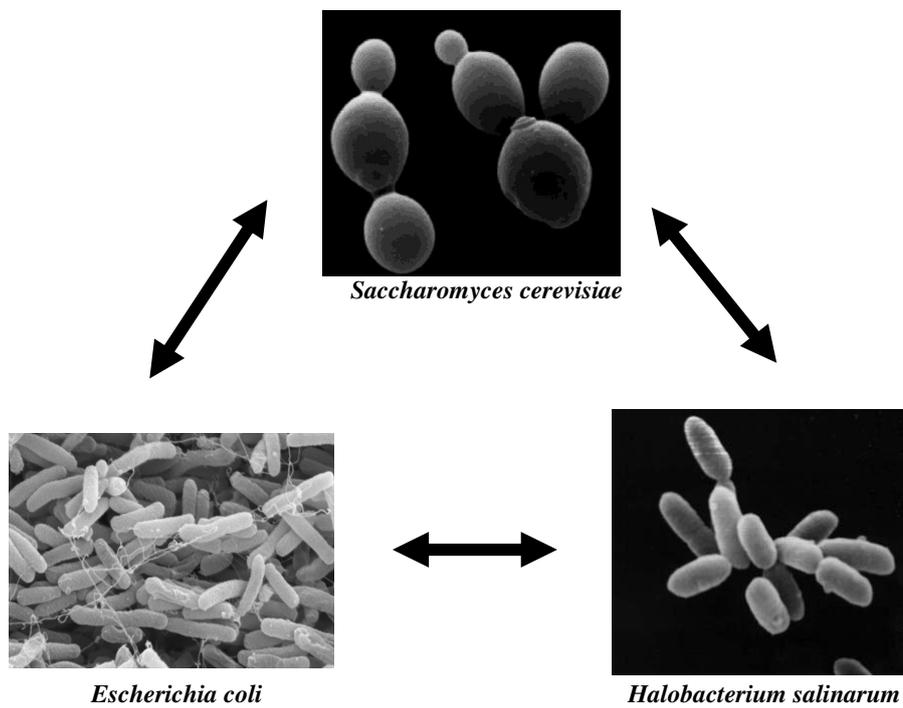


Ana Raquel de Souza Monteiro

Uso de *Saccharomyces cerevisiae* para estudo de organismos procariotos.



Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Uso de *Saccharomyces cerevisiae* para estudo de organismos procariotos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mônica Bucciarelli Rodriguez

Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2006

Índice

Agradecimentos	5
Resumo	8
Abstract	10
1. Introdução	12
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no estudo de outros organismos	13
1.2 Interesse em caracterização de novos promotores	16
1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de tolerância a sal	17
1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no estudo de organismos procariotos	18
2. Objetivos	20
3. Material e Métodos	22
3.1 Microrganismos	23
3.1.1 Linhagens Bacterianas	23
3.1.2 Linhagem de Archaea	23
3.1.3 Linhagem de levedura	23
3.2 Cultivo de microrganismos	23
3.2.1 Meios de cultura bacteriana	23
3.2.2 Antibióticos	25
3.2.3 Meios para cultura de leveduras	25
3.2.4 Meio para cultura de <i>Halobacterium salinarum</i>	26
3.3 Métodos	27
3.3.1 Contagem de células de levedura	27
3.3.2 Transformação de microrganismos	27
3.3.2.1 Preparação de leveduras competentes e transformação	27
3.3.2.2 Preparação de bactérias eletrocompetentes	28
3.3.2.3 Transformação de bactérias	28
3.3.3 Extração de DNA	29
3.3.3.1 Extração de DNA plasmidiano de bactéria por lise alcalina	29
3.3.3.2 Extração de DNA plasmidiano de levedura	30
3.3.3.3 Extração de DNA gênomico de <i>Halobacterium salinarum</i>	31

3.3.4	Teste de marcas	31
3.3.5	Carimbo por técnica de veludo	32
3.3.6	Revelação de atividade amilolítica com vapores de iodo	32
3.3.7	Ensaio de degradação de ONPG	32
3.3.8	Curva de crescimento de leveduras	33
3.3.9	Conjugação bacteriana	34
3.3.10	Eletroforese de DNA em gel de agarose	34
3.3.11	Purificação de DNA em gel de agarose com lã de vidro	34
3.3.12	Precipitação de DNA com Acetato de Amônio	35
3.3.13	Ligação de fragmentos de DNA	35
3.3.14	Desfosforilação de Vetor	36
3.3.15	Tratamento com Klenow polimerase	36
3.3.16	Tratamento com T4 DNA polimerase	36
3.3.17	Construção de biblioteca	37
3.3.18	Reação de polimerase em cadeia –PCR	37
3.3.19	PCR de colônia	37
3.3.20	Sequenciamento em MegaBace	38
4.	Resultados	39
4.1	Rascunho do Artigo: Sequences from the Archaea <i>Halobacterium salinarum</i> increasing salt tolerance in the budding yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
4.2	Biblioteca de promotores de <i>Halobacterium salinarum</i>	54
4.3	Rascunho do artigo: Construction of a new promoter-trap vector that harbors two fluorescent proteins cloned divergently as reporter genes.	59
4.4	Avaliação de complexos de tetraciclina com os metais paládio e platina, utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	71
5.	Discussão Geral	80
6.	Referências	83

Agradecimentos

A **Deus** por colocar em minha vida grandes oportunidades e pessoas maravilhosas.

À minha orientadora **Mônica Bucciarelli Rodriguez** por estar ao meu lado por tantos anos, sendo sempre amiga e dando sábios conselhos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular e Microrganismos **Amanda, Ana Alice, Andréa Reis, Bianca, Carla, Cláudia B., Claudia H., Daniela, Danielle, Dulce, Eduardo, Emerson, Flaviane, Fred, Gabriel, Geovane, Gleydson, Gilka, Karla, Kênia, Kinulpe, Lília, Marcela, Maria Rosa, Michele, Paixão, Patrícia, Rodrigo, Luciana e Wallucia** pelo companheirismo, pela ajuda na bancada e brincadeiras.

Aos professores do Laboratório de Genética Molecular e Microrganismos **Adlane, Andréa Amaral e Chartone** e à professora **Marisa** do Laboratório de Genética de Neoplasias e Mutagênese, pela atenção e conselhos.

Á **Marina**, secretária da pós-graduação da Genética, pela ajuda em todos esses anos.

Á minha companheira de bancada, sala de aula e estudos **Rosana**. Obrigada pela amizade e carinho sempre a postos.

Á **Renata**, por ter me ajudado tanto com os experimentos. Muito obrigada por todas as transformações e pelo seu bom humor.

Ao meu amigo **Híggor**, por sempre me ajudar quando precisei e me fazendo rir em todos os momentos.

Á **Elaine** (Menininha), companheira de MICs, curvas de crescimento e festas. Muito obrigada por toda ajuda.

Ao **Sávio**, pelos divertidos, mas sempre sábios conselhos.

Aos grandes amigos de toda vida **Chico, Denis, Bruno, Eliza e LÍlian**. Sempre presentes nos bons e maus momentos.

Ao **Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular**, pela ajuda com os experimentos de seqüenciamento.

Ao **Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares**, pela ajuda com as PCRs.

Ao **Laboratório de Biodados, Biologia Celular & Desenvolvimento**, pelo empréstimo de equipamentos e reagentes.

Á **Rosana**, técnica do Laboratório de Biodados, Biologia Celular & Desenvolvimento, pela ajuda com as soluções.

Ao **Laboratório de Genética Celular e Molecular**, pelo empréstimo de equipamentos.

Ao **Laboratório de Mecanismos Gerais de Infecções Fúngicas**, pela ajuda com o microscópio de fluorescência.

Ao **Laboratório de Genética de Populações, Evolução e Conservação da Biodiversidade**, pelo empréstimo de equipamentos.

Ao **Tércio Góes** do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, pela proteína vermelha fluorescente mCherry.

Ao professor **Enrique Herrero**, da Universidade de Lleida, pelo envio do plasmídeo pCM 173 e artigo.

A **todos os amigos do ICB**, por fazerem parte da minha história.

Aos meus pais **Agílio e Sandra** e aos meus irmãos **Cássia e Messias**, por me amarem, serem sempre amigos e me apoiarem nas minhas decisões.

Ao meu amor **Leandro** por estar ao meu lado, me apoiando e ajudando. Obrigada por estar na minha vida e fazer dela muito mais feliz.

Resumo

Saccharomyces cerevisiae é um dos organismos modelos mais utilizados em estudos genéticos. As possibilidades oferecidas por este organismo são inúmeras, podendo ser classificado como uma ferramenta prática para explorar e estudar outros organismos.

Com o objetivo de explorar o genoma da Archaea *Halobacterium salinarum*, foram construídas duas bibliotecas genômicas deste organismo, tendo como hospedeira a levedura *S. cerevisiae*. Em uma das bibliotecas procuramos, sem sucesso, por seqüências do genoma de *H. salinarum* capazes de ativar a transcrição do gene da glicoamilase do fungo *Aspergillus awamori* em diferentes fontes de carbono. Desenvolvemos paralelamente dois vetores caça – promotores, que possuem genes repórteres com fenótipos de fácil detecção. Em um deles utilizamos o gene repórter da α – amilase, que tem sua ativação detectada por formação de halos de degradação de amido. No outro vetor estamos utilizando os genes repórteres das proteínas fluorescentes EGFP e MCherry clonados divergentemente, o que permite a detecção de promotores clonados em qualquer direção.

Na outra biblioteca procuramos por seqüências do genoma de *H. salinarum* que, quando ativadas pelo promotor forte de levedura *PGK*, aumentariam a tolerância a sal de *S. cerevisiae*. Foram selecionados 37 clones de levedura capazes de crescer em 1,5 M de NaCl. A caracterização dos fragmentos clonados não foi concluída.

Procurando entender a ação de complexos de tetraciclina com os metais paládio e platina, utilizamos a levedura *S. cerevisiae* para verificar a ligação dos complexos ao repressor *tetR* de Tn 10 e para avaliar a toxicidade destes antibióticos em organismos eucariotos.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is one of the most used model organism in genetic studies. It displays several possibilities and may be classified as a practical tool in exploring and studying other organisms.

Aiming to explore the genome of the Archaea *Halobacterium salinarum*, two genomic libraries of this organism were constructed, and the yeast *S. cerevisiae* was used as host. One of the libraries had the purpose to look for sequences in the *H. salinarum* genome able to direct the transcription of the glucoamylase gene from the *Aspergillus awamori* fungi, in different carbon sources. We also developed two promoter-trap vectors harboring reporter genes, which phenotype is easily detectable. One of them harbors the α -amylase reporter gene, which has its activity detected by the formation of starch degradation haloes. In the other vector we used two fluorescent proteins as reporter genes, cloned divergently. This allows the detection of promoters cloned in any direction.

In the other library we searched for sequences in the *H. salinarum* genome that would increase the *S. cerevisiae*'s salt tolerance, when activated by the strong yeast promoter *PGK*. 37 yeast clones able to grow at 1.5 M of NaCl were selected. The characterization of the cloned fragments was not yet concluded.

We tried to understand the action of palladium and platinum complexes of tetracycline. For this purpose we used *S. cerevisiae* to check the complexes binding to the *tetR* repressor from Tn 10 and to evaluate the toxicity of these antibiotics in eukaryotes.

1. Introdução

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* no estudo de outros organismos

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos organismos modelo mais utilizados para estudar outros organismos, interações de proteínas, descobrir estrutura e função de proteínas e várias outras abordagens. Além de possuir características interessantes para o trabalho laboratorial, como não ser patogênica e considerada GRAS (*generally regarded as safe*), ser de fácil crescimento e ser passível de técnicas como transformação, *replica-plating*, isolamento de mutantes, e outros, a levedura *S. cerevisiae* divide técnicas com o também organismo modelo *Escherichia coli*, sendo possível trabalhar com estes dois organismos conjuntamente, o que aumenta as possibilidades de estudos. Linhagens de *E. coli* e *S. cerevisiae* com diferentes genótipos estão facilmente disponíveis. Vetores bifuncionais (estáveis em bactérias e leveduras) podem ser introduzidos em *S. cerevisiae* e funcionar tanto como moléculas replicativas como serem integrados por recombinação homóloga ao genoma. Como a recombinação é quase exclusivamente homóloga em *S. cerevisiae*, é possível que um plasmídio seja integrado em sítios específicos.

Esta levedura foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma seqüenciado e disponível desde 1996 (Gouffreau *et al.*, 1996). Seus 16 cromossomos, bem caracterizados, indicaram 6183 ORFs de um genoma extremamente compacto, com apenas 3,18% das ORFs contendo íntrons. Aproximadamente 70% dos genes possuem função desconhecida, mas pelo menos metade destes possui algum motivo de classe de proteínas já caracterizada (Sherman, 2002). Evolutivamente, acredita-se que o genoma de *S. cerevisiae* seja o produto de perda massiva de genes de um ancestral que tenha passado por um processo de WGD (whole genome duplication) (Kellis *et al.*, 2004). O processo de WGD, em comparação com múltiplas duplicações independentes e divergência de genes ou segmentos individuais, é considerado como mais eficiente e pode oferecer boas oportunidades para evolução coordenada (Kellis *et al.*, 2004). Esta teoria evolutiva poderia explicar um genoma tão compacto e eficiente.

Devido a essas várias características, *S. cerevisiae* é muito utilizada como hospedeira para estudos em bibliotecas. As bibliotecas de YACs (yeast artificial chromosomes) são ferramentas muito utilizadas para mapeamento físico de genomas. Com os YACs é possível isolar fragmentos grandes de DNA (acima de várias

megabases) e facilmente modificar o DNA clonado. Um dos exemplos é a biblioteca de YACs contendo fragmentos grandes de DNA humano de 1990 (Albertsen *et al.*, 1990) e a organização do genoma do arroz, que foi realizada utilizando-se dados obtidos a partir de bibliotecas de YACs (Kurata *et al.*, 2002). Utilizando-se a técnica de clonagem em YACs, já foram isoladas regiões cromossômicas e genes de diversos organismos como chimpanzé, gorila, orangotango, macaco rhesus e camundongo (Kouprina *et al.*, 2003). Além da caracterização do genoma pelas bibliotecas de YACs, bibliotecas genômicas utilizando a levedura *S. cerevisiae* como hospedeira permitem o estudo de estrutura, função e evolução de proteínas de organismos distantes, devido a possível homologia, como é o caso da proteína ribossômica L1 de *Xenopus laevis*, que possui representante homólogo em *S. cerevisiae*, a proteína ribossômica L2. Estas proteínas estão envolvidas na regulação pós-transcricional atuando no *splicing* e estabilidade do RNA precursor (Presutti *et al.*, 1988).

A fácil manipulação de *S. cerevisiae* e ampla caracterização de seu genoma permite que estudos de complementação de genes de outros organismos sejam desenvolvidos com sucesso. Por exemplo, a caracterização de proteínas envolvidas no processo de glicosilação da levedura metilotrófica *Hansenula polymorpha*, foi realizada através de experimentos de complementação em *S. cerevisiae* (Kim *et al.*, 2006). Os estudos de complementação são bastante generalizados, não se limitando a leveduras. É possível a complementação com genes de organismos bem distantes de leveduras, como plantas. Subunidades da proteína succinil CoA ligase de tomate envolvida no ciclo de Krebs, foram utilizadas para complementar mutantes nessas subunidades de *S. cerevisiae* com sucesso (Stuart-Guimarães *et al.*, 2005).

O estudo de proteínas em *S. cerevisiae* também é feito com o uso de genes repórteres como ferramentas. Através da análise do fenótipo produzido pelo gene repórter é possível realizar estudos como a localização subcelular de proteínas, identificação de interações protéicas, estudos de expressão gênica, caracterização de promotores e estimação da transcrição de um gene (Koloteva *et al.*, 1998). Existem dois tipos de fusão de genes repórteres, traducional e transcricional. A fusão traducional ocorre quando o gene repórter é fundido a uma seqüência de DNA que possui os sinais de tradução da proteína a ser estudada. Já a fusão transcricional, ocorre quando um gene repórter é fusionado a um promotor e sítios regulatórios transcricionais. No estudo realizado por Ding e colaboradores (2000), uma biblioteca genômica da levedura *Schizosaccharomyces pombe* fusionada ao gene repórter *GFP* (green fluorescent

protein) foi utilizada para localização intracelular de proteínas. Neste estudo, tanto elementos regulatórios transcricionais quanto traducionais estavam presentes na fusão ao gene repórter (Ding *et al.*, 2000).

O uso de genes repórteres associados a promotores caracterizados, pode servir na avaliação de novas espécies como organismos hospedeiros para síntese de proteínas heterólogas. Em *Debaryomyces hansenii*, a produção de GFP foi monitorada utilizando-se vários promotores de *S. cerevisiae* já caracterizados e o resultado desta expressão comparado com um promotor da própria *D. hansenii*. A partir deste estudo, verificou-se que a produção de proteína heteróloga foi similar tanto em *S. cerevisiae* quanto em *D. hansenii*, utilizando-se promotores de *S. cerevisiae* caracterizados (*CYCI*, *GPD1*, *HSP12* e *SME1*) com exceção do promotor *ADH2*, que não foi capaz de induzir expressão em *D. hansenii*. O promotor *GPD1d* de *D. hansenii* se mostrou eficiente tanto em seu organismo de origem quanto em *S. cerevisiae*, apresentando melhor desempenho em presença de maior quantidade de NaCl no meio (Maggi *et al.*, 2004).

Dentre os promotores de *S. cerevisiae* mais utilizados estão os promotores *GAL1-10*, induzidos na presença de galactose e reprimidos na presença de glicose (Johnston & Carlson, 1992). Trata-se de um promotor forte com transcrição divergente, pois *GAL1* e *GAL 10* estão adjacentes e em direções opostas. O promotor *MET3*, também indutível, é eficientemente regulado por sua repressão na presença de metionina (Mao *et al.*, 2002). Além destes promotores indutíveis, promotores constitutivos são amplamente utilizados, como os promotores *PGK* (fosfoglicerato kinase) (Cheng *et al.*, 2006;) e *ADHI* (álcool desidrogenase) (Sanseverino *et al.*, 2005).

A levedura *S. cerevisiae* é muito utilizada na produção de proteínas heterólogas, não só pelos seus promotores bem caracterizados, mas também pelo fato de esta ser capaz de realizar modificações pós-traducionais na proteína como “*foldin*” apropriado e glicosilação (Klis *et al.*, 1998; Byrne *et al.*, 2005). As modificações pós-traducionais de *S. cerevisiae* foram cruciais na sua escolha como organismo para produzir altos níveis de diferentes proteínas de HCV (Vírus da Hepatite C) (Parolin *et al.*, 2005), assim como a super expressão da proteína de membrana do retículo sarcoplasmático ATPase transportadora de Ca^{2+} de coelho (Jidenko *et al.*, 2005). A produção de proteínas heterólogas em *S. cerevisiae* ocorre tanto com o uso dos promotores dos próprios genes heterólogos utilizados, como nos casos descritos acima, mas também com o uso dos promotores de *S. cerevisiae*. São utilizados tanto promotores constitutivos quanto indutíveis, como o promotor *MET25*. O promotor *MET25* é

reprimido na presença de metionina, entretanto há ativação da transcrição em concentrações inferiores a 0,05 mM de metionina. Assim, com a concentração certa de metionina, é possível ocorrer a repressão da síntese heteróloga no início da fase estacionária e dar início a expressão no final desta fase (Solow *et al.*, 2005). Esta característica é interessante porque permite a produção de proteínas tóxicas. As diferenças nas regulações dos promotores de *S. cerevisiae* permite que haja uma maior escolha por parte dos pesquisadores na produção de proteínas heterólogas.

1.2 Interesse em caracterização de novos promotores

Promotores bem caracterizados são extremamente necessários nos estudos genéticos. Esta necessidade é devida ao abrangente uso de promotores não só na produção de proteínas heterólogas, mas também em estudos de caracterização de genes e linhagens (Maggi *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2002).

A indústria atual possui grande interesse na produção de proteínas em larga escala, porque a sua recuperação e purificação seria considerada economicamente viável, pois mesmo com a perda esperada nestes processos, ainda sim se obteria uma quantidade substancial da proteína. Devido a isso, microrganismos são extremamente utilizados na produção de proteínas heterólogas, já que o crescimento destes é rápido e os custos muito mais baixos quando comparados a sistemas de expressão heteróloga em mamíferos (Byrne *et al.*, 2005). É interessante que os promotores utilizados na produção heteróloga em grande quantidade sejam fortes, sendo constitutivos ou não, e principalmente não patenteados, pois a utilização de promotores patenteados acarreta na submissão a royalties, muitas vezes inviável.

