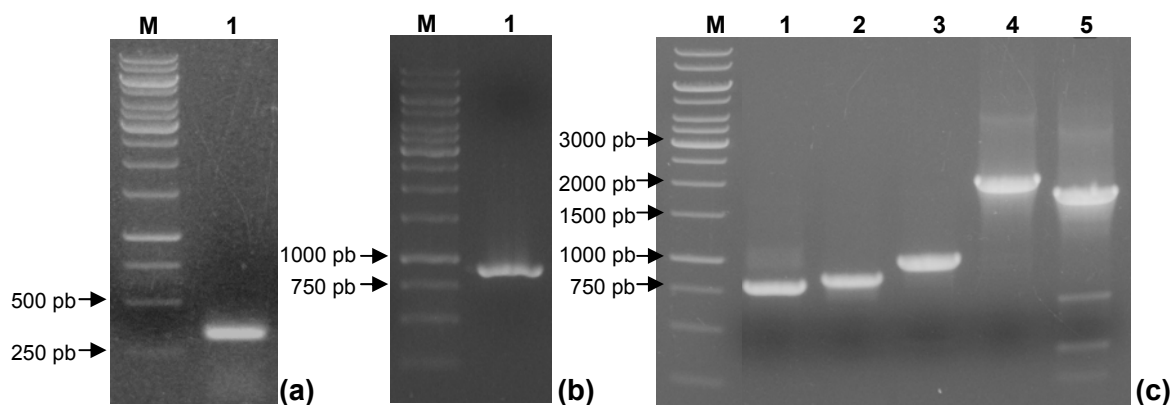
O fragmento do gene *KanMX* foi amplificado do genoma de um mutante de *S. cerevisiae* em que o gene SOK2 foi interrompido pelo *KanMX*. O fragmento amplificado de 1600pb aproximadamente foi correspondente ao tamanho esperado

para o gene *KanMX* (de aproximadamente 1470pb) flanqueado por um fragmento do gene *SOK2* no terminal 3'(figura 9c, coluna 5).

A maioria das reações foram específicas, exceto para o  $\alpha$ MF-eng-TT e *KanMX*, mesmo assim todos os fragmentos intermediários amplificados foram purificados para não levar possíveis interferentes para a etapa 2 da PCR de fusão, como recomendado por Heckman e colaboradores (2007). A enzima Pfu polimerase foi utilizada nessa primeira etapa do método de PCR de fusão para garantir a qualidade da amostra e para não produzir interferentes que prejudicassem a sobreposição, segundo Shevchuk e colaboradores (2004) a presença de apenas uma base nas extremidades, como a adenina adicionada por polimerases do tipo Taq, pode prejudicar a sobreposição durante a reação. Para evitar a indução de mutações, quando foi observada alta especificidade a reação foi purificada diretamente, mas quando não foi específica, toda a reação foi purificada do gel, com o cuidado de não expor diretamente o gel à luz UV.



**Figura 8:** Fracionamento do produto da reação de PCR em gel de agarose 0,9%. M: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder (New England Biolabs); (1): Produto da amplificação do amplificação do fragmento  $\alpha$ MF-cbhA-TT de 2260pb.



**Figura 9:** Fracionamento do produto das reações de PCR em gel de agarose 0,9%. **M:** padrão de tamanho molecular 1Kb *DNA Ladder* (Fermentas); **(a):** Produto da amplificação do promotor PCPL3 de 314 pb (1); **(b):** Produto da amplificação do promotor PGK de 890pb (1); **(c):** Produto da amplificação do promotor INU1 de 800pb (1); produto da amplificação do promotor HXT1 de 862pb (2); produto da amplificação do promotor TDH3 de 980pb (3); produto da amplificação do fragmento  $\alpha$ MF-eng-TT de 1900pb (4); produto da amplificação do gene KanMX de 1600 pb (5).

### 5.3.2. Padronização da reação de PCR de fusão

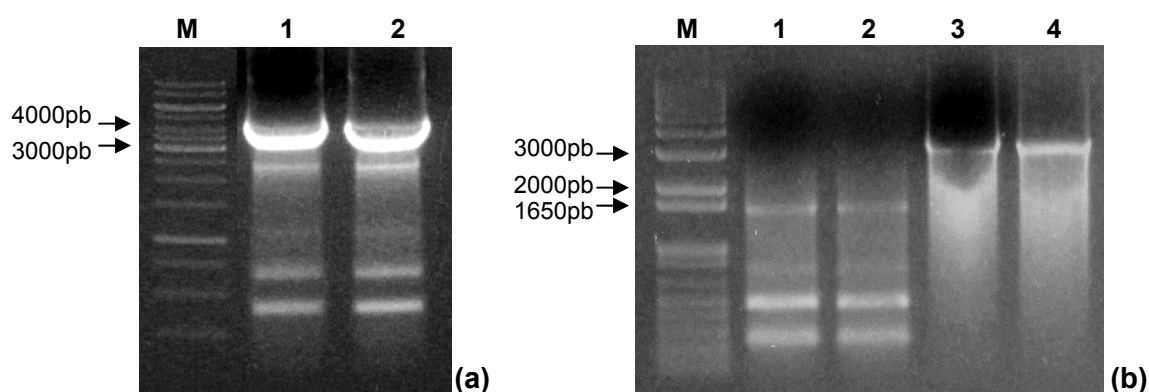
Para padronização da reação de fusão analisamos duas estratégias com promotor PGK. Na primeira utilizamos três *megaprimers* (figura 3a - material e métodos). O PGK foi fusionado por sobreposição à sequência do fragmento  $\alpha$ MF-eng-TT, e o gene KanMX foi fusionado por uma sequência C<sub>15</sub>G<sub>15</sub>. A fusão dos fragmentos utilizando essa estratégia foi possível, como mostra a figura 10a, mas não eficiente, uma vez que houve um grande número de amplificações inespecíficas e a reação não foi reproduzida com a mesma qualidade ou até mesmo sem sucesso. Para tentar contornar esse problema, mudamos as condições da reação e fizemos tentativa de fusão de apenas dois elementos, onde observamos que a fusão entre PGK e  $\alpha$ MF-eng1-TT foi eficiente, mas a fusão entre  $\alpha$ MF-eng1-TT e o gene *KanMX* não (figura 10b).

Diante desses resultados, formulamos uma hipótese de que a extremidade de fusão contendo a sequência de poliC ou poliG estava interferindo na especificidade da reação, uma vez que estávamos fusionando fragmentos que podiam conter alto conteúdo de CG, principalmente na região promotora. Para testar essa hipótese decidimos projetar uma nova estratégia. Nessa segunda estratégia utilizamos dois *megaprimers* (figura 3b - material e métodos) e todos os fragmentos foram fusionados por sobreposição. Esse método se mostrou mais eficiente, como pode ser visto na figura 11, tanto para a fusão de dois ou três fragmentos, confirmando a nossa

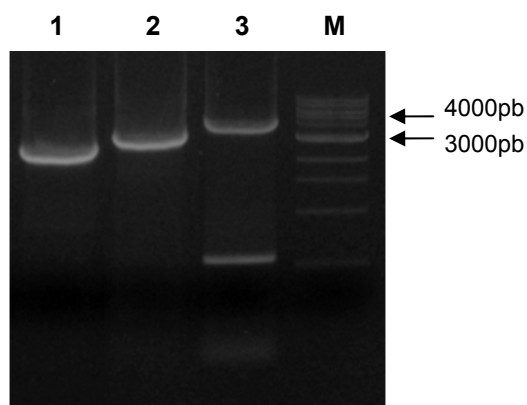
hipótese. Testamos aumentar a temperatura de anelamento do passo B de 56 para 60°C e observamos maior especificidade sem comprometimento da qualidade da reação para fusão dos três fragmentos.

