

CLÁUDIA SOUZA MACÊDO

Transformação de *Pichia pastoris* com o gene  
de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus var. lactis*

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2001

CLÁUDIA SOUZA MACÊDO

Transformação de *Pichia pastoris* com o gene  
de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus var. lactis*

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

**APROVADA:** 15 de Março de 2001.

---

Prof<sup>a</sup>. Elizabeth P. B. Fontes  
(Conselheira)

---

Prof. Jorge Luiz C. Coelho  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Célia Alencar de Moraes

---

Prof<sup>a</sup>. Elza Fernandes de Araújo

---

Prof<sup>a</sup>. Flávia Maria Lopes Passos  
(Orientadora)

À minha estrutura básica:  
Maltez e Carmélia,  
Carla e Cléia.  
Caíque, e  
Maria Eugênia.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela fonte de vida e fortaleza.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

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

À minha orientadora, prof<sup>a</sup> Flávia Maria Lopes Passos, pela grande amizade, atenção, compreensão e pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.

Aos professores conselheiros prof<sup>a</sup> Elizabeth P. B. Fontes e prof. Jorge Luiz Cavalcante Coelho, pelo interesse, pela disponibilidade e pelos ensinamentos necessários para o meu aprendizado.

Aos demais membros da banca: prof<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes e prof<sup>a</sup> Elza Fernandes de Araújo, pela atenção, dedicação e pelo carinho.

A todos os professores do Curso, pela dedicação em ensinar e pelo apoio.

À minha família, Maltez, Carmélia, Carla e Cléia, pela compreensão em todos os momentos de minha existência, pelo amor e pelo apoio constante.

Ao meu filho Caique, especialmente pela grande paciência e pelo amor durante o curso.

A Maria Eugênia, “lindinha da titia”, pelos momentos agradáveis e pela

companhia ingênua durante a elaboração desta tese.

Aos amigos que, de maneira bastante especial, contribuíram diretamente para a realização deste trabalho: Marcelo Rodrigues, Leonardo Damasceno, Gisele Chaves, Joci Neuby e Carlos Priminho.

À minha amiga “fanta”, Juliana Magalhães, e aos amigos Audecir Giombeli e Maurício Costa, pelo companheirismo, pelas palavras solidárias compartilhadas nos momentos difíceis e felizes: *toujour avec une repas savoureux et un bon vin*.

À minha grande amiga Ana Paula Ornelas, pela imensa participação na minha vida e pelas palavras carinhosas ditas na hora certa.

A Lízia Lenza que, além de colega, tomou-se integrante da minha família em Viçosa, pela alegria e boas risadas que contribuíram para o agradável convívio.

Aos meus colegas de laboratório Ann, Cássia, Fábria, Fábio, Greice Kelle, Gilseane, Juliana, Otávio, Ximena, Pollyanna, Wendel, Cláudio, Elizama, Evandro, Gislene, Verônica, Mônica, Roberta, Virgínia e Cesário, pela amizade, pelo bom convívio.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BiP), pela atenção e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos “superamigos” Luciana, Adalgisa, Simone, João Batista, Patrícia, Francelina e Ana Lúcia, pela agradável convivência diária e ajuda durante os estudos.

A todos os meus amigos dos laboratórios de Microbiologia Industrial, Genética de Microrganismos, Microbiologia de Alimentos e Micorriza, que me auxiliaram e ajudaram em algum momento.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Nilcéia, Laura, Aparecida, Arlindo, Danilo, José Reinaldo, Evandro, Raimundo, Antônio e Paulo.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, especialmente aos professores Nélio José de Andrarde, Adão José Rezende Pinheiro e Sebastião César Cardoso Brandão pelo incentivo constante e por acreditarem no meu aprendizado.

## **BIOGRAFIA**

CLÁUDIA SOUZA MACÊDO, filha de Maltez Juvenal de Macêdo e Carmélia Souza de Macêdo, nasceu em Salvador, Estado da Bahia, a 16 de março de 1967.

Em agosto de 1994, formou-se em Tecnólogo em Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. Em 1996, iniciou o curso de Agronomia e, em outubro de 1998 diplomou-se Bacharela em Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em novembro de 1998, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola nessa mesma Universidade, concluindo em Março de 2001.

## ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Obtenção das construções de DNA.....	11
3.1.1 Obtenção da região codificadora do gene <i>LAC4</i> .....	11
3.1.2 Obtenção da região codificadora do gene <i>LAC4</i> truncado ( <i>LAC4-NH<sub>2</sub></i> ).....	12
3.2. Estratégia de clonagem.....	14
3.2.1. Clonagem da região codificadora do gene <i>LAC4</i> , obtido por “PCR” no vetor pPIC9 de <i>Pichia pastoris</i> .....	14
3.2.2. Clonagem da região codificadora do gene <i>LAC4</i> no vetor pPIC9 na orientação senso.....	16
3.2.3. Clonagem da região codificadora do gene <i>LAC4</i> truncado, obtido pela digestão de clones senso (pL1S) no vetor pPIC9 de <i>Pichia pastoris</i> .....	17

3.2.4.	Isolamento de DNA plasmidial.....	17
3.3	Transformação de <i>Pichia pastoris</i> GS115 com a região codificadora do gene <i>LAC4</i> da <i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i> .....	18
3.3.1.	Preparo e linearização do DNA plasmidial.....	18
3.3.2.	Preparo de células competentes de <i>Pichia pastoris</i> .....	19
3.3.3.	Transformação de <i>Pichia pastoris</i> .....	20
3.3.4.	Análise da presença da região codificadora do gene <i>LAC4</i> no genoma de <i>Pichia pastoris</i> .....	20
3.3.4.1	Isolamento do DNA genômico de <i>Pichia pastoris</i> .....	20
3.3.4.2.	Análise de colônias transformantes por “PCR”.....	21
3.4.	Análise da atividade de $\beta$ -galactosidase em transformantes <i>Pichia pastoris</i> .....	22
3.4.1.	Indução da proteína heteróloga e amostragem.....	22
3.4.2.	Análise da atividade de $\beta$ -galactosidase.....	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1.	Obtenção e clonagem da região codificadora dos genes <i>LAC4</i> e <i>LAC4-NH<sub>2</sub></i> no vetor de expressão e secreção pPIC9 de <i>P. pastoris</i> .....	24
4.2.	Integração da região codificadora dos genes <i>LAC4</i> e <i>LAC4-NH<sub>2</sub></i> no genoma de levedura <i>Pichia pastoris</i> .....	33
4.3.	Atividade de $\beta$ -galactosidase em transformantes <i>Pichia pastoris</i> GS115.....	36
5.	RESUMO E CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## RESUMO

MACÊDO, Cláudia Souza, M. S., Universidade Federal de Viçosa, 15 de Março 2001. **Transformação de *Pichia pastoris* com o gene de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*.** Professora Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Professores Conselheiros: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

A região codificadora do gene *LAC4*, que codifica a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, foi isolada do plasmídeo pLAC4-12, por meio da técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores, que amplificam um fragmento de aproximadamente 3.000 pb. Com os objetivos de expressar e secretar a  $\beta$ -galactosidase, este fragmento foi clonado em um vetor de expressão e secreção pPIC9 do sistema de expressão de *Pichia pastoris*. A região codificadora *LAC4* intacta e uma versão truncada foram fundidas em fase com a seqüência sinal de secreção do fator- $\alpha$ , sob controle do promotor AOX1. A hidrólise dos DNAs recombinantes obtidos com as enzimas de restrição apropriadas confirmou a clonagem da região codificadora *LAC4* intacta nas orientações anti-senso e senso e da versão truncada no vetor pPIC9. Os clones foram linearizados e usados para transformar células eletrocompetentes de *Pichia pastoris* GS115 (His<sup>-</sup> e Mut<sup>+</sup>). Colônias recombinantes foram isoladas e as inserções da região codificadora *LAC4* intacta e truncada no genoma da levedura foram confirmadas por "PCR" com iniciadores específicos. Colônias

recombinantes positivas foram cultivadas em glicerol e a expressão dos genes recombinantes foi induzida com metanol. Amostras foram coletadas periodicamente e o meio extracelular e a massa de células analisados quanto à atividade de  $\beta$ -galactosidase. Nenhum aumento na atividade de  $\beta$ -galactosidase foi observado perante o controle. Espera-se que a transformação de linhagens da levedura Mut<sup>r</sup> com os clones obtidos possa resultar na produção de uma proteína funcional.

## ABSTRACT

MACÊDO, Cláudia Souza, M. S., Universidade Federal de Viçosa, March 2001.  
**Transformation of *Pichia pastoris* with a  $\beta$ -galactosidase gene from *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Committee Members: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

The coding region of the  $\beta$ -galactosidase LAC4 gene, from *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* was isolated from pLAC4-12, by polymerase chain reaction (PCR) technique with primers that amplify a fragment of approximately 3.000 bp. Expression and secretion vector to express and secrete  $\beta$ -galactosidase, the intact and truncated LAC4 coding regions were fused in phase with the factor- $\alpha$  secretion signal sequence in the *Pichia pastoris* pPIC9. Appropriate restriction enzyme hydrolyses confirmed the insertion of the intact LAC4 coding region in sense and antisense orientations, as well as its truncated version in to the pPIC9 vector. The clones were linearized and used to transform electrocompetent *Pichia pastoris* GS115 (His<sup>-</sup> e Mut<sup>+</sup>) cells. Recombinant cells were isolated and the insertions of intact and truncated LAC4 coding regions in the yeast genome were confirmed by PCR with specific primers. Positive recombinant colonies were grown in glycerol and the expression of the heterologous genes was induced with methanol. Samples were periodically collected and the extracellular medium and cell mass were analyzed for  $\beta$ -galactosidase activity. No increase in  $\beta$ -galactosidase activity

was observed over the control. The transformation of Mut<sup>-</sup> yeast cell lines with the clones is expected to result in the production of a functional protein.

## 1. INTRODUÇÃO

A demanda por enzimas na indústria de processamento, em particular na indústria de alimentos, tem sido cada vez mais acentuada. Enzimas podem modificar o alimento no sentido de melhorar suas propriedades nutricionais, sensoriais e funcionais. Por exemplo, a preparação comercial de  $\beta$ -galactosidase é usada em vários ramos da indústria de alimentos e da farmacêutica. Tem função a de disponibilizar glicose e galactose em produtos de leite, aliviando os sintomas gastrointestinais da intolerância à lactose em pessoas sensíveis, além de melhorar a solubilidade dos produtos concentrados de leite e torná-los mais facilmente fermentáveis (RICHMOND et al., 1981; KULIKOVA et al., 1990; BONEKAMP e OOSTEROM, 1994).

Existem diversas fontes de  $\beta$ -galactosidase na natureza, tais como plantas, animais, bactérias, leveduras e fungos. A especificidade da  $\beta$ -galactosidase de diversas fontes é a mesma, o que sugere um grau de conservação evolutiva da proteína ancestral comum. Porém, apresentam diferentes propriedades com potenciais variados de aplicação tecnológica.

Dentre os fungos produtores de  $\beta$ -galactosidase, os unicelulares da espécie *Kluyveromyces marxicianus* var. *lactis* (*K. lactis*) destacam-se por apresentarem maior velocidade de crescimento e maior facilidade de cultivo em fermentadores em escala industrial, comparados a fungos filamentosos.

Entretanto, ao contrário dos fungos filamentosos, *K. lactis* sintetiza, mas

não secreta  $\beta$ -galactosidase. De fato, a localização subcelular de  $\beta$ -galactosidase nos diferentes microrganismos é variável, diferindo também quanto às suas estruturas oligoméricas. A  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis* é dimérica e permanece no citoplasma (DICKSON et al., 1979; RICHAMOND et al., 1981). Portanto, como outras enzimas intracelulares, requer etapas adicionais nas etapas de processamento, como lise das células, extração, isolamento e purificação. A indústria biotecnológica possui um amplo mercado para enzimas e vem investindo em pesquisas para otimizar a produção e a purificação dessas proteínas. Além da aplicação industrial, a enzima  $\beta$ -galactosidase tem sido modelo no desenvolvimento de novas tecnologias, inclusive de sistemas de expressão de proteínas recombinantes, utilizando microrganismos alternativos como hospedeiros.

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem revelado excelente potencial como sistema de expressão heteróloga. Neste sistema, altos níveis de expressão de genes heterólogos e secreção de diferentes proteínas com importância comercial e medicinal têm sido obtidos (CEREGHINO e CREGG, 2000).

Relatos da produção extracelular de  $\beta$ -galactosidase recombinante de qualquer fonte foram encontrados, entretanto a eficiência de secreção é ineficiente.

O presente trabalho teve como objetivo principal a produção extracelular de  $\beta$ -galactosidase, codificada pelo gene *LAC4* da *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, em *Pichia pastoris*. Para isso, a região codificadora (intacta ou truncada) do gene *LAC4* foi fundida à seqüência sinal de secreção fator- $\alpha$ , sob controle do promotor *AOX1*, em um vetor de expressão de *Pichia pastoris*. As construções de DNA foram propagadas em *E. coli* JM109 e usadas para transformar *Pichia pastoris*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A enzima  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23), classificada na família 2  $\alpha$ -glicosil hidrolase, catalisa a hidrólise de  $\beta(1-4)$ D-galactopiranosil-D-glicopiranoose (INOHARA-OCHIAI et al., 1998), além de sintetizar oligossacarídeos via atividade galactosil transferase. A enzima é comercialmente conhecida como lactase e está associada à hidrólise da lactose, dissacarídeo que ocorre somente no leite. A hidrólise da lactose é utilizada na indústria de leite por razões nutricionais, para atender às necessidades de população intolerante à lactose devido à insuficiência intestinal de  $\beta$ -galactosidase e, também, por razões tecnológicas, para melhorar produtos derivados do leite como doce de leite, leite condensado e sorvetes, em que a baixa solubilidade da lactose confere uma textura arenosa, característica indesejável no produto (RICHMOND et al., 1984; KULIKOVA et al., 1990; BONEKAMP e OOSTEROM, 1994). A enzima  $\beta$ -galactosidase também é útil na hidrólise da lactose do soro de queijo, subproduto da indústria de laticínios, cujo volume não aproveitado constitui um grande problema de poluição ambiental. O soro de queijo hidrolisado é utilizado como ingrediente em diversos produtos.