Existe ainda uma outra vertente de pesquisa com interesse biotecnológico, que tem por objetivo a produção de proteínas heterólogas em microrganismos que sejam consideráveis seguros para o consumo humano. Daí surge a iniciativa de se utilizar organismos que sejam considerados GRAS como hospedeiros na produção de proteínas heterólogas. Este tipo de abordagem possui grande interesse na caracterização de novos promotores indutíveis que não requeiram a utilização de reagentes estranhos ao microrganismo, pois assim ele não seria aprovado para o consumo humano.

Uma das formas mais eficientes de se localizar seqüências com atividade promotora é pelo uso de genes repórteres (Scorpione *et al.*, 1993). Um vetor contendo um MCS (sítio múltiplo de clonagem) a montante de um gene repórter, sem atividade

promotora própria, é uma ferramenta ideal para este tipo de estudo (Koloteva *et al.*, 1998).

1.3 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de tolerância a sal

A homologia de genes entre *S. cerevisiae* e plantas permite que *S. cerevisiae* seja um dos organismos modelo mais utilizados para estudos de tolerância a sal. Vários estudos mostram que fungos e plantas possuem mecanismos similares de transporte de íons e detoxicação de cátions (Posas *et al.*, 2000; Gaxiola *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2004).

A agricultura sofre grande prejuízo devido à salinização dos solos, devido a isso, existe um grande interesse em se conhecer e avaliar os mecanismos pelos quais as plantas lidam com a alta concentração de sal no solo, seja por uma questão de adaptação de novas espécies a solos salinos ou conhecimento de uma espécie que possua alta tolerância ao sal.

A proximidade dos mecanismos de tolerância a sal em leveduras e plantas pode ser evidenciada pelos genes *NHX*, que codificam transportadores de prótons Na^+/H^+ viabilizando o englobamento de Na^+ nos vacúolos (Ohnishi *et al.*, 2005), sendo que o gene *NHX* da planta modelo para estudos, *Arabidopsis thaliana*, é capaz de complementar uma levedura mutante em *nhx* (Gaxiola *et al.*, 1999). Além da complementação em leveduras, já foi visto que uma super expressão destes genes pode aumentar a tolerância a sal em *A. thaliana* (Apse *et al.*, 1999).

A relação entre plantas e leveduras pode ser abordada também quanto a regulação da transcrição por ação de proteínas reguladoras atuando em genes que conferem tolerância a sal. A proteína Athb-12 de *A. thaliana*, que possui domínio homeobox (HD) e motivo de estrutura zíper com resíduos de leucina, é capaz de regular a expressão do gene *PMR2A* de resposta a estresse de levedura (Shin *et al.*, 2004).

O estresse salino acarreta não só a toxicidade catiônica, mas também o estresse osmótico. Logo, o estresse salino pode desencadear a ação de vários tipos de mecanismos. Estes mecanismos estão geralmente relacionados a uma diminuição no influxo e aumento no efluxo de íons Na^+ , a otimização no sequestro vacuolar de íons Cl^- e Na^+ e na produção e acúmulo de osmólito compatível. No caso de *S. cerevisiae*, um aumento osmótico acarreta na ativação da via de fosforilação de Hog1 (*high osmolarity glycerol response*) e conseqüente acúmulo intracelular de glicerol (Posas *et al.*, 2000).

S. cerevisiae não possui grande desempenho em altas concentrações de sal, podendo crescer a até aproximadamente 1,1M de NaCl, o que pode ser considerado uma característica positiva para estudos em que se tem como objetivo procurar por genes que confirmam tolerância a sal. A levedura *S. cerevisiae* foi utilizada como hospedeira para uma biblioteca genômica de *Debaryomyces hansenii*. Esta levedura é capaz de crescer em altas concentrações de sal, cerca de 4 M de NaCl. A partir da biblioteca, foi possível isolar seqüências do genoma de *D. hansenii* capazes de aumentar a tolerância a sal de *S. cerevisiae* em até 2,2M de NaCl (Prista *et al.*, 2002).

1.4 *Saccharomyces cerevisiae* no estudo de organismos procariotos

Considerando-se todas as aplicações em *S. cerevisiae*, já citadas, foram desenvolvidas algumas abordagens com uso de *S. cerevisiae* para estudo de organismos procariotos.

Nosso primeiro objeto de estudo foram seqüências do genoma da Archaea *Halobacterium salinarum*. Archaeas e organismos do Domínio Eukarya possuem alta similaridade em suas RNA polimerases, além de outras características similares na regulação da transcrição. Em Archaea estão presentes fatores de transcrição e TBP (TATA binding protein) (Brown & Doolittle, 1997; Allers *et al.*, 2005). A partir destes dados imaginamos se seria possível isolar seqüências do genoma de *H. salinarum* que exibissem atividade promotora através de uma biblioteca tendo a levedura *S. cerevisiae* como hospedeira. Paralelamente construímos dois vetores caça-promotores. Um deles possui o gene repórter da α -amilase fusionado ao peptídeo sinal de fator α e o outro possui dois genes de proteínas fluorescentes clonados divergentemente e flanqueando um MCS, como repórteres.

Em um segundo objetivo, ainda explorando o genoma de *H. salinarum*, procuramos por seqüências de seu genoma que fossem capazes de aumentar a tolerância a sal de *S. cerevisiae*. *H. salinarum* é um organismo obrigatoriamente halofílico, não sendo capaz de crescer em concentrações de NaCl inferiores a 1 M (Ng *et al.*, 2000). Para isso, construímos uma biblioteca genômica, mais uma vez utilizando *S. cerevisiae* como organismo hospedeiro, onde os fragmentos de DNA genômico de *H. salinarum* eram regulados pelo promotor forte de levedura *PGK*.

Por fim, procurando avaliar a ação de complexos de tetraciclina com os metais paládio e platina, foram realizadas curvas de crescimento com *S. cerevisiae*, pois assim

seria possível verificar se a presença destes antibióticos afetaria de alguma forma o tempo de dobramento desta levedura. Foram também realizados ensaios de ONPG em *S. cerevisiae*, para se avaliar a capacidade dos complexos de tetraciclina de se ligarem ao repressor *tetR*. Para isso utilizou-se o vetor de expressão de levedura pCM 173 desenvolvido por Garí e colaboradores (1997), que possui um sistema promotor regulado pela presença de tetraciclina.

Parte dos resultados está apresentada em forma de rascunho de artigo, mesmo que estejam faltando alguns resultados importantes a serem obtidos antes da submissão destes.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo explorar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para estudo de organismos procariotos. Dentro deste trabalho foram definidas as seguintes metas:

- Procurar seqüências do genoma da Archaea halófila *Halobacterium salinarum* capazes de aumentar a tolerância a sal de *S. cerevisiae*
- Procurar seqüências de *H. salinarum* capazes de exercer atividade promotora em *S. cerevisiae*, pela ativação do gene repórter da glicoamilase. Paralelamente desenvolver dois vetores caça - promotores:
 - Caça-promotores tendo como gene repórter a α -amilase pancreática de camundongo
 - Caça-promotores tendo como genes repórteres duas proteínas fluorescentes clonadas divergentemente flaqueando um sítio múltiplo de clonagem
- Verificar em *S. cerevisiae* a ação de complexos metálicos com tetraciclina, pelo uso de sistema promotor regulado por tetraciclina e avaliar a toxicidade destes complexos metálicos em organismos eucariotos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

3.1.1 Linhagens Bacterianas: *Escherichia coli*

MC1061 - *F-araΔ139 D(ara-leu) 7696 gaE15 galK16 Δ(lac)X74 rpsI (Str^r), hsdR2 (r_k-M_k⁺) mcrAmcrB1* (Wertman *et al.*, 1986; Raleigh *et al.*, 1989)

HB101 - *F-hsdS20 (r_B⁻, r_B⁻) leuB6 supE44 ara14 recA13 proA2 rpsL20 (Str^r) lacY1 galK2 mtl1*

ATCC 25922 - isolado clínico susceptível a cefamandole, cefalexina, cefaloglicina, cefaloridina, cefalotina, cloramfenicol, colistina (colimicina), gentamicinas, kanamicina, ácido nalidixico, neomicina, tetraciclina (coleção ATCC).

XL1 Blue – *F'::Tn10 proA⁺ B⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k-M_k⁺) supE44 relA1*.

3.1.2 Linhagem de Archaea: *Halobacterium salinarum*

ATCC 19700 strain (Moore *et al.*, 1969)

3.1.3 Linhagem de levedura: *Saccharomyces cerevisiae*

IH1784 – *α trip1 leu2 ura3 his4 can1*

3.2 Cultivo de microrganismos

Todos os meios foram esterilizados em autoclave (120 Kgf/cm² – 15 minutos) antes de serem utilizados.

3.2.1 Meios de cultura bacteriana (Sambrook *et al.*, 1989):

LB:

Tripton 1.0%

Extrato de levedura 0.5%

NaCl 1.0%

Obs: Ágar 1.5% para meio LB sólido

Mueller Hinton (DIFCO)

Mueller Hinton Ágar (DIFCO)

SOB:

Bactotripton 1.0%

Extrato de levedura 0.5%

NaCl 10mM

KCl 2.5 mM

MgCl₂ 10mM

MgSO₄ 10mM

SOC:

Meio SOB 100ml

Solução glicose 2M estéril 1ml

Solução de Mg²⁺ 2M (MgSO₄ 1M + MgCl₂ 1M) 1ml

2xYT:

Bactopeptona 1.0%

Extrato de levedura 0.5%

NaCl 1.0%

pH 7.4

O estoque de bactérias foi mantido a -90°C, sendo 1ml de cultura em 400µl de glicerol. Placas em meio LB das bactérias foram mantidas a 4°C e renovadas periodicamente.

3.2.2 Antibióticos:

Para critérios de seleção foi utilizada ampicilina na concentração final de 100µg/µl.

Para curva de crescimento das leveduras foi utilizado o antibiótico tetraciclina nas concentrações 20.08, 66.5, 133 µmol/L, como controle. O complexo tetraciclina paládio foi utilizado nas concentrações 20.08 e 133 µmol/L e o complexo tetraciclina platina nas concentrações 20.08 e 66.5 µmol/L.

Para ensaio de ONPG, dosagem de unidades de β-galactosidase, foram utilizados os antibióticos tetraciclina, tetraciclina com paládio e tetraciclina com platina na concentração de 20.08 µmol/L.

Obs: As concentrações 20.08, 66.5 e 133 µmol/L são equivalentes a 10, 32 e 64 µg/ml de tetraciclina, respectivamente.

3.2.3 Meios para cultura de leveduras (Guthrie & Fink, 1991):

A esterilização dos meios, assim como a estocagem de leveduras, foi feita seguindo os mesmos procedimentos para as bactérias, descritos acima.

Obs: Foi adicionado ágar 2.0% para meios sólidos. Para meios contendo NaCl, foi adicionado ágar 4.0%.

YPD (meio completo):

Extrato de levedura 1.0%

Peptona 2.0%

Dextrose 2.0%

SD (meio mínimo):

YNB sem aminoácidos e persulfato de amônia – 0.17% (DIFCO)

Dextrose 2.0%

Sulfato de amônia 0.5%

Complemento para meio mínimo (SD) para levedura:

Complemento	Meio (ml)	Quantidade (μ l)	Concentração final
Triptofano (2mg/ml)	25	250	30 μ g/ml
Leucina (3mg/ml)	25	250	20 μ g/ml
Lisina (3mg/ml)	25	250	30 μ g/ml
Uracila (2mg/ml)	25	250	20 μ g/ml
Adenina (2mg/ml)	25	250	20 μ g/ml
Histidina (2mg/ml)	25	250	30 μ g/ml

Obs: nas placas contendo fonte alternativa de carbono (maltose e frutose), foi feito o meio mínimo (SD) com substituição da dextrose por maltose ou frutose, na mesma quantidade. As placas com etanol como fonte de carbono alternativa, foram feitas com meio mínimo sem dextrose e adição de 5% do volume final da placa de etanol absoluto.

3.2.4 Meio para cultura de *Halobacterium salinarum*:

A esterilização do meio, assim como a estocagem de *H. salinarum*, foi feita seguindo os mesmos procedimentos descritos acima, para os outros microrganismos.

Casamino ácidos 0.75%

Extrato de levedura 1.0%

Na₃-citrato 0.3%

KCl 0.2%

MgSO₄.7H₂O 2.0%

FeSO₄.7H₂O 0.005%

MnSO₄.H₂O 0.02%

NaCl 15.0%

Ágar 2.0%

pH 7.4

3.3 MÉTODOS -

3.3.1 Contagem de células de levedura

Para contagem de células foi utilizada uma câmara de Neubauer, onde aplicou-se uma alíquota de 10 µl e cobriu-se com uma lamínula. A câmara de Neubauer é formada por 9 quadrados subdivididos. O quadrado central é dividido em 25 quadrados, que são divididos em 16 quadrados. As células dos 4 quadrados das extremidades foram contadas e foi tirada uma média desse valor. O valor obtido foi então multiplicado por 25 (número total de quadrados). O valor obtido é o valor de células/ml da alíquota em uma diluição de 10⁻⁴.

3.3.2 Transformação de microrganismos

3.3.2.1 Preparação de leveduras competentes e transformação - receita para 12 transformações (Gietz *et al.*, 1995)

Uma colônia da levedura selecionada foi utilizada para inóculo em 5ml de meio YPD, que foi mantido a 30°C com agitação por 24 horas. 20 µl dessa cultura foram utilizados para inocular 10 ml de meio YPD, sendo que este foi mantido overnight a 30°C com agitação. As células foram contadas e uma alíquota dessa cultura foi utilizada para inocular 75 ml de meio YPD a uma densidade de 5x10⁷ células/ml. O crescimento foi acompanhado até atingir uma densidade de 1.6 a 2.0x10⁷ células/ml, tendo atingido este valor, um volume equivalente a 1x10⁸ células foi centrifugado por 5 minutos a 7000rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1ml de H₂O mili-Q esterelizada. As células foram novamente centrifugadas por 30 segundos a 10.000 rpm e ressuspensas em 400 µl de LiAc 0.1M, este processo de lavagem com LiAc foi repetido mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se na seguinte ordem: 240 µl de PEG 50% (p/v), 36 µl de LiAc 1M, 25 µl de ss-DNA 2mg/ml (previamente fervido e resfriado em gelo), 50 µl de solução de DNA contendo 1µg de plasmídeo. A mistura foi vortexada e levada a banho-maria 30°C por 30 minutos. Logo após, as células foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 30 minutos. As células foram centrifugadas (30 segundos), o sobrenadante foi descartado e as células

ressuspendidas em 500 µl H₂O mili-Q esterelizada. As células foram então plaqueadas em meio seletivo.

Soluções utilizadas:

LiAc dissolvido em H₂O mili-Q esterilizada em uma concentração de 0,1 e 1M;

PEG 3350 dissolvido em H₂O mili-Q estéril a 50% (p/v);

ss-DNA (DNA de espermatozoides de salmão) dissolvido em H₂O mili-Q estéril (2mg/ml)

3.3.2.2 Preparação de bactérias eletrocompetentes (Sambrook *et al.*, 1989 modificado por Dr. Marcelo Bento Soares)

Foi realizado um pré-inóculo a partir de uma colônia da bactéria escolhida em 100ml de meio 2xYT. Este foi incubado overnight a 37°C com agitação. Utilizou-se 10ml do pré-inóculo para inocular 1 L de meio 2xYT que foi levado para agitação a 37°C até atingir D.O._{600nm} de 0.2-0.25. Resfriou-se o frasco com a cultura em gelo. Após resfriada, a cultura foi centrifugada (16000 G – 10 minutos – 4°C) até total sedimentação das células, com descarte do sobrenadante em seguida. O foi ressuspendido em 50 ml de glicerol 10% a 4°C autoclavado e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores, por 15 minutos. Foram realizadas mais duas etapas de lavagem das células em 100 ml de glicerol 10% a 4°C autoclavado, com centrifugações nas mesmas condições anteriores. O final foi ressuspendido em 1 ml de glicerol 10% e uma alíquota de 25 µl da ressuspensão foi diluída em 10 ml de glicerol 10%. A D. O. _{600nm} foi medida e a ressuspensão diluída com glicerol 10% até a D. O. atingir 0.15. A suspensão foi dividida em alíquotas de 40 µl e armazenada a -90°C.

3.3.2.3 Transformação de bactérias (Sambrook *et al.*, 1989)

As células eletrocompetentes foram descongeladas em gelo por 15 minutos. Adicionou-se em seguida 1µl da solução de DNA (concentração de ~20ng/µl) selecionada e as células foram incubadas em gelo por mais 5 minutos. As células com o DNA foram transferidas para cubetas de eletroporação (2mm) e submetidas a um choque elétrico de 2.5 KV (resistência 200OHMs, capacitância de 25 µFD). As bactérias foram ressuspendidas com 1ml de meio SOC e transferidas para eppendorff.

Após transferência foram incubadas a 37°C sem agitação por 1 hora e plaqueadas em meio seletivo apropriado.

3.3.3 Extração de DNA

3.3.3.1 Extração de DNA plasmidiano de bactéria por lise alcalina - mini-extração (Sambrook *et al.*, 1989 com modificações)

Uma colônia da bactéria selecionada para extração foi inoculada em 5ml de meio LB com antibiótico e levada para crescimento overnight a 37°C com agitação. A cultura foi centrifugada (10.000 rpm – 10 minutos – 4°C). Após centrifugação, a cultura foi ressuspensa em 100µl de GTE. Adicionou-se 200 µl de solução de lise fresca, girou-se o tubo gentilmente na posição horizontal e incubou-se por 5 minutos em gelo. Foi adicionado 150 µl de KOAc e levou-se o tubo para vortex. As células lisadas foram centrifugadas (10.000 rpm – 10 minutos – 4°C) e recuperou-se o sobrenadante em eppendorf. Foram adicionados 400 µl de fenol:clorofórmio 1:1, vortexou-se e centrifugou-se o eppendorf por 1 minuto. Foram adicionados 400 µl de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1, vortexou-se e centrifugou-se o eppendorf por 1 minuto. Foram adicionados 400 µl de isopropanol gelado. O eppendorf foi vortexado e levado para o freezer (-20°C) por pelo menos 24 horas. Após incubação, o eppendorf foi centrifugado (13.400 rpm – 15 minutos) e o sobrenadante descartado. O foi ressuspensa em 1 ml de etanol absoluto e centrifugado novamente (13.400 rpm – 5 minutos). Descartou-se o sobrenadante e ressuspensa-se o em 20 µl de TE-RNase.

GTE: (100ml)

Glicose (dextrose) - 0.9 gr

EDTA 0.5 M - 2ml

Tris-Cl 1M (pH 8.0) - 2.5ml

H₂O mili-Q esterelizada

Solução de lise: (5ml)

NaOH 5N - 200µl

SDS 10% - 500 µl

H₂O mili-Q esterelizada

KOAc:(100ml)

Acetato de potássio 5M – 60 ml

Ácido acético glacial – 11.5 ml

H₂O mili-Q esterelizada – 28.5 ml

TE-RNAse:

Tris-Cl (pH 7.4) 10mM

EDTA (pH8) 1mM

RNAse pancreática livre de DNAse (20µg/ml)

3.3.3.2 Extração de DNA plasmidiano de levedura (Hoffman e Winston, 1987 com modificações)

Foram inoculados 250 µl de cultura líquida em 5 ml de meio seletivo e crescidos por 24 horas a 30°C. 1,5 ml da cultura foram centrifugados em eppendorf a 13.400 rpm por 15 segundos. O sobrenadante foi descartado e as células vortexadas para ressuspensão no líquido residual. Adicionou-se 400 µl de solução de lise e vortexou-se. Foram adicionados 400 µl de fenol:clorofórmio (1:1) e 0,3 g (aproximadamente o volume de células) de pérolas de vidro e vortexou-se por 2 minutos. O eppendorf foi centrifugado por 5 minutos a 13.400 rpm e a fase aquosa retirada. Foram adicionados à fase aquosa 0.25 volumes de acetato de amônio (10M) e 1 µl de glicogênio. Vortexou-se e foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto. A solução foi incubada a -20°C por pelo menos 24 horas e o sobrenadante retirado por aspiração. O sedimento foi lavado com 400 µl de etanol 80% e ressuspendido em 20µl de H₂O mili-Q.