Em 2004, Shevchuk e colaboradores sugeriram que para fusão de três fragmentos utilizando apenas um *megaprimer* para cada, a sequência de sobreposição deveria conter entre 50 e 70 nucleotídeos, porém, Chen e colaboradores em 2008, demonstraram que a eficiência de fusão é inversamente proporcional ao tamanho do *megaprimer*. Cha-aim e colaboradores em 2009 não obtiveram sucesso no uso de fragmentos complementares para fusão do promotor PGK usando uma cauda de sobreposição com 40 nucleotídeos complementar ao terminador e reafirmaram que o tamanho do *primer* influencia na eficiência de reação. Esses pesquisadores também afirmaram que sequências complementares para a fusão pode ser prejudicial dependendo da qualidade da mesma. Diante disso, eles desenvolveram um novo método de fusão por sequências de até 15 nucleotídeos ricas apenas em nucleotídeos C e G (cauda poli CG).

Nesse trabalho nós testamos a estratégia de fusão com a cauda poliCG, mas o resultado não foi satisfatório. Como alternativa desenhamos apenas *megaprimers* contendo sequência híbrida complementar e menor do que 30 nucleotídeos e usamos o modelo de reação em dois passos de Shevchuk e colaboradores (2004), e nossos resultados demonstram que essa estratégia foi mais eficiente que as demais.



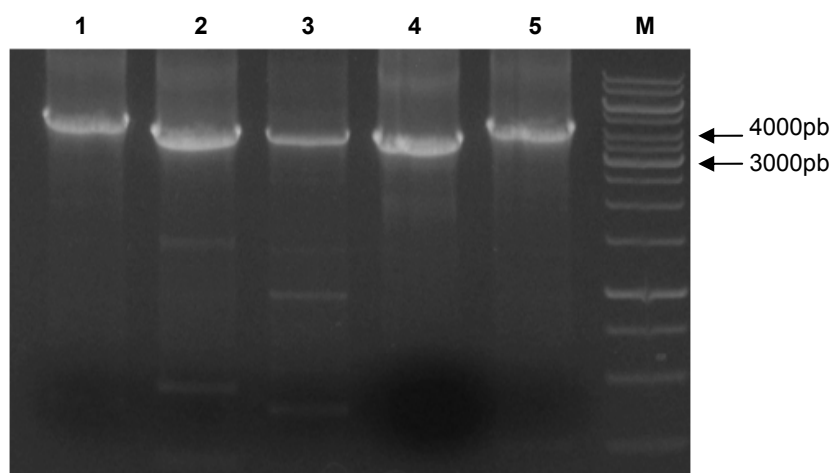
**Figura 10:** Fracionamento do produto das reações de *overlap* PCR em gel de agarose 0,9%, com a estratégia de 3 *megaprimers*. (a): Produto da amplificação do cassete PEK de 4295pb (1 e 2); M: padrão de tamanho molecular 1Kb *DNA Ladder* (Fermentas); (b): Produto da amplificação dos fragmentos  $\alpha$ MF-eng-TT + *KanMX* de 3405pb (1 e 2); Produto da amplificação dos fragmentos PGK +  $\alpha$ MF-eng-TT de 2895pb (3 e 4) ; M: padrão de tamanho molecular 1Kb Plus *DNA Ladder* (Invitrogen).



**Figura 11:** Fracionamento do produto das reações de *overlap* PCR em gel de agarose 0,9% com a estratégia de 2 *megaprimers*. Produto da amplificação dos fragmentos PGK +  $\alpha$ MF-eng-TT de 2895pb (1); Produto da amplificação dos fragmentos  $\alpha$ MF-eng-TT + KanMX de 3405pb (2); Produto da amplificação do cassette PEK de 4295pb (3); M: padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder (Fermentas).

### 5.3.3. PCR de fusão com os diferentes promotores

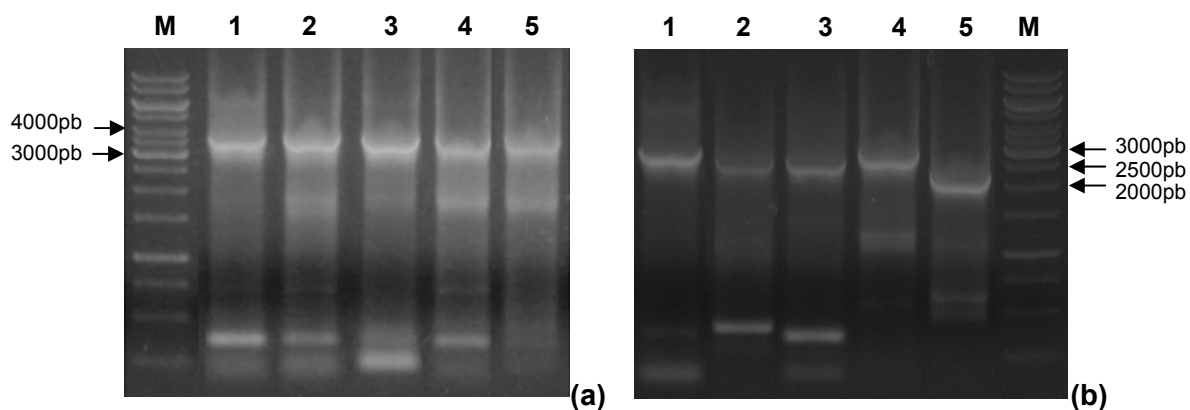
Após padronização da reação de PCR de fusão, escolhemos a estratégia de dois *megaprimers* para a construção dos demais cassetes. As condições das reações foram as mesmas para todos os promotores, uma vez que os *primers* foram desenhados de forma que as temperaturas de *melting* fossem próximas. Embora para os promotores HXT1 e INU1 o resultado não foi específico, todas as reações se mostraram eficientes uma vez que a banda do tamanho esperado para cada construção foi obtida com maior concentração do que as demais (figura 12). Mesmo após a purificação, o rendimento foi suficiente para atender aos protocolos de transformação. Além da versatilidade do método, sua reprodutibilidade também foi avaliada, o produto de reação do passo A, assim como os fragmentos intermediários foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e depois utilizados em nova reação de fusão e a eficiência foi semelhante à inicial.



**Figura 12:** Fracionamento em gel de agarose 0,9% mostrando as construções: TDH3- $\alpha$ MF-eng1-TT-KanMX de 4425pb (1); HXT1-  $\alpha$ MF-eng1-TT-KanMX de 4213pb (2); INU1- $\alpha$ MF-eng1-TT-KanMX de 4168pb (3); PCPL3- $\alpha$ MF-eng1-TT-KanMX de 3719pb (4); PGK- $\alpha$ MF-eng1-TT-KanMX de 4295pb (5); M: padrão de tamanho molecular 1Kb *DNA Ladder* (Fermentas).

#### 5.3.4. PCR de confirmação das construções

Para confirmar a presença de cada fragmento nos cassetes, foram feitas reações de confirmação usando combinações de *primers* que permitiram amplificar os fragmentos promotor e  $\alpha$ MF-eng1-TT, de tamanhos variados (figura 13a), ou  $\alpha$ MF-eng1-TT e *kanMX*, de 3405pb (figura 13b). As condições de reação foram as mesmas para todas as construções e para os dois tipos de combinação. Em todos os casos houve ampliações inespecíficas, provavelmente porque a temperatura de anelamento empregada foi menor do que a utilizada para construção dos cassetes, de 60 para 52°C. Essa redução teve o objetivo de reproduzir a temperatura usada para o seqüenciamento, mas apesar das bandas indesejadas, a banda esperada pôde ser observada, confirmando as construções.