A  $\beta$ -galactosidase pode ser encontrada em intestinos de animais e em plantas, além de leveduras, fungos filamentosos e bactérias gram-negativas entéricas e gram-positivas (RICHMOND et al., 1981). A especificidade da  $\beta$ -

galactosidase de diferentes fontes é a mesma, porém as propriedades moleculares, tais como tamanho das subunidades, estrutura oligomérica e requerimentos especiais para a sua atividade ótima, diferem significativamente com a fonte da enzima. Essas observações sugerem uma diversidade estrutural das  $\beta$ -galactosidases (INOHARA-OCHIAI et al., 1998; RICHMOND et al., 1981). A produção industrial de enzimas a partir de células microbianas requer menor número de operações que a partir de células de organismos superiores. Se a célula microbiana secreta a enzima para o meio extracelular tanto melhor, pois reduz as operações de isolamento e purificação da preparação final. Preparações comerciais de  $\beta$ -galactosidase são derivadas da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* (*K. lactis*) e de fungos filamentosos como *Aspergillus niger* (SOMKUTI e HOLSINGER, 1997).

A  $\beta$ -galactosidase produzida por fungos filamentosos é extracelular, uma glicoproteína monomérica com massa molecular de 96 - 150 KDa, contendo de 5 a 30% de carboidratos. A presença de carboidratos na molécula pode explicar a alta termoestabilidade, com temperatura ótima entre 50 - 60 °C (KULIKOVA et al., 1990). A enzima fúngica também apresenta pH ótimo na faixa ácida (2,5 - 5,0). Ao contrário dos fungos filamentosos, a levedura *K. lactis* sintetiza uma  $\beta$ -galactosidase intracelular, sendo uma proteína dimérica com subunidades idênticas, com massa molecular de 135 KDa, termosensível, pH ótimo na faixa neutra (6,7 - 7,0) (DICKSON et al., 1979; RICHAMOND et al., 1981) e requer íons de manganês, potássio e sódio para atividade máxima (MOLDER et al., 1993). A composição dos aminoácidos presentes na  $\beta$ -galactosidase de levedura é caracterizada por alto conteúdo de cisteína, em que os grupos sulfidrila são necessários para atividade catalítica da enzima (KULIHOVA et al., 1990). *Escherichia coli* produz uma enzima intracelular homotetramérica, com massa molecular de aproximadamente 520 KDa e sítio de ligação para íon de  $Mg^{2+}$  em cada subunidade, sendo este sítio cataliticamente importante (JACOBSON, 1994). A enzima de *E. coli* apresenta baixa resistência às temperaturas mais elevadas, exibindo pH ótimo na faixa neutra a básica (RICHMOND et al., 1981). A seqüência de DNA do gene em *E. coli*, *lacZ*, codifica um polipeptídeo de 116 KDa de 1.023 aminoácidos com altos níveis de resíduos de triptofano e arginina (FOWLER et al., 1978;

JACOBSON et al., 1994).

O mecanismo de ação da  $\beta$ -galactosidase de *E. coli*, conhecido como duplo deslocamento, propõe que o sítio ativo da enzima seja constituído de resíduos de ácido glutâmico, histidina e cisteína. A conformação funcional da enzima promove a aproximação dos três radicais de aminoácidos por meio de ligações de hidrogênio, de modo a facilitar o ataque nucleofílico do grupo imidazol do resíduo de histidina ao carbono 1 da galactose. O grupo sulfidril do resíduo de cisteína atua protonando o átomo de oxigênio glicosídico, ocorrendo, assim, a liberação do primeiro produto, a glicose, e formando um complexo covalente galactosil-enzima. Para a hidrólise da galactose, uma molécula de água (acceptor galactosil) cede próton ao ânion sulfidril e participa do ataque da hidroxila ao carbono 1; assim, os elétrons retornam para o nucleófilo, restaurando o sítio ativo da enzima (STEVENSON et al., 1993; WHITAKER, 1994).

A levedura *K. lactis*, além de sintetizar uma  $\beta$ -galactosidase de atividade em pH neutro, útil no processamento de leite, é um organismo classificado como GRAS (*Generally Recognised As Safe*) segundo a FDA (*Food and Drug Administration*). De acordo com a FDA, a presença de *K. lactis* em produtos lácteos é normal e nenhum relato de toxicidade e patogenicidade foi descrito (Randolph, 1984, citado por BONEKAMP e OOSTEROM, 1994). Entretanto, a produção e o uso industrial dessa enzima intracelular são problemáticas, devido ao alto custo associado à extração da enzima, que requer condições severas, podendo afetar a estabilidade da proteína e adicionar impurezas nas preparações, levando ao baixo rendimento (BECERRA et al., 1997).

Dentre as leveduras, *K. lactis* é uma das poucas espécies que podem utilizar lactose como única fonte de carbono e energia (CZYZ et al., 1993; GELLISSEN e HOLLENBERG, 1997; POCH et al., 1992; SREEKRISHNA et al., 1984). O gene estrutural da  $\beta$ -galactosidase, *LAC4*, foi isolado de uma biblioteca de genes da *K. lactis*, por ensaios de complementação em *E. coli* mutante com deleção no gene *lacZ* (*Lac*<sup>-</sup>), cultivada na presença de lactose, (DICKSON e MARTIN, 1978). Foi demonstrado que o fragmento de DNA de 12 Kb, que contém o gene *LAC4*, também continha o gene da permease, porque

conferiu fenótipo Lac<sup>+</sup> em *Saccharomyces cerevisiae*, normalmente incapaz de transportar e hidrolisar lactose. O gene da permease designado *LAC12* foi mapeado no plasmídeo pKR1B-LAC4-1, que contém o fragmento de 12 Kb utilizado nos ensaios de complementação em *S. cerevisiae*, estando localizado entre 2 e 8,6 Kb acima do *LAC4* (SREEKRISHNA e DICKSON,1985). O gene *LAC4* é regulado positivamente em nível transcripcional pela lactose e galactose (BREUNING et al., 1984; SHEETZ e DICKSON, 1981), sendo observada uma indução de 125 vezes pela lactose e 150 vezes pela galactose.

Em uma tentativa de obter mutantes que secretam  $\beta$ -galactosidase, BARRETO (1998) submeteu uma cultura de *K. lactis* selvagem a tratamento com agente mutagênico. Os mutantes foram selecionadas quanto à resistência à geneticina na expectativa de liberar a enzima no meio de cultura. Entre os mecanismos da resistência à geneticina, foram observadas mutações em proteínas de membrana que resultaram em maior secreção de proteínas. Entretanto, nenhum dos vários mutantes testados apresentou atividade extracelular da enzima  $\beta$ -galactosidase.

Utilizando diferentes linhagens de *S. cerevisiae* com fenótipo super secretor e transformadas com o gene da enzima  $\beta$ -galactosidase de *K. lactis*, foi demonstrado que apenas 10% da atividade enzimática localizava-se no periplasma (BECERRA et al.,1999). Mesmo assim, esta baixa atividade foi suficiente para permitir a linhagem recombinante de *S. cerevisiae* crescer em meio contendo lactose como única fonte de carbono.

Várias seqüências sinais têm sido usadas para direcionar a secreção de proteínas heterólogas em leveduras. A mais comumente usada é a seqüência derivada do precursor do feromônio fator- $\alpha$  da *S. cerevisiae*. A interação do peptídeo sinal com a partícula de reconhecimento de sinal, no citoplasma, assegura que as proteínas a serem secretadas sejam sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) e transferidas para o lúmen da organela (HALBAN e IRMINGER, 1994). Tem sido demonstrado que a fusão de uma seqüência sinal na extremidade 5' do gene de interesse é eficiente na secreção de pequenos peptídeos, mas não favorece a secreção de proteínas de alta massa molecular, como  $\beta$ -galactosidase (BECERRA et al., 1997).

Na tentativa de secretar  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* em *S. cerevisiae*,

fundida nos sinais de secreção fator- $\alpha$  e glicoamilase, observou-se que a proteína foi corretamente processada, porém retida no periplasma (DAS et al., 1989; VANONI et al., 1989). Similamente  $\beta$ -galactosidase (*LAC4*) de *K. lactis* fundida no sinal fator- $\alpha$  não foi secretada em *S. cerevisiae* (BECERRA et al., 1997), sugerindo que a dificuldade de secreção de  $\beta$ -galactosidase pode ser uma propriedade inerente da proteína.

A proteína secretada segue uma via específica na célula, permitindo que eventos pós-traducionais importantes aconteçam para a obtenção de uma proteína funcional. O trânsito através desta via pode ou não ocorrer eficientemente para proteínas heterólogas ou para proteínas homólogas (SMITH et al., 1985).

A transferência da proteína a ser secretada para o lúmen do retículo endoplasmático (RE) ocorre em conjunto com a tradução, e este mecanismo é denominado co-translocação. No lúmen do RE, a proteína a ser secretada é auxiliada por *chaperones* moleculares residentes neste compartimento, para atingir a sua conformação funcional (estrutura terciária) (ROMANOS et al., 1992; HALBAN e IRMINGER, 1994; HARTL, 1996). Proteínas que não conseguem adquirir a conformação funcional ligam-se permanentemente ao *chaperone* molecular e são endereçadas para uma rota de degradação (HOLKERI e MAKROW, 1998), pois o tráfego normal no aparelho secretor é bloqueado, formando complexos estáveis, que vão ser reconhecidos pelo sistema proteolítico da célula (HURTLEY et al., 1989). Em leveduras, a degradação pode ocorrer no citosol (HILLER et al., 1996), no vacúolo ou em algum dos primeiros compartimentos da rota secretora, talvez no próprio RE (HOLKERI e MAKROW, 1998).

Algumas proteínas heterólogas são glicosiladas quando secretadas em leveduras, porém eventos indesejáveis como processamento aberrante ou hiperglicosilação podem acontecer durante o processo de secreção (ROMANOS et al., 1992). Os carboidratos componentes das glicoproteínas podem conferir funções importantes no dobramento da proteína, como atividade, montagem do oligômero, processo de secreção e/ou características imunogênicas (JENKINS et al., 1996; MONTESINO et al., 1998).

A expressão de proteínas heterólogas em leveduras tem atraído

atenção, porque leveduras combinam a facilidade de manipulação genética e características de crescimento de organismos procariotos. Os recombinantes são facilmente selecionados por complementação, os genes podem ser facilmente engenheirados para expressar uma proteína heteróloga processada com localização citoplasmática ou para secreção extracelular (BUCKHOLZ e GLEESON, 1991; ROMANOS et al., 1992; CREGG et al., 1993; HADFIELD et al., 1993; GELLISSEN e HOLLENBERG, 1997).

A *S. cerevisiae* foi a primeira levedura usada para a expressão de proteínas heterólogas de interesse industrial, devido aos conhecimentos acumulados de sua genética, fisiologia, fermentação, além de sua condição como um organismo GRAS (ROMANOS et al., 1992; CREGG et al., 1993). Muitas vezes, as células procarióticas são incapazes de produzir proteínas funcionais a partir de genes eucarióticos, não processando adequadamente proteínas heterólogas mesmo que os sinais para expressão desses genes estejam presentes. Além disso, algumas proteínas eucarióticas devem ser modificadas após a tradução para serem funcionais (CONTIM, 1999). As células de mamíferos utilizadas como ferramenta para a expressão de genes têm uso restrito, pois podem conter DNA oncogênico ou DNA viral. Contudo, algumas limitações foram verificadas quando *S. cerevisiae* foi considerada como um organismo de expressão heteróloga: ausência de promotores fortes isolados, secreção e produtividade ineficientes, hiperglicosilação, instabilidade de produção das linhagens e dificuldades com fermentações de alta densidade celular (ROMANOS et al., 1992).

Um crescente número de leveduras não-*Saccharomyces* está disponível como hospedeiras para a produção de polipeptídeos recombinantes. *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Candida boidinii* e *Yarrowia lipolytica* (BUCKHOLZ e GLEESON, 1991; HADFIELD et al., 1993; GELLISSEN e HOLLENBERG, 1997) destacam-se devido à disponibilidade de promotores fortes isolados, potencial de secreção e capacidade de cultivo em alta densidade celular (ROMANOS et al., 1992). Esse sistema pode contribuir para minimizar os custos envolvidos em cada etapa de purificação.

Embora as leveduras não-*Saccharomyces* mencionadas possam ser

consideradas como hospedeiras efetivas para a expressão de genes que codificam proteínas heterólogas, o sucesso e disponibilidade de um sistema desenvolvido para a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* têm concorrido para a sua popularidade.

O sistema de expressão da *Pichia pastoris* foi desenvolvido com base na sua habilidade em crescer em metanol como única fonte de carbono e energia. Neste organismo, dois genes cromossômicos AOX (AOX1 e AOX2) que codificam álcool oxidase foram identificados. O promotor do gene AOX1 (álcool oxidase 1) é fortemente induzido durante o crescimento das células em metanol, sendo responsável pela maior parte da atividade da álcool oxidase na célula. Esta enzima, que constitui aproximadamente 20 - 30% da proteína celular total, catalisa a primeira etapa no metabolismo de metanol, isto é, sua oxidação em formaldeído utilizando oxigênio molecular (ROMANOS et al., 1992; CREGG et al., 1993; FABER et al., 1995; LAL et al., 1997; KATAKURA et al., 1998). *P. pastoris* também abriga um segundo gene funcional de álcool oxidase, AOX2, apresentando homologia de 97% e aproximadamente a mesma atividade específica que AOX1 (CREGG, 1993). A interrupção do gene estrutural AOX1 produz uma linhagem que cresce lentamente em metanol (Mut<sup>S</sup>, *aox1AOX2*), podendo resultar em uma proporção acentuada de acúmulo de proteínas heterólogas quando comparada com a linhagem Mut<sup>+</sup> (AOX1AOX2) (FABER et al., 1995).