Solução de lise:

Triton X-100 2%

SDS 1%

NaCl 100mM

Tris-HCl 10mM (pH 8,0)

EDTA 1mM (pH 8.0)

3.3.3.3 Extração de DNA gênomico de *Halobacterium salinarum*

As células foram incubadas por cerca de 5 dias em 30ml de meio apropriado a 37°C. Após crescimento, células foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e aproximadamente 0.05g de células ressuspensas em 540µl de TE (Tris-Cl 10mM-pH 7.4, EDTA 1mM- pH8.0). Adicionou-se 25µl de lisozima (10mg/ml), 100µl de SDS e 3µl de RNase (10mg/ml). A suspensão foi agitada gentilmente e incubada a 37°C por 1 hora. Foram adicionados 3µl de Proteinase K e incubou-se a 55°C por 2 horas. Adicionou-se 100µl de NaCl 5M e agitou-se gentilmente. Foram adicionados 100 µl de CTBA/NaCl (10% CTBA/0.7M NaCl), vortexou-se e incubou-se a 65°C por 20 minutos. Foram adicionados 600 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e agitou-se gentilmente por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm e a fase aquosa retirada. Repetiu-se o passo de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido da centrifugação e retirada da fase aquosa. Foram adicionados 700 µl de fenol:clorofórmio (1:1) e agitou-se gentilmente por 10 minutos. A solução foi centrifugada e repetiu-se o passo do fenol: clorofórmio (1:1). Após centrifugação e retirada da fase aquosa, adicionou-se 420µl de isopropanol (6 volumes) e incubou-se a 20°C por pelo menos 24 horas. Após incubação a solução foi centrifugada por 20 minutos a 10.000 rpm e lavada com etanol 80%. O sedimento foi deixado a temperatura ambiente para secagem e ressuspensado em 20µl de TE.

3.3.4 Teste de marcas (Guthri & Fink, 1991)

Este teste foi realizado para verificar a possibilidade de haver contaminantes após o processo de transformação de leveduras. As leveduras foram colocadas para crescer em placas seletivas para todos os aminoácidos pertinentes, a 30°C sem agitação. Após aproximadamente 72 horas, analisou-se o crescimento das leveduras nas diversas placas. O crescimento deve ocorrer somente onde a auxotrofia for complementada ou onde a levedura for originalmente prototrófica.

3.3.5 Carimbo por técnica de veludo

Para realizar o carimbo pela técnica de veludo, foram utilizados os seguintes materiais: cilindro de madeira com diâmetro pouco menor que o da placa a ser carimbada, presilha de madeira com diâmetro igual ao da placa a ser carimbada, pedaço quadrado de tecido do tipo veludo com largura pelo menos 1,5 vezes maior que o diâmetro da placa. O tecido foi colocado em cima do cilindro de madeira com o lado felpudo para cima e preso com a presilha. A placa foi muito levemente pressionada no tecido preso no cilindro. Uma amostra dos clones ficou “presa” ao veludo no cilindro e este foi utilizado imprimir a amostra dos clones em um máximo de 4 placas por pedaço de tecido.

3.3.6 Revelação de atividade amilolítica com vapores de iodo

Placas contendo 0.5% de amido foram utilizadas para o crescimento da levedura. Após o crescimento (~3 dias), foi adicionado às tampas das placas cerca de 2.5 mg de cristais de iodo. A parte inferior das placas foi colocada sobre as tampas, para que os vapores de iodo entrassem em contato com o amido de meio e este fosse corado. Após pouco mais de 1 minuto verificou-se a formação ou não de halo por degradação de amido.

3.3.7 Ensaio de degradação de ONPG [MATCHMAKER Random Peptide Library User Manual PT 3039-1 (Clontech., Palo Alto, CA) com modificações]

As culturas de leveduras foram inoculadas em meio seletivo por 12-16 horas a 30°C e em seguida repicadas em meio seletivo na concentração de $0,5 \times 10^7$ células/ml e crescidas por mais o tempo determinado para o ensaio (3 horas para ensaios com células em fase exponencial de crescimento e 24 para ensaios com células em fase estacionária de crescimento). Neste momento foi adicionado o antibiótico pertinente. Depois deste tempo (tempo zero) foram recolhidas alíquotas das culturas para o ensaio e medida a D_{600nm} de cada uma delas. Quantidades iguais das culturas foram lavadas em 1,5ml de tampão Z sem β -mercaptoetanol. As leveduras foram ressuspensas em 300 μ l de tampão Z sem β -mercaptoetanol e foram separadas alíquotas de 100 μ l. As células foram lisadas por três etapas de congelamento e descongelamento, sendo 1 minuto cada,

em nitrogênio líquido e banho a 37°C, respectivamente. Em seguida, foram adicionados 700 µl de tampão Z com β-mercaptoetanol e 160 µl de ONPG (o-nitrophenyl galactopyranoside, 4mg/ml, em tampão Z sem β-mercaptoetanol). O tempo foi registrado e a reação incubada a 30°C até atingir a cor amarela, quando então a reação foi interrompida adicionando-se 400 µl de Na₂CO₃ 1M. A reação foi centrifugada e a D.O._{420nm} do sobrenadante medida. Durante todo o experimento trabalhou-se com 2 tubos branco que não continham células, como controle.

As unidades de β-galactosidase foram calculadas pela fórmula:

$$U_{\beta\text{-gal}} = \text{D.O.}_{420\text{nm}} \times 1000 / [\text{tempo (minutos)} \times \text{D.O.}_{600\text{nm}} \times \text{volume (ml)}]$$

Tampão Z (Z-buffer):

Na₂HPO₄ 60mM

NaH₂PO₄ 40mM

KCl 10mM

MgSO₄ 1mM

SDS 0,025% p/v

β-mercaptoetanol 50mM (quando necessário)

pH 7

3.3.8 Curva de crescimento de leveduras

Culturas de leveduras foram inoculadas em meio seletivo e crescidas por 12-16 horas. Após este período as leveduras foram contadas e volumes equivalentes a 1x10⁶ células/ml separados em tubos para adição dos antibióticos pertinentes e separação do controle sem adição de antibiótico. Essas culturas foram incubadas novamente a 30°C. Após 1 hora de incubação seguiu-se a uma contagem de hora em hora de cada uma das culturas.

3.3.9 Conjugação bacteriana

Foram feitos inóculos separados das linhagens receptora e doadora em meio LB líquido e incubados a 37°C por 18-24 horas. Após o crescimento, 200 µl da cultura da linhagem doadora e 800 µl de cultura da linhagem receptora foram adicionados a 4 ml de meio LB líquido e incubados a 37°C sem agitação por 2-4 horas. Após este período 100 µl da cultura mista foram utilizados para plaquear uma placa contendo dois antibióticos, sendo cada um deles para a resistência de uma das linhagens.

3.3.10 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A agarose (0.8% p/v) foi aquecida em TAE 1X no volume final desejado para o gel e acrescentou-se brometo de etídio em concentração final de 0.5 µl/ml. O gel foi polimerizado em temperatura ambiente e, para a corrida do DNA, aplicou-se uma voltagem de 1 a 5 V/cm².

TAE 1X:

Tris-acetato 0.04M

EDTA 0.001 M

3.3.11 Purificação de DNA em gel de agarose com lã de vidro

A solução com o DNA a ser purificado foi aplicada em gel de agarose 0.8% e corrida até total separação das bandas. A banda de interesse foi excisada do gel visualizado por UV longa. A banda foi colocada em um eppendorf pequeno (0.5 ml) contendo um furo na base e lã de vidro autoclavada cobrindo o furo. O eppendorf foi colocado dentro de outro eppendorf grande (1.5 ml) sem tampa e estes foram levados para centrifugação a 8.000 rpm por 20 segundos. O DNA contido no líquido recuperado no eppendorf maior foi precipitado.

3.3.12 Precipitação de DNA com Acetato de Amônio (Sambrook *et al.*, 1989 com modificações)

A solução de DNA teve seu volume completado para 100 μ l. Foram adicionados 1 μ l de glicogênio para facilitar a visualização do sedimento final, 25 μ l de acetato de amônio 10M (concentração final de 2.5M). A solução foi vortexada e adicionou-se 250 μ l de etanol absoluto (2 volumes). A solução foi novamente vortexada e incubada em freezer a -20°C por pelo menos 24 horas. Em seguida foi centrifugada por 15 minutos a 13.400 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o ressuspenso no volume apropriado de H₂O mili-Q.

3.3.13 Digestão de DNA com enzima de restrição (Sambrook *et al.*, 1989 com modificações)

Para cada μ g de DNA a ser digerido foi adicionado 1 unidade de enzima de restrição, sendo que o volume de enzima não deve ultrapassar 10% do volume final da reação. Adicionou-se tampão apropriado para enzima utilizada na quantidade de 10% do volume final da reação de digestão e o volume final foi completado com H₂O mili-Q estéril. Foi verificado que a eficiência da digestão era maior quando esta era feita com concentração final de DNA igual ou inferior a 0.1 μ g/ μ l. A digestão foi colocada na temperatura apropriada para ação da enzima de restrição por um período de 3 a 5 horas.

3.3.14 Ligação de fragmentos de DNA (Sambrook *et al.*, 1989 com modificações)

Para a ligação de fragmentos de DNA procurou-se evitar que o volume final excedesse a 10 μ l. Adicionou-se 100ng do vetor em solução, 3x a quantidade do vetor em equivalente molar de inserto e H₂O mili-Q. Esta solução foi levada a um banho-maria a 60°C e em seguida o banho foi desligado. Somente quando a solução atingiu a temperatura ambiente, adicionou-se o tampão da ligase (10% do volume final) e 1 μ l de ligase (GIBCO, 5u/ μ l). Para ligações de fragmentos de DNA com pontas coesivas a ligação foi levada a 22°C por 16 horas, para ligações de fragmentos com pontas cegas a ligação foi levada a 16°C por 16 horas.

3.3.15 Desfosforilação de Vetor (Sambrook *et al.*, 1989)

Este protocolo foi feito para se evitar a religação do vetor no processo de ligação de fragmentos de DNA. O vetor linearizado foi precipitado, segundo protocolo de precipitação com acetato de amônio, e ressuspenso no volume de H₂O mili-Q apropriado para uma reação de volume final de 10 µl. Adicionou-se tampão da fosfatase (10% do volume final) e 5 unidades da enzima fosfatase. A reação foi levada a 37°C por 30 minutos. Após este período, foi adicionado EDTA para concentração final de 5mM e a reação foi levada a 65°C por 1 hora para inativação da enzima. Após a inativação a reação é novamente precipitada com acetato de amônio, para proceder à ligação de fragmentos de DNA.

3.3.16 Tratamento com Klenow polimerase -DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment- (Sambrook *et al.*, 1989)

Este procedimento foi realizado para preencher fita de DNA 5' protuberante e se proceder à ligação de fragmentos de DNA com extremidade cega. Este procedimento foi necessário quando as enzimas de restrição, utilizadas para gerar os fragmentos de DNA da ligação, produziam extremidades coesivas com a fita 5' protuberante e estas não eram compatíveis. Foi adicionada à solução de DNA de uma ligação a ser tratada com Klenow: 3µl de tampão REACT 2 10X (GIBCO), 1µl de dNTP (0.5mM), 1µl de Klenow polimerase (GIBCO, 0.5U/µl) e H₂O mili-Q para completar um volume final de 30µl. A reação foi incubada em gelo por 20 minutos. Após incubação procedeu-se a precipitação por acetato de amônio.

3.3.17 Tratamento com T4 DNA polimerase

Este procedimento foi realizado para excisão de fita de DNA 3' protuberante e preenchimento de fita 5' protuberante presente na extremidade do fragmento de DNA, deixando assim as extremidades cegas. Este procedimento foi necessário quando as enzimas de restrição, utilizadas para gerar os fragmentos de DNA da ligação, produziam extremidades coesivas com a fita 3' protuberante e 5' protuberante, e estas não eram compatíveis. Adicionou-se ao produto de uma ligação a ser tratado com T4 DNA

polimerase: 100 μ M de dNTP e 1 unidade de T4 DNA polimerase. A reação foi incubada a 12°C por 15 minutos. A reação foi interrompida com a adição de EDTA para concentração final de 10mM e incubada a 75°C por 20 minutos.

3.3.18 Construção de biblioteca

Para construção das bibliotecas foram gerados fragmentos de DNA genômico através de digestão parcial com enzima de restrição. As digestões foram de aproximadamente 1 hora e os fragmentos recuperados e purificados segundo o protocolo de lâ de vidro, descrito anteriormente. Os fragmentos foram ligados em vetor linearizado, com a mesma enzima de restrição utilizada na digestão dos fragmentos, e desfosforilado com enzima fosfatase. Após a ligação, a reação de ligação foi utilizada em seu volume total para eletroporações de bactéria. As placas seletivas contendo as bactérias transformantes foram lavadas com GTE e as células ressuspensas com o auxílio de uma alça de Drigalsky. A suspensão de células foi utilizada para extração de DNA plasmidiano por lise alcalina.

3.3.19 Reação de polimerase em cadeia –PCR- (Sambrook *et al.*, 1989)

Para reações em que o DNA molde era pequeno (cerca de 5Kb) foram utilizados 30ng de DNA. Nas reações em que o DNA molde era relativamente maior (acima de 10Kb), utilizou-se cerca de 100ng de DNA. Adicionou-se tampão de Taq polimerase (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH9, 0,1% de Triton X100 e 0,15mM de MgCl₂) a 10% do volume final, 0,2mM de dNTP, 0,04U/ μ l de Taq polimerase e 1.0 μ M de cada iniciador. A reação foi levada ao termociclador e uma alíquota de 5 μ l do produto final utilizada para análise em gel de agarose 0.8% com brometo de etídio.

3.3.20 PCR de colônia

A colônia utilizada foi retirada da placa seletiva com ponteira, sendo que esta foi levemente raspada em outra placa contendo meio seletivo. A ponteira foi utilizada para refluxo na reação de PCR previamente preparada, fornecendo assim o DNA molde. A placa seletiva foi incubada na temperatura apropriada e a reação foi levada ao

termociclador. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 0.8% com brometo de etídio.

3.3.21 Sequenciamento em MegaBace

O sequenciamento foi feito utilizando-se cerca de 600 ng de DNA em solução, sendo que o volume de DNA e água da reação deve ser de 5µl. Trata-se de um grande quantidade de DNA, cerca de 3X mais do que é utilizado com produtos de PCR, mas devido ao grande tamanho do vetor seqüenciado (10Kb), utilizamos uma quantidade maior. Adicionou-se 1µl de um dos iniciadores (5µM/µl) e 4µl de DYEnamic ET[®] Terminator kit. A reação foi levada a um termociclador e aplicada no aparelho MegaBACE 1000[®] Amersham-Biosciences-GE.

4. Resultados

4.1 Rascunho do Artigo: Sequences from the Archaea *Halobacterium salinarum* increasing salt tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Ana Raquel de Souza Monteiro, Sávio Faria Torres, Mônica Bucciarelli Rodriguez*

Dep. de Biologia Geral, Inst. de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais,
Belo Horizonte, MG, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-091, Brazil

* Corresponding author: Tel.: 55(31) 3499-2602, Fax: 55(31) 3499-2567 e-mail: monicabr@icb.ufmg.br

Abstract

The Archaea Domain has been studied in the past few years and similarities to the Eukarya Domain have been found, especially concerning to elements involved in the transcriptional regulation. *Halobacterium* species are obligatory halophilic organisms, being unable to grow in NaCl concentrations lower than 1 M. These organisms may be considered as a rich source of genes involved in salt tolerance. Considering that, the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a known organism for salt tolerance studies, was used as host to a genomic library of the Archaea *Halobacterium salinarum*, which was screened in plates containing 1.5 M of NaCl. The library was constructed in a plasmid harboring the strong yeast promoter PGK. 37 yeast clones of *S. cerevisiae* able to grow in 1.5 M of NaCl were isolated to further studies.

Keywords: Archaea, Genomic Library, Salt tolerance

Introduction

The Archaea Domain, which organisms were once denominated as bacteria due to its morphologic characteristics, is today well defined as a monophyletic group (Woese *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1997). There are 4 phylas (*Korarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*) which are comprised in a rRNA tree (Allers *et al.*, 2005).

In the 90's several of those organisms had their genome sequenced. It was clear then that Archaea genomes have genes with characteristics shared with genes from very different sources. Clusters of genes organized as operons can be found in Archaea such as in Bacteria. This suggests lateral gene transfer (LGT) happened, which is a driving force in prokaryotic evolution. The possibility of this genetic exchange is facilitated by the fact that methanogens and halophiles Archaeas usually share with bacteria the same environment (Allers *et al.*, 2005).

On the other hand, Archaea and Eukarya have similarities especially concerning gene transcription. The RNA polymerases of these two domains have more similarities than with the bacterial RNA polymerase. The archaeal RNA polymerase possesses extra subunits with homology with eukaryotic RNA polymerase that are not present in the bacterial enzyme. Like as in eukaryotes, the archaeal RNA polymerase requires basic transcriptional elements such as TBP (TATA-box binding protein), TFB (transcription factor B) (Brown & Doolittle, 1997). Besides that, more than 10 initiation factors are found in Archaea and Eukarya, while only 3 can be found in Bacteria. Also, translation initiation in Archaea uses methionina as in eukaryotes, while bacteria uses the N-formylmethionine (Allers *et al.*, 2005).

Of all of the studied archaeas, the *Halobacterium* species are among the most explored. They belong to the *Euryarchaeota* phyla, characterized by the presence of histones in their chromatin. All *Halobacterium* already described are obligatory halophilic and do not grow in NaCl concentrations lower than 1M. *Halobacterium* genus possesses several species that have not a well defined phylogenic relationship (Ng *et al.*, 2000). In 2000 the genome sequence of *Halobacterium salinarum* was published by the MPG (Max Planck Gesellschaft, (<http://www.halolex.mpg.de/>) and the genome sequence of *Halobacterim sp.* NRC-1 by the NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Ng *et al.*, 2000). The genome sequences of these two

species were considered as essentially identical. These *Halobacterium* species are considered as high potential organisms for advanced genetics, since it is possible to utilize techniques such as use of shuttle vectors, gene replacement and reporter genes (Allers *et al.*, 2005).

The *Halobacterim sp.* NRC-1 possesses a 2,571,010 bp genome, which is, until this moment, the smallest genome among the halophiles. There are a GC-rich chromosome (68% G+C) and two minichromosomes, pNRC200 and pNRC100 with respectively 365,425 bp and 191,346 bp and 58-59% G+C composition (Ng *et al.*, 2000). In the minichromosomes 145,428 bp of identical DNA and about 12 families of IS elements were found. The genome contains 2,630 likely protein-coding genes and 2,532 of these are unique. Among the predicted proteins a substantial number of bacterial homologs was found, leading to the LGT possibility (DasSarma *et al.*, 2006). Since the genome was sequenced, it was possible to infer few points about the osmotic balance mechanism. The K⁺ intracellular and Na⁺ extracellular ion concentration are the same. Passive permeability to these ions is low; therefore, it is necessary to have an active transport to keep the ion balance. The Na⁺ efflux is probably mediated by NhaC proteins and several K⁺ transporters are present (Ng *et al.*, 2000).

The mechanisms surrounding the osmotic balance and the salt tolerance are target of studies in several organisms. One of the most used host organism to salt tolerance studies is the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The main reason for that is the fact that higher fungi and plants share several mechanisms involved in ion transport and cationic detoxification. (Posas *et al.*, 2000; Gaxiola *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2004.). Agriculture is suffering several losses due to the soil salinization, hence there is a great interest in understanding and evaluating the mechanisms by which plants deal with high salt concentration, aiming obtain new species with adaptation to salt soils or the knowledge about species already adapted to high salt concentration. The proximity of mechanisms between yeasts and plants may be evidenced by the *NHX* genes, which encode Na⁺/H⁺ ion transporters, promoting the Na⁺ sequestration into the vacuoles (Ohnishi *et al.*, 2005). The *Arabidopsis thaliana* *NHX* gene is also able to complement *nhx* mutant yeast (Gaxiola *et al.*, 1999).

The salt stress leads not just to the cationic toxicity, but also to osmotic stress. The yeast *S. cerevisiae*, when in osmotic stress, produces a protective osmolyte, the glycerol (Shen *et al.*, 1999). An increase in the osmotic pressure leads to the Hog1 (high osmolarity glycerol response) MAP kinase pathway activation. After phosphorylation,

Hog1 MAPK is translocated to the nucleus, where it induces several stress responses (Posas *et al.*, 2000). Between these several stress responses is the activation an NADH-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) encoded by the gene called *GPD1*, which leads to the biosynthesis of glycerol (Albertyn *et al.*, 1994).