**Figura 13.** Fracionamento em gel de agarose 0,9% da confirmação das construções: **(a)** usando *primers* do  $\alpha$ -MF e do KanMX, correspondendo a um fragmento de 3405pb para todas as construções: PGK (1); HXT1 (2); INU1 (3); TDH3 (4); PCPL3 (5). **(b)** usando *primers* dos promotores o KanMX nested, correspondendo a fragmentos de 2795 para o PGK (1); 2713pb para o HXT1 (2); 2568 para o INU1 (3); 2825 para o TDH3 (4); e 2219 para o PCPL3 (5); (M): padrão de tamanho molecular 1Kb *DNA Ladder* (Fermentas).

### 5.3.5. Sequenciamento

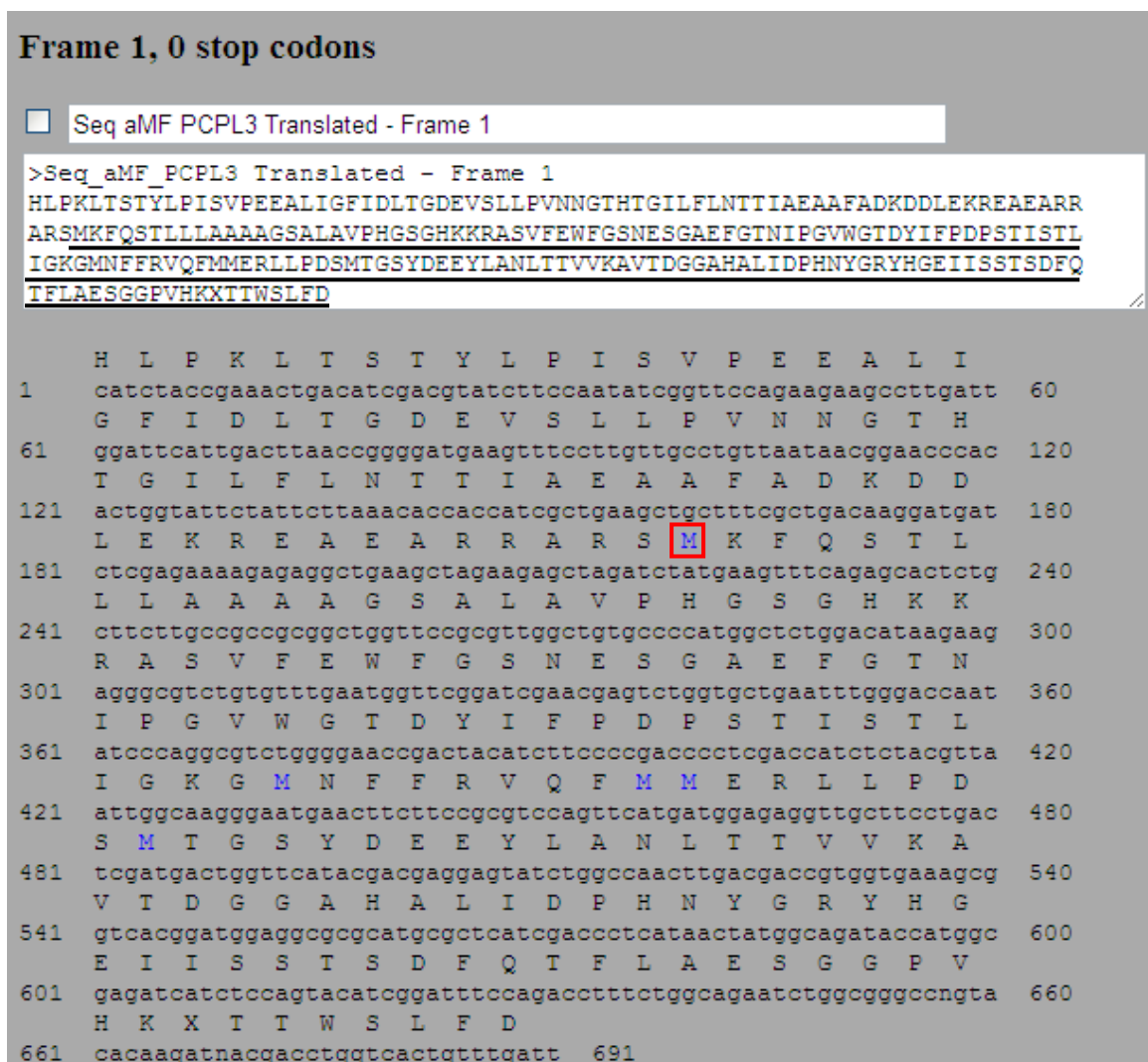
Os cassetes para o gene *eng1* foram sequenciados a fim de confirmar as construções e avaliar a presença de mutações que pudessem comprometer a sua utilização para expressão dos genes de celulases. Os *primers* utilizados foram: *primer forward* de cada promotor;  $\alpha$ -MF; e KanMX nested. O resultado foi analisado por alinhamento com o banco de dados do GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn do NCBI. Os resultados dos alinhamentos estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 5: Resultado do sequenciamento**

<b>Cassete</b>	<b>Primer</b>	<b>Alinhamento GeneBank</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Identidade (%)</b>
PLEK	nested	PCPL3 de <i>K. marxianus</i>	100	96
	$\alpha$ -MF	<i>engB</i> de <i>A. niger</i>	68	97
		pKLAC1	31	99
PEK	nested	PGK de <i>S. cerevisiae</i>	97	98
	$\alpha$ -MF	<i>engB</i> de <i>A. niger</i>	65	96
		pKLAC1	27	100
HEK	nested	HXT1 de <i>S. cerevisiae</i>	-	-
	$\alpha$ -MF	<i>engB</i> de <i>A. niger</i>	66	98
		pKLAC1	33	98
IEK	nested	INU1 de <i>K. marxianus</i>	-	-
	$\alpha$ -MF	<i>engB</i> de <i>A. niger</i>	40	95
		pKLAC1	58	97
TEK	nested	TDH3 de <i>S. cerevisiae</i>	99	98
	$\alpha$ -MF	<i>engB</i> de <i>A. niger</i>	55	96
		pKLAC1	42	96

O resultados dos alinhamentos demonstraram que o gene *engB* de *A. niger* foi clonado em detrimento do gene *eng1*, uma vez que em todos os cassetes, as sequências obtidas com o *primer*  $\alpha$ -MF apresentaram identidade com o gene *engB* de *A. niger*, com valores de variando entre 95 e 97%, maiores do que a identidade obtida para o gene *eng1*. Esses valores diferentes de identidade podem estar relacionados à qualidade do sequenciamento ou à presença de mutações na sequência real, uma vez que alguns pontos com substituições de bases foram identificados. Os genes *eng1* e *engB* apresentam 92,1% de identidade. A análise comparativa do alinhamento e do cromatograma possibilitou diferenciar mutações e erros no sequenciamento. As substituições interpretadas como mutações podem ser atribuídas ao erro da técnica de PCR e às diferenças naturais encontradas entre o material genético da linhagem utilizada nesse trabalho e da linhagem cuja sequência está depositada no banco de dados.