Uma vez que o fenótipo Mut (utilização de metanol) afeta a taxa de crescimento durante indução, linhagens Mut<sup>S</sup> podem produzir altos níveis de proteínas heterólogas corretamente dobradas, e a velocidade de dobramento é fator limitante. Para alguns produtos heterólogos, como a partícula de 22 nm do antígeno de superfície da Hepatite B, a baixa velocidade de crescimento das células trouxe vantagens para o arranjo correto da partícula (CREGG et al., 1987). A clonagem do gene *lacZ*, que codifica β-galactosidase de *E. coli*, no vetor de expressão em *P. pastoris* foi demonstrada inclusive com alto nível de expressão em linhagens Mut<sup>S</sup> (TSCHOPP et al., 1987).

A secreção de proteínas heterólogas usando o sistema de expressão *P. pastoris* é complexa e depende não apenas de fatores como dosagem do gene e fenótipo Mut, mas também de fatores como seqüência sinal,

processamento, proteólise e glicosilação, que afetam o rendimento e a qualidade do produto (ROMANOS, 1995). Uma vez que a superexpressão de ubiquitina pode aumentar a secreção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* (SREEKHISHNA et al., 1997), tem sido recomendado que este fenótipo seja testado em qualquer uma das estirpes produtoras disponíveis.

A integração de múltiplas cópias de um cassete de expressão pode algumas vezes produzir mais proteínas heterólogas do que uma linhagem que contém uma única cópia do cassete de expressão. Devido aos requerimentos de estabilidade e ao dobramento da proteína, a opção de secreção é reservada para proteínas heterólogas que são normalmente secretadas em seus hospedeiros nativos (CEREGHINO e CREGG, 2000). Entretanto, altos rendimentos de proteínas recombinantes têm sido reportados, por exemplo, 12 g/L para o fragmento C da toxina tetânica (HADFIELD et al., 1993; SREEKRISHNA et al., 1997), 2.5 g/L para invertase (MONTESINO et al., 1998) e 3 g/L para a albumina do soro humana (HSA) secretada no meio de cultura (SREEKRISHNA et al., 1992).

Utilizando o sistema de expressão *Pichia pastoris*, uma grande variedade de proteínas tem sido produzida com diferentes graus de sucesso (SREEKRISHNA et al., 1997). Contudo, o rendimento final de uma proteína parece ser influenciado por propriedades inerentes à proteína e pode ser aumentado pela manipulação de diversos fatores que influenciam a expressão do gene e a estabilidade do produto.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das Construções de DNA

##### 3.1.1. Obtenção da região codificadora do gene *LAC4*

O plasmídeo pLAC4-12 (SREEKRISHNA e DICKSON, 1985), contendo o gene *LAC4* que codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxicianus var. lactis* e cedido pelo Dr. Dickson da Universidade de Kentucky, foi utilizado como molde para obtenção do gene *LAC4* por amplificação por PCR (“Polimerase Chain Reaction”). Para amplificação do fragmento de DNA correspondente à região codificadora do gene *LAC4* (aproximadamente 3.000 pb), uma reação-padrão foi conduzida em um volume total de 100  $\mu$ L contendo Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 8,8, KCl 0,01 mol/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,01 mol/L,  $\text{MgSO}_4$  0,002mol/L, Triton X-100 0,1% (v/v), BSA 1mg/mL, 10 ng de DNA plasmidial pLAC4-12 purificado, 25 mmol/L de cada dNTP, 5 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores, LAC4AF (5' P-TAC GTA ATG TCT TGC CTT ATT CCT GAG 3', coordenadas 43 a 63) e LAC4AR (5' P-TTA TTC AAA AGC GAG ATC AAA CTC 3', posições 3097 – 3120), sintetizados por Life Technologies Inc. (GIBCO/BRL) (Figura 1) e 2,5U de enzima *Pfu* DNA polimerase (*Pyrococcus furiosus*). Uma reação-controle também foi conduzida conforme descrito acima, porém, o DNA molde foi omitido na reação. O fragmento amplificado, correspondente à região codificadora do gene *LAC4*, contém um sítio *Sna*BI,

imediatamente anterior ao códon de iniciação (introduzido no oligonucleotídeo LAC4AF), introduzido por PCR.

A amplificação da região codificadora *LAC4*, usando *Pfu* DNA polimerase, foi efetuada nas seguintes condições: (i) a 94 °C por 5 minutos (um ciclo); (ii) a 94 °C por 1 minuto, a 42 °C por 1 minuto, a 72 °C por 6 minutos (30 ciclos); (iii) a 72 °C por 10 minutos (um ciclo). Em seguida, o fragmento de DNA de interesse foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% TAE (Tris-Acetato 0,04 mol/L, EDTA 0,5 mol/L, pH 8,0), contendo brometo de etídeo 0,1 µg/mL, utilizando o “Kit Prep-A-Gene” (BIORAD), conforme recomendações do fabricante. A região no gel que continha o fragmento de interesse, aproximadamente 3.000 pb, foi cortada e dissolvida em perclorato de sódio 4,5 mol/L, a 55 °C. A “Matriz Prep-A-Gene” foi adicionada na relação de 5 µL de matriz para cada µg de DNA, misturada gentilmente e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a adsorção do DNA à sílica, a amostra foi lavada duas vezes com o tampão de lavagem (BIORAD) contendo etanol 70% (v/v). O DNA foi eluído em água MilliQ estéril a 50°C, por 20 minutos.

### **3.1.2. Obtenção da região codificadora do gene *LAC4* truncado (*LAC4-NH<sub>2</sub>*)**

O gene *LAC4* truncado (*LAC4-NH<sub>2</sub>*) foi obtido a partir do fragmento liberado, aproximadamente 3.000 pb, com as enzimas de restrição *Sna*BI e *Not*I, do clone pL1S. Em seguida, o fragmento liberado foi clivado com a enzima de restrição *Eco*RI, obtendo-se um fragmento de DNA de aproximadamente 2.000 pb, contendo o possível sítio catalítico e a extremidade amino-terminal (POCH et al., 1992; INOHARA-OCHIAI et al., 1998) (Figura 1). O fragmento de interesse (2.000 pb) foi purificado em gel de agarose, utilizando o “Kit Prep-A-Gene” (BIORAD), conforme descrito anteriormente.

*tac gta*

1 (5') aaaaaaaaa**AA TA**aacacaca tactcatcga gaactgaaag at**atg****tcttg** **ccttattcct**  
61 **gaga**atattaa ggaaccccaa aaaggttcac gaaaatagat tgccacttag ggcttactac  
121 tatgatcagg atatcttcga atctctcaat gggccttggg cttttgcgtt gtttgatgca  
181 cctcttgacg ctccggatgc taagaattta gactgggaaa cggcaaagaa atggagcacc  
241 atttctgtgc catccattg ggaacttcag gaagactgga agtacggtaa accaatctac  
301 acgaacgtac agtaccctat cccaatcgac atcccaaatc ctcccactgt aaatcctact  
361 ggtgtttatg ctagaacttt tgaattagat tcgaaatcga ttgagtcgtt cgagcacaga  
421 ttgagatttg aggggtgaga caattgttac gagctttatg ttaatgggca atatgtgggt  
481 ttcaataaag ggtcccgtaa cggggctgaa tttgatatcc aaaagtacgt ttctgagggc  
541 gaaaacttag agttcgtaa ggtttcaag tggccgatt ccacttatat cgaggacca  
601 gatcaatggt ggctctctgg tatttacaga gacgtttctt tactaaaatt gcctaagaag  
661 gccatattg aagacgtag ggtcactaca acttttggg actctcagta tcaggatgca  
721 gagctttctg tgaagttga tgtccagggt tcttcttatg atcacatcaa ttccactt  
781 tacgaactg aagatggatc taaagtttac gatgcaagct ctttgttgaa cgaggagaat  
841 gggaaacaga cttttcaac taaagaattt attccttct ccacaaaaa gaacgaagaa  
901 acagctttca agatcaactg caaggccca gaacattgga ccgcagaaaa tcctactttg  
961 tacaagtacc agttggattt aattggatct gatggcagtg tgattcaatc tattaagcac  
1021 catgttggtt tcagacaagt ggagttgaag gacggaaca ttactgttaa tggcaaagac  
1081 attctcttta gaggtgtcaa cagacatgat caccatcaa gggtcggtag agctgtgcca  
1141 ttgattttg ttgttaggga cttgattcta atgaagaagt ttaacatcaa tgctgttctg  
1201 aactcgcatt atccaaacca tcctaagggt tatgacctct tcgataagct gggcttctgg  
1261 gtcattgacg aggcagatct tgaactcat ggtgttcaag agccatttaa tcgctacacg  
1321 aacttgaggy ctgaatatcc agatactaa aataactct acgatgttaa tgcccattac  
1381 ttaacagata atccagagta cgaggtcgcg tacttagaca gagcttccca acttgccta  
1441 agagatgtca atcatccttc gattattatc tggctcctgg gtaac**gaa**gc ttgttatggc  
1501 agaaccaca aagccatgta caagttaatt aaacaattgg atcctaccag acttgtgcat  
1561 tatgaggggt acttgaacgc tttgagtgca gatatcttta gtttcag**ta c**ccaacattt  
1621 gaaattatgg aaagggtgag gaagaaccac actgatgaaa atggtaagtt tgaagaagcct  
1681 ttgatcttgt gtgag**tac**gg ccatgcaatg ggtaacggtc ctggctcttt gaagaatat  
1741 caagagttgt tctacaagga gaagttttac caaggtggct ttatctggga atgggcaa  
1801 cacggtatt**g aattc**gaaga tgttagtact gcagatggta agttgcataa agcttatgct  
1861 tatggtggtg actttaagga agaggttcat gacggagtgt tcatcatgga tggtttgtgt  
1921 aacagtgacg ataactctac tccgggcctt gtagagtata agaaggttat tgaaccctt  
1981 catatataaa ttgcgcacgg atctgtaaca atcaaaaata agcagactt cattacgaca  
2041 gaccacttat tgtttatcga caaggacacg gaaagacaa tcgacgttcc atctttaaag  
2101 ccagaagaat ctgttactat tccttctgat acaacttatg ttgttgccgt gttgaaagat  
2161 gatgctggtg ttctaaagc aggtcatgaa attgcctggg gccaaagctga acttccattg  
2221 aaggtagccg atttgttac agagacagca gaaaagctg cgaagatcaa cgacggtaa  
2281 cgttatgtct cagtgaatc cagtggattg cattttatct tggacaaat gttgggtaa  
2341 attgaaagcc taaaggtaa gggtaaggaa atttccagca agtttgaggg ttcttcaatc  
2401 actttctgga gacctcaac gaataatgat gaacctaggg actttaagaa ctggaagaag  
2461 tacaatattg atttaatgaa gcaaaacatc catggagtga gtgtcgaaaa aggttcta  
2521 ggttctctag ctgtagtcac ggttaactct cgtatatccc cagtgtgatt ttactatggg  
2581 tttgagactg ttcagaagta cacgatcttt gctaacaaaa taaactgaa cacttctatg  
2641 aagcttactg gcgaatatca gcctctgat ttccaagag ttgggtacga attctggcta

**Figura 1** - Sequência de nucleotídeos do gene *LAC4* da levedura *Kluyveromyces marxianus var. lactis*. Letras maiúsculas em negrito correspondem à sequência conservada TATA (posição 8) e ao sinal de poliadenilação (posição 3.401); letras em negrito e itálico, seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (GIBCO/BRL); caixa com letras em negrito, aminoácidos ácido glutâmico (posição 1.485) e tirosina (posição 1.609 e 1.696) componentes do sítio catalítico; seqüência sublinhada, sítio da enzima *EcoRI* (posição 1.810); sombreado, códons de início e de término (Poch et al., 1992).

```

2701 ggagatagtt atgaatcatt tgaatgggta ggtcgcgggc cggcgaatc atatccggat
2761 aagaaggaat ctcaaagatt cggcttttac gattccaaag atgtagagga attcgtatat
2821 gactatcctc aagaaaatgg aaatcataca gataccact ttttgaacat caaatttgaa
2881 ggtgcaggaa aactatcgat cttccaaaag gagaagccat ttaacttcaa gatttcagac
2941 gaatacgggg ttgatgaagc tgcccacgct tgtgacgta aaagatacgg cagacactat
3001 ctaaggttgg accatgcaat ccatggtgtt ggtagcgaag catgcccacc tgctgttctg
3061 gaccagtaca gattgaaagc tcaagatttc aactttgagt ttgatctcgc ttttgaataa
                                     (3')ctca aactagagcg aaaacttatt
3121 gaattttata cttagataag tatgtactta caggtatatt tctatgagat actgatgtat
3181 acatgcatga taatatttaa acggttatta gtgccgattg tcttgtgcca taatgacgtt
3241 cctatcaaag caatacactt accacctatt acatgggcca agaaaatatt ttcgaacttg
3301 tttagaatat tagcacagag tatatgatga tatccgtagg attatgcatg attcattcct
3361 acaacttttt cgtagcataa ggattaatta cttggatgcc AATAAAaaaa aaaaacatcg
3421 agaaaatttc agcatgctca gaaacaattg cagtgtatca aagtaaaaaa aagattttca
3481 ctacatgttc cttttgaaga aagaaaatca tggaacatta gattacaaa aatttaacca
3541 ccgctgatta acgattagac cgtaagcgc acaacagggtt attagtacag agaaagcatt
3601 ctgtggtgtt gccccggact ttcttttgcg acataggtaa atcgaatacc atcatactat
3661 cttttccaat gactocctaa agaagactc ttcttcgatg ttg (3')

```

**Figura 1** - (Cont.) Seqüência de nucleotídeos do gene *LAC4* da levedura *Kluyveromyces marxicianus* var. *lactis*. Letras maiúsculas em negrito correspondem à seqüência conservada TATA (posição 8) e ao sinal de poliadenilação (posição 3.401); letras em negrito e itálico, seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (GIBCO/BRL); caixa com letras em negrito, aminoácidos ácido glutâmico (posição 1.485) e tirosina (posição 1.609 e 1.696) componentes do sítio catalítico; seqüência sublinhada, sítio da enzima *EcoRI* (posição 1.810); sombreado, códons de início e de término (Poch et al., 1992).