In an attempt to investigate the *H. salinarum* genome and the possibility to have an Archaeal sequence expressed in a eukaryotic organism, we constructed a *H. salinarum* genomic library using the yeast *S. cerevisiae* as host. *H. salinarum* may be considered as a source of genes conferring salt tolerance. *S. cerevisiae* IH1784, a strain that grows until 1,0M of NaCl was transformed with *H. salinarum* genes induced by a strong promoter (PGK) and yeast clones able to grow in 1,5M of NaCl were selected.

Material and Methods

Archaeal, bacterial and yeast strains

Archaea *Halobacterium salinarum* ATCC 19700 strain (Moore *et al.*, 1969) was used for the library construction. *Escherichia coli* MC1061 (Wertman *et al.*, 1986; Raleigh *et al.*, 1989) was used as the bacterial host for construction of the genomic *H. salinarum* library and propagation of the plasmids. *Saccharomyces cerevisiae* IH1784 (α *tripl1 leu2 ura3 his4 can1*) was used as recipient strain for the library.

Growth conditions and culture media

H. salinarum was grown in complete medium (casamimo acids 0.75%, yeast extract 1.0%, Na₃ citrate 0.3%, KCl 0.3%, FeSO₄.7H₂O 0,005%, MgSO₄.7H₂O 20%, MnSO₄. 7H₂O 0.02%,NaCl 15%) at 37°C. *E. coli* was grown in Luria-Bertani (LB) medium (triptone 1,0%, yeast extract 0,5%, NaCl 1,0%) supplemented with ampicillin (to the final concentration of 0,1 mg/ml) at 37°C. *S. cerevisiae* was maintained in YPD medium (yeast extract 1,0%, peptone 2,0%, glucose 2,0%) supplemented with NaCl, when necessary, at 30°C. For selective purposes, *S. cerevisiae* was grown in YNBD medium (YNB 0,17%, dextrose 2,0%, amonium sulfate 0,5%) supplemented with , leucine, tryptophan, uracil, adenine, histidine , lysine, NaCl or sorbitol when required.

Transformation procedures

Competent cells of *E. coli* MC1061 were prepared and transformed as described in Sambrook *et al.* (1989). Competent cells of *S. cerevisiae* IH1784 were prepared and transformed by the LiAc protocol as described in Gietz *et al.* (1992) and selected in YNBD w/o leucine medium (YNBD-leu).

DNA extractions

Archaeal genomic DNA was extracted according to the following protocol: Cells were grown at 37°C for at least 5 days. After growth, cells were harvested and about 0,05g was resuspended in 540µl of TE (Tris-HCl 1M pH 8,0; EDTA 0,5M pH 8,0). 25µl of lisosyme (10mg/ml), 100 µl of SDS (10%) and 3µl of RNase 10 mg/ml. Gently mixed and incubated at 37°C for 1 hour. 3µl of proteinase K was added, the tube was gently mixed and incubated at 55°C for 2 hours. 100 µl of NaCl 5M was added, the tube was gently mixed. 100 µl of CTAB/NaCl (0.7M NaCl, 10% CTAB) was added, the tube was mixed and incubated at 65°C for 20 minutes. 600µl of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) was added, the tube was gently mixed for 10 minutes. It was centrifuged for 10 minutes at 10000 rpm. The aqueous phase was kept and the chloroform: isoamyl alcohol extraction repeated. 700µl of phenol:chloroform (1:1) was added, the tube was gently mixed for 10 minutes and centrifuged for 10 minutes at 12000 rpm. The aqueous phase was kept and phenol:chloroform step repeated. 420 µl isopropanol (0.6 volumes) was added, the tube was incubated at -20°C for 1 hour. It was centrifuged for 20 minutes at 10000 rpm 4°C, washed with 80% ethanol, air dried and resuspended in 25-50 µl TE.

Plasmid isolation from bacteria was performed as described in Sambrook *et al.* (1989). For yeast plasmid isolation, the procedure was performed according to Hoffman and Winston (1987).

DNA manipulation

DNA digestion, dephosphorylation and ligation were performed according to the supplier's recommendations. All the procedures were performed with enzymes from Promega Corporation.

DNA fragments purification

DNA fragments were recovered and purified by glass wool following protocol: The region in the agarose gel containing the fragments was excised and introduced in to a small tube (0,5 ml). This tube had a hole in its bottom and glass wool inside of it, recovering the bottom. The tube was put inside of a larger tube (1,5 ml) and centrifugated at 8.000 rpm by 15 seconds. The recovered liquid in the bigger tube, which contains the DNA, was precipitated by the ammonium acetate protocol (Sambrook *et al.*, 1989).

Genomic library construction

The plasmid YEpG1 (Scorpione *et al.*, 1993) was cut with *Bgl II* and treated with calf intestine alkaline phosphatase. *H. salinarum* genomic DNA was partially digested with *Bgl II* enzyme for 1 hour and the fragments ranging 2kb-4kb and 0,6Kb-2Kb were rescued. Fragments between 0,6 Kb-2Kb and 2Kb-4Kb were inserted into YEpG1 to generate the library in two versions. The ligation reaction was used to transform *E. coli* MC1061 and transformants were selected on LB plates with ampicillin. Colonies were collected by washing the plates with GTE (glucose 50mM, EDTA 10mM pH 8, Tris-HCl 25mM pH 8) and had its plasmids extracted by alkaline lysis protocol as described in Sambrook *et al.* (1989).

Phenotypic selection of transformants from the library

During transformation, yeast clones were selected in YNBD medium containing 1,5 M of NaCl. An aliquot of 100 µl from the final transformation suspension was plated on plates without NaCl to check for the transformation efficiency.

Plasmid loss

Yeast transformants were inoculated in complete medium (YPD) and an aliquot of this culture was used to inoculate subsequent cultures for two weeks. This would allow the spontaneous loss of the yeast plasmids.

Characterization of the selected transformants from the library

Selected transformants were plated on YNBD w/o leucine plates containing 2.0M, 2.5M, 3.0M, 3.5M of sorbitol and 1.75 M, 2.0 M of NaCl.

Sequencing of the fragments of the selected transformants from the second library

The fragments were sequenced by the MegaBACE 1000[®] Amersham-Biosciences-GE system, using DYEnamic ET[®] Terminator kit from the same company. Primers pgk588F (5'gctttatgagggtaacatcaat3') and gluco604R (5'gcggtgtaccactgctta3') were designed in order to hybridize in the plasmid sequences flanking the fragments, as shown in figure 1.

Results

Construction of the *H. salinarum* genomic library

A library was constructed in order to find sequences from *H. salinarum* that would increase the salt tolerance of *S. cerevisiae*. The library was constructed in the vector YEpG1 that contains the *S. cerevisiae* strong promoter PGK, in two pools. In the first pool *H. salinarum* genomic DNA was partially digested and fragments ranging between 0.6Kb and 2Kb were cloned into the *Bgl II* site of the dephosphorilated vector. After bacterial transformation with the ligation product approximately 100.000 clones resistant to ampicillin were obtained. The number of colonies obtained by the vector religation control was one third of the total number of clones obtained by this first pool of the library. Considering the *H. salinarum* genome size (~2,5Mb) (Allers *et al.*, 2005), the fragments sizes and the religation control, this first library covered the archaeal genome about 43 times. In the second pool, another library was constructed with fragments ranging between 2 Kb and 4 Kb. The religation control was also done in this second pool and it took also one third of the total number of clones of the second library. 7.000 clones resistant to ampicillin were generated and covered the *H. salinarum* genome around 6 times.

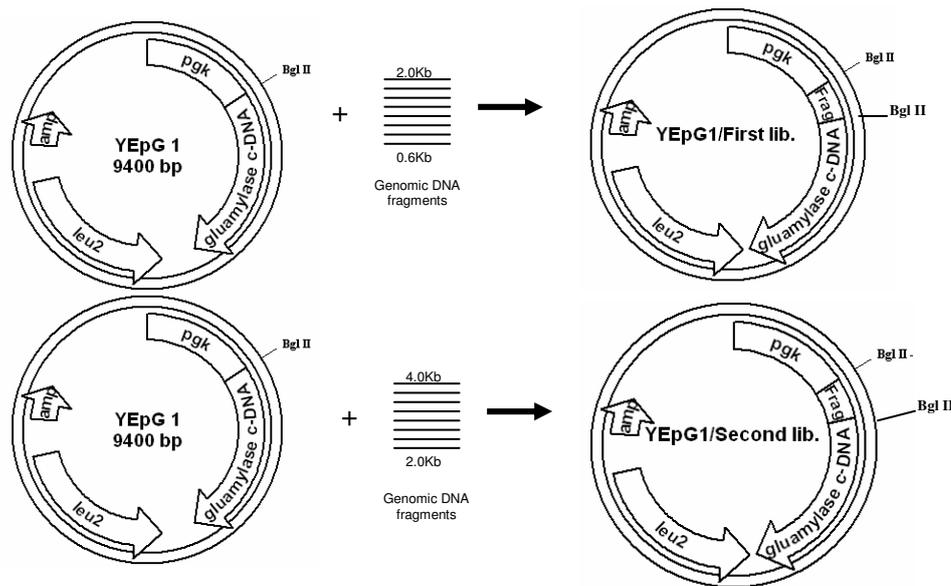


Figure 1. Library construction. Fragments ranging between 0.6Kb-2Kb were inserted in to YEpG1 vector generating the first library. Fragments ranging 2Kb-4Kb were inserted in to YEpG1 vector generating a second library. Primers used in the sequencing are indicated as arrows in the vectors.

Selection of *S. cerevisiae* transformants

S. cerevisiae IH1784 was transformed with 4 μ g of DNA from both pools separately. The transformation suspension was plated on selective plates containing 1,5M of NaCl. An aliquot of the transformation was plated in YNBD w/o leucine plates (selective media) without the addition of NaCl, so it would be possible to check the transformation efficiency, which was around 500 clones per 1 μ g of library DNA. 10 yeast clones able to grow in 1.5M of NaCl were selected from the first library transformations. Other 27 clones from the second library were also able to grow at 1.5M of NaCl and selected to further tests.

Characterization of transformants

All the selected yeast transformants were characterized according to its ability to grow in NaCl higher concentrations (1.75M and 2.0M) and in different concentrations of sorbitol (2.0M, 2.5M and 3.0M). All the clones were tolerant to 1.75M of NaCl, but none of them could grow in higher concentrations. None of the clones could grow in sorbitol concentrations higher than 2.5 M, that is the same behavior showed by the original yeast strain.

Fragments characterization

Plasmidial DNAs extracted from yeast transformants were introduced into bacteria, in order to obtain a larger amount of DNA. These DNAs were digested with *Bgl II* enzyme for checking the size of the fragments. The digestion was partial, since longer incubation leads to degradation of the fragments. Figure 2 shows an example of the results produced by *Bgl II* digestion. Clones 1, 2 and 3 liberated only fragments of approximately 4Kb. Clones 32, 35, 36 and 37 liberated fragments of approximately 2 Kb and 4 Kb.

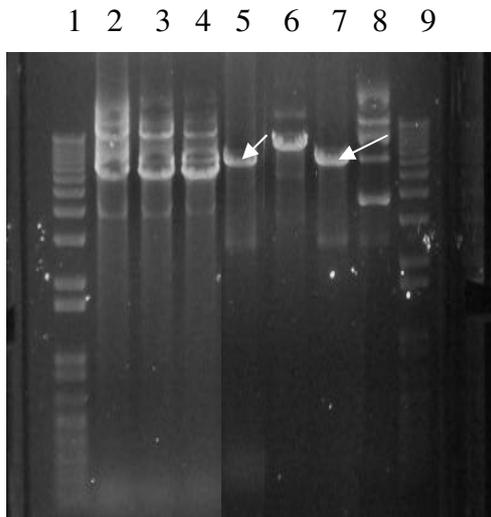


Figure 2. Partial digestion of plasmid DNAs originated from the yeast transformants . Lanes 1 and 9: 1 Kb ladder; lanes 2-4: plasmid DNA isolated from clones 1-3. Lanes 5-8: plasmid DNAs isolated from clones 32, 35, 36, 37 respectively. Arrows indicate linear YEpG1 DNA.

Salt tolerance is dependent of plasmid presence

Some of the yeast clones had their plasmids extracted and used to retransform the host strain. These retransformants showed again ability to grow in high salinity. The original clones were subsequently cultivated in complete medium (YPD) for two weeks to achieve the spontaneous plasmid loss and consequently the lost of the salt tolerant phenotype. The culture was used to spot YPD plates and selective plates containing 1.5 M of NaCl, showed in figure 3.

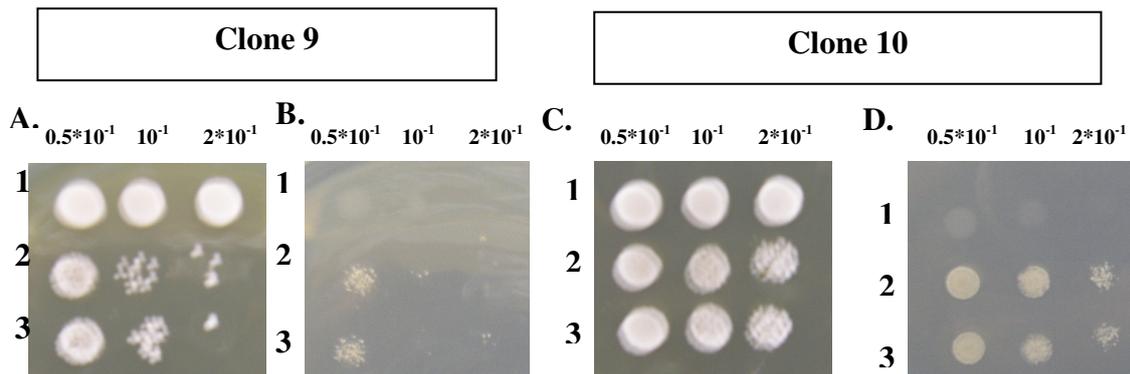


Figure 3. Plasmid loss by non-selective culture. A and C show growth in YPD plates of clones 9 and 10 respectively. B and D cultures were spotted in SD –Leu plates, containing 1,5 M of NaCl. 1 indicates cultures of yeast transformants that were subsequently cultivated in YPD medium to achieve loss of the plasmid. 2 indicates cultures of the yeast transformants. 3 indicates cultures of retransformed yeast clones. Dilutions ($0.5 \cdot 10^{-1}$, 10^{-1} and $2 \cdot 10^{-1}$) are indicated above the pictures.

Sequencing: ainda em execução.

Discussion

(Será modificada após obtenção dos dados de sequenciamento.)

Our libraries were able to cover the *H. salinarum* genome several times. The first library pool covered the archaeal genome about 43 times and the second pool about 6 times. The first and the second library pools generated 10 and 27 clones able to grow at 1.5 M of NaCl, respectively. These 37 clones were also able to grow at 1.75 M of NaCl, but none of them could grow in sorbitol concentrations higher than control. It was demonstrated that the salt tolerance phenotype is dependent on the recombinant plasmid presence.

The fragments characterization by partial digestion showed fragments ranging from 2 Kb to 4 Kb. There is the possibility of loss of the smaller fragments during the library construction, considering the protocol used to purify the fragmented genomic DNA. The amount of smaller fragments was probably lower than the amount of larger fragments.

An increase in the NaCl concentration leads to the cationic toxicity of the medium and the osmotic stress. Sorbitol is usually used in osmotic stress studies, since it increases the osmotic pressure but does not dissociates in toxic cations. Under osmotic stress *S. cerevisiae* increases the glycerol production, which is an osmoprotectant of the yeast. Previous studies showed that the *GPD1* gene, whose product is involved in the glycerol biosynthesis, from the osmotolerant yeast

Debaryomyces hansenii can complement the *S. cerevisiae* glycerol production efficiently, but this gene could not increase *S. cerevisiae* salt tolerance (Thomé, 2005). In a comparison of transcriptional responses between a laboratory strain and a brewing strain of *S. cerevisiae* under high NaCl concentration conditions, using microarray analysis, *GPD1* was considered one of the genes classified as potential in the construction of salt tolerant strains by its overproduction. The other genes that could also improve *S. cerevisiae* behavior under high NaCl concentrations were *ENA1*, that encodes a sodium ion efflux protein, and *CUP1*, that encodes copper ion metallothionein (Hirasawa *et al.*, 2005).

Our yeast clones showed no increasing in the sorbitol tolerance, compared to control. This result does not exclude the possibility of the clones being able to grow in higher concentrations of other polyols and exhibit an improvement in its tolerance to osmotic pressure. Other polyols such as mannitol, xylitol and ribitol have been used to study the polyol transport and osmosignaling in yeasts exposed to an osmotic stress (Karlgrén *et al.*, 2005). We consider that there is not an overproduction of glycerol by the transformants. This result is expected since there is no register of the archaea *H. salinarum* increasing glycerol production under osmotic stress. The salt tolerance of our transformants is probably conferred by sequences involved in ion transport, which would lead to an overproduction of this kind of proteins, as in clones overexpressing the *ENA1* gene, described by Hirasawa and coworkers (2005).

Conclusion and future prospects

We have evidences that sequences involved in ion transport from *H. salinarum* were responsible for the increasing in the *S. cerevisiae* IH1784 salt tolerance. Although, these results will be more conclusive after the sequencing of the DNA fragments. It would be very interesting to check in the future, if these sequences may increase the salt tolerance in plants, such as *Arabidopsis thaliana*.

Acknowledgments

We would like to thank Ana Clara Guerrini Schenberg and Elisabete José Vicente for providing the plasmid YEpG1, and Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz in Rio

de Janeiro, Brazil) for providing the *H. salinarum* strain. This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

1. Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M., Prior, B. A. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*. **14**, 4135-4144 (1994).
2. Allers, T., Mevarech, M. Archaeal genetics-the third way. *Nature Reviews Genetics*.**6**, 58-73 (2005).
3. Brown, J. R., Doolittle, W.F. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiology and Molecular biology Reviews*. **61**, 456-502 (1997).
4. DasSarma, S., Berquist, B. R., Coker, J.A., DasSarma, P., Muller, J. A. Post-genomics of the model haloarchaeon *Halobacterium* sp. NRC-I. *Saline Systems*. **2**, 1-12, (2006).
5. Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L., Fink, G. R. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **96**, 1480-1485 (1999).
6. Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., Schiestl, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nuclei Acids Research* **20**, 1425 (1992).
7. Hirasawa, T., Nakakura, Y., Yoshikawa, K., Ashitani, K., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., Shimizu, H., Shioya, S. Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **11**, 1-12 (2005).

8. Hoffman, C. S., Winston, F. A ten-minute DNA preparation efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. **57**, 267-272 (1987)
9. Karlgren, S., Pettersson, N., Nordlander, B., Mathai, J. C., Brodsky, J. L., Zeidel, M. L., Bill, R. M., Hohmann, S. Conditional osmotic stress in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. **25**, 7186-7193 (2005).
10. Moore, R. L., McCarthy, B. J. Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology* **99**, 248-254 (1969).
11. Ng, W.V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahi, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M., Angevin, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniel, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Ehardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L., DasSarma, S. Genome Sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**, 12176-12181 (2000).
12. Ohnishi, M., Fukada-Tanaka, S., Hoshino, A., Takada, J., Inagaki, Y., Iida, S. Characterization of a Novel Na⁺/H⁺ Antiporter Gene InNHX2 and Comparison of InNHX2 with InNHX1, Which is Responsible for Blue Flower Coloration by Increasing the Vacuolar pH in the Japanese Morning Glory. *Plant Cell Physiology*. **46**, 259–267 (2005).
13. Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., Nadal, E., Ariño, J. The transcriptional response of yeast to saline stress. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**, 17249-17255 (2000).
14. Raleigh, E.A., et al. *Current Protocols in Molecular Biology* eds. Ausubel, F.M. et al. Publishing Associates and Wiley Interscience; New York. Unit 1.4.(1989).

15. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press* 2-2100p (1989).
16. Scorpione, R.C., Camargo, S. S., Schenberg, A. C. G., Astolfi-Filho, S. A new promoter-probe vector for *Saccharomyces cerevisiae* using fungal glucoamylase cDNA as the reporter gene. *Yeast*. **9**, 599-605 (1993).
17. Shen, B., Hohmann, S., Jensen, R. G., Bohnert, H. J. Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiology*. **121**, 45-52 (1999).
18. Shin, D., Koo, Y. D., Lee, J., Lee, H., Baek, D., Lee, S., Cheon, C., Kwak, S., Lee, S. Y., Yun, D. Athb-12, a homeobox-leucine zipper domain protein from *Arabidopsis thaliana*, increases salt tolerance in yeast by regulating sodium exclusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **323**, 534-540 (2004.)
19. Thomé, P.E. Heterologous expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene [*DhGPD1*] from the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Microbiology*. **51**, 87-90 (2005).
20. Wertman, K. F. *et al.* *Gene*. **49**, 253-262 (1986)
21. Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **87**, 4576-4579 (1990).