As seqüências obtidas com o *primer*  $\alpha$ -MF em cada cassete foram traduzidas e submetidas à avaliação do posicionamento correto da janela de leitura pela ferramenta SIXFRAME do software SDSC Biology Workbench. Em nenhuma das construções foi observado a inserção de códons de parada dentro da seqüência codificadora. A figura 14 mostra um resultado desse tipo de análise.



**Figura 14:** Resultado da análise no SIXPRAME da região codificadora da seqüência obtida do seqüenciamento utilizando o *primer*  $\alpha$ -MF. A metionina inicial do Eng1 está marcada em vermelho e a seqüência de aminoácidos correspondente está sublinhada. A seqüência *usptream* à do gene *eng1* corresponde ao peptídeo sinal  $\alpha$ -MF clonado *in frame* com a seqüência codificadora do *eng1*.

A estratégia adotada nesse trabalho demonstrou que a fusão dos três fragmentos pela técnica de *overlap* PCR foi eficiente e pode ser utilizada a construção de cassetes de expressão sem comprometimento da qualidade das seqüências.

## 5.4. Transformação de *K. marxianus* UFV-3 e seleção de transformantes

### 5.4.1. Eficiência de transformação de *K. marxianus* UFV-3 pelos métodos de acetato de lítio e eletroporação

Os métodos de transformação com acetato de lítio, adaptado para *K. marxianus* por Abdel-Banat e colaboradores em 2010, e de eletroporação, adaptado para *K. lactis* por Sánchez e colaboradores em 1993, foram testados para transformação da *K. marxianus* UFV-3. O cassete utilizado nessa comparação foi o PEK (tabela 4) na concentração de 100ng/μl.

Os valores de eficiência dos dois métodos foram de  $3,5 \times 10^4$  UFC/μg de DNA para o acetato de lítio e de 400 UFC/μg de DNA para a eletroporação. Com uma diferença de até 89%, o método de transformação com acetato de lítio foi mais eficiente que o de eletroporação (tabela 6), porém, esses valores são inferiores aos esperados. Para o método de eletroporação foi observado que a presença de até 1μg de DNA carreador aumenta o número de transformantes (Sánchez et al, 1993), então nós decidimos testar se a presença de DNA carreador aumentava a eficiência do protocolo de eletroporação escolhido. Nossos resultados mostraram que houve aumento de quase 60% do número de UFC com a utilização de DNA carreador, mas a eficiência de transformação ainda foi mais baixa do que com o método de acetato de lítio. Abdel-Banat e colaboradores demonstraram não haver interferência do DNA carreador no protocolo por eles padronizado e este parâmetro não foi testado nesse trabalho.

Apesar de Sánchez e colaboradores conseguirem uma eficiência de transformação na ordem de  $10^5$  UFC/μg de DNA com a levedura *K. lactis*, nossos resultados demonstram que esse protocolo não é indicado, ou deve ser adaptado para obtenção de transformantes em *K. marxianus*.

**Tabela 6: Eficiência de transformação de *K. marxianus* UFV-3 com os métodos de acetato de lítio e eletroporação**

Método	UFC/ $\mu$ g de DNA	Eficiência (%)
Acetato de lítio (Abdel-Banat et al, 2010)	$3,5 \times 10^4$	100
Eletroporação (Sánchez et al, 1993)	400	11
Eletroporação com DNA carreador (Sánchez et al, 1993)	675	19

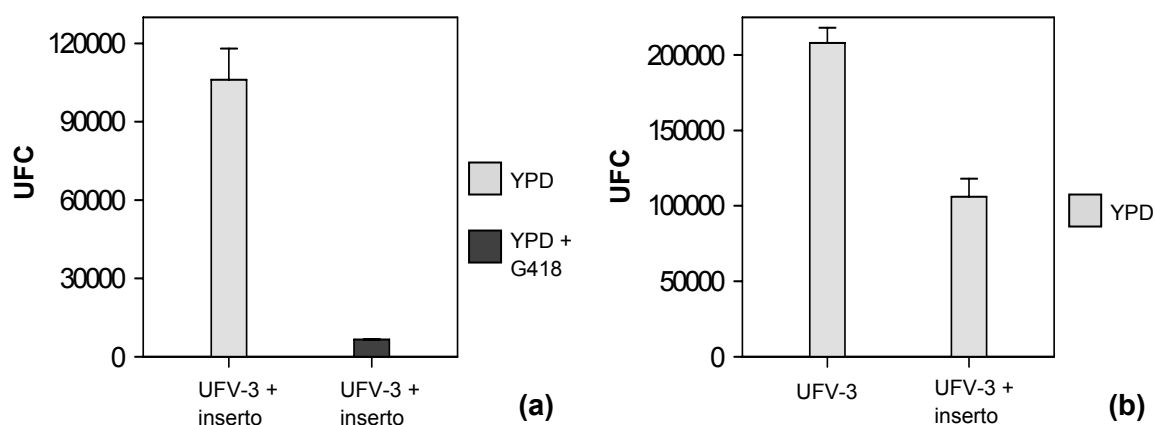
Abdel-Banat e colaboradores conseguiram a eficiência de  $1,8 \times 10^6$  UFC/ $\mu$ g de DNA para a *K. marxianus* DMKU3-1042, muito superior à obtida nesse trabalho de  $3,5 \times 10^4$  UFC/ $\mu$ g de DNA. Porém, com o mesmo método os pesquisadores obtiveram  $5,7 \times 10^4$  UFC/ $\mu$ g de DNA, para a linhagem IFO0273,  $3,6 \times 10^3$  UFC/ $\mu$ g de DNA, para a NCYC587, resultado mais compatível com os nossos. A *K. marxianus* DMKU3-1042 foi caracterizada por Nonklang e colaboradores (2008) e apresenta a característica de ser mais termotolerante do que outras linhagens testadas. Porém, essa característica, considerada por Abdel-Banat ao padronizar o protocolo com choque-térmico a 47°C, não justifica a maior eficiência do método para a DMKU3-1042, fato esse comprovado por análise da taxa de sobrevivência das linhagens. Esse resultado reafirmou a diversidade fisiológica entre as espécies de *K. marxianus* e demonstrou que o potencial de transformação também é diferente entre elas.

Souza e colaboradores (2012) demonstraram que a linhagem UFV-3 apresentou bom crescimento na temperatura de 45°C. Com o objetivo de analisar se a UFV-3 foi sensível ao protocolo de choque térmico a 47°C, avaliamos a sobrevivência das células após o tratamento. O número de UFC em meio não seletivo foi maior do que no meio com 50 $\mu$ g/ml de antibiótico, mostrando que não houve prejuízo no número de células viáveis após o procedimento e sim um menor rendimento na transformação ou na seleção dos transformantes (figura 15a). Neste trabalho, diferente da marca de seleção por auxotrofia utilizada por Abdel-Banat e pela maioria dos trabalhos com transformação de *K. marxianus*, usamos uma marca dominante para selecionar as leveduras transformadas (resistência ao antibiótico geneticina), e obtivemos menor número de transformantes. No trabalho de Khramtsov e colaboradores (2011), linhagens industriais da levedura *Saccharomyces cerevisiae* também apresentaram

baixa eficiência de transformação, cerca de 100 UFC/ $\mu$ g de DNA, utilizando a seleção por resistência a antibiótico.