## 3.2. Estratégia de Clonagem

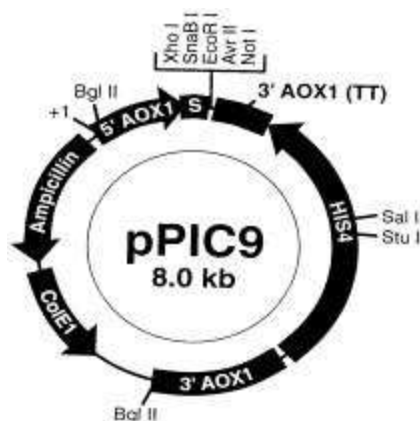
### 3.2.1. Clonagem da região codificadora do gene *LAC4*, obtido por “PCR” no vetor pPIC9 de *Pichia pastoris*

O vetor escolhido para clonagem, pPIC9 (INVITROGEN, Califórnia, USA) (Figura 2), projetado para integração no genoma da célula hospedeira *Pichia pastoris*, possui a região promotora 5' AOX1 (álcool oxidase) induzido por metanol, uma seqüência sinal de secreção fator- $\alpha$  da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seguida por sítio de múltipla clonagem e região terminadora 3' AOX1. Apresenta marca de seleção auxotrófica, gene *HIS4*, para seleção em leveduras hospedeiras.

Inicialmente, o vetor pPIC9 foi digerido com a enzima *SnaBI* (TAC↓GTA) e desfosforilado. A reação de desfosforilação de extremidades abruptas foi preparada de acordo com SAMBROOK et al. (1989). A enzima

fosfatase alcalina foi adicionada à reação, em presença de Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 0,001 mol/L e ZnCl<sub>2</sub> 0,001 mol/L. Devido à presença de extremidades abruptas, a reação foi conduzida em duas etapas: a 37 °C por 15 minutos e a 55 °C por 15 minutos, com a adição de uma unidade de fosfatase alcalina em cada etapa.

A reação de ligação do fragmento de DNA ao vetor pPIC9 foi conduzida segundo SAMBROOK et al. (1989). O fragmento de DNA LAC4 e o vetor pPIC9 foram utilizados na proporção de 7:1 em um volume final de 20 µL, na presença da enzima T<sub>4</sub> DNA ligase (PHARMACIA), em Tris-HCl 660 mmol/L pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 66mmol/L, DTT (ditiotrietol) 100 mmol/L, ATP 660µmol/L, por um período de 17 horas, a 14 °C.



**Figura 2** - Mapa físico do vetor de expressão e secreção pPIC9 *Pichia pastoris* (INVITROGEN). No esquema estão destacados o promotor 5'AOX1; sinal de secreção (S) fator- $\alpha$ ; sítios únicos para *Xho* I, *SnaB* I, *EcoR* I, *Avr* II, *Not* I; região terminadora 3'AOX1 (TT); gene *HIS4* para seleção em *Pichia*; fragmento 3'AOX1; origem de replicação ColE1 e gene para resistência à ampicilina.

Células ultracompetentes, *E. coli* JM109, foram preparadas de acordo com INOUE et al. (1990). A estirpe utilizada de *E. coli* JM109 foi cultivada em SOB (extrato de levedura 5 g/L, triptona 20 g/L, NaCl 0,01 mol/L, KCl 0,0025 mol/L, MgCl<sub>2</sub> 0,01 mol/L, MgSO<sub>4</sub> 0,01 mol/L ) a 19 °C, até atingir uma DO<sub>600</sub> de 0,5, incubada em gelo por 10 minutos e coletada por centrifugação a 2.000 g a

4 °C, por 10 minutos. As células foram ressuspensas em um volume de TB (PIPES 0,01 mol/L, CaCl<sub>2</sub> 0,015 mol/L, KCl 0,25 mol/L, pH 6,7, MnCl<sub>2</sub> 0,055 mol/L) gelado, equivalente a 1/3 do volume original do meio de cultura e incubadas por 10 minutos no gelo. Novamente as células foram coletadas por centrifugação a 2.000 g, a 4 °C, por 10 minutos e concentradas dez vezes pela ressuspensão em TB e DMSO (dimetil sulfoxido) 7% (v/v). Alíquotas de 200 µL foram estocadas a – 80 °C até o uso.

A transformação foi realizada adicionando 10 µL da reação de ligação a uma alíquota de células ultracompetentes JM109, mantida a 0 °C, por 30 minutos. Após choque térmico de 2 minutos, a 42 °C, 1 mL de meio LB (Tryptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) foi adicionado, incubando-se por 1 hora, a 37 °C. As células foram concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100 µL de meio LB e espalhadas em placas contendo meio LB e ampicilina 100 µg/mL a 37 °C, para seleção dos transformantes. Estes foram cultivados em 2 mL de meio LB contendo ampicilina para subsequente isolamento do DNA plasmidial com enzimas de restrição apropriadas.

### **3.2.2. Clonagem da região codificadora do gene *LAC4* no vetor de pPIC9 na orientação senso**

Para a obtenção do clone contendo o gene *LAC4* na orientação senso (pL1S), o fragmento de interesse de aproximadamente 3.000 pb foi liberado do clone anti-senso (pL1AS) com as enzimas de restrição *XhoI* (C↓TC GAG) e *SnaBI*; em seguida, foi tratado com T<sub>4</sub> DNA polimerase (BOEHRINGER MANNHEIM) e purificado em gel de agarose, utilizando o “Kit Prep-A-Gene” (BIORAD). Assim, o fragmento de interesse com extremidades abruptas foi subclonado no vetor de expressão e secreção pPIC9, previamente linearizado com a enzima de restrição *SnaBI* e desfosforilado, conforme descrito anteriormente. O fragmento de DNA e o vetor foram utilizados na proporção 3:1 em um volume final de 20 µL, na presença da enzima T<sub>4</sub> DNA ligase. A obtenção de células ultracompetentes e a transformação em bactéria foram conduzidas conforme descrito anteriormente.

### **3.2.3. Clonagem da região codificadora do gene *LAC4* truncado, obtido pela digestão de clones senso (pL1S) no vetor pPIC9 de *Pichia pastoris***

O fragmento de 3.000 pb correspondente à região codificadora do gene *LAC4* foi liberado com as enzimas de restrição *SnaBI* e *NotI*, mantendo o seu sítio catalítico. Em seguida, este fragmento foi purificado e digerido com *EcoRI*. O fragmento resultante de aproximadamente 2.000 pb foi subclonado no vetor pPIC9 na proporção 3:1, previamente hidrolisado com as enzimas de restrição *SnaBI* e *EcoRI*. A obtenção de células ultracompetentes e a transformação em bactéria foram conduzidas conforme descrito anteriormente

### **3.2.4. Isolamento de DNA plasmidial**

O isolamento do DNA plasmidial de bactérias, clones e vetor foi conduzido, em grande escala, pelo método da lise alcalina e adsorção de DNA em sílica, utilizando-se o “Plasmid Maxi Kit” (QIAGEN), e, em pequena escala, utilizando-se o “Flexi Prep Kit” (PHARMACIA), de acordo com as recomendações dos fabricantes

Para o isolamento em grande escala, foram utilizados 100 mL de meio de cultura. Este método é baseado em um procedimento modificado de lise alcalina, seguido pela adsorção de DNA plasmidial em resina de troca iônica, em condições apropriadas de baixa concentração de sal e pH. RNA, proteínas e impurezas de baixo peso molecular são removidos pela lavagem com concentração média de sal. O DNA plasmidial é eluído em um tampão com alta concentração de sal e então concentrado e desalinizado por meio da precipitação com isopropanol.

As bactérias transformadas foram cultivadas em meio LB com ampicilina, por 12 a 16 horas. Após a centrifugação, 6000 g, por 5 minutos, a 4°C, as células foram ressuspensas na solução I (glicose 0,005 mol/L, Tris-HCl 0,025 mol/L, pH 8,0 e EDTA 0,02 mol/L) contendo RNase A 100 µg/L. Em seguida, foi adicionada a solução II, solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 10 g/L) e a mistura foi incubada por 5 minutos, à temperatura ambiente. A esta mistura, foi adicionada a solução III (CH<sub>3</sub>COOK 3 mol/L), prolongando-se a incubação por mais 20 minutos em banho de gelo. O resíduo insolúvel foi

descartado por centrifugação a 20.000 g, por 30 minutos, a 4 °C. A solução recuperada, após lise alcalina, foi aplicada na coluna “QIAGEN-tipo 500” (QIAGEN), previamente equilibrada com 10 mL de tampão QB [NaCl 0,75 mol/L, MOPS 0,05 mol/LL, pH 7,0, isopropanol 15% (v/v) e Triton X-100 0,15% (v/v)]. Em seguida, a coluna que continha o DNA foi lavada duas vezes com 30mL de tampão QC [NaCl 1 mol/L, MOPS 0,05 mol/L, pH 7,0 e isopropanol 15% (v/v)]. Após lavagem da coluna, o DNA foi eluído com 15 mL de tampão QF [NaCl 1,25 mol/L, Tris-HCl 0,05 mol/L, pH 8,5 e isopropanol 15% (v/v)] e sedimentado com 42% (v/v) de isopropanol. Após centrifugação a 15.000 g, por 30 minutos, a 4 °C, o DNA foi lavado com 5 mL de etanol 70% (v/v) e ressuspenso em 500 µL de água MilliQ estéril.

Para o método de isolamento em pequena escala, a lise alcalina foi conduzida conforme descrito anteriormente, exceto que foram utilizados 2 mL de meio de cultura. O lisado insolúvel de células foi removido por centrifugação a 11.000 g, por 10 minutos. Após a lise alcalina, o DNA plasmidial foi sedimentado do sobrenadante pela adição de isopropanol, na concentração final de 42% (v/v), incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, coletado por centrifugação a 11.000 g, por 10 minutos. A suspensão “Sephaglas™ FP” (PHARMACIA) foi adicionada ao DNA plasmidial, seguida de lavagem com tampão de lavagem [Tris-HCl 0,02 mol/L, pH 7,5, EDTA 0,002 mol/L, NaCl 0,2 mol/L e etanol 60% (v/v)] (PHARMACIA). O DNA foi eluído em água por 5 minutos, à temperatura ambiente.

O DNA plasmidial foi digerido com enzimas de restrição selecionadas, para análise dos clones de interesse, e separado por eletroforese em gel de agarose 1% TAE.

### **3.3. Transformação de *Pichia pastoris* GS115 com a região codificadora do gene *LAC4* da *Kluyveromyces marxicianus var. lactis***

#### **3.3.1. Preparo e linearização do DNA plasmidial**

Os clones pL1S e pL2S, contendo o gene *LAC4* de levedura *K. lactis* nas orientações senso e versão truncada, respectivamente, bem como o plasmídeo pPIC9 (controle), foram usados para transformar *P. pastoris* GS115 (His<sup>-</sup> e Mut<sup>+</sup>). Na tentativa de direcionar a integração do gene *LAC4*

no genoma da estirpe hospedeira, todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do “*Pichia* Expression Kit” (INVITROGEN). O isolamento do DNA plasmidial dos clones e do vetor foi feito em grande escala, conforme descrito anteriormente. Os plasmídeos purificados foram hidrolisados com a enzima de restrição *SacI*, sítio único localizado na seqüência do promotor *AOX1*, e dessalinizados com o “Kit Prep-A-Gene” (BIORAD), conforme descrito anteriormente. A linearização dos plasmídeos com a enzima de restrição *SacI* direciona o evento de integração do DNA recombinante, com um único “crossing over” entre o locus *AOX1* no cromossomo e o promotor *AOX1* no vetor, gerando transformantes fenotipicamente com alta velocidade de crescimento em metanol, uma vez que mantém o gene *AOX1* endógeno intacto. Assim, o fenótipo dos transformantes é o mesmo da estirpe parental (Mut<sup>+</sup>).

### **3.3.2. Preparo de células competentes de *Pichia pastoris***

As células competentes da estirpe *Pichia pastoris* GS115 foram preparadas conforme recomendações do “*Pichia* Expression Kit” (INVITROGEN). A estirpe utilizada GS115 foi cultivada primeiramente em 5 mL de meio YPD (extrato de levedura 10g/L, peptona 20 g/L e dextrose 20 g/L) a 30 °C, por 12 horas. Após este período, aproximadamente 500 mL de meio YPD foram inoculados com 5 mL de meio saturado, incubados a 30 °C, sob agitação de 250 rpm, até  $A_{600}$  entre 1,3 e 1,5. As células foram coletadas por centrifugação a 1.500 *g*, a 4 °C, por 5 minutos. Em seguida, lavadas com 500 mL e 250 mL de água destilada gelada estéril, por centrifugação a 1.500 *g*, por 5 minutos, a 4 °C. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 20 mL de sorbitol 1 mol/L, a 4 °C, estéril, novamente coletadas por centrifugação a 1500 *g*, por 5 minutos, a 4 °C, e concentradas em 1,5 mL de sorbitol 1 mol/L a 4 °C, estéril. As células competentes assim preparadas foram imediatamente transformadas, uma vez que experiências anteriores mostraram que a estocagem a – 80 °C, embora sugerida pelo fabricante, resultou em baixa eficiência de transformação.