4.2 Biblioteca de promotores de *Halobacterium salinarum*

Com o objetivo de explorar o genoma da Archaea *H. salinarum*, foi elaborada uma biblioteca genômica deste organismo, tendo como hospedeira a levedura *S. cerevisiae*. Nesta biblioteca procuramos seqüências que pudessem exercer atividade promotora pela ativação do gene repórter glicoamilase (1,4- α -glucan glicohidrolase) de *Aspegillus awamori*. A proteína glicoamilase é uma hidrolase glicosídica que leva à liberação de β -D-glicose (Tatsumi & Katano, 2005). O fenótipo deste gene repórter é detectado pela formação de halos gerados pela hidrólise de pontes α -1,4- glicosídicas das extremidades não redutoras de amido ou outros oligômeros (Tatsumi & Katano, 2005). A maioria dos genes de Archaea possui um TATA box localizado 24-28 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição, que se liga a uma TBP (TATA binding protein) (Gregor & Pfeifer, 2005; Brown & Doolittle, 1997). Já foi descrito que um fragmento de 492 pb da Archaea *Halobacterium halobium* é capaz de exercer atividade promotora nos três domínios: Archaea (*Haloferax volcanii*), Eukarya (*S. cerevisiae*) e Bacteria (*E. coli*) (Yang *et al.*, 2003). Muitos promotores de Archaea contém ainda o elemento BRE que reconhece o fator de transcrição B (homólogo ao fator de transcrição IIB de eucariotos), consistindo de 8 pb ricos em purina. O elemento BRE, além de determinar a força do promotor, também determina a orientação da transcrição (Gregor & Pfeifer, 2005).

A biblioteca foi construída no vetor YEpG161 desfosforilado (Scorpione *et al.*, 1993) com inserção de fragmentos de DNA genômico de *H. salinarum* de 0,6Kb a 2,0Kb no sítio de restrição Bgl II do vetor (figura 1A). Os fragmentos de DNA genômico de *H. salinarum* foram gerados por digestão parcial (1 hora de incubação a 37°C) com a enzima Bgl II. Como controle positivo foi utilizado o plasmídeo YEpG1 (Scorpione *et al.*, 1993), que possui o gene repórter da glicoamilase regulado pelo promotor forte de levedura PGK e como controle negativo, foi utilizado o vetor YEpG161 sem a inserção de fragmentos (figura 1). Para controle da eficiência de ligação do vetor aos fragmentos, foi feita também um reação de ligação do vetor YepG 161 desfosforilado sem a presença de inserto. Assim, teríamos uma idéia da taxa de religação do vetor.

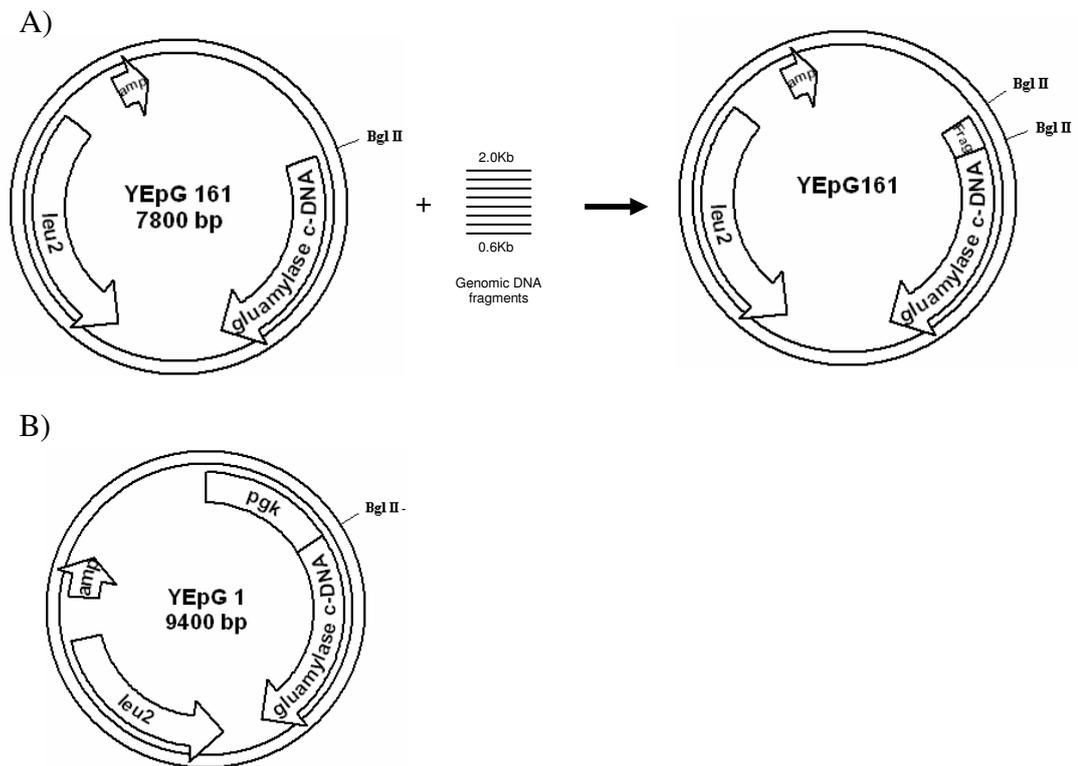


Figura 1 – A) Esquema de construção da biblioteca de promotores, utilizando-se o vetor YEpg 161 linearizado com Bgl II e fragmentos de DNA genômico de *H. salinarum*, gerados por digestão parcial com a enzima Bgl II. B) Vetor YEpg 1, utilizado para controle positivo da biblioteca.

A bactéria *E. coli* MC1061 foi utilizada para propagação dos plasmídios da biblioteca e foram obtidos 9.000 clones bacterianos. A eletroporação da bactéria MC1061 com o produto de ligação do controle de religação do vetor YEpg 161 apresentou cerca de 40 clones, aproximadamente 0,4% dos clones totais obtidos da biblioteca. Considerando-se o tamanho dos insertos, o tamanho do genoma de *H. salinarum* (~2,5Mb) (Allers *et al.*, 2005) e a possibilidade de religação do vetor, houve uma cobertura do genoma de aproximadamente 4,7 vezes.

Com o objetivo de identificar possíveis diferentes mecanismos de regulação de atividade nas seqüências com atividade promotora a serem verificadas, as placas contendo clones de levedura após a transformação foram carimbadas, conforme a técnica de veludo, em placas contendo seis meios diferentes: YNB com quatro diferentes fontes de carbono (dextrose, maltose, frutose, e etanol), YNBD contendo 1,0M de NaCl e YPD. Todas as placas continham 0,5% de amido e foram analisados

11.200 clones de levedura. Foi verificado por Starling e colaboradores (2003) que o gene repórter da glicoamilase é capaz de produzir halos em meios YNB.

Após o crescimento dos clones nas placas, foram adicionados cristais de iodo nas tampas das placas por pouco mais de 1 minuto para verificar a presença de halos por degradação do amido. Não foi observada a formação de nenhum halo (figura 2).

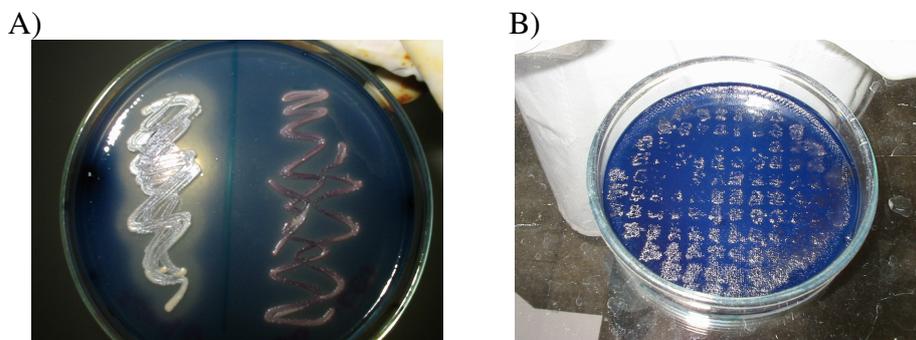


Figura 2- A) *S. cerevisiae* IH 1784 contendo o vetor YEpG 1, controle positivo com formação de halo. *S. cerevisiae* IH 1784 contendo o vetor YEpG 161, controle negativo sem formação de halo. (meio SD - Leu). B) Placa carimbada por técnica de veludo, contendo clones sem atividade promotora (meio SD -Leu).

O vetor YEpG 161 já foi utilizado na procura de seqüências de atividade promotora de *S. cerevisiae*. Com a análise de 40.000 clones de levedura, foram localizados 9 clones exibindo atividade amilolítica (Scorpione *et al.*, 1993). Entretanto, a glicoamilase produz uma resposta fenotípica fraca, visto que a quebra do amido ocorre em apenas um ponto, gerando o açúcar β -D-glicose. Sendo assim, é necessária a ação de um promotor com atividade forte, como o PGK de levedura, para a produção de um halo detectável. Seqüências com atividade promotora fraca não seriam então verificadas com este repórter. Sendo assim, foi proposta a construção de um novo vetor caça-promotores utilizando-se a α -amilase como gene repórter. Esta proteína é capaz de múltiplos ataques nas pontes glicosídicas do amido, liberando principalmente maltoses e maltotrioses. Como a quebra do amido ocorreria em vários pedaços, seria possível a visualização de halos mesmo com a regulação de seqüências promotoras mais fracas. Foi visto que interações protéicas podem ser melhor detectadas pelo sistema de duplo híbrido usando α -amilase como repórter em placas contendo 0,1% de amido (Cruz, 2006). Sendo assim, quanto menor a quantidade de amido nas placas, melhor a visualização do halo.

Para construção do novo vetor utilizou-se como base o plasmídeo YCplac33 (Gietz & Sugino, 1988). Foi utilizada a α -amilase pancreática de camundongo em fusão

com seqüência do peptídeo sinal de fator α (Astolfi-Filho *et al.*, 1986) gerada através de PCR. Os iniciadores foram BamAmyF (5' CGCGGATCCATGAGATTT CCTTCAATTTTT 3') contendo o sítio de restrição de BamH I e SalAmyR (5' GCG TGTCGACTTCTTACAATTTTGAGACAGC 3') contendo o sítio de restrição de Sal I e como molde o vetor pESA (Astolfi-Filho *et al.*, 1986). O produto de PCR foi clonado no plasmídeo pGEM-T (PROMEGA) e recuperado por digestão com BamH I e Sal I. Este inserto foi então inserido no vetor YCplac33 através de dois passos. O vetor YCplac33 foi linearizado com a enzima BamHI e desfosforilado. O vetor aberto foi então ligado ao inserto que possuía a extremidade coesiva de BamHI. Logo após, o produto da ligação foi tratado com a enzima Klenow polimerase (GIBCO), para preenchimento das extremidades 5' protuberantes, e novamente ligado (figura 3). Após esta segunda ligação, o produto foi utilizado para eletroporar bactérias *E. coli* MC1061. Foram escolhidos 17 clones aleatórios para PCR de colônia, utilizando-se os iniciadores BamMFamyF e SalAmyR. 8 clones mostraram amplificação de tamanho compatível com o tamanho da α -amilase (1,8Kb).

O vetor YCplac33/amy poderá ser utilizado como um caça-promotor mais sensível. Foi observado que deve ser utilizado o meio YPD para visualização do halo produzido pela α -amilase (Cruz, 2006). Futuramente este vetor será utilizado para triar seqüências de *H. salinarum* com atividade promotora.

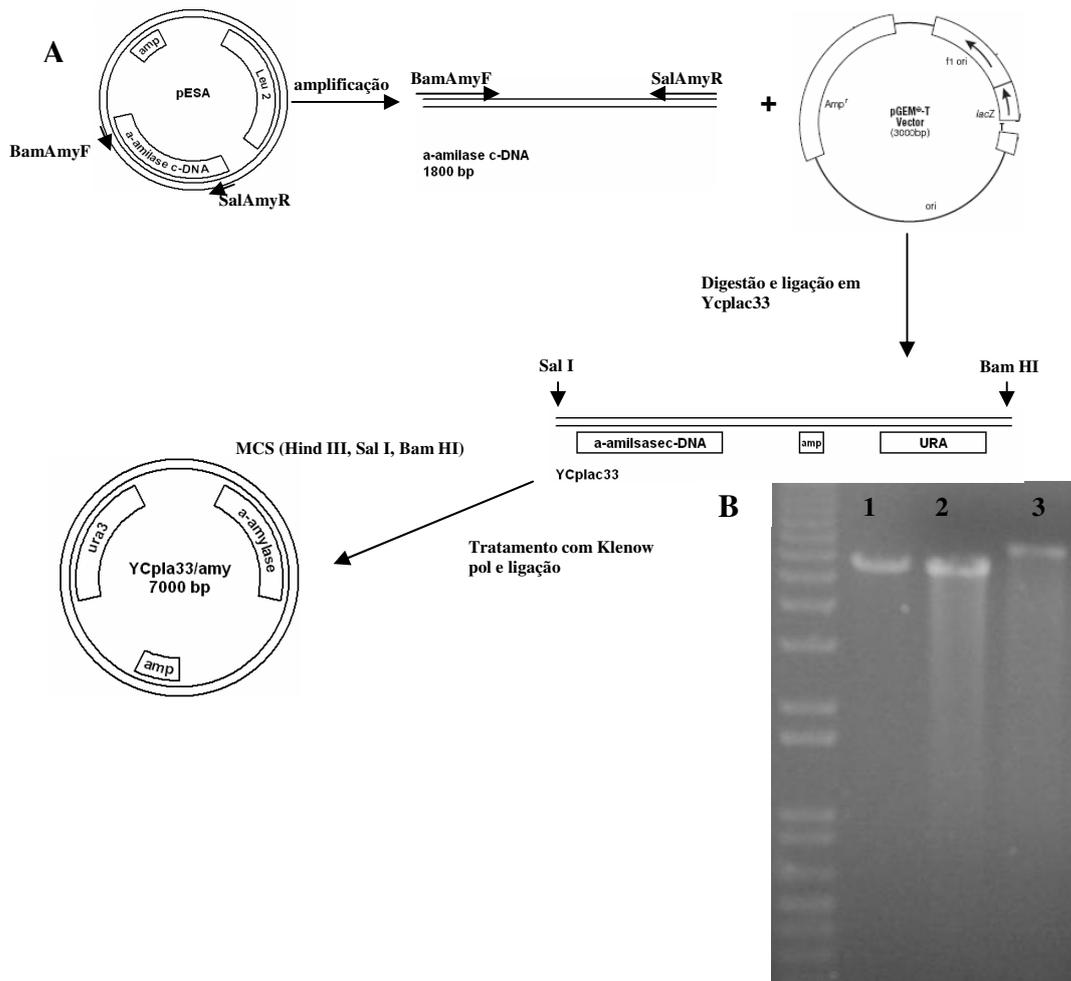


Figura 3- A -esquema de construção do vetor YCplac33/amy. B - gel de agarose 0,8% com vetor linearizado sem a adição de α -amilase (YCplac33 - ~5,5Kb - canaletas 1 e 2) e vetor com a adição de α -amilase linearizado (YCplac33/amy - ~7Kb - canaleta 3).

4.3. Rascunho do artigo: Construction of a new promoter-trap vector that harbors two fluorescent proteins cloned divergently as reporter genes.

Ana Raquel de Souza Monteiro and Mônica Bucciarelli Rodriguez*

Dep. de Biologia Geral, Inst. de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-091, Brazil

* Corresponding author: Tel.: 55(31) 3499-2602 Fax: 55(31) 3499-2567 e-mail: monicabr@icb.ufmg.br

Abstract

Promoters are very important for academic and biotechnological studies, especially for expression of heterologous proteins. Although there are several well characterized promoter systems, it is always interesting to seek for new promoters. In an attempt to develop a new tool to seek for promoters, we designed a new vector that harbors two fluorescent proteins cloned divergently as reporter genes.

Key words: promoters, reporter genes, EGFP, MCHERRY.

Introduction

An interesting approach in exploiting genomes is to identify new promoters. Promoter systems are very important in academic and biotechnological studies, either to express endogenous or heterologous proteins. It is very important to have an efficient promoter system regulating the expression of heterologous proteins and although there are several well characterized promoters, such as the yeast promoters Gal 1-10 (galactose inducible, Johnston & Carlson, 1992) and PGK (constitutive), it would be very interesting to have new ones, especially with a non expensive induction.

An efficient manner to seek for new promoters and characterize its activity is to use a vector that possesses a MCS (multiple cloning site) upstream of a reporter gene with no promoter activity of its own (Koloteva *et al.*, 1998). This kind of approach is very interesting, since by its use it is possible to isolate sequences with promoter activity that would be not found by algorithms, due to the lack of some promoter motive in the sequence. The transcriptional regulation harbors a lot of mysteries that have yet to be clarified. An example of an unexpected situation described is the transcriptional regulation performed by an intergenic transcript that is not translated and represses the SER3 gene expression in *S. cerevisiae* (Martens *et al.*, 2004).

The use of fluorescent proteins has been very widespread as reporter systems. The possibility of directly detect the reporter gene product by view of its intrinsic fluorescence has ease the studies. One of the most used reporter gene is GFP (green fluorescent protein) from the jellyfish *Aequorea victoria*. This protein emits green light with a wavelength of 510 nm when excited with UV light in 395 nm. The improved GFP, the EGFP (enhanced fluorescent protein) fluoresces 35 times more than the wild-type GFP (Comarck *et al.*, 1997).

This protein has been used for intracellular protein localization in *Schizosaccharomyces pombe* (Ding *et al.*, 2000) and characterization of the yeast *Debaryomyces hansenii* as a potential host for heterologous expression, besides characterization of the *D. hansenii* GPDd promoter. EGFP was also used as a tag to evaluate mouse sex chromosomes (Kobayashi *et al.*, 2006) and to monitor the Nha1p Na⁺/H⁺ antiporter protein from *S. cerevisiae* (Mitsui *et al.*, 2005). Therefore, EGFP is an important genetic tool that has been used from microorganisms to mammals.

Several fluorescent proteins have been identified in the past few years, including the GFP variants (blue, cyan and yellow) and used as reporter genes. One of the identified proteins is the red fluorescent protein (DsRed or dfFP583) from *Discosoma* coral (Matz *et al.*, 1999). This protein has an emission maximum at 583 nm which is an important characteristic, since it has a wavelength far from GFP and its variants emission wavelength, providing a distinct label and becoming a partner to be used together with GFP. However, the use of DsRed as a reporter gene showed a few problems like incomplete maturation and obligated tetramerization. Because that, the use of DsRed to subcellular localization is affected, since the tetramerization may interfere in the fusion protein localization and function. To overcome this problem a monomeric form of the DsRed protein was developed. The mRFP1 is a monomer that matures rapidly and exceeds DsRed excitation and emission wavelengths in 25 nm (Campbell *et al.*, 2002). The mRFP1 protein was subjected to an improvement in its brightness by screening a library in which the residues near the chromophore were randomized. Several clones containing mutations were isolated and after several manipulations, the final optimized clone mCherry was isolated. This protein has nearly complete disappearance of the absorbance peak at ~510 nm and an emission maximum at 610 nm (Shaner *et al.*, 2004).

In an attempt to develop an efficient tool to search for new promoter sequences, we designed a vector that harbors the *EGFP* and the *MCHERRY* genes cloned divergently and flanking a multiple cloning site. To evaluate its potential, we used the divergent promoter Gal1-10.

Material and methods

Bacterial and yeast strains

Escherichia coli MC1061 (Wertman *et al.*, 1986; Raleigh *et al.*, 1989) was used as the bacterial host for the constructions and propagation of the plasmids. *Saccharomyces cerevisiae* IH1784 (α *trip1 leu2 ura3 his4 can1*) was used as recipient strain.

Growth conditions and culture media

E. coli was grown in Luria-Bertani (LB) medium (tryptone 1,0%, yeast extract 0,5%, NaCl 1,0%) supplemented with ampicillin (to the final concentration of 0,1 mg/ml) at 37°C. *S. cerevisiae* was maintained in YPD medium (yeast extract 1,0%, peptone 2,0%, glucose 2,0%) at 30°C. For selective purposes, *S. cerevisiae* was grown in YNBD medium (YNB 0,17%, dextrose 2,0%, ammonium sulfate 0,5%) supplemented with , leucine, tryptophan, uracil, adenine, histidine and lysine when required. For selective purposes and activation of the GAL1-10 promoter, *S. cerevisiae* was grown in YNBG (YNB 0,17%, galactose 2,0%, ammonium sulfate 0,5%) and the required aminoacids.