A menor eficiência de transformação com uma marca dominante pode estar relacionada à necessidade de mudança no metabolismo das células no meio seletivo, o que pode influenciar o tempo de geração do transformante e até mesmo ocasionar a perda da viabilidade celular. Nos nossos resultados esse fenômeno foi observado quando comparamos o número de UFC obtida em meio não seletivo de uma alíquota de células competentes que não entraram em contato com o cassete de expressão (UFV-3 controle) e o número de UFC obtida de uma alíquota de células competentes que receberam o inserto. Podemos observar que até mesmo em meio sem pressão de seleção, o número de UFC resultante da transformação com o inserto que contém o gene de resistência é menor (figura 15b).

No caso do método de transformação com acetato de lítio podemos concluir que a linhagem UFV-3 mostrou menor potencial de ser transformada geneticamente do que a DMKU3-1042, nas condições utilizadas nesse trabalho, e que, mais estudos são necessários para melhor caracterização molecular dessa linhagem para fins de manipulação genética.



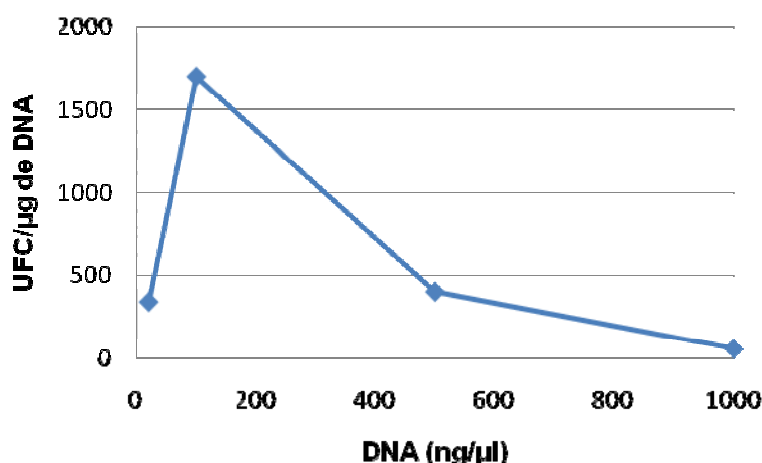
**Figura 15:** Viabilidade da levedura UFV-3 representada pelo número de UFC resultante após transformação: **(a)**: com o inserto em placas de meio YPD com e sem o antibiótico; **(b)**: sem e com o inserto em placas de YPD sem o antibiótico.

#### 5.4.2. Avaliação da influência de diferentes parâmetros na eficiência de transformação de *K. marxianus* UFV-3

O protocolo de Abdel-Banat e colaboradores (2010) foi adotado como padrão, e foram analisadas as variáveis: concentração de DNA; sequência de homologia no cassete de integração; concentração de antibiótico; e combinações de insertos.

- **Concentração de DNA**

Para avaliação da influência da concentração de DNA utilizada no processo de transformação da linhagem UFV-3, as concentrações de DNA escolhidas foram de 20, 100, 500 e 1000 ng/μl. Na transformação com o cassete contendo o promotor PGK (PEK), a eficiência de transformação foi de 340, 1700, 400 e 60 UFC/μg de DNA para as concentrações de 20, 100, 500 e 1000ng/μl, respectivamente (figura 16). Esses dados mostram um aumento de 80% quando a concentração do DNA passa de 20 para 100ng/μl (aumento de 5x na concentração), porém, quando a concentração de DNA passa de 100 para 500ng/μl (aumento de 5x na concentração) e de 500 para 1000ng/μl (aumento de 2x), observa-se uma redução de 77% e de quase 97%. Logo, esse resultado mostrou que a relação entre eficiência de transformação e concentração de DNA não é linear e que entre as concentrações testadas de DNA, a de 100ng/μl foi a que mostrou maior eficiência.



**Figura 16:** Resultado da transformação de *K. marxianus* UFV-3, em placas com 100 μg/ml de G418, com o cassete PEK nas concentrações de 20, 100, 500 e 1000ng/μl. O número de unidades formadoras de colônia é visivelmente menor nas concentrações abaixo e acima de 100ng/μl de inserto.

No protocolo padronizado por Abdel-Banat a concentração de DNA recomendada era de 25-50ng/μl, mas a influência do aumento na concentração do inserto não foi avaliada. Sánchez mostrou que para o protocolo de eletroporação, a eficiência de transformação é maior à medida que a concentração do DNA aumenta, atingindo o máximo em 1000ng/μl. Nosso resultado mostrou, para o método adotado, que a influência da concentração do DNA na eficiência de transformação não é linear, assumindo o máximo em 100ng/μl.

- **Sequência de homologia**

Definidos o método e a concentração de DNA que proporciona maior eficiência de transformação para a *K. marxianus* UFV-3 com cassete linear integrativo, prosseguimos a transformação com os outros cassetes, para expressão do gene *eng1*, construídos nesse trabalho. Todas as transformações foram realizadas com alíquotas da mesma preparação de células competentes. Na tabela 7 está o resultado da eficiência de transformação com cada cassete.

**Tabela 7: Eficiência de transformação com os diferentes cassetes de expressão para o gene *eng1* em concentrações de G418 de 50 e 100 μg/ml**

Cassete de expressão	Promotor	UFC/μg de DNA	
		50 μg/ml	100 μg/ml
TEK	TDH3	1,6 x10 <sup>5</sup>	500
PEK	PGK	2,8 x10 <sup>4</sup>	10
HEK	HXT1	3,5 x10 <sup>4</sup>	5
PLEK	PCPL3	2,7 x10 <sup>4</sup>	0
IEK	INU1	1,8 x 10 <sup>3</sup>	0

A eficiência foi diferente entre os cassetes. A transformação com o cassete do promotor TDH3 resultou em um número maior de UFC/μg de DNA nas duas concentrações de antibiótico. Esse resultado nos revela que é provável que a sequência do promotor presente no inserto esteja direcionando a integração no genoma da levedura. De acordo com Lane e Morrissey (2010), o sistema de integração em leveduras do gênero *Kluyveromyces* é baseado no mecanismo de reparo de extremidades não homólogas (NHEJ). Porém, quando o inserto apresenta longa sequência de homologia com o genoma de *K. marxianus*, pode haver uma

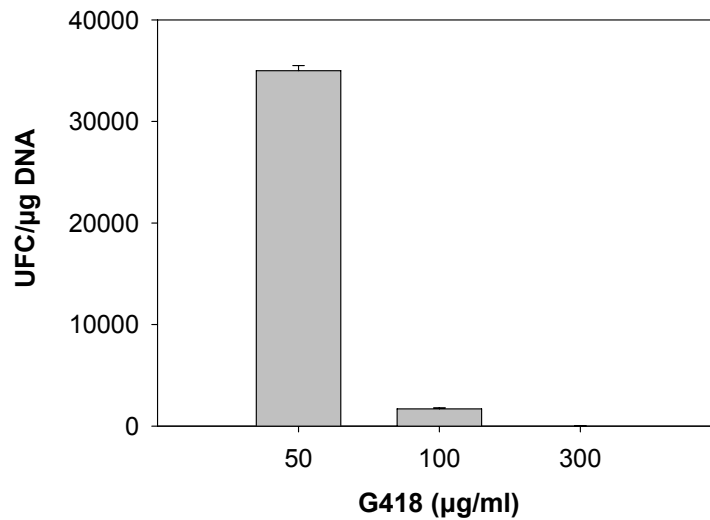
competição entre o sistema NHEJ e a recombinação homóloga, resultando em uma diminuição do número de transformantes (Abdel-Banat et al, 2010; Astromskas et al, 2009). Curiosamente, em nosso trabalho também foi obtido um menor número de transformantes com o cassete contendo o promotor endógeno INU1.