### **3.3.3. Transformação de *Pichia pastoris***

Os clones e o vetor pPIC9 linearizado foram inseridos na *Pichia pastoris* GS115 por eletroporação, conforme recomendações do “*Pichia* Expression Kit” com pequenas modificações. Em cubeta de 0,2 cm (BIORAD), foram misturados 80 µL de células competentes e 5 µg de DNA linearizado com a enzima de restrição *SacI*. A cubeta foi mantida em gelo por 5 minutos e, em seguida, 320 µL de sorbitol 1 mol/L, a 4 °C, estéril, foram adicionados. A eletroporação foi conduzida em eletroporador “GenePulser” (BIORAD), onde foi aplicado um pulso de 1.500 V, a uma capacitância de 25 µF e resistência de 400 Ω, conforme descrito no catálogo do fabricante. Após a eletroporação, as células foram plaqueadas em meio sólido MD (YNB 13,4 g/L, biotina 4 x 10<sup>-4</sup> g/L e dextrose 20 g/L). As placas permaneceram a 30 °C até o aparecimento de colônias isoladas de *Pichia pastoris*.

### **3.3.4. Análise da presença da região codificadora do gene *LAC4* no genoma de *Pichia pastoris***

#### **3.3.4.1. Isolamento do DNA genômico de *Pichia pastoris***

O isolamento do DNA genômico transformantes foi conduzido conforme as instruções do “*Pichia* Expression Kit” (INVITROGEN).

As colônias transformantes foram inoculadas em 10 mL do meio MGY (YNB 13,4 g/L, glicerol 10 g/L, biotina 4 X 10<sup>-4</sup> g/L), incubadas a 30 °C, sob agitação de 250 rpm, até A<sub>600</sub> de 5 a 10. As células foram coletadas e lavadas em 10 mL de água estéril por centrifugação a 1,500 g, por 5 minutos, à temperatura ambiente, e ressuspensas em tampão SCED (sorbitol 1 mol/L, citrato de sódio 0,01 mol/L, pH 7,5, EDTA 0,01 mol/L, DTT 0,01 mol/L) recém-preparado. Em seguida, foi adicionada à suspensão 0,1 a 0,3 mg de liticase; a mistura foi incubada a 37 °C, por 50 minutos, para a formação de esferoplastos. Após o período de incubação, foram adicionados 2 mL de SDS 10 g/L, e a mistura foi levemente agitada por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de acetato de potássio 5 mol/L, pH 8,9, e gentilmente misturado. O sobrenadante foi recuperado por centrifugação a 10.000 g, por 10

minutos, a 4 °C. Em seguida, o DNA foi sedimentado com etanol concentração final 70% (v/v) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi recuperado por centrifugação a 10.000 g, por 20 minutos, a 4 °C, e ressuspensão em 0,7 mL de tampão TE (Tris-HCl 0,01 mol/L, pH 7,4, EDTA 0,001 mol/L, pH 8,0). O DNA foi extraído com um volume igual de fenol/clorofórmio (1:1 v/v), seguido de clorofórmio/álcool isoamil (24:1 v/v) e sedimentado com etanol concentração final 70% (v/v), acetato de amônio 7,5 mol/L, pH 7,5, a -20 °C, por 1 hora. O DNA foi novamente recuperado por centrifugação a 10.000 g, por 20 minutos, a 4 °C, lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) e ressuspensão em 50 µL de tampão TE.

### **3.3.4.2. Análise de colônias transformantes por “PCR”**

A seleção inicial das leveduras transformantes foi feita pela capacidade de crescimento na ausência de histidina no meio de cultura e confirmada pela detecção da presença do *LAC4* no genoma da *Pichia pastoris* por “PCR”.

A integração do *LAC4* (senso) e *LAC4-NH<sub>2</sub>* (truncado) no genoma de *Pichia pastoris* GS115 foi confirmada por meio da técnica de “PCR”. Para amplificação de *LAC4*, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos, LAC4AF e LAC4AR, previamente utilizados na obtenção do gene *LAC4* do pLAC4-12 e, no caso do gene truncado *LAC4-NH<sub>2</sub>*, foram utilizados o oligonucleotídeo LAC4AF e o oligonucleotídeo reverso 3'AOX1 (5' GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC 3'), que anela no vetor (INVITROGEN). Aproximadamente 1 µg de DNA genômico de leveduras foi adicionado à reação-padrão em um volume total de 25 µL, usando 1U de *Taq* DNA polimerase e seguindo o mesmo programa de “PCR” já descrito na obtenção do gene *LAC4*. Após amplificação, o fragmento de interesse foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% TAE, contendo brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

## **3.4. Análise da Atividade de β- galactosidase em Transformantes**

## de *Pichia pastoris*

### 3.4.1. Indução da proteína heteróloga e amostragem

Leveduras transformantes positivas foram cultivadas a 30 °C, individualmente, em 250 mL do meio MGY, sob agitação de 250 rpm, até atingir  $A_{600}$  entre 2 e 6 (aproximadamente de 16 h a 18 h). As células foram coletadas por centrifugação de 1.500 g, por 5 minutos, à temperatura ambiente, e ressuspensas em 100 a 200 mL do meio MM (YNB 13,4 g/L, biotina  $4 \times 10^{-4}$  g/L, metanol 0,5%) para iniciar a indução da expressão do gene heterólogo. A cada 24 horas, a cultura era suplementada com metanol para atingir uma concentração final de 5 %, mantendo assim a indução. Amostras da cultura foram coletadas após 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72 ou 84 horas, por centrifugação a 16.000 g, por 2 a 3 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante (proteínas extracelulares) e o sedimento de células (proteínas intracelulares) foram analisados quanto à atividade de  $\beta$ -galactosidase.

O sobrenadante foi recolhido (fração extracelular) e estocado a - 80°C. O sedimento de células coletados durante a indução da cultura de *P. pastoris* recombinante foi ressuspenso em 500  $\mu$ L de tampão SCED (sorbitol 1 mol/L, citrato de sódio 0,01 mol/L, pH 7,5, EDTA 0,01 mol/L, DTT 0,01 mol/L) recém-preparado. Em seguida, 0,3 mg da enzima liticase foi adicionado e a suspensão celular foi incubada a 37 °C, por 1 hora. Após a incubação, 1/10 do volume de Triton X100 foi adicionado e as células sonicadas (três pulsos de 15 segundos).

### 3.4.2. Análise da atividade de $\beta$ -galactosidase

A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada espectrofotometricamente no sobrenadante e em sedimento das culturas de células induzidas, conforme descrito por DICKSON e MARTIN (1980). Resumidamente, as amostras do sedimento celular foram ressuspensas em 1mL de tampão Z sem  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,06 mol/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,04 mol/L, HCl 0,01 mol/L,  $\text{MgSO}_4$  0,001 mol/L, pH 7,0). Em um volume de 500  $\mu$ L das amostras ressuspensas, foram adicionados 100  $\mu$ L de SDS 10 g/L, 100  $\mu$ L de clorofórmio, mantido sob agitação por 1 minuto. A reação foi iniciada pela

adição de 400  $\mu\text{L}$  do substrato cromogênico ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo), 4 mg/L em 100  $\mu\text{L}$  da mistura acima (fração intracelular) e em 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante (fração extracelular). Após 30 minutos, à temperatura ambiente, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 mol/L. Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420 nm. O produto da reação ONP (o-nitrofenol) foi quantificado, convertendo a absorvância a 420 nm em  $\mu\text{mol}$  de ONP de acordo com uma curva-padrão. Uma unidade de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi definida com  $\mu\text{moles/L}$  de ONP liberados por minuto de reação.

As concentrações das proteínas das frações celulares foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976), usando BSA (albumina de soro bovina) como padrão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

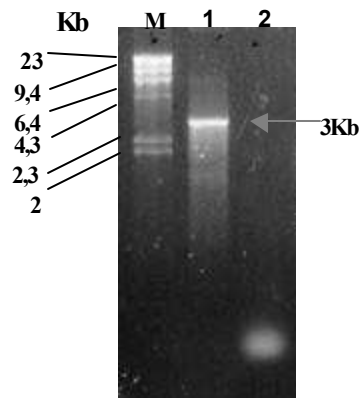
### 4.1. Obtenção e Clonagem da Região Codificadora dos Genes *LAC4* e *LAC4-NH<sub>2</sub>* no Vetor de Expressão e Secreção pPIC9 de *P. pastoris*

O gene *LAC4* codifica  $\beta$ -galactosidase em *Kluyveromyces lactis*, a enzima chave do metabolismo de lactose. O gene foi pela primeira vez localizado e clonado juntamente com o gene *LAC12* (lactose permease) no plasmídeo pLAC4-12 por SREEKRISHNA e DICKSON (1985).

A Figura 3 mostra o perfil obtido após amplificação por PCR da região codificadora do gene *LAC4*, a partir do pLAC4-12, indicando a posição esperada para o fragmento correspondente ao gene *LAC4*. O gene *LAC4* de levedura *Kluyveromyces lactis* possui entre 3,2 e 3,3 Kb (BREUNING et al., 1984; DICKSON e RILEY, 1989).

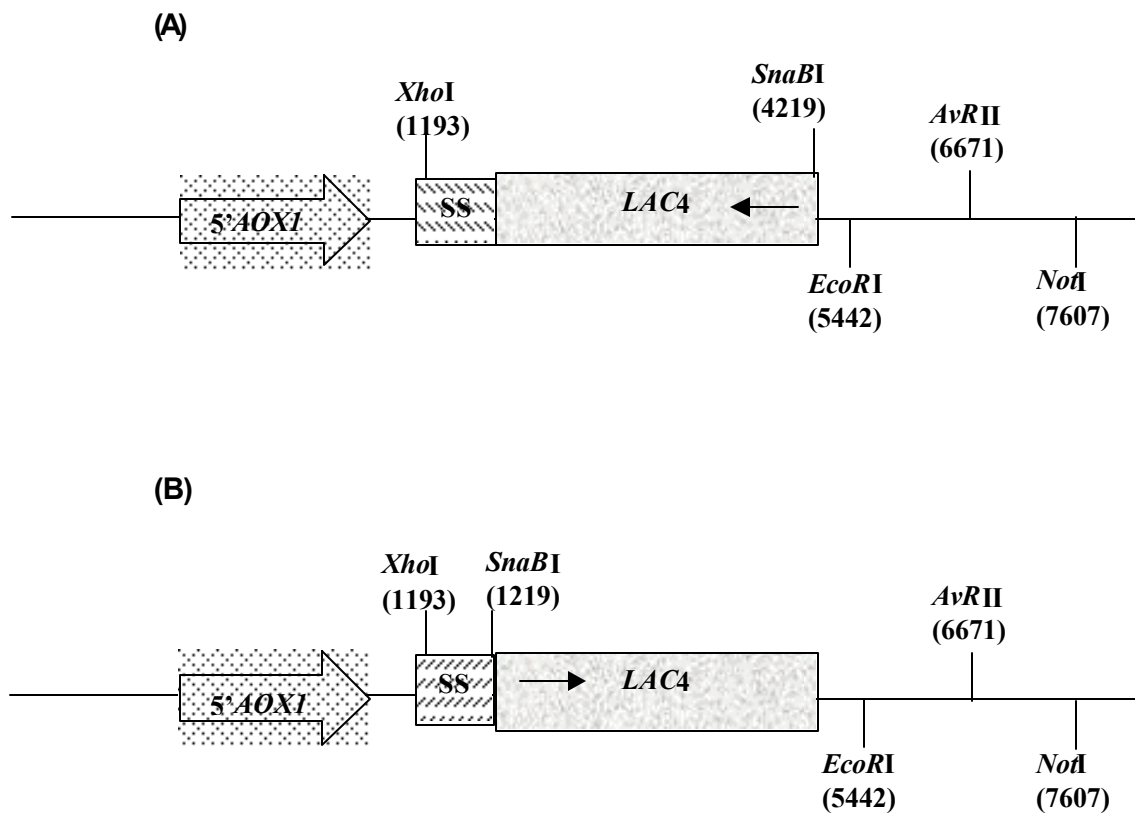
A enzima *Pfu* DNA polimerase utilizada na reação de PCR, ao contrário da enzima *Taq* DNA polimerase, apresenta uma baixa taxa de erro, uma alta fidelidade de amplificação e gera fragmentos de PCR com extremidades abruptas. Esta característica, aliada ao fato de que o produto de PCR a ser clonado possui cadeia longa, como a seqüência *LAC4*, dificulta a clonagem. Nestes casos, experiências recomendam a remoção do fragmento do plasmídeo com endonucleases de restrição. Entretanto, não foi possível a obtenção da região codificadora do gene *LAC4* intacto, utilizando endonucleases de restrição. Nenhum sítio de clivagem que removesse

exclusivamente o *LAC4* foi detectado na análise computacional da seqüência (banco de dados – WEB CUTTER). Apesar dessa limitação, várias tentativas foram feitas para que a clonagem da região codificadora do gene *LAC4* no vetor pPIC9 do sistema de expressão e secreção da *Pichia pastoris* fosse bem sucedida.



**Figura 3** - Amplificação do fragmento do gene *LAC4* (pLAC4-12). 10  $\mu$ L de uma reação de 100  $\mu$ L foram adicionados em gel de agarose 1% TAE contendo brometo de etídeo. Linha 1 contém o produto de PCR do gene *LAC4* ( $\cong$  3.000 pb). O “PCR” foi feito usando “primers” LAC4AF e LAC4AR. A linha 2 contém a reação controle “PCR”, sem o DNA molde. A linha M contém o marcador de tamanho DNA fago lambda *HindIII* (PROMEGA).