Plasmids

The plasmids used in this work were YCplac33 (Gietz & Sugino, 1988), pYES2 (PROMEGA Corporation), pYESEGFP (Starling *et al.*, 2003), pGEM-T/MCHERRY (gently provided by Tércio Góes) and pCM 173 (Garí *et al.*, 1997).

Transformation procedures

Competent cells of *E. coli* MC1061 were prepared and transformed as described in Sambrook *et al.* (1989). Competent cells of *S. cerevisiae* IH1784 were prepared and transformed by the LiAc protocol as described in Gietz *et al.* (1995) and selected in YNBD w/o leucine medium (YNBD-leu).

DNA extractions

Plasmid isolation from bacteria was performed as described in Sambrook *et al.* (1989).

DNA manipulation

DNA digestion, dephosphorylation, ligation, “filling in” 5' overhangs of double-stranded DNA fragments with Klenow polymerase fragment [DNA polymerase I, large (Klenow) fragment], “filling in” of 5' overhangs of double-stranded DNA fragments and 3' overhang removal using T4 DNA polymerase were performed according to the supplier's recommendations.

DNA fragments purification

DNA fragments were recovered and purified by the glass wool following protocol: the region in the agarose gel containing the fragments was excised and introduced in to a small tube (0.5 ml). This tube had a hole in its bottom and glass wool inside of it, recovering the bottom. The tube was put inside of a bigger tube (1.5 ml) and centrifugated at 8.000 rpm by 15 seconds. The recovered liquid in the bigger tube, which contains the DNA, was precipitated by the ammonium acetate protocol (Sambrook *et al.*, 1989).

Results

Vector Construction

The *EGFP* gene was excised from the pYES.EGFP plasmid using the restriction enzymes *EcoR I* and *Xba I*. The *EGFP* gene was then cloned in to the pCM 173 plasmid lacking the *LacZ* gene and its promoter, which were excised using the restriction enzymes *Sal I* and *EcoR I*. This restriction generated two fragments with approximated sizes (5341 bp and 5076 bp), hence it would not be possible to distinguish between them. So the plasmid was also digested with *BamH I*, to split the not wanted fragment. The ligation generated an opened plasmid, since the ends *Sal I* and *Xba I* are not compatible. So the plasmid was treated with Klenow polymerase to “fill in” the 5’ overhanging ends and proceed to ligation (figure 1). The *EGFP* was ligated in to the pCM 173 vector in order to be excised containing the CYC terminator fused downstream to it.

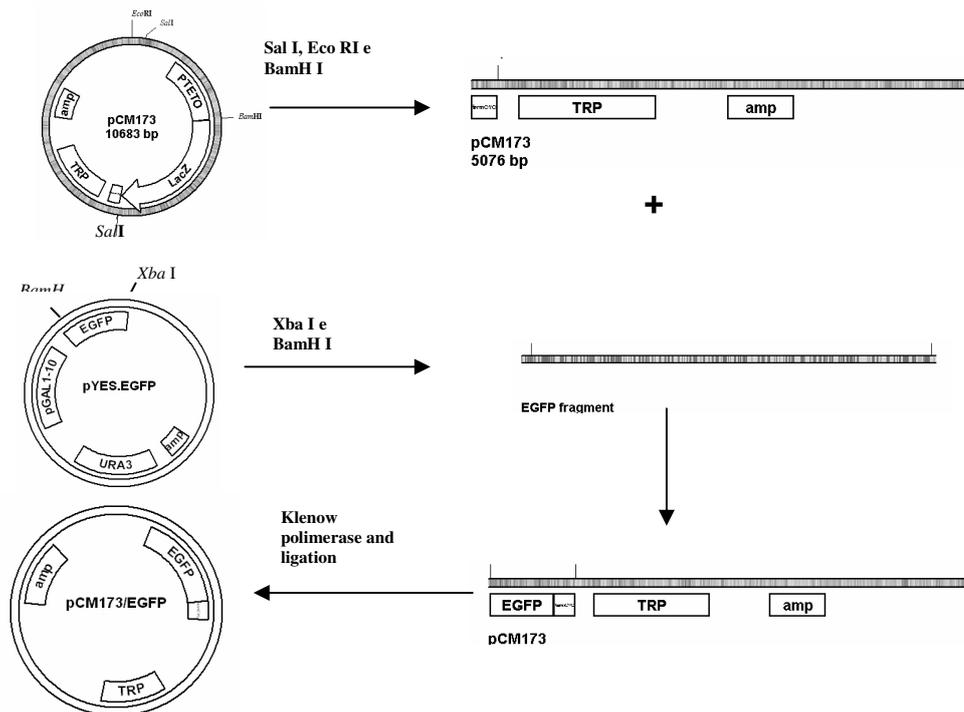


Figure 1. Vector construction, step 1. Excision of the *LacZ* gene with *Sal I*, *EcoR I* and *BamH I* and introduction of the *EGFP* gene upstream of the *CYC* terminator. The *EGFP* gene was excised from the plasmid pYES.EGFP with *BamH I* and *Xba I*. The *EGFP* fragment was ligated to the pCM173 plasmid that was circularized after Klenow polymerase treatment to blunt the DNA ends.

The *EGFP* gene fused to the *CYC* terminator was excised from the pCM173 plasmid with the restriction enzymes *BamH I* and *Hind III*, and introduced in to the same sites from YCplac 33, which is the backbone plasmid to the promoter-trap vector construction (figure2).

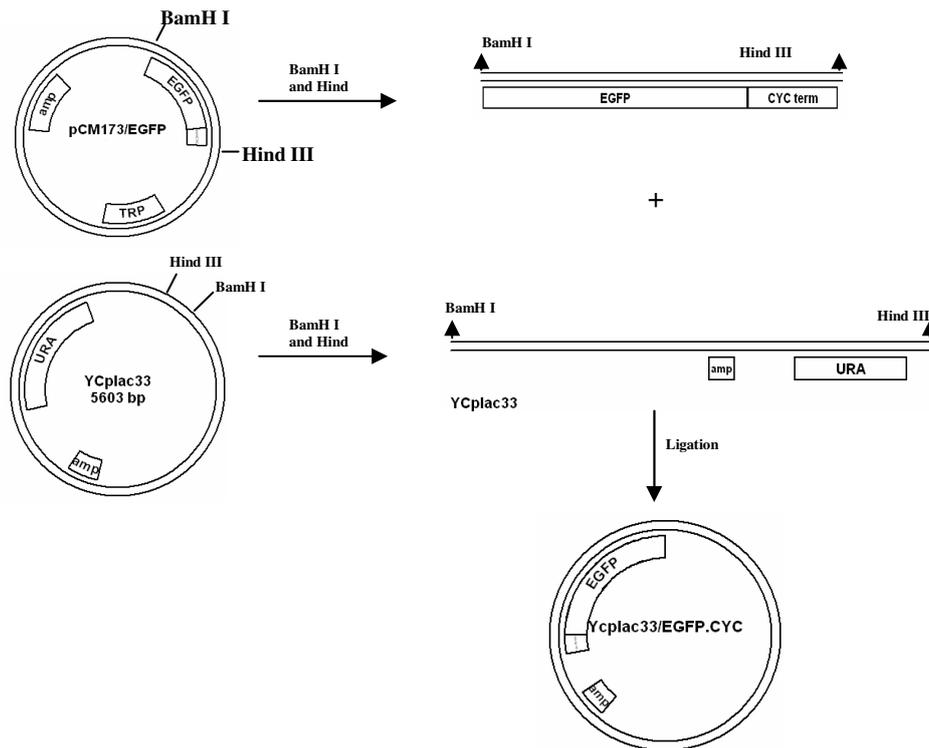


Figure 2. Vector construction, step 2. Introduction of the *EGFP* gene fused to the *CYC* terminator in to the backbone plasmid YCplac33. EGFP.CYC was excised with the enzymes *BamH I* and *Hind III* and introduced in to the *BamH I* and *Hind III* sites into the YCplac33 plasmid.

The GAL 1-10 promoter was used to test efficiency of the cloned reporter gene. The GAL1-10 promoter was excised from the plasmid pYES2 with *BamH I* and *Pst I*, and introduced in to the *BamH I* site in the YCplac33/EGFP.CYC plasmid (figure 3). *(construção ainda em andamento)*

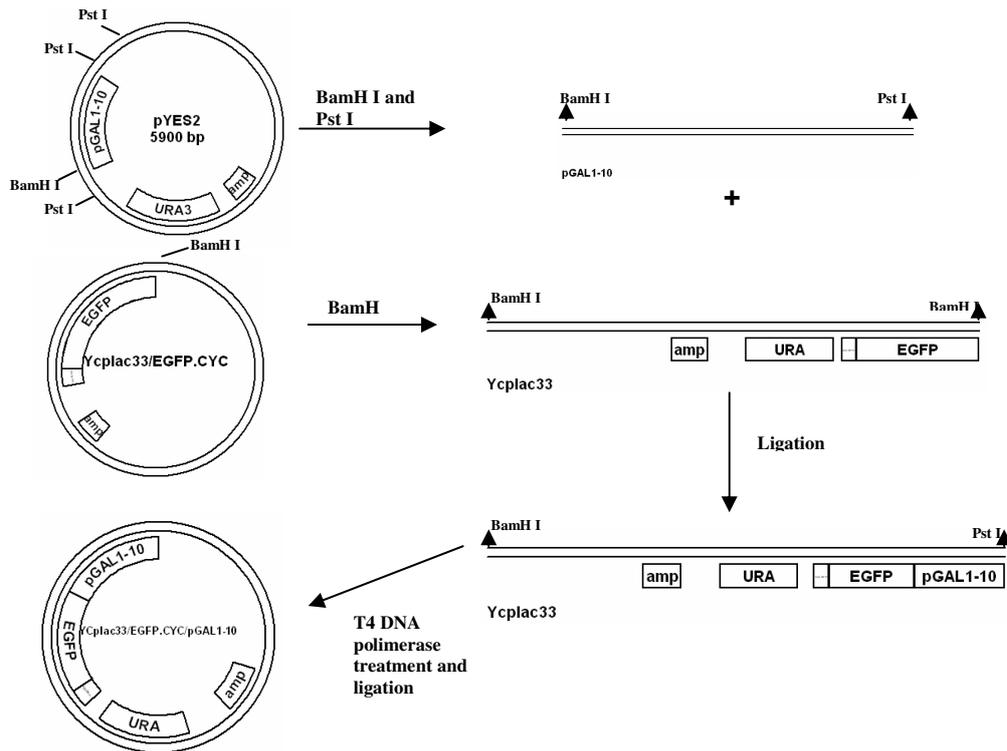


Figure 3- Introduction of the Gal1-10 promoter. The pGAL1-10 fragment was excised from the pYES2 plasmid using the restriction enzymes *BamH I* and *Pst I*. The fragment was ligated in to the *BamH I* site from the YCplac33/EGFP.CYC plasmid. The product of ligation was circularized after T4 DNA polymerase treatment.

O próximo passo será a introdução do gene da proteína fluorescente vermelha fusionada ao terminador CYC. A proteína fluorescente mCherry foi gentilmente cedida pelo aluno de doutorado do Departamento de Bioquímica Tércio Góes, clonada ao vetor pGEM-T. Esta foi excisada pelas enzimas *Xho I* e *Pst I*. O fragmento será introduzido no plasmídeo pCM173 sem o gene repórter *LacZ*, para assim como o gene *EGFP*, ser excisado em fusão com o terminador CYC. O fragmento contendo o gene *MCHERRY* fusionado ao terminador CYC será excisado pela enzimas *Sac I* e *Pvu II* e será clonado nos sítios *Sac I* e *Pvu II* do vetor YCplac33/EGFP.CYC e do vetor YCplac33/EGFP.CYC/pGAL1-10 (figuras 4 e 5).

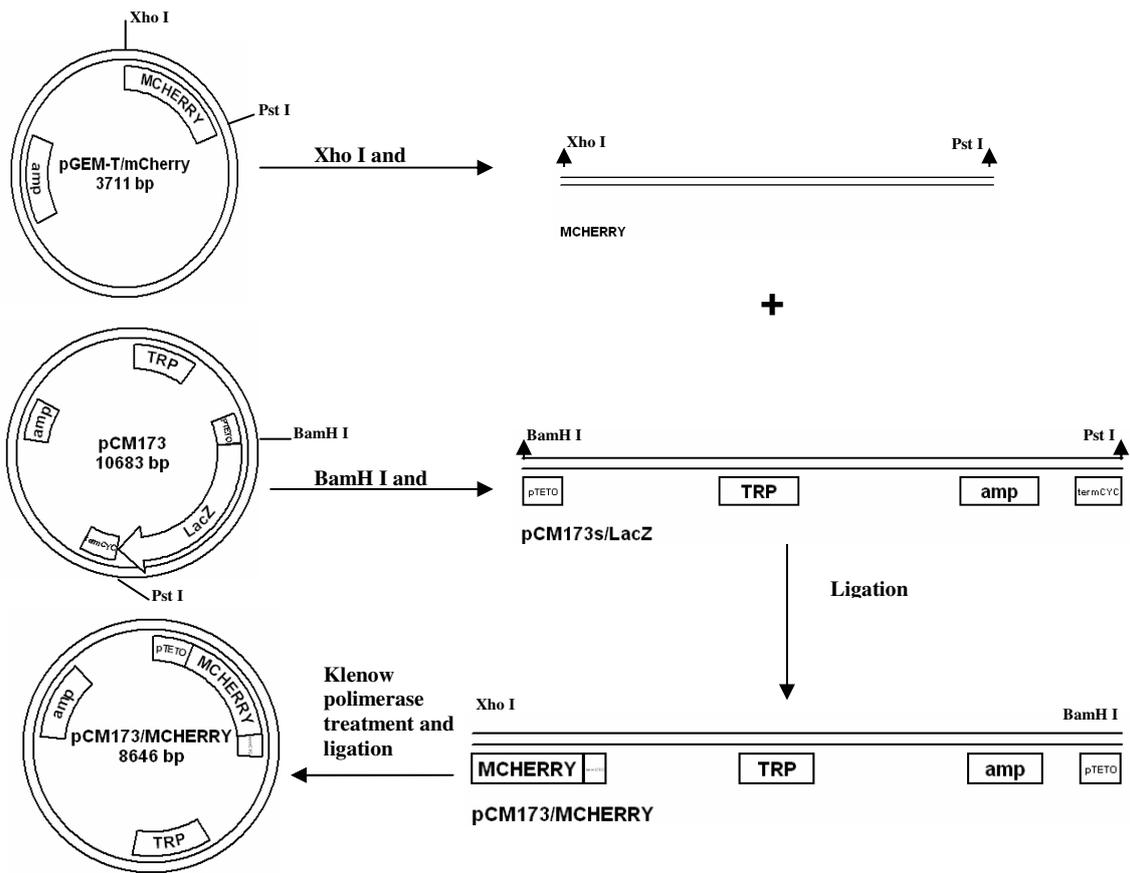


Figura 4 – Excisão do fragmento contendo o gene MCHERRY do vetor pGEM-T com as enzimas Xho I e Pst I. Introdução do fragmento no vetor pCM 173, sem *LacZ*, nos sítios BamH I e Pst I, com circularização do vetor por ligação precedida de tratamento com a enzima Klenow polimerase.

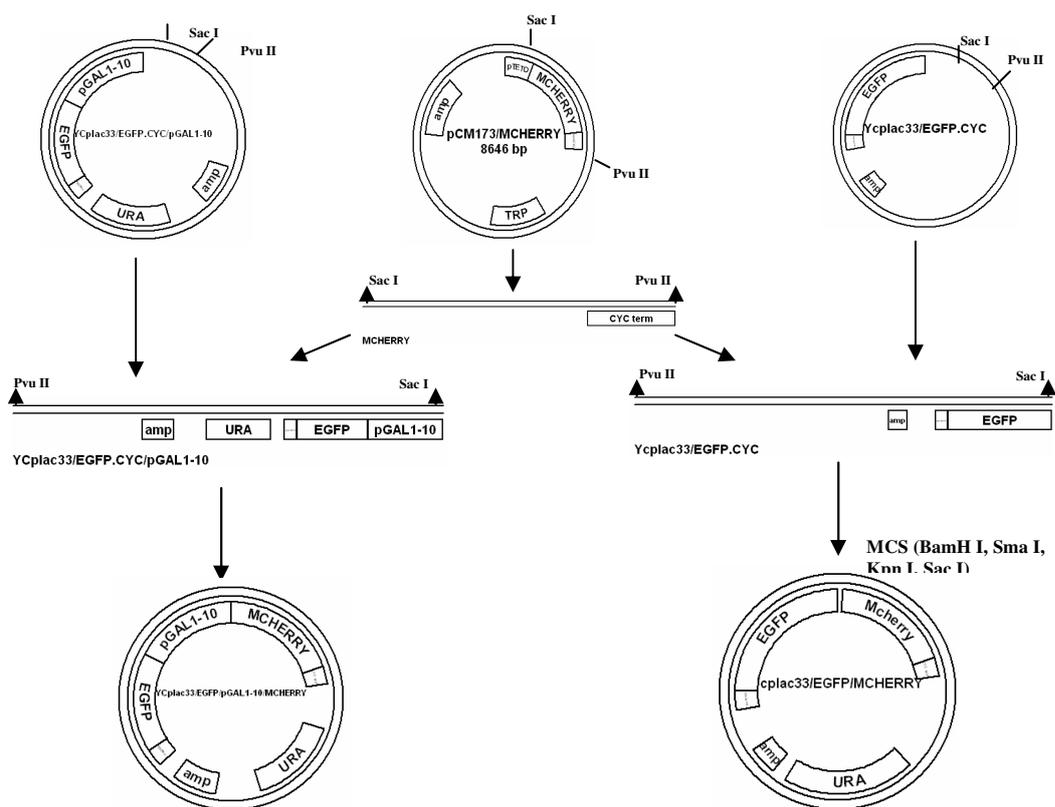


Figura 5- Retirada do fragmento contendo o gene MCHERRY fusionado ao terminador CYC com as enzimas Sac I e Pvu II e introdução dos fragmentos nesses mesmos sites dos vetores YCplac33/EGFP.CYC e YCplac33/EGFP.CYC/pGAL1-10.

Após a construção de todos os vetores, estes serão utilizados para transformar a levedura *S. cerevisiae* IH 1784. Deverá ser verificada ausência de qualquer fluorescência na levedura transformada com o vetor YCplac33/EGFP/MCHERRY e a fluorescência das duas proteínas presentes no vetor YCplac33/EGFP/pGAL1-10/MCHERRY. Para isso serão utilizados fluorímetro e/ou microscópio de fluorescência .

References

1. Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y. A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**, 7877-7882 (2002).
2. Comarck, B. P., Valvidia, R. H., Falkows, S. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*. **143**, 303–311(1997).
3. Ding, D., Tomita, Y., Yamamoto, A., Chikashige, Y., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. Large-scale screening of intracellular protein localization in living fission yeast cells by the use of a GFP-fusion genomic DNA library. *Genes to Cells*. **5**, 169-190 (2000).
4. Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., Herrero, E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **13**, 837-848 (1997).
5. Gietz, R. D., Sugino, A. New yeast- *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction. *Gene*. **74**, 527-535 (1988).
6. Gietz, R. D., Schiestl, R. H. Transforming yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. **5**, 255-269 (1995).
7. Koloteva, N., Hughes, J. M. X., McCarthy J. E. G. Reporter genes and their use in studying yeast gene expression. *Methods in Microbiology*. **26**, 141-159 (1998).
8. Johnston, M., Carlson, M. Regulation of carbon and phosphate utilization. *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression*. **2**, 193-281 (1992).
9. Kobayashi, S., Isotani, A., Mise, N., Yamamoto, M., Fujihara, Y., Kaseda, K., Nakanishi, T., Ikawa, M., Hamada, H., Abe, K., Okabe, M. Comparison of Gene

- Expression in Male and Female Mouse Blastocysts Revealed Imprinting of the X-Linked Gene, *Rhox5/Pem*, at Preimplantation Stages. *Current Biology*. **16**, 166–172 (2006).
10. Martens, J. A. La prade, L., Winston, F. Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene. *Nature*. **429**, 571-574 (2004).
 11. Matz, M. V. Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. g., Markelov, M. L., Lukyanov, S. A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology*. **17**, 969-973 (1999).
 12. Mitsui, K. Yasui, H., Nakamura, N., Kanazawa, H. Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na⁺/H⁺ antiporter Nha1p: Implications for its antiporter activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. Article in Press.(2005)
 13. Raleigh, E.A., et al. *Current Protocols in Molecular Biology eds.* Ausubel, F.M. et al. *Publishing Associates and Wiley Interscience*; New York. Unit 1.4.(1989).
 14. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* *Cold Spring Harbor Press*. **2**, 2100p (1989).
 15. Starling, A. L., Ortega, J. M., Gollob, K. J., Vicente, E. J., Andrade-Nóbrega, G. M., Rodriguez, M. B. Evaluation of alternative reporter genes for the yeast two-hybrid system. *Genetics and Molecular Research*. **2**, 124-135 (2003).
 16. Shaner, N. C. Campbell, R. E., Stenbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., Tsien, R. Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. **22**, 1567-1572 (2004).
 17. Wertman, K. F. et al. *Gene*. **49**, 253-262 (1986)

4.4 Avaliação de complexos de tetraciclina com os metais paládio e platina, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

Tetraciclinas são antibióticos de amplo espectro e baixa toxicidade. Entretanto, nas últimas décadas, foram selecionadas várias espécies bacterianas resistentes a esses antibióticos. Uma das formas de resistência bacteriana a tetraciclina, é a conferida pelo Tn 10. Este transposon codifica, através do gene *tetA*, a proteína TetA, que exporta a tetraciclina para fora da célula. A transcrição de *tetA* é reprimida pela proteína repressora TetR, codificada por *tetR*, sendo induzida pela presença de tetraciclina, que se liga à proteína repressora e a inativa (McMurry *et al.*, 2002).