Também observamos com esse experimento que a eficiência de transformação diminuiu quase 100% quando utilizamos a seleção com 100µg/ml. Esse resultado nos alertou para um provável escape na seleção de transformantes na concentração de 50µg/ml do antibiótico, fazendo-se necessário avaliar esse parâmetro.

- **Concentração de antibiótico**

As concentrações de geneticina (G418) utilizadas nas transformações foram 50, 100 e 300µg/ml. Os resultados revelam que a eficiência de transformação em *K. marxianus* UFV-3 é inversamente proporcional à concentração de G418 e que as colônias demoraram um tempo maior para crescer no meio seletivo à medida que a concentração do antibiótico era maior. Para o cassete PEK, a eficiência de transformação foi de  $3,5 \times 10^4$ , 1700 e 100 UFC/µg de DNA para placas contendo 50, 100 e 300µg/ml do antibiótico (figura 17). Esses dados mostram uma redução de 95% de eficiência quando a concentração de G418 passa de 50 para 100µg/ml, e de praticamente 100% de 50 para 300µg/ml.

Para avaliar se o efeito do maior tempo de incubação sobre o crescimento das colônias estava relacionado à degradação do antibiótico, essas foram replicadas em novas placas, contendo a mesma concentração de geneticina, e o resultado confirmou que as colônias com crescimento tardio tratavam-se de possíveis clones, uma vez que elas se mostraram resistentes.



**Figura 17:** Resultado da transformação de *K. marxianus* UFV-3 com o cassete PEK na concentração de 100ng/μl. O número de unidades formadoras de colônia é menor quanto maior é a concentração de antibiótico no meio.

- **Combinação de insertos**

Nesse trabalho avaliamos a transformação com o cassete completo, PEK, contendo a região promotora e a marca de seleção, de 4295pb, ou com uma combinação dos insertos: construção contendo apenas a região promotora e o gene *eng1* (PE, de 2895pb) e a construção contendo a marca de seleção e o gene *eng1* (EK, de 3405). Observamos que o número de UFC/μg de DNA foi maior quando a transformação foi feita com a combinação dos insertos PE e EK do que com o cassete completo. Apesar do número de colônias diminuir com o aumento da concentração de DNA, como demonstrado anteriormente, a diferença entre as eficiências de transformação com os dois tipos de construção é melhor percebida à medida que aumentamos a concentração do inserto e do antibiótico no meio. Na tabela 8 apresentamos os valores de eficiência em cada transformação. Embora na concentração de 100ng/μl de DNA, o número de UFC em placas de 100μg/ml de G418 não foi considerado maior para a combinação dos insertos, nas concentrações de 500 e 1000ng/μl esse valor foi de quase 2 e 23 vezes maior. Na seleção com concentração de 300μg/ml de G418 a eficiência de PE+EK foi 3 e 1,5 vezes maior do que para PEK em concentrações de 100 e 500ng/μl do inserto.

**Tabela 8: Eficiência de transformação com o cassete PEK e a combinação dos insertos PE e EK**

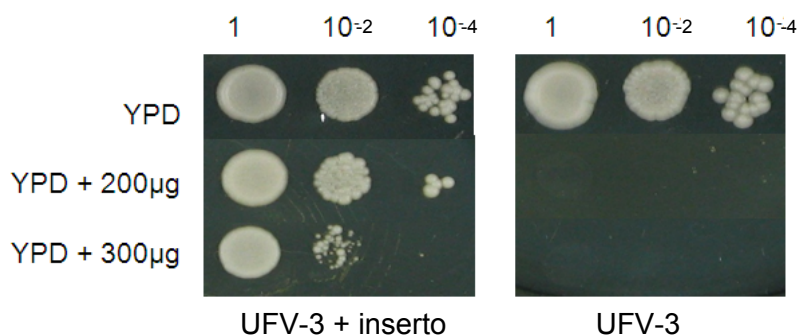
Construção	DNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	UFC/ $\mu\text{g}$ de DNA	
		100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	300 $\mu\text{g}/\text{ml}$
PEK	0,1	1700	100
	0,5	400	40
	1	6	0
PE + EK	0,1	1800	300
	0,5	780	60
	1	140	0

De acordo com Bryksin e Matsumura (2010), a eficiência de transformação diminui até 50% com o aumento do tamanho do inserto, o que pode explicar a maior eficiência obtida nesse trabalho com a combinação PE+EK cujo tamanho é menor do que o cassete completo com o promotor e a marca se seleção juntos.

#### **5.4.3. Seleção de transformantes**

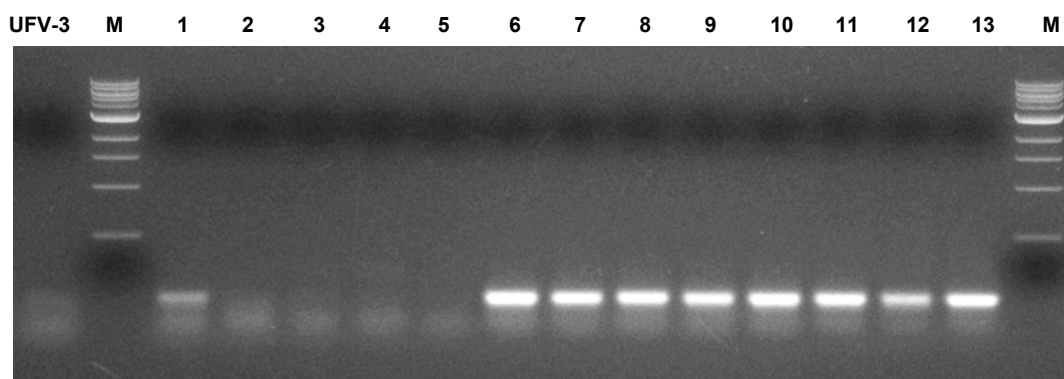
Após a avaliação de que a sensibilidade da *K. marxianus* UFV-3 ao antibiótico geneticina (G418) é discutível foram feitas transformações com seleção em 300 e até 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de antibiótico, porém, o número de UFC chegou a zero na última concentração, portanto, para a seleção dos clones decidimos continuar com as colônias crescidas em 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de G418 e foi realizada uma seleção por crescimento diferencial em placas com concentrações crescentes do antibiótico. Na figura 18 temos um exemplo de crescimento diferencial de um possível clone e da UFV-3 não transformada.

Foram selecionados para análise de expressão apenas as colônias transformantes que conseguiram crescer até a concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , comprovando que houve integração do cassete e que a marca de seleção está sendo expressa. Nas placas de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de geneticina foram selecionados 7 colônias para os promotores HXT1, INU1, PGK e PCPL3, e 13 colônias para o TDH3. Entre essa colônias foram selecionadas em 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$  apenas 3 colônias para os promotores HXT1, PCPL3 e PGK, e 2 colônias para o INU1 e TDH3.



**Figura 18:** Resultado da seleção de possíveis clones por comparação do crescimento de um das colônias resultantes da transformação (UFV-3 + inserto) com a linhagem UFV-3 não transformada (UFV-3).

O resultado do crescimento em placas mostrou uma diferença nítida de crescimento entre essas colônias selecionadas e a levedura não transformada, porém, apesar do crescimento diferencial em geneticina, não foi possível confirmar a integração dos fragmentos do promotor e marca de seleção do cassete por PCR. A única reação possível foi a amplificação de um fragmento de 100pb da região 3' do gene *eng1* (figura 19), essa reação mostrou que apesar de ser a maioria, nem todas as colônias podem ser consideradas transformantes.