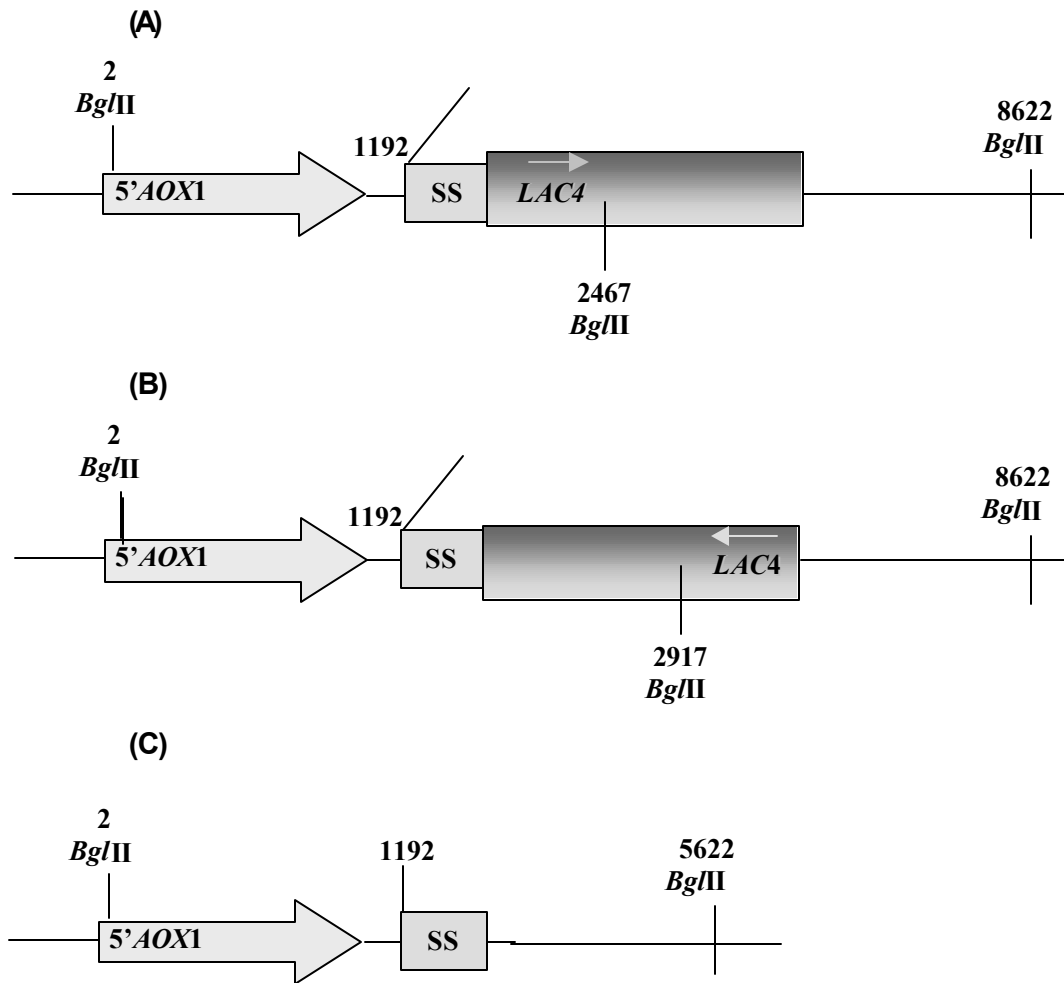
A clonagem da região codificadora intacta do gene *LAC4* no vetor de expressão e secreção pPIC9 possibilitaria a obtenção de duas construções (Figura 4): a inserção da região codificadora do gene intacto de *LAC4*, no referido vetor de expressão e secreção, resultando no clone pL1AS, na orientação anti-senso (Figura 4A), e no clone pL1S na orientação senso (Figura 4B).



**Figura 4** - Diagrama das construções de *LAC4* no vetor pPIC9 usadas na transformação de *E. coli* JM109. A região codificadora do gene *LAC4* intacto da levedura *Kluyveromyces lactis* nas orientações anti-senso (A), senso (B) estão sob controle do promotor regulado e induzido AOX1 e do sinal de secreção fator- $\alpha$  (SS). A posição de alguns sítios de enzimas de restrição no vetor original está indicada.



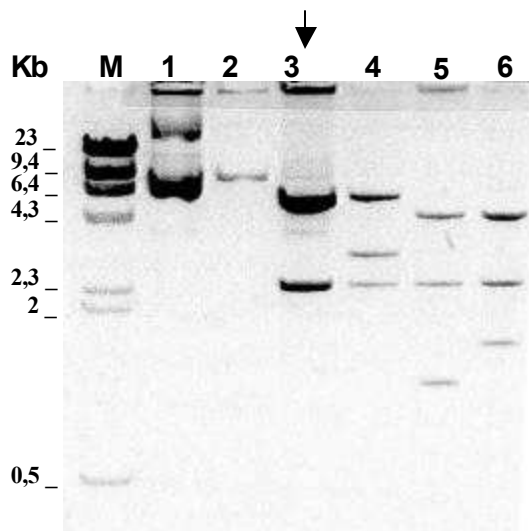
A clonagem do fragmento *LAC4* intacto pode ser verificada pelo padrão de clivagem sugerido nas Figuras 5 e 6. A região codificadora do gene *LAC4* possui um único sítio da enzima de restrição *Bgl*III na posição 1.275 e dois sítios no vetor plasmidial pPIC9 nas posições 2 e 5.622 e, assim, produz o padrão de clivagem analisado na orientação senso e anti-senso observados nas Figuras 5A e 5B, respectivamente.



**Figura 5** - Diagrama do padrão de restrição esperado do clone contendo a região codificadora do gene *LAC4* íntegro. A região codificadora do gene *LAC4* de *K. lactis* usado para a clonagem no vetor de expressão e secreção pPIC9 orientações senso (A) (2380pb, 2465pb, 6155pb) e anti-senso (B) (2380pb, 2915pb, 5705pb) está sob controle do promotor regulado e induzido AOX1 e do sinal de secreção fator- $\alpha$  (SS); (C) vetor pPIC9 (8000pb).

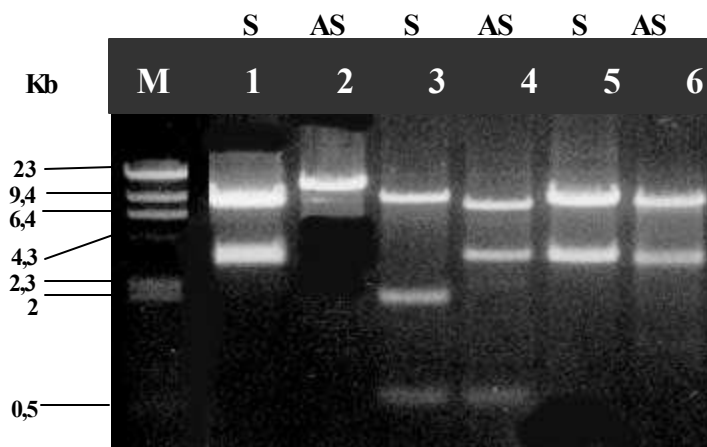
Foram analisadas 25 amostras de DNA plasmidial dos clones recombinantes. Das amostras analisadas hidrolisadas com a enzima *Bgl*I, nenhuma continha a região codificadora do gene *LAC4* na orientação correta e a maioria continha o *LAC4* clonado na orientação anti-senso. É possível que a dificuldade de obter transformantes contendo o *LAC4* na orientação senso esteja relacionada com o fato de o inserto e vetor conterem extremidades abruptas e, talvez, à existência de uma certa homologia entre a seqüência do fragmento com o vetor, favorecendo a posição anti-senso (Figura 6, linha 4). Outra dificuldade está relacionada com o tamanho do fragmento, pois tem sido demonstrado que produtos de PCR contendo grande número de pares de bases e com extremidades abruptas reduzem a eficiência da reação de ligação do fragmento no vetor.

O conveniente seria, inicialmente, clonar o produto de PCR no vetor pUC criando qualquer sítio de restrição nas extremidades da seqüência a ser clonada, porém isto não foi possível, uma vez que a inserção destes sítios de restrição resultaria em uma clonagem, no vetor de expressão e secreção pPIC9 fora de fase.



**Figura 6** - Padrão de restrição dos clones em bactéria contendo a região codificadora *LAC4* intacta no vetor pPIC9 resolvido em gel de agarose 1%. Linha M contém o marcador de tamanho DNA fago lambda *HindIII* (PROMEGA); linha 1 - pPIC9 não hidrolisado; linha 2 - pPIC9/*SnaBI*; linha 3 - pPIC9/*BglII*, linha 4 (seta) corresponde a pL1AS hidrolisado com *BglII* (2380pb, 2915pb, 5705pb); linhas 5 e 6 correspondem a transformantes negativos hidrolisado com *BglII*.

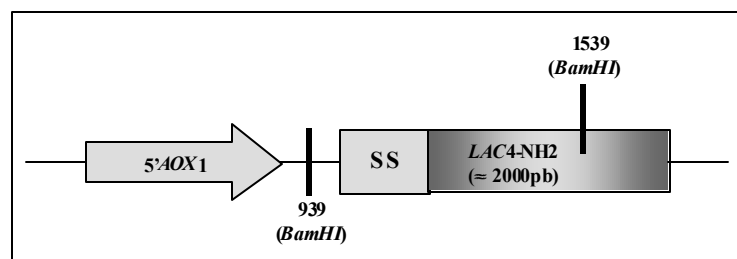
Com a finalidade de aumentar a eficiência de clonagem da região codificadora do gene *LAC4* no vetor pPIC9 de forma a possibilitar a obtenção do clone na orientação senso, o fragmento de interesse foi liberado do clone pL1AS com as enzimas de restrição *XhoI* e *SnaBI* e tratado com T<sub>4</sub> DNA polimerase. O fragmento de DNA resultante foi subclonado no vetor de expressão e secreção pPIC9. Embora maior eficiência de clonagem na orientação incorreta tenha persistido com esta estratégia, pelo menos 25% dos DNAs recombinantes obtidos continham a região codificadora do gene *LAC4* na orientação senso. De fato, o clone pL1S, contendo o *LAC4* na orientação senso, foi diagnosticado pelo perfil de hidrólise com as enzimas de restrição *SnaBI* e *NotI* (Figura 7, linha 1), além da hidrólise com a enzima de restrição *KpnI* (linha3). O seqüenciamento parcial do clone pL1S confirmou a orientação correta da região codificadora do gene *LAC4* fundida em fase com o sinal de secreção do fator- $\alpha$  (dados não mostrados).



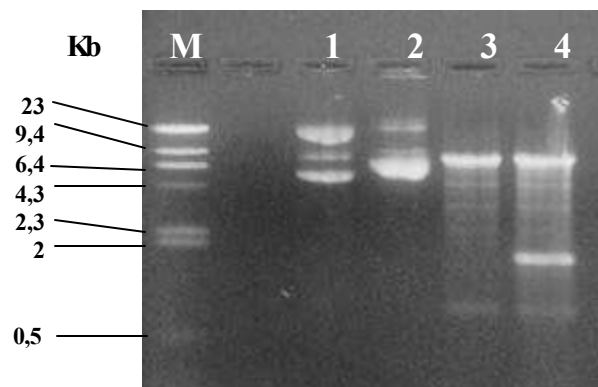
**Figura 7** - Padrão de restrição dos clones em bactéria contendo o *LAC4* intacto no vetor pPIC9 resolvido em gel de agarose 1%. Linha M contém o marcador de tamanho DNA fago lambda *HindIII* (PROMEGA). Orientação senso (S) e anti-senso (AS). Cada linha corresponde a 20  $\mu$ L da reação de hidrólise dos clones pL1S/*SnaBI* e *NotI* (1); pL1AS/*SnaBI* e *NotI* (2); pL1S/*KpnI* (8615pb, 1773pb, 612pb) (3); pL1AS/*KpnI* (7161pb, 3227pb, 612pb) (4); pL1S/*XhoI* e *NotI* (5); pL1AS/*XhoI* e *NotI* (6).

Para a produção de uma versão truncada da proteína, um fragmento de 2.000 pb que codifica a região codificadora da proteína e contém o sítio catalítico da enzima foi liberado de pL1S com *Sna*BI e *Not*I, digerido com *Eco*RI e subclonado no vetor pPIC9, resultando no clone pL2S. Uma vez que o sítio *Sna*BI foi criado por PCR imediatamente adjacente ao códon de iniciação e o sítio *Eco*RI posiciona-se internamente no fragmento *LAC4* (Figura 1), esta estratégia direcionou a clonagem do fragmento truncado (*LAC4-NH*<sub>2</sub>) na orientação senso (Figura 8A). De fato, a hidrólise do DNA plasmidial dos transformantes com a enzima de restrição *Bam*HI confirmou o perfil eletroforético de bandas correspondentes ao clone na orientação senso (Figura 8B). A expectativa de produzir uma versão truncada da enzima β-galactosidase estava em verificar se, ao diminuir seu tamanho, a célula hospedeira poderia secretar mais facilmente a proteína, e também em tentar encontrar o *core* desta enzima cataliticamente ativo.

(A)



(B)



**Figura 8** - Diagrama (A) e padrão de restrição em gel de eletroforese (B) do clone pL2S contendo o *LAC4-NH<sub>2</sub>* no vetor pPIC9. Linha M contém o marcador de tamanho DNA fago lambda *HindIII* (PROMEGA); vetor pPIC9 não hidrolisado (1); pL2S não hidrolisado (2); pPIC9 hidrolisado com *BamHI* (3); pL2S hidrolisado com *BamHI* (4) (fragmentos de aproximadamente 8018 pb e 1792 pb).

