



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

**CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO
DO SISTEMA DE LIPASES DE *Yarrowia lipolytica***

Isolamento e caracterização do gene *YILIP3*

Altino Branco Choupina
(Mestre)

Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Doutor Angel Dominguez Olavarri
Co-orientadores: Doutor Francisco Javier Burguillo Muñoz
Doutor Joaquim Manuel Sampaio Cabral

Júri:

Presidente: Reitor da Universidade Técnica de Lisboa
Vogais: Doutor Angel Dominguez Olavarri
Doutor Francisco Javier Burguillo Muñoz
Doutor Dionísio Afonso Gonçalves
Doutor Joaquim Manuel Sampaio Cabral
Doutora Maria Ângela Cabral Garcia Taipa Menezes de Oliveira
Doutor Gabriel António Amaro Monteiro

Março de 2001



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

**CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO
DO SISTEMA DE LIPASES DE *Yarrowia lipolytica***

Isolamento e caracterização do gene *YILIP3*

Altino Branco Choupina
(Mestre)

Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Doutor Angel Dominguez Olavarri
Co-orientadores: Doutor Francisco Javier Burguillo Muñoz
Doutor Joaquim Manuel Sampaio Cabral

Júri:

Presidente: Reitor da Universidade Técnica de Lisboa
Vogais: Doutor Angel Dominguez Olavarri
Doutor Francisco Javier Burguillo Muñoz
Doutor Dionísio Afonso Gonçalves
Doutor Joaquim Manuel Sampaio Cabral
Doutora Maria Ângela Cabral Garcia Taipa Menezes de Oliveira
Doutor Gabriel António Amaro Monteiro

Março de 2001

RESUMO

De entre as espécies de leveduras, *Yarrowia lipolytica* é uma das maiores produtoras de proteínas extracelulares (proteases ácidas neutras e alcalinas, fosfatase ácida, ribonucleases e lipases). As lipases (triacilglicerol hidrolases) são enzimas importantes no metabolismo das gorduras, catalizando a ruptura dos triacilgliceróis em ácidos gordos livres e glicerol. Para além da baixa solubilidade dos seus substratos naturais, esta hidrólise é catalizada na interface entre um substrato insolúvel e a fase aquosa na qual a enzima está solubilizada. Este aspecto distingue-as das esterases, as quais catalizam preferencialmente a hidrólise de ésteres solúveis em água. As lipases constituem um grupo ubíquo de enzimas capazes de catalizarem diversas reacções, muitas das quais de interesse industrial (hidrólise estereo-selectiva, trans-esterificação, etc.).

Neste trabalho, descreve-se a clonagem molecular e a caracterização de um gene de *Yarrowia lipolytica*, que codifica para uma proteína com actividade lipásica, bem como a caracterização fenotípica de outro gene que codifica para uma proteína com o mesmo tipo de actividade. As sequências completas de DNA destes genes codificam para duas proteínas de 486 e 498 aminoácidos. As sequências de DNA deduzidas apresentam homologia com lipases de outros fungos (*Candida cylindracea* e *Geothrichum candidum*) possuindo em comum a sequência do sítio de activação interfacial. As lipases de *Yarrowia lipoytica* possuem sítios potenciais de N-glicosilação e regiões reguladoras de ORE (oleate response element) nos promotores de ambos os genes. Estas proteínas não apresentam um sinal peptídico claro.

A interrupção dos genes *YILIP1* e *YILIP3* produz uma diminuição da actividade lipásica em meios com azeite comparativamente com a estirpe selvagem.

Palavras-Chave:

Lipase
Yarrowia sp.
Actividade
Clonagem
YILIP1
YILIP3

ABSTRACT

Among yeast species, *Yarrowia lipolytica* is one of the highest producers of extracellular proteins (acid, neutral and alkaline proteases, acid phosphatase, ribonucleases and lipases). Lipases (triacylglycerol hydrolases) are important enzymes in fat metabolism, catalyzing the breakdown of triacylglycerols to free fatty acids and glycerol. Owing to the very low solubility of their natural substrates, this hydrolysis is catalyzed at the interface between an insoluble substrate and the aqueous phase in which the enzyme is solubilized. This feature distinguishes them from esterases, which preferentially catalyze the hydrolysis of soluble esters in water. Lipases constitute a ubiquitous group of enzymes able to catalyze a number of different reactions, many of them of industrial interest (stereoselective hydrolysis, transesterification, etc.).

In the present work, we report the molecular cloning and the characterization of one gene of *Yarrowia lipolytica* encoding for a protein with lipase activity as well as the phenotypic