**Figura 19:** Fracionamento em gel de agarose 0,9% do produto da amplificação de 100 pares de base correspondentes à porção 3' do gene *eng1*. (M): padrão de tamanho molecular 1Kb *DNA Ladder* (New England BioLabs); (1 e 5 a 13): colônias UFV-3 + inserto; (2, 3 e 4): colônias UFV-3 sem o inserto.

Com esses resultados de crescimento e PCR, não podemos afirmar que o antibiótico G418 nas concentrações testadas funciona para a seleção de apenas clones verdadeiros, porém, foi possível identificar *K. marxianus* UFV-3 transformantes para o gene *eng1*, e análises de expressão e secreção serão analisadas posteriormente.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, os genes da endoglucanase e da celobiohidrolase de *A. niger* foram subclonados no vetor pKLAC1 e utilizados para construção de cassetes de expressão lineares pela técnica de PCR de fusão, com o gene KanMX e os promotores HXT1, INU1, PCPL3, PGK e TDH3.

Este trabalho abre perspectivas para obtenção de leveduras recombinantes por uma técnica alternativa à utilização de plasmídeos. A estratégia adotada para fusão dos fragmentos possibilitou obter as construções em apenas duas etapas de PCR, uma para amplificação dos fragmentos e a outra para a fusão. A construção de cassetes de expressão lineares por esse método mostrou-se reprodutível e versátil, podendo ser aplicado para qualquer sequência desejada. A transformação de *K. marxianus* com os protocolos adotados nesse trabalho mostrou que a metodologia de acetato de lítio foi mais eficiente do que a eletroporação. A seleção dos transformantes foi realizada por resistência ao antibiótico G418 e os resultados mostraram que a metodologia requer análises posteriores de resistência das colônias resultantes da transformação.

Apesar de não ter sido avaliado ainda a expressão e a secreção, neste trabalho foi possível padronizar a construção dos cassetes de expressão, a transformação e seleção dos transformantes de *K. marxianus* UFV-3.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-banat, B.M.A.; Nonklang, S.; Hoshida, H.; Akada, R. Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*. 2010; 27:29-39.
- Astromsskas, E.; Cohn, M. Ends-in vs. ends-out targeted insertion mutagenesis in *Saccharomyces castelli*. *Current Genetics*. 55:339-347 (2009).
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E., et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: John Wiley and Sons, Inc., 2003.
- Baldrian, P.; Valaskova, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 32: 501-521.
- Ball, M.M.; Raynal, A.; Iborra, G.; Iborra, F. Construction of efficient centromeric, multicopy and expression vectors for the yeast *Kluyveromyces marxianus* using homologous elements and the promoter of a purine-cytosine-like permease. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnolog*. 1999; 2:347-353.
- Bergkamp, R. J.; Bootsman, T. C.; Toschka, H.Y.; Mooren, A.T.; Kox, L.; Verbakel, J.M.; Geerse, R.H.; Planta, R.J. Expression of an alpha-galactosidase gene under control of the homologous inulinase promoter in *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993; 40:309-317.
- Bryksin, A. V.; Matsumura, I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*. 2010; 48:463-365.
- Cha-aim, K.; Fukunaga, T.; Hoshida, H.; Akada, R. Reliable fusion PCR mediated by GC-rich overlap sequences. *Gene*. 2009; 434(1-2):43-49.
- Chen, J-R.; Lu, J-J.; Wang, H-F. Rapid and Efficient Gene Splicing Using Megaprimer-Based Protocol. *Molecular Biotechnology*. 2008; 40:224-230.
- Cortez, L. A. B. Bioetanol de cana-de-açúcar, PD para produtividade e sustentabilidade. Bluncher. (2010).

- Diniz, R. H. S.; Silveira, W. B.; Fietto, L. G.; Passos, F. M. L. The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek*. (2011).
- Fonseca, G.G.; Heinzle, E.; Wittmann, C.; Gombert, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79:339-54 (2008).
- Gietz, R. D.; Schiest, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*. 2, 31–34 (2007).
- Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Lidén, G.; Zacchi, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *TRENDS in Biotechnology*. 24 (2006).
- Hamilton, S.R.; Gerngross, T.U. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(5):387-92 (2007).
- Hasunuma, T.; Kondo, A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnology Advances*. (2011).
- Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*. 2(4):924-32 (2007).
- Hensing, M.C.; Rouwenhorst, R.J. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. *Antonie van Leewenhoek*. 3: 261-279 (1995).
- Heyland, J.; Fu, J.; Blank, L.M.; Schmid, A. Quantitative Physiology of *Pichia pastoris* During Glucose-Limited High-Cell Density Fed-Batch Cultivation for Recombinant Protein Production. *Biotechnology and Bioengineering*. 107: 357-368 (2010).
- Hill, J.; Ian, K. A.; Donald, G.; Griffiths, D. E. DMSO-Enhanced Whole Cell Yeast Transformation. *Nucleic Acid Research*. 19 (1991).

- Hong, J.; Tamaki, H.; Akiba, S.; Yamamoto, K.; Kumagai, H.. Cloning of a Gene Encoding a Highly Stable Endo-beta-1,4-Glucanase from *Aspergillus niger* and Its Expression in Yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92: 434-441 (2001).
- Hong, J.; Wang, Y.; Kumagai, H.; Tamaki, H. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *Journal of biotechnology*. 130(2):114-23 (2007).
- Iborra F. High efficiency transformation of *Kluyveromyces marxianus* by a replicative plasmid. *Current Genetics*. 24:181–183 (1993).
- Idiris, A.; Tohda, H.; Kumagai, H.; Takegawa, K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Applied Microbiology*. 86:403-417 (2010).
- Jeffries, T.W.; Cregg, J.M. Protein Expression in Nonconventional Yeasts. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 64 (2010).
- Jeon, E.; Hyeon, J.; Suh, D.J.; Suh, Y.W.; Kim, S.W.; Song, K.H.; Han, S.O. Production of cellulosic ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* heterologous expressing *Clostridium thermocellum* endoglucanase and *Saccharomyces fibuligera*  $\beta$ -glucosidase genes. *Molecules and Cells*. 2009.
- Khramtsov, N.; McDade, L.; Amerik, A.; Yu, E.; Divatia, K.; Tikhonov, A.; Minto, M.; Kabongo-Mubalamate, G.; Markovic, Z.; Ruiz-Martinez, M.; Henck, S. Industrial yeast strain engineered to ferment ethanol from lignocellulosic biomass. *Bioresourse Technology*. 102: 8310-8313 (2011).
- Lane, M.M.; Morrissey, J.P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*. 24:17-26 (2010).
- Linger JG, AdneyWS, Darzins A. Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by *Zymomonas mobilis*. *Applied Environmental Microbiology*. 76: 6360–9 (2010).