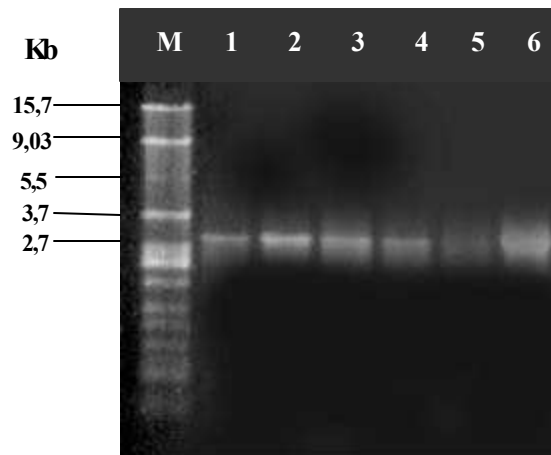
#### 4.2. Integração da Região Codificadora dos Genes *LAC4* e *LAC4-NH<sub>2</sub>* no Genoma de Levedura *Pichia pastoris*

Após a confirmação das construções positivas em bactéria, o DNA plasmidial de cada construção e o vetor sem inserto pPIC9 foram extraídos e hidrolisados com a enzima *SacI* e, em seguida, usados para transformar células eletrocompetentes de *P. pastoris*, linhagem GS115 (Mut<sup>+</sup> e His<sup>-</sup>). A obtenção de transformantes demonstra que a integração ocorreu, uma vez que o fenótipo His foi restabelecido, já que a replicação autônoma do vetor linearizado, se religado, não seria possível devida à ausência de origem de replicação no vetor da *Pichia*.

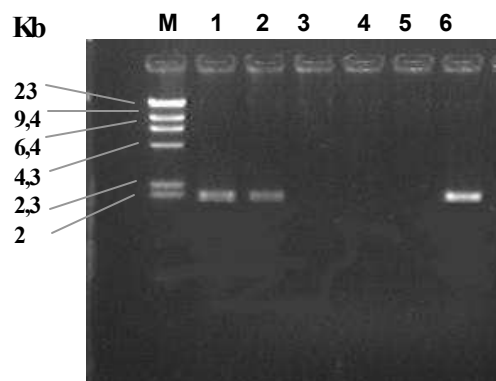
A enzima de restrição *SacI* hidrolisou os clones na região promotora 5' *AOX1*, favorecendo a integração do DNA transformado na região *AOX1* genômico. A inserção ocorreu por recombinação homóloga entre a região 5' do promotor *AOX1* e uma região 3' terminadora homóloga, comuns no plasmídeo e no genoma de *P. pastoris*. A integração pela linearização do vetor com a enzima *SacI* orientou a integração por único "crossing over" no locus *AOX1* cromossomal (CLARE et al., 1991). Assim, o gene *AOX1*, responsável pela utilização de metanol, permanece intacto e a linhagem é fenotipicamente Mut<sup>+</sup> (CLARE et al., 1991; ROMANOS, 1995). A inserção do cassete de expressão no genoma de *P. pastoris* obtido neste trabalho restaurou o *his4* mutado e manteve o gene *AOX1* do genoma da levedura, produzindo assim recombinantes com alta velocidade de crescimento em metanol, isto é, a linhagem *P. pastoris* GS115 transformante possui o fenótipo His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup>.

Uma amostra de 5 colônias transformantes de *P. pastoris* obtidas com os clones pL1S (*LAC4* intacto) e pL2S (*LAC4* truncado) foi submetida à análise por PCR. A Figura 9 mostra o perfil obtido após amplificação de um fragmento de tamanho aproximado de 3.000 pb do DNA genômico dos transformantes contendo a região codificadora do gene *LAC4* intacto, enquanto a Figura 10 mostra o perfil da amplificação de um fragmento de aproximadamente 2.000 pb do DNA genômico dos transformantes contendo a região codificadora *LAC4-NH<sub>2</sub>* (truncada). A transformação estável de *P. pastoris* com os clones pL1S e pL2S foi também confirmada por "Dot Blot" de DNA genômico de dezenas de transformantes, usando uma sonda não-radioativa obtida pela liberação de um

fragmento de 1.800 pb com as enzimas *XhoI* e *EcoRI* do clone pL2S (dado não mostrado).



**Figura 9** - Diagnóstico da integração da região codificadora do gene *LAC4* no genoma de *Pichia pastoris*. O DNA total dos transformantes foi extraído e usado como molde em reação de PCR, usando os oligonucleotídeos iniciadores LAC4AF e LAC4AR, específicos para o gene *LAC4* intacto e que amplificam um fragmento de 3.000 pb. Linha M contém o marcador de tamanho DNA fago lambda *EcoRI/BamHI/HindIII*; linhas 1 a 5 correspondem ao DNA genômico de leveduras transformadas com o gene *LAC4* intacto; linha 6 controle (pL1S).



**Figura 10** - Diagnóstico da integração da região codificadora *LAC4-NH<sub>2</sub>* (truncada) no genoma de *Pichia pastoris*. O DNA total dos transformantes foi extraído e usado como molde em reação de PCR, usando os oligonucleotídeos iniciadores LAC4AF e 3'AOX1 específicos para o gene *LAC4* truncado e que amplificam um fragmento de 2.000 pb. Linha M contém o marcador de tamanho DNA fago lambda *Hind*III (PROMEGA); linhas 1, 2 e 6 correspondem ao DNA genômico de leveduras transformadas com o clone pL2S; linhas 3 e 4 correspondem a transformantes negativos; linha 7 corresponde ao DNA genômico de levedura transformada com o vetor de expressão e secreção pPIC9.

#### 4.3. Atividade de $\beta$ -galactosidase em Transformantes *Pichia pastoris* GS115

Nenhuma colônia de *P. pastoris* GS115 transformante exibiu coloração azul no meio mínimo contendo metanol e 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -galactopiranosídeo (X-gal), conforme observado para o controle positivo *Kluyveromyces lactis* (Lac4<sup>+</sup>) (dado não mostrado). A ausência de hidrólise de X-gal pela *Pichia* recombinante indica ausência de atividade da enzima extracelular, mas não significa ausência de atividade da enzima intracelular, o que poderia ser justificado pela ausência de lactose permease na hospedeira para transportar o substrato cromogênico para hidrólise intracelular.

As atividades de  $\beta$ -galactosidase intra e extracelular de culturas recombinantes foram medidas em vários tempos durante indução por metanol (Figuras 11 e 12). A atividade do meio intracelular foi aproximadamente 10 vezes maior que a do meio extracelular. Essa diferença provavelmente reflete o aumento de densidade populacional e não o aumento do produto cromogênico da hidrólise enzimática, uma vez que a cultura *P. pastoris* GS115 (controle) apresentou o mesmo perfil de atividade que os recombinantes testados. As unidades específicas não tendem a aumentar com o tempo de indução.

O sistema de expressão *P. pastoris* tem sido reconhecido pela alta eficiência na produção de proteínas recombinantes (SREEKRISHNA et al., 1997); entretanto, as amostras tomadas em todos os períodos anteriores e posteriores à adição de metanol não indicaram uma resposta nítida, em termos de atividade intra ou extracelular, que refletisse a indução da expressão. Se a ausência de atividade é devida à falha na transcrição do gene heterólogo ou ao processamento pós-traducional, isso não foi possível estabelecer com os resultados.

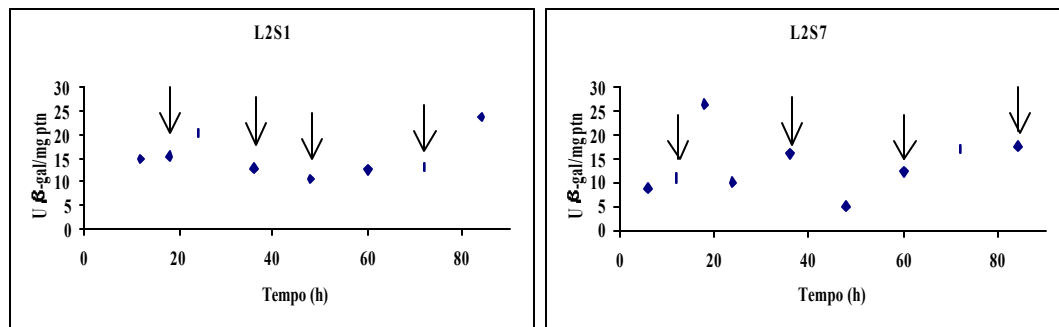
Apesar de a clonagem do gene *lacZ* de *E. coli* em *P. pastoris* ter sido demonstrada, inclusive com alto nível de expressão, o vetor utilizado foi pSAOH5 designado para a expressão intracelular (TSCHOPP et al., 1987). Não está documentado se a clonagem do *lacZ* no vetor de expressão e secreção pPIC9 resultaria na expressão intra ou extracelular de  $\beta$ -galactosidase. É interessante observar que o alto nível de expressão reportado por TSCHOPP et al. (1987) do clone contendo o *lacZ* foi obtido em linhagens *Pichia pastoris*

Mut<sup>S</sup>, que cresce muito lentamente em metanol durante o período de indução.

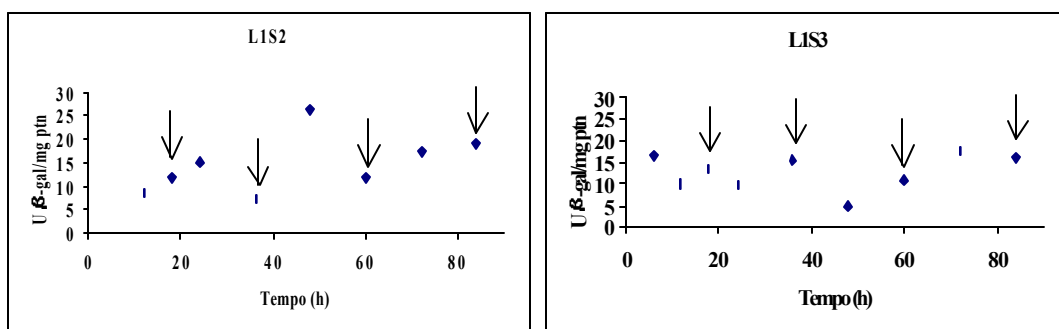
A produção de proteínas heterólogas na linhagem Mut<sup>S</sup> frequentemente resulta em níveis muito superiores às obtidas com a linhagem selvagem (Mut<sup>+</sup>), provavelmente porque a cinética do processo favoreça as reações necessárias ao processamento da proteína, antecedendo ao processo de divisão celular (CEREGHINO e CREEG, 2000). É provável que a clonagem direta da região codificadora do gene *LAC4* no vetor de secreção tenha imposto um trânsito da proteína nascente através da membrana do RE, antes que os eventos necessários para a formação de uma proteína funcional ocorram. Assim sendo, transformar linhagens de *Pichia pastoris* KM71 (Mut<sup>S</sup>) com os clones obtidos neste trabalho constitui uma meta futura. Da mesma forma, clonar a região codificadora do gene *LAC4* nos vetores para a expressão intracelular como pHIL-D2 ou pPIC3.5 e analisar a eficiência de produção da proteína recombinante são alternativas que devem ser consideradas.

Altas concentrações de ubiquitina produzida pela célula hospedeira parecem aumentar a secreção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* (SREEKHISHNA et al., 1997). Estes autores recomendam que clones de ubiquitina sejam co-transformados com os genes heterólogos em quaisquer das espécies produtoras disponíveis.

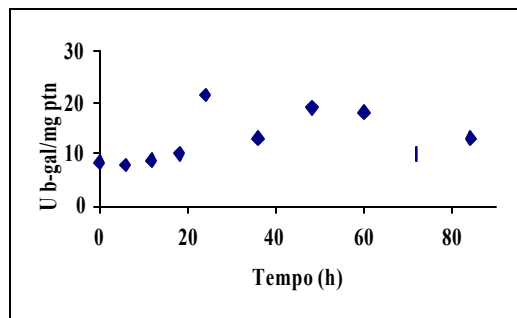
Qualquer sugestão para expressão e secreção de  $\beta$ -galactosidase em *P. pastoris* requer a identificação prévia do ponto crítico responsável pela interrupção do processo de transcrição ou tradução. Assim sendo, qualquer tentativa na busca de sobrepor as dificuldades deve ser precedida por uma análise envolvendo mais técnicas moleculares, tais como mRNA por “Northern blot” ou da proteína por “Western blot”.



(A)

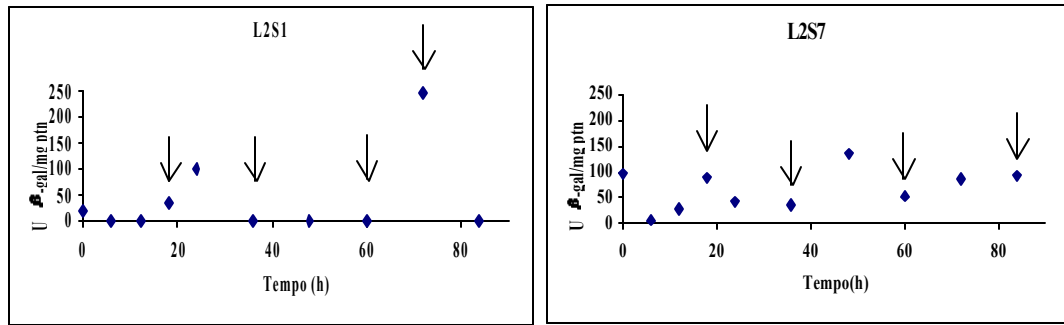


(B)

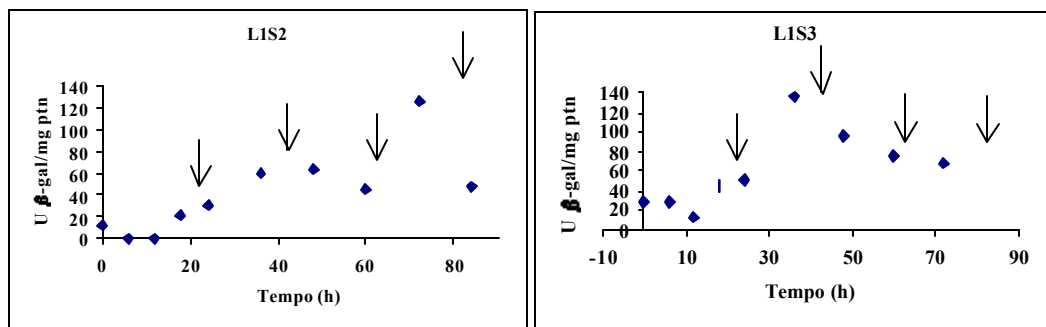


(C)

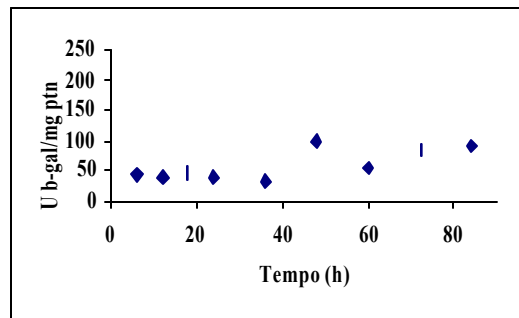
**Figura 11** - Atividade específica de  $\beta$ -galactosidase no extrato celular de transformantes *Pichia pastoris* GS115 contendo os genes *LAC4-NH<sub>2</sub>* (A) e *LAC4* (B) e o controle (C); as setas indicam os tempos de indução pela adição de metanol (18, 36, 54, 72 horas). Os dados são resultados de um único experimento.