Com o objetivo de encontrar novos compostos que sejam ativos em bactérias resistentes à tetraciclina, o grupo de pesquisa da Profa. Elene Pereira Maia sintetizou agentes da família das tetraciclinas coordenados com íons metálicos. As atividades destes complexos foram analisadas em linhagens sensíveis e resistentes da bactéria *Escherichia coli*, com a supervisão da Profa. Mônica Bucciarelli Rodriguez e do Prof. Edmar Chartone-Souza.

As linhagens sensíveis foram: *E. coli* HB 101 e *E. coli* ATCC 25922. A linhagem resistente utilizada foi: *E. coli* HB101 contendo o plasmídeo pBR 322 que confere resistência a ampicilina e tetraciclina. O plasmídeo pBR 322 possui o gene que codifica a proteína TetA com transcrição constitutiva e não há a presença da proteína repressora TetR. Os antibióticos utilizados para análise foram: tetraciclina, doxiciclina e clortetraciclina e os complexos tetraciclina paládio (II) –TcPD, doxiciclina paládio (II) –DoxPd e clortetraciclina paládio (II) – ClorPd. Foram definidos pela aluna de iniciação científica Elaine de Andrade Azevedo, com o meu auxílio, os MICs (concentrações inibitórias mínimas) e um FR (fator de resistência), que é o MIC da linhagem resistente (*E. coli* HB101/ pBR322) dividido pelo MIC da linhagem sensível parental (*E. coli* HB101) (Guerra *et al.*, 2005).

As análises mostraram que o complexo TcPd é 16 vezes mais potente do que a tetraciclina livre e que o complexo DoxPd é duas vezes mais eficiente do que a doxiciclina livre. Entretanto o complexo ClorPd não apresentou melhor atividade do que a clortetraciclina livre (Guerra *et al.*, 2005). A síntese de complexo de tetraciclina com outro metal, platina (Pt), fora feita anteriormente e este complexo se mostrou 6

vezes mais eficiente que a tetraciclina livre na linhagem resistente de *E. coli* HB101/pBR322 (Chartone-Souza *et al.*, 2005).

A partir desses resultados, MICs de vários complexos foram realizados, e foi avaliada também uma linhagem resistente à tetraciclina com a ação do repressor *tetR*, *E. coli* MC1061/F'::Tn10 (*tet^r*). Esta linhagem foi gerada por conjugação bacteriana tendo como doadora a linhagem *E. coli* XL1 Blue. Os complexos analisados foram TcPd, TcPt, DoxPd, DoxPt, OxiPd, OxiPt, ClorPd e ClorPT. Os complexos paládio (Pd) e platina (Pt) da tetraciclina foram mais potentes que a tetraciclina livre na inibição das linhagens resistentes, assim como os complexos de doxiciclina, comparados à doxiciclina livre.

Procurando avaliar a ação destes complexos, foram realizados pela aluna Elaine de Andrade Azevedo e por mim, dois experimentos. Foi realizado um ensaio de ativação do gene repórter *LacZ* na levedura IH 1784 contendo o plasmídio pCM 173, para se avaliar a capacidade dos complexos de tetraciclina de se ligarem ao repressor *tetR* (figura 3). Foram feitas também curvas de crescimentos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* IH 1784 na presença dos complexos de tetraciclina (figuras 4 a 11), pois assim seria possível verificar se a presença destes antibióticos seria tóxica, afetando de alguma forma o tempo de dobramento desta levedura (tabela 1).

A ativação do gene repórter foi avaliada através de um ensaio de medida das unidades de β – galactosidase (conforme descrito no item 3.3.7 – *Ensaio de degradação de ONPG* – do Material e Métodos), para verificar o poder de ligação dos complexos ao repressor *tetR*. Este ensaio foi realizado utilizando-se o plasmídio pCM 173 (figura 1) desenvolvido por Garí e colaboradores (1997). Esse grupo de pesquisa desenvolveu uma série de vetores de expressão de leveduras, contendo o sistema promotor regulado por tetraciclina. Este sistema possui o operador tetraciclina (*tetO*) e o transativador tTA [domínio de ativação VP16 do vírus herpes simplex fusionado ao repressor induzível por tetraciclina (*tetR*) do operon de resistência a tetraciclina codificado pelo Tn10]. Através deste sistema a transcrição do gene em fusão com o promotor é bloqueada na presença de tetraciclina, pois esta se liga ao repressor *tetR*, impedindo a ligação do transativador tTA ao operador *tetO* (figura 2). No seu trabalho, Garí e colaboradores (1997) examinaram a eficiência deste sistema na presença de tetraciclina, doxiciclina, oxytetraciclina e clortetraciclina. Todos os antibióticos foram eficientes na repressão da transcrição do gene repórter *LacZ*, em fusão com o sistema promotor. Foi verificado um

melhor desempenho de doxiciclina em comparação com os outros membros da família das tetraciclina (Garí *et al.*, 1997).

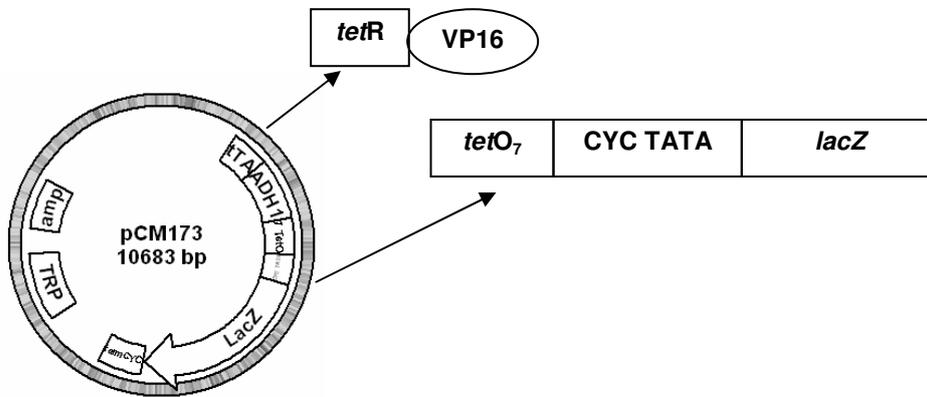
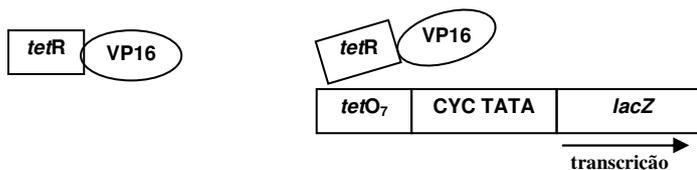


Figura 1 – Plasmídeo pCM 173 com sistema promotor regulado por tetraciclina. Promotor *tetO*-CYC1, gene repórter *LacZ* e transativador tTA (VP16/*tetR*).

Sistema sem tetraciclina



Sistema com tetraciclina

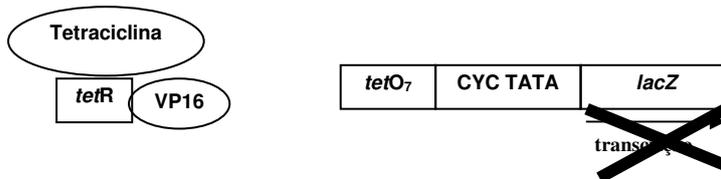


Figura 2 – Sistema regulado por tetraciclina. Na ausência de tetraciclina o transativador tTA se aproxima do promotor *tetO*-CYC1, permitindo a transcrição do gene repórter *LacZ*. Na presença de tetraciclina, esta se liga ao repressor *tetR* presente no transativador tTA, impedindo a ligação deste ao promotor *tetO*-CYC1 e consequentemente impedindo a transcrição do gene repórter *LacZ*.

Para este experimento todos os antibióticos foram utilizados na concentração de 20.08 $\mu\text{mol/L}$ e a incubação foi de 3 horas. Todos os complexos (TcPd e TcPt) se ligaram ao repressor *tetR* de forma eficiente, reduzindo assim a quantidade de β -galactosidase presente nas leveduras (figura 3). Sendo assim, podemos afirmar que a ação dos complexos de tetraciclina sobre o repressor *tetR*, ocorre da mesma forma que com a tetraciclina livre, já que os complexos mostraram se ligar eficientemente ao

repressor *tetR* do sistema promotor regulado por tetraciclina, presente no plasmídio pCM 173.

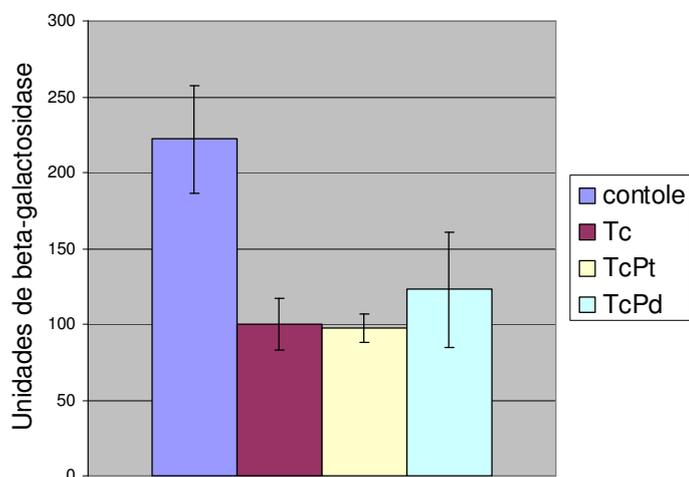


Figura 3 – Dosagem de unidades de β -galactosidase na levedura IH 1784 transformada com o plasmídio pCM 173. O ensaio foi realizado com as células de levedura em fase exponencial de crescimento. Após 3 horas de crescimento foram separadas 4 amostras da cultura. À uma das amostras não se adicionou antibiótico algum (controle negativo indicado pela cor lilás). À uma segunda amostra adicionou-se 20.08 $\mu\text{mol/L}$ de tetraciclina (controle positivo indicado pela cor vinho), a outras duas amostras adicionou-se 20.08 $\mu\text{mol/L}$ de TcPt e TcPd separadamente (indicadas pelas cores amarelo e azul claro respectivamente).

As curvas de crescimentos feitas para se avaliar a toxicidade dos complexos foram realizadas com contagens de hora em hora. Foram utilizados os seguintes antibióticos nas seguintes concentrações: tetraciclina livre (20.08, 366.5 e 133 $\mu\text{mol/L}$), complexo TcPd (20.08 e 133 $\mu\text{mol/L}$) e complexo TcPt (20.08 e 66.5 $\mu\text{mol/L}$), observando-se que as concentrações 20.08, 66.5 e 133 $\mu\text{mol/L}$ são equivalentes a 10, 32 e 64 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina, respectivamente.

Foram feitos gráficos com os dados correspondentes à fase logarítmica de crescimento (figuras 4 a 11) utilizando-se os programas Origin para obtenção da regressão linear e Microsoft Excel quando a regressão linear não foi possível. A partir dos gráficos foram determinados os tempos de dobramento da levedura (tabela 1).

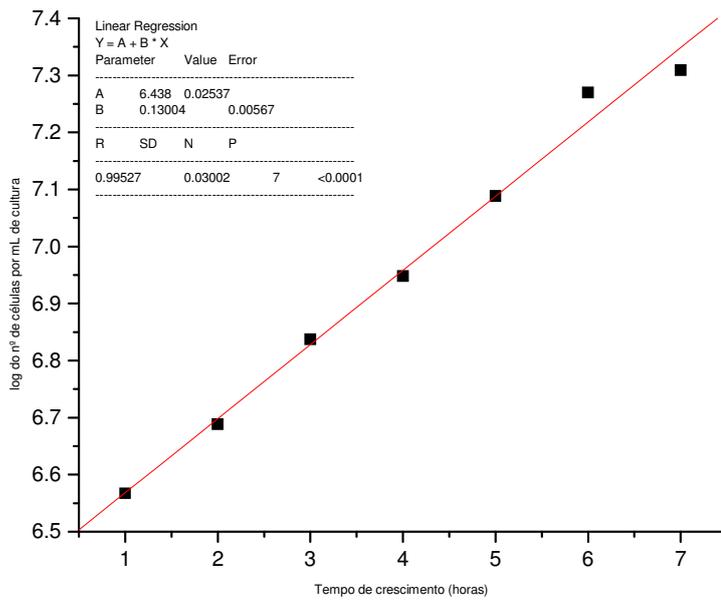


Figura 4: Regressão linear da fase logarítmica da curva de crescimento da levedura IH 1784 inoculada em meio completo (YPD) sem a presença de antibiótico.

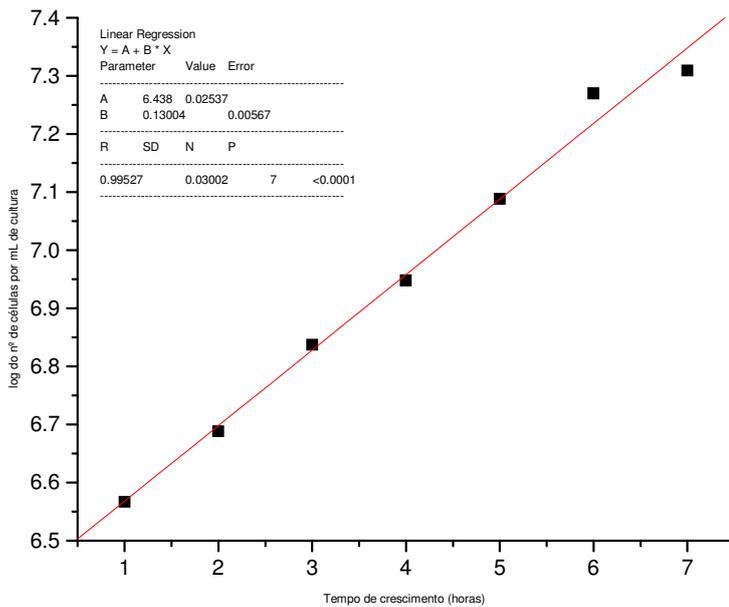


Figura 5: Regressão linear da fase logarítmica da curva de crescimento da levedura IH 1784 inoculada em meio completo (YPD) na presença de 20.08 µmol/L de tetraciclina.

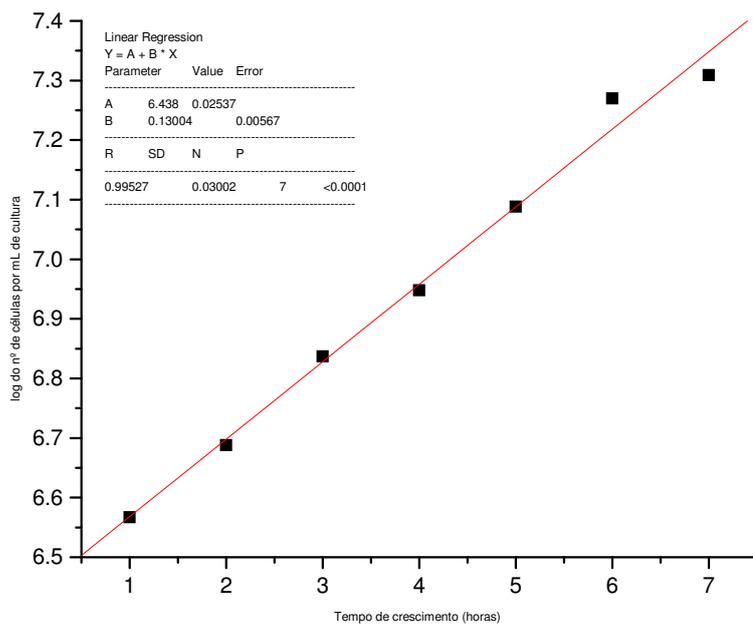


Figura 6: Regressão linear da fase logarítmica da curva de crescimento da levedura IH 1784 inoculada em meio completo (YPD) na presença de 66.5 µmol/L de tetraciclina.

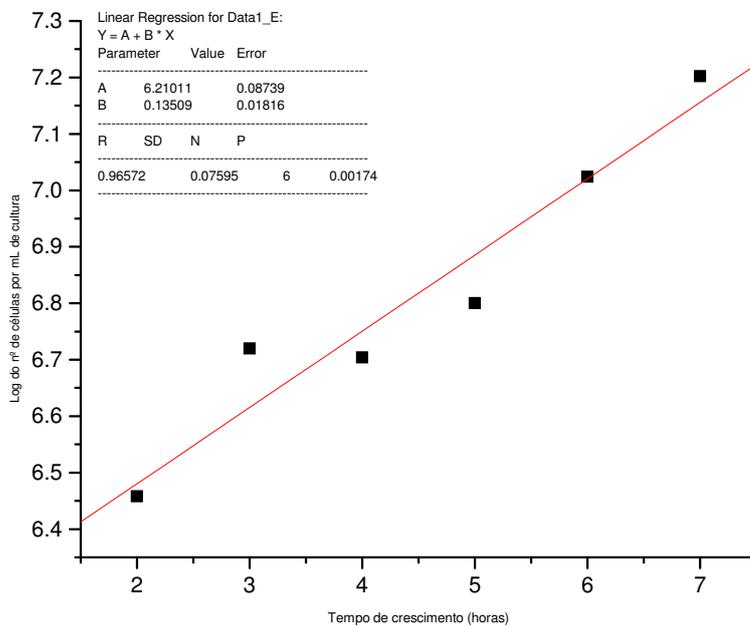


Figura 7: Regressão linear da fase logarítmica da curva de crescimento da levedura IH 1784 inoculada em meio completo (YPD) na presença de 133 µmol/L de tetraciclina.

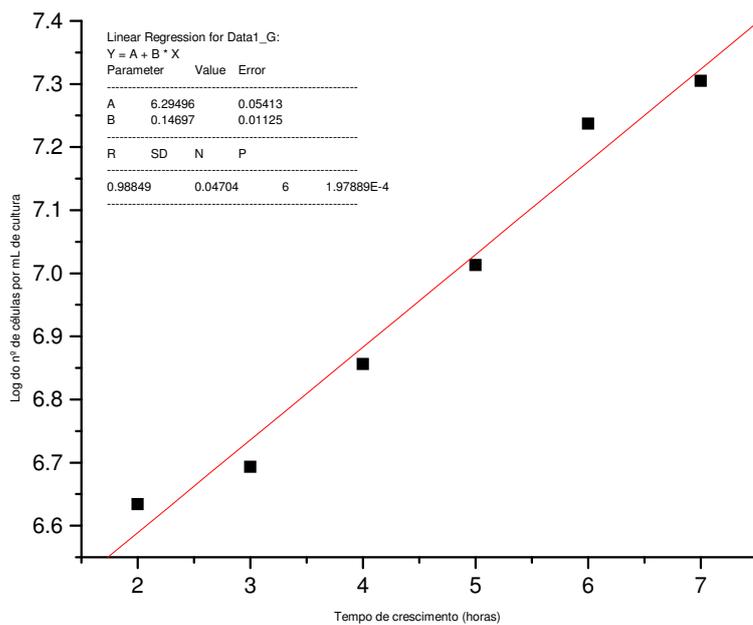


Figura 8: Regressão linear da fase logarítmica da curva de crescimento da levedura IH 1784 inoculada em meio completo (YPD) na presença do complexo de tetraciclina com paládio na concentração de 20.08 $\mu\text{mol/L}$.