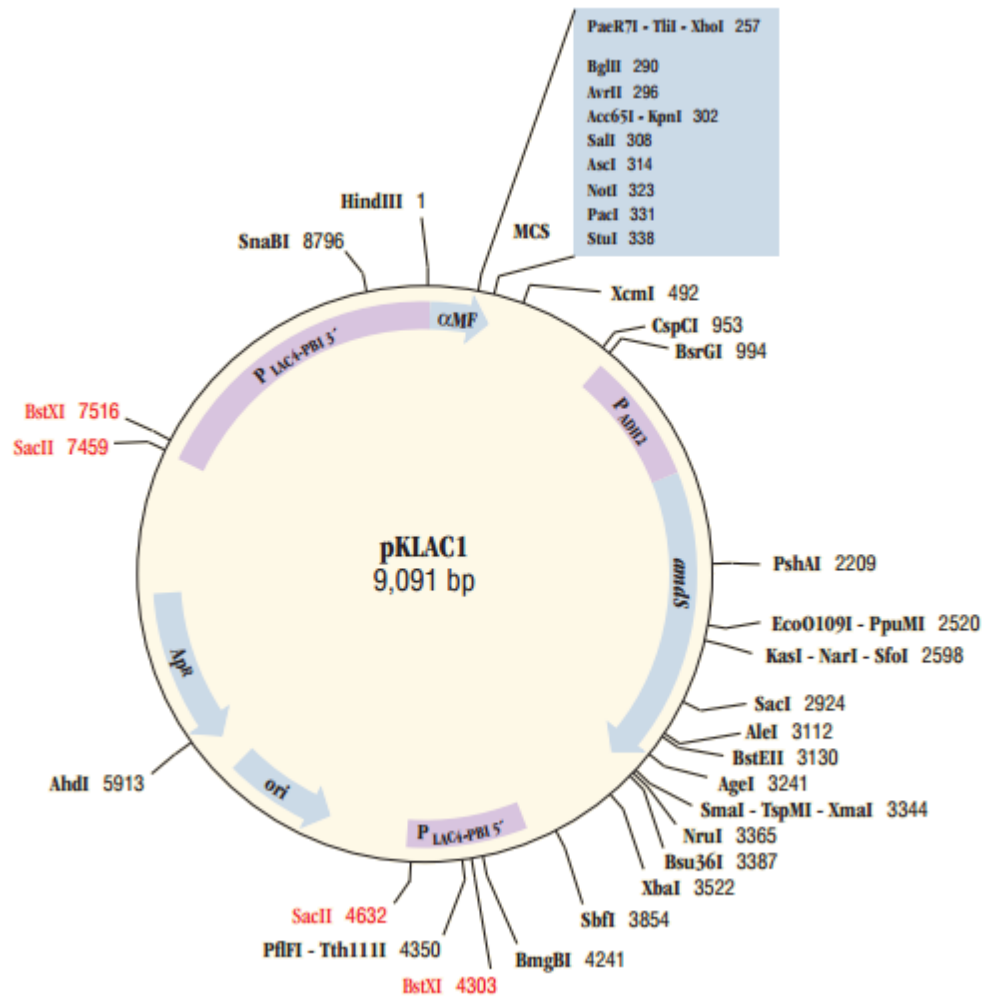
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25: 402 – 408 (2001).
- Lopes, M. L. Identificação e purificação de uma  $\beta$ -glicosidase extracelular e construção de vetores para expressão constitutiva de celulases em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. Dissertação de Mestrado (Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.
- Mäki-Arvela, P.; Anugwoma, I.; Virtanena, P.; Sjöholma, R.; Mikkola, J. P. Dissolution of lignocellulosic materials and its constituent liquids – A review. *Industrial Crops and Products*. 32: 175–201 (2010).
- Meilhoc, E.; Masson, J.M.; Teissié, J. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Journal of Biotechnology*. 1990; 8:223–227.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 96 673-686 (2005).
- Nelson, M. D.; Fitch, D. H, A. Overlap Extension PCR: An Efficient Method for Transgene Construction. *Methods in Molecular Biology*. 772: 459-470 (2011).
- Nonklang, S.; Abdel-banat, B.M.A.; Cha-aim, K.; Moonjai, N.; Hoshida, H.; Limtong, s.; Yamada, M.; Akada, R. High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(24):7514-7521 (2008).
- Nonklang, S.; Ano, A.; Abdel-banat, B.M.A.; Saito, Y.; Hoshida, H.; Akada, R. Construction of a flocculent *Kluyveromyces marxianus* strains suitable for high temperature ethanol fermentation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 73:1090-1095 (2009).
- Ooyen A.J.J.; Dekker, P.; Huang, M.; Olsthoorn, M. M.; Jacobs, D. I.; Colussi, P.; Taron, C.H. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS yeast research*. 6(3):381-92 (2006).

- Pecota, D. C.; Rajgarhia, V.; Da Silva, N. A. Sequencial Gene Integration For The Engineering Of *Kluyveromyces Marxianus*. *Journal Of Biotechnology*. 127:408-416 (2007).
- Porro, D.; Sauer, M.; Branduardi, P.; Mattanovich, D. Recombinant Protein Production in Yeasts. *Molecular Biotechnology*. 31:245-259 (2005).
- Rocha, S.N. Expressão e secreção de proteínas heterólogas em leveduras do gênero *Kluyveromyces*. *Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Engenharia*. 2010.
- Rocha, S.N.; Abrahão-neto, J.; Cerdán, M.E.; González-siso, M.I.; Gombert, A.K. Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microbial Cell Factories*.1-12 (2010).
- Rocha, S.N.; Abrahão-neto, J.; Gombert, A.K. Physiological diversity within the *Kluyveromyces marxianus* species. *Antonie van Leeuwenhoek*.100: 619-630 (2011).
- Rodrigues, M.Q.R.B. Expressão do gene eng1 de *Aspergillus niger* em *Kluyveromyces marxianus*: uma alternativa para a produção de etanol celulósico. *Monografia apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa*. 2009.
- Ryu S, Karim MN. A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91:529–42 (2011).
- Sánchez, M.; Iglesias, F. J.; Santamaría, C.; Domínguez, A. Transformation of *Kluyveromyces lactis* by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (7): 2087-2092 (1993).
- Santos, A. F. Clonagem do gene CBHA de *Aspergillus niger* em vetor para expressão em *Kluyveromyces marxianus* UFV3. *Monografia apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa*. 2009.

- Shevchuk, N.; Bryksin, A.V.; Nusinovich, Y.; Cabello, F.C.; Sutherland, M.; Ladisch, S. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Research*. 32 (2004).
- Souza, C. J. A.; Costa, D. A.; Rodrigues, M. Q. R. B.; Santos, A. F.; Lopes, M. R.; Abrantes, A. B. P.; Costa, P. S. Silveira, W. B; Passos, F. M. L.; Fietto, L. G. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresourse and Biotechnology*. (2012).
- Torres, F.A.G.; Moraes, L.M.P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *BioTecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 12:20-22 (2000).
- Voronovsky AY, Rohuya OV, Abbas CA, Sibirny AA. Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan. *Metabolic Engineering*. 11:234–42 (2009).
- Xu Q, Singh A, Himmel ME. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Current Opinion in Biotechnology*. 20:364–71 (2009).
- Yanase, S.; Hasunuma, T.; Yamada, R.; Tanaka, T.; Ogino, C.; Fukuda, H.; Kondo, A. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88:381-388 (2010).
- Yon, J.; Fried, M. Precise gene fusion by PCR. *Nucleic Acids Research*. 17: 4895 (1989).
- Zhang, J.; Yuan, H.; Wen, T.; Xu, F.; Di, Y.; Huo, K.; Li, Y. Cloning of the KcURA3 gene and development of a transformation system for *Kluyveromyces cicerisporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62: 387–391 (2003).
- Zhang, Y.-HP.; Himmel, M. E., Mielenz, J. R. Outlook For Cellulase Improvement: Screening And Selection Strategies. *Biotechnology Advances*. 24:452–481 (2006).

Zhang, A.; Luo, J.; Zhang, T.; Pan, Y.; Tan, Y.; Fu, C.; Tu, F. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports*. 2009; 36:1611–1619.

## 8 ANEXOS



Anexo I: Mapa do plasmídeo pKLAC1.