(A)



(B)



(C)

**Figura 12** - Atividade específica de  $\beta$ -galactosidase extracelular de transformantes *Pichia pastoris* GS115 contendo os genes *LAC4-NH<sub>2</sub>* (A) e *LAC4* (B) e o controle (C); as setas indicam os tempos de indução pela adição de metanol (18, 36, 54, 72 horas). Os dados são resultados de um único experimento.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

O plasmídeo pLAC4-12 foi utilizado como molde na reação de polimerização em cadeia (PCR) para obtenção do fragmento de aproximadamente 3.000 pb correspondente à região codificadora do gene *LAC4* da levedura *Kluyveromyces lactis*. Com o objetivo de expressar e secretar a  $\beta$ -galactosidase, este fragmento foi clonado em um vetor de expressão e secreção pPIC9 do sistema de expressão de *Pichia pastoris*. Toda população de transformantes positivos mostrou conter o clone na orientação anti-senso, isdado e denominado pL1AS. Devido à dificuldade em se obterem clones na orientação correta, o fragmento de 3.000pb foi liberado de pL1AS com enzimas de restrição e subclonado em pPIC9, resultando no clone na orientação senso denominado pL1S.

A partir do clone pL1S, o fragmento de 3.000 pb foi liberado com *SnaBI* e *NotI*, hidrolisado com a enzima de restrição *EcoRI*. O fragmento de 2.000 pb resultante foi reclonado no vetor pPIC9, originando o clone pL2S (versão truncada) a partir do qual se esperava produzir uma proteína recombinante com atividade de  $\beta$ -galactosidase.

A hidrólise dos clones com as enzimas de restrição apropriadas, confirmou a presença da região codificadora *LAC4* intacta nas orientações anti-senso e senso e da versão truncada no vetor pPIC9. O sequenciamento parcial dos clones confirmou que tanto a região codificadora do gene *LAC4* intacto

quanto o *LAC4-NH<sub>2</sub>* (truncado) foram ligados em fase com a seqüência sinal de secreção do fator- $\alpha$ .

Os plasmídeos recombinantes foram linearizados com a enzima de restrição *SacI* e usados para transformar células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115 (*His<sup>-</sup>* e *Mut<sup>+</sup>*). Colônias recombinantes foram isoladas e as inserções da região codificadora *LAC4* intacta e truncada no genoma da levedura foram confirmadas por “PCR” com iniciadores específicos. Além disso, a análise de “*Dot Blot*” de DNA genômico dos transformantes confirmou a inserção no genoma da hospedeira.

Colônias de *Pichia pastoris* GS115 recombinantes foram cultivadas em glicerol e posteriormente induzidas com metanol. Amostras foram coletadas após 0, 6, 12, 18, 36, 48, 60, 72 ou 84 horas de indução. O meio extracelular e a massa de células foram analisados quanto à atividade de  $\beta$ -galactosidase. Nenhum aumento na atividade de  $\beta$ -galactosidase foi observado tendo o controle como referência. É provável que a divisão celular durante o período de indução, devido à alta velocidade de crescimento da estirpe *Mut<sup>+</sup>* em metanol, tenha impedido o trânsito da proteína nascente através da membrana do RE, sem permitir que eventos necessários para formação de uma proteína funcional ocorressem antes da divisão celular.

Sendo assim, sugere-se que a transformação de linhagens da levedura *Mut<sup>+</sup>* com os clones obtidos, bem como a clonagem da região codificadora do gene *LAC4* nos vetores para expressão intracelular (*pHIL-D2* e *pPIC3,5*) sejam consideradas como alternativas para produção da proteína funcional. Porém, qualquer sugestão deve prever uma investigação sobre o ponto crítico responsável pela interrupção do processo, isto é transcrição, tradução ou pós-tradução.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETO, E. S. Atividade de beta-galactosidase e caracterização de mutantes de *Kluyveromyces lactis* resistentes a geneticina. Viçosa, MG: UFV, 1998. 43p. (dissertação de Mestrado em Microbiologia).
- BECERRA, M., CERDÁN, E., GONZÁLEZ SISO, M. I. Heterologous *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase production and release by *Saccharomyces cerevisiae* osmotic-remedial thermosensitive autolytic mutants. **Biochimica et Biophysica**, 1335:235-241, 1997.
- BECERRA, M., GONZÁLEZ SISO, M. I., CERDÁN, M. E. *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase secretion by *ssc* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. In: **12<sup>th</sup> Meeting on "Biology of Kluyveromyces"**, Rimini (Itália), 1999.
- BONEKAMP, F. J.; OOSTEROM, J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* - a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, 41:1-3, 1994.
- BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.
- BREUNIG, K. D.; DAHLEMS, U.; DAS, S.; HOLLENBERG, C. P. Analysis of a eukaryotic  $\beta$ -galactosidase gene: the N-terminal end of the yeast *Kluyveromyces lactis* protein shows homology to the *Escherichia coli lacZ* gene product. **Nucleic Acids Research**, 12(5): 2327-2341, 1984.
- BUCKHOLZ, R.; GLEESON, M. A. G. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins (Review). **BioTechnology**, 9:1067-1072, 1991.

- CEREGHINO, J. L., CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Review**, 24(1):45-66, 2000.
- CLARE, J. J., RAYMENT, F. B., BALLANTINE, S. P., SREEKRISHNA, K. ROMANOS, M. A. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. **Bio/Technology**, 9:455-460, 1991.
- CONTIM, L. A. S. Expressão heteróloga do gene *s-64* de soja (*Glycine max* (L) Merrill) em leveduras (*Pichia pastoris*): modificação pós-traducional da proteína recombinante. Viçosa: UFV, 1999. (Dissertação).
- CREGG, J. M., TSCHOPP, J. F., STILLMAN, C. High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Bio/Tecnology**, 5:479-485, 1987.
- CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* (Review). **Bio/Technology**, 11:905-910, 1993.
- CZYZ, M.; NAGIEC, M. M.; DICKSON, R. C.; Autoregulation of GAL4 transcription is essential for rapid growth of *Kluyveromyces lactis* on lactose and galactose. **Nucleic Acids Research**, 21(18):4378-4382, 1993.
- DAS, R. C., SHULTZ, J. L., LEHMAN, D. J.  $\alpha$ -Factor leader sequence-directed transport of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genetic**, 218:240-248, 1989.
- DICKSON, R. C., DICKSON, L. R., MARKIN, J. S. Purification and properties of on inducible  $\beta$ -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**, 51-61, 1979.
- DICKSON, R. C., MARTIN, J. S. Molecular cloning and expression in *E. coli* of a yeast gene coding for  $\beta$ -galactosidase. **Cell**, 15:123-130, 1978.
- DICKSON, R. C., MARTIN, J. S. Physiological studies of  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Bacteriology**, 777-785, 1980.
- DICKSON, R. C., RILEY, M. I. The lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*. **Yeast Genetic Engineering Butterworth**, Boston 19-40, 1989.
- FABER, K. N., HARDER, W., AB, G., VEENHUIS, M. Review: Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. **Yeast**, 11:1331-1344, 1995.
- FOWLER, A. V., ZABIN, I. Amino acid sequence of  $\beta$ -galactosidase. **The Journal of Biological Chemistry**, 253(15):5521-5525, 1978.

- GELLISSEN, G.; HOLLENBERG, C. P. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review. **Gene**, 190:87-97, 1997.
- HADFIELD, C., RAINA, K. K., SHASHI-MENON, K., MOUNT, R. C. The expression and performance of cloned genes in yeast. **Mycological Research**, 97(8):897-944, 1993.
- HALBAN, P. A., IRMINGER, J-C. Sorting and processing of secretory proteins. **Biochemistry Journal**, 299, 1-18, 1994.
- HARTL, F. V. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, 381:571-580, 1996.
- HILLER, M. M., FINGER, A., SCHWEIGER, M., WOLF, D. H. ER degradation of misfolded luminal proteins by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. **Science**, 273:1725-1728, 1996.
- HOLKERI, H., MAKROW, M. Different degradation pathways for heterologous glycoproteins in yeast. **FEBS Letter**, 429:162-166, 1998.
- HURTLEY, S. M., BOLE, D. G., HOOVER-LITTY, H., HELENIUS, A., COPELAND, C. S. Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein BiP. **Journal Cell Biology**, 108:2127-2136, 1989.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. Transformation "ultra-competent" *E. coli*. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, 96:23-28, 1990.
- INAHORA-OCHIAI, M.; NAKAYAMA, T.; NAKAO, M.; FUJITA, T.; UEDA, T.; ASHIKARI, T.; NISHINO, T.; SHIBANO, Y. Unique primary structure of a thermostable multimetal  $\beta$ -galactosidase from *Saccharopolyspora rectivirgula*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1388:77-83, 1998.
- JACOBSON, R. H., ZHANG, X-J., DuBOSE, R. F., MATTHEWS, B. W. Three-dimensional structure of  $\beta$ -galactosidase from *E. coli*. **Nature**, 369:761-766, 1994.
- JENKINS, N., PAREKH, R. B., JAMES, D. C. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. **Nature Biotechnology**, 14:975-981, 1996.
- KATAKURA, Y.; ZHANG, W.; ZHUANG, G.; OMASA, T.; KISHIMOTO, M.; GOTO, Y.; SUGA, K-I. Effect of methanol concentration on the production of human  $\beta_2$ -glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 86(5):482-487, 1998.

- KULIKOVA, A. K.; GOMARTELI, M. M.; TSERETELI, A. K.; BEZBORODOV, A. M.; KVESITADZE, G. I.; BILAI, T. I.  $\beta$ -galactosidase of lower eukaryotes (fungi and yeasts) (review)1990.
- LAL,S. K.; TULASIRAM, P.; JAMEEL, S. Expression and characterization of the hepatitis E virus ORF3 protein in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Gene**, 190:63-67, 1997.
- MODLER, H. W.; GELDA, A.; YAGUCHI, M.; GELDA, S. Production of fluid milk with a high degree of lactose hydrolysis. **Bulletin of the IDF** 289:57-61, 1993.
- MONTESINO, R., GARCÍA, R., QUINTERO, O., CREMATA, J. A. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 14:197-207, 1998.
- POCH, O.; L'HÔTE H.; DALLERY, V.; DEBEAUX, F.; FLEER, R.; SODOYER, R. Sequence of the *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase: comparison with procaryotic enzymes and secondary structure analysis. **Gene**, 118:55-63, 1992.
- RICHMOND, M. L.; GRAY, J. I.; STINE, M. Beta-galactosidase: Review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. **Journal Dairy Science**, 64:759-1771, 1981.
- ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene in expression. **Current Opinion in Biotechnology**, 6:527-533, 1995.
- ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, 8:423-488, 1992.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T., FRISTSCH, E. F. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SHEETZ, R. M.; DICKSON, R. C. LAC4 is the structural gene for  $\beta$ -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. **Genetics**, 98:729-745, 1981.
- SMITH, R. A.; DUNCAN, M. J.; MOIR, D. T. Heterologous protein secretion from yeast. **Science**, 229:1219-1224, 1985.
- SOMKUTI, G. A.; HOLSINGER, V. H. Microbial technologies in the production of low-lactose dairy foods. **Food Science and Technology International**, 3:163-169, 1997.

- SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R. G.; KROPP, K. E.; BLANKENSHIP, D. T.; TSAY, J.-T.; SMITH, P. L.; WIERSCHKE, J. D.; SUBRAMANIAM, A.; BIRKENBERGER, L. A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, 190:55-62, 1997.
- SREEKRISHNA, K.; DICKSON, R. C. Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. **Proc. Natl. Science**, 82:7909-7913, 1985.
- SREEKRISHNA, K.; WEBSTER, T. D.; DICKSON, R. C. Transformation of *Kluyveromyces lactis* with the kanamycin (G418) resistance gene of Tn903. **Gene**, 28:73-81, 1984.
- STEVENSON, D. E., STANLEY, R. A., FURNEAUX, R. H. Optimization of alkyl  $\beta$ -D-galactopyranoside synthesis from lactose using commercially available  $\beta$ -galactosidases. **Biotechnology and Bioengineering**, 42:657-666, 1993.
- TSCHOPP, J. F., BRUST, P. F., CREGG, J. M., STILLMAN, C. A., GINGERAS, T. R. Expression of *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Research**, 15:3859-3876, 1987
- VANONI, M., PORRO, D., MARTEGANI, E., ALBERGHINA, L. Secretion of *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae* using the signal sequence from the glucoamylase-encoding *STA2* gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 164(3):1221-1338, 1989.
- WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for the food sciences. **Food science and technology**, 2<sup>nd</sup> ed., 1994.