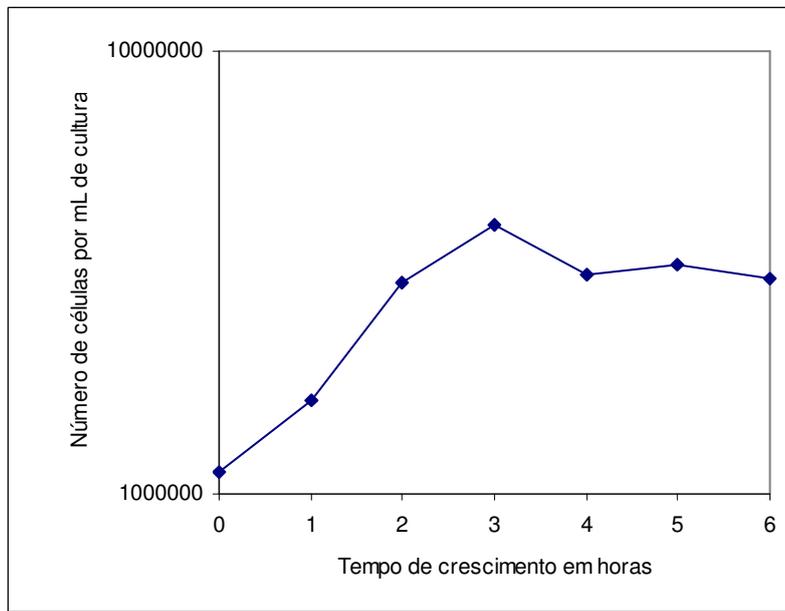


Figura 9: Curva de crescimento da levedura IH 1784 inoculada em meio completo (YPD) na presença do complexo de tetraciclina com paládio na concentração de 133 $\mu\text{mol/L}$.

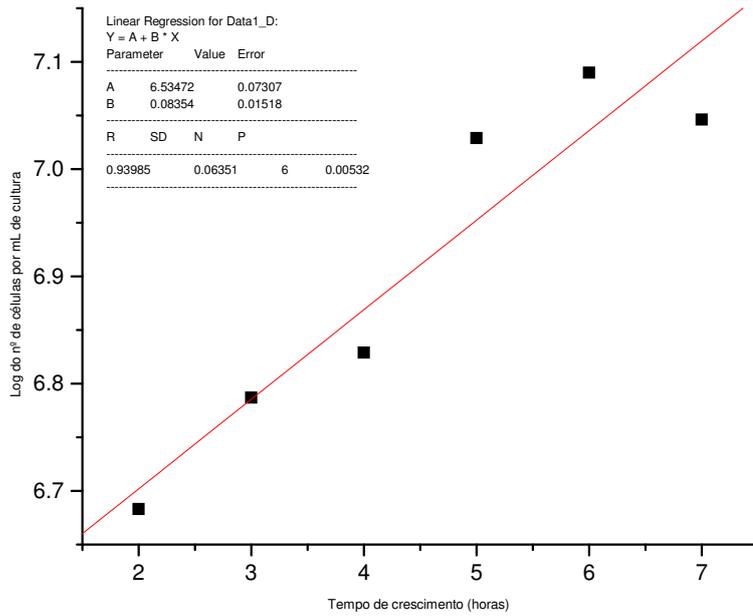


Figura 10: Regressão linear da fase logarítmica da curva de crescimento da levedura IH 1784 inoculada em meio completo (YPD) na presença do complexo de tetraciclina com platina na concentração de 20.08 µmol/L.

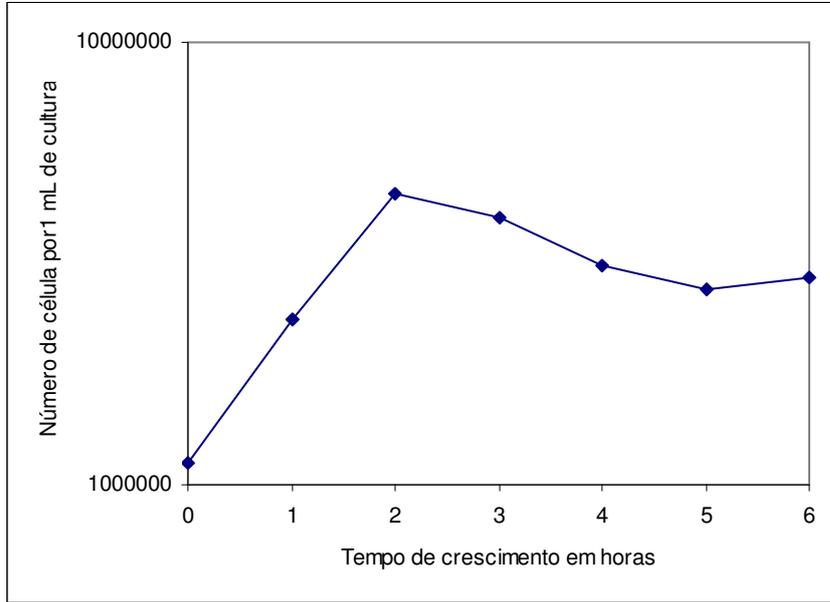


Figura 11: Curva de crescimento da levedura IH 1784 inoculada em meio completo (YPD) na presença do complexo de tetraciclina com platina na concentração de 66.5 µmol/L.

Concentração:	Tempo de dobramento da levedura em horas			
	0 $\mu\text{mol/L}$	20.08 $\mu\text{mol/L}$	66.5 $\mu\text{mol/L}$	133 $\mu\text{mol/L}$
Tc	1,5	1,5	1,5	1,5
TcPd	1,5	1,5	-	Não calculado
TcPt	1,5	2,0	Não calculado	-

Tabela 1 – Tempo de dobramento da levedura *S. cerevisiae* IH 1784 na presença de Tc, TcPd e TcPt. - : não testado.

O tempo de dobramento da levedura nas concentrações mais altas dos complexos não foi calculado, pois foi verificada uma queda no número de leveduras a partir de aproximadamente 3 horas de incubação (figuras 9 e 11). Entretanto, não foi verificada qualquer alteração na morfologia das células. Levantou-se, então, a hipótese de que os complexos em altas concentrações estariam lisando as células, já que o número de leveduras caiu e normalmente não ocorre lise das células de levedura quando estas morrem. Existe também a possibilidade dos metais sozinhos serem tóxicos para levedura, apesar de já ter sido visto que estes metais sozinhos não são tóxicos em *E. coli* (Chartone-Souza *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2005). É necessário fazer uma nova curva de crescimento, com as leveduras expostas aos sais dos metais paládio e platina. Para verificar a hipótese de lise das leveduras, iremos transformar a levedura *S. cerevisiae* IH 1784 com um plasmídeo contendo o gene que codifica a proteína fluorescente EGFP e colocá-la em crescimento na presença de 66.5 $\mu\text{mol/L}$ de TcPt e 133 $\mu\text{mol/L}$ de TcPd. Após 3 horas de incubação vamos avaliar a presença da proteína EGFP no sobrenadante. Caso seja visto que realmente ocorre lise das leveduras na presença de altas concentrações dos complexos, se esclarecerá a forma de toxicidade destes complexos em levedura.

5. Discussão Geral

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada com sucesso na procura por seqüências de *Halobacterium salinarum* envolvidas no mecanismo de tolerância a sal. As seqüências isoladas foram capazes de aumentar a tolerância de *S. cerevisiae* em relação à toxicidade catiônica, entretanto não foram capazes de aumentar a tolerância ao estresse osmótico produzido por concentrações maiores de sorbitol. Para que isso acontecesse, ela teria que ser capaz de produzir uma quantidade maior de glicerol, osmólito protetor produzido por *S. cerevisiae* quando exposta à altas concentrações salinas. Já foi observado que uma superexpressão do gene *GPD1* de *S. cerevisiae* é capaz de aumentar a sua tolerância a sal (Hirasawa *et al.*, 2005).

Estudos de análise da resposta transcricional de *S. cerevisiae* por DNA microarray mostraram que durante o estresse salino ocorre a indução de genes com várias funções como transporte de açúcar e fosforilação (*STL1*, *GLK1*), metabolismo de glicerol (*GPD1*, *GPD2*), metabolismo de trealose (*TSL1*, *TPS1*), metabolismo de glicogênio (*GSY2*, *GAC1*), resposta a estresse (*SED5*, *PAI3*), proteínas ribossômicas (*RPS10B*, *RPL35A*), homeostase iônica (*VMA6*, *VPH1*, *ENA1*), metabolismo de aminoácidos (*YPS1*, *ASN2*) e vários outros (Posas *et al.*, 2000, Hirasawa *et al.*, 2005). Ou seja, a resposta transcricional de *S. cerevisiae* ao estresse salino é extremamente variada, não se restringindo apenas a transportadores de íons e produção de osmoprotetores. Sendo assim, os clones de levedura obtidos no nosso trabalho podem estar expressando seqüências de *H. salinarum* com funções inesperadas, como metabolismo de aminoácidos, em conjunto com seqüências envolvidas no transporte de íons.

A biblioteca genômica para procura de seqüências com atividade promotora de *H. salinarum* não obteve sucesso. Entretanto, vários fatores podem ter afetado o sucesso desse trabalho. Apesar do número de clones obtidos ter sido considerado suficiente para cobertura total do genoma várias vezes, é possível que o genoma não tenha realmente sido totalmente coberto. Algumas seqüências podem ser mais difíceis de serem clonadas do que outras. É possível também que seja necessário um tempo maior de incubação das leveduras para se verificar a atividade promotora, além de uma quantidade muito menor de amido na placa (0,1% de amido). As particularidades do sistema utilizado impõem limitações, como a quebra do amido por glicoamilase em apenas um ponto. Talvez, com a utilização de outros caça-promotores, seja possível localizar seqüências de *H. salinarum* com atividade promotora. O vetor caça-promotor com o gene da α -amilase,

seria uma ferramenta mais sensível para detecção de tais seqüências, afinal esta é capaz de quebrar o amido em várias partes, podendo ser encontradas seqüências com atividade promotora fraca, que podem não ter sido vistas na primeira triagem. O vetor de proteínas fluorescentes poderá também ser utilizado nesta abordagem, assim como em outras triagens de promotores de outros organismos. O fato deste vetor possuir as duas proteínas fluorescentes clonadas divergentemente, permite uma maior varredura de qualquer genoma.

S. cerevisiae também se mostrou eficiente na avaliação dos complexos de tetraciclina. Os ensaios com ONPG foram definitivos para avaliar a capacidade dos complexos de se ligarem ao repressor *tetR* de Tn10. Sendo assim, os complexos de tetraciclina provavelmente possuem os mesmos alvos de ataque da tetraciclina livre, já que se ligam eficientemente a repressor *tetR*. Ficou evidenciada a possibilidade de toxicidade dos complexos em organismo eucarioto, entretanto são necessários mais experimentos para verificar a forma de toxicidade dos complexos em levedura.

Enfim, a levedura *S. cerevisiae*, conhecida por suas várias características que fazem dela um excelente organismo modelo, se mostrou eficiente em estudos que exploram organismos procariotos e na validação de novos antibióticos.

6. Referências

1. Albertsen, H. M., Abderrahim, H., Cann, H. M., Dausset, J., Paslier, D. L., Cohen, D. Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **87**, 4256-4260 (1990).
2. Allers, T., Mevarech, M. Archaeal genetics-the third way. *Nature Reviews Genetics*. **6**, 58-73 (2005).
3. Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A., Blumwaldt, E. Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiport in *Arabidopsis*. *Science*. **285**, 1256-1258 (1999).
4. Astolfi-Filho, S., Galembeck, E. V., Faria, J. B., Frascino, A. C. S. Stable yeast transformants that secrete functional α -amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. *Biotechnology*. **4**, 311-315 (1986).
5. Brown, J. R., Doolittle, W.F. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiology and Molecular biology Reviews*. **61**, 456-502 (1997).
6. Byrne, L. J., O'Callaghan, K. J., Tuite, M. F. Heterologous Gene Expression in Yeast. *Methods in molecular Biology*. **308**, 51-64 (2005).
7. Chartone-Souza, E., Loyola, T. L., Bucciarelli-Rodriguez, M., Menezes, M. Ã. B. C., Rey, N. A., Pereira-Maia, E. C. Synthesis and characterization of a tetracycline-platinum(II) complex active against resistant bacteria. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **99**, 1001-1008(2005).
8. Cheng, J., Wan, D., Gu, J., Gong, Y., Yang, S., Hao, D., Yang, L. Establishment of a yeast system that stably expresses human cytochrome P450 reductase: Application for the study of drug metabolism of cytochrome P450s in vitro. *Protein Expression and Purification*. Article in Press (2006).
9. Cruz, R. C. Genes repórteres alternativos para sistemas de duplo-híbrido em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação, Mestrado em Genética, UFMG (2006).
10. Ding, D., Tomita, Y., Yamamoto, A., Chikashige, Y., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. Large-scale screening of intracellular protein localization in living fission yeast cells by the use of a GFP-fusion genomic DNA library. *Genes to Cells*. **5**, 169-190 (2000).
11. Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., Herrero, E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **13**, 837-848 (1997).

12. Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L., Fink, G. R. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **96**, 1480-1485 (1999).
13. Gietz, R. D., Sugino, A. New yeast- *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction. *Gene*. **74**, 527-535 (1988).
14. Gietz, R. D., Schiestl, R. H. Transforming yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. **5**, 255-269 (1995).
15. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. Life with 6000 genes. *Science*. **274**, 546-567 (1996).
16. Gregor, D., Pfeifer, F. *In vivo* analyses of constitutive and regulated promoters in halophilic archaea. *Microbiology*. **151**, 25-33 (2005).
17. Guerra, W., Azevedo, E. A., Monteiro, A. R. S., Bucciarelli-Rodriguez, M., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. M., Fontes, A. P. S., Moyec, L. L., Pereira-Maia, E. C. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three palladium(II) complexes of tetracyclines. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **99**, 2348-2354 (2005).
18. Guthrie, C., Fink, G. R. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology*. **194**, (1991).
19. Hoffman, C. S., Winston, F. A ten-minute DNA preparation efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. **57**, 267-272 (1987).
20. Jidenko, M., Nielsen, R. C., Sorensen, T. L., Moller, J. V., Maire, M., Nissen, P., Jaxel, C. Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**, 11687-11691 (2005).
21. Johnston, M., Carlson, M. Regulation of carbon and phosphate utilization. *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression*. **2**, 193-281 (1992).

22. Kellis, M., Birren, B. W., Lander, E. S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. **428**, 617-624 (2004).
23. Kim, M. W., Kim, E. J., Kim, J., Park, J., Oh, D., Shimma, Y., Chiba, Y., Jigami, Y., Rhee, S. K., Kang, H. A. Functional Characterization of the *Hansenula polymorpha* *HOC1*, *OCH1*, and *OCR1* Genes, as Members of the Yeast *OCH1* Mannosyltransferase Family involved in Protein Glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry*. Article in Press (2006).
24. Klis, F. M., Ram, A. F. J., Montijn, R. C., Kapteyn, J. C., Caro, L. H. P., Vossen, J. H., Van Berkel, M. A. A., Brekelmans, S. S. C., Van den Ende, H. Posttranslational modifications of secretory proteins. *Methods in Microbiology*. **26**, 223-238 (1998).
25. Koloteva, N., Hughes, J. M. X., McCarthy J. E. G. Reporter genes and their use in studying yeast gene expression. *Methods in Microbiology*. **26**, 141-159 (1998).
26. Kouprina, N., Larinov, V. Exploiting the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the study of the organization and evolution of complex genomes. *Microbiology Reviews*. **27**, 629-649 (2003).
27. Kurata, N., Nonomura, K., Harushima, Y. Rice genome organization: the centromere and genome interactions. *Annals of Botany*. **90**, 427-435 (2002).
28. Maggi, R. G., Govind, N. S. Regulated expression of green fluorescent protein in *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **7**, 301-310 (2004).
29. Mao, X., Hu, Y., Liang, C., Lu, C. MET3 Promoter: A Tightly Regulated Promoter and Its Application in Construction of Conditional Lethal Strain. *Current Microbiology*. **45**, 37-40 (2002).
30. McMurry, L. M., Aldema-Ramos, M. L., Levy, S. B. Fe²⁺Tetracycline-Mediated Cleavage of the Tn10 Tetracycline Efflux Protein TetA Reveals a Substrate Binding Site near Glutamine 225 in Transmembrane Helix 7. *Journal of Bacteriology*. **184**, 5113-5120 (2002).
31. Moore, R. L., McCarthy, B. J. Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology* **99**, 248-254 (1969).
32. Ng, W.V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D.,

- Hall, J., Dahi, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M., Angevin, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniel, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Ebhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L., DasSarma, S. Genome Sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**, 12176-12181 (2000).
33. Ohnishi, M., Fukada-Tanaka, S., Hoshino, A., Takada, J., Inagaki, Y., Iida, S. Characterization of a Novel Na⁺/H⁺ Antiporter Gene InNHX2 and Comparison of InNHX2 with InNHX1, Which is Responsible for Blue Flower Coloration by Increasing the Vacuolar pH in the Japanese Morning Glory. *Plant Cell Physiology*. **46**, 259–267 (2005).
34. Parolin, C., Corso, A. D., Alberghina, L., Porro, D., Branduardi, P. Heterologous production of five Hepatitis C virus-derived antigens in three *Saccharomyces cerevisiae* host strains. *Journal of Biotechnology*. **120**, 46-58 (2005).
35. Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., Nadal, E., Ariño, J. The transcriptional response of yeast to saline stress. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**, 17249-17255 (2000).
36. Presuti, C., Lucio, A., Bozzoni, I. Ribosomal protein L2 in *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to ribosomal protein L1 in *Xenopus laevis*. *The Journal of Biological Chemistry*. **263**, 6188-6192 (1988).
37. Prista, C., Soeiro, A., Veseley, P., Almagro, A., Ramos, J., Loureiro-Dias, M. C. Genes from *Debaryomyces hansenii* increase salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* W303. *Yeast Research*. **2**, 151-157 (2002).
38. Raleigh, E.A., et al. *Current Protocols in Molecular Biology* eds. Ausubel, F.M. et al. Publishing Associates and Wiley Interscience; New York. Unit 1.4.(1989).
39. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press*. **2**, 2100p (1989).
40. Sanseverino, J., Gupta, R. K., Layton, A. C., Patterson, S. S., Ripp, S. A., Saidak, L., Simpson, M. L., Schultz, T. W., Sayleri, G. S. Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid, Sensitive Detection of Estrogenic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 4455–4460 (2005).

41. Scorpione, R.C., Camargo, S. S., Schenberg, A. C. G., Astolfi-Filho, S. A new promoter-probe vector for *Saccharomyces cerevisiae* using fungal glucoamylase cDNA as the reporter gene. *Yeast*. **9**, 599-605 (1993).
42. Sherman, F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 3-41 (2002).
43. Shin, D., Koo, Y. D., Lee, J., Lee, H., Baek, D., Lee, S., Cheon, C., Kwak, S., Lee, S. Y., Yun, D. Athb-12, a homeobox-leucine zipper domain protein from *Arabidopsis thaliana*, increases salt tolerance in yeast by regulating sodium exclusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **323**, 534-540 (2004.)
44. Solow, S. P., Sengbusch, J., Lai, M. W. Heterologous Protein Production from the Inducible *MET25* Promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*. **21**, 617-620 (2005).
45. Starling, A. L., Ortega, J. M., Gollob, K. J., Vicente, E. J., Andrade-Nóbrega, G. M., Rodriguez, M. B. Evaluation of alternative reporter genes for the yeast two-hybrid system. *Genetics and Molecular Research*. **2**, 124-135 (2003).
46. Studart-Guimarães, C., Gibon, Y., Frankel, N., Wood, C. C., Zanori, M. I., Fernie, A. R., Carrari, F. Identification and characterization of the α and β subunits of succinyl CoA ligase of tomato. *Plant Molecular Biology*. **59**, 781-791 (2005).
47. Tatsumi, H., Katano, H. Kinetics of the surface hydrolysis of raw starch by glucoamylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**, 8123-8127 (2005).
48. Yang, Y., Huang, Y. P., Shen, P. The 492-bp RM07 DNA fragment from the halophilic Archaea confers promoter activity in all three domains of life. *Current Microbiology*. **47**, 388-394 (2003).
49. Wertman, K. F. *et al.* *Gene*. **49**, 253-262 (1986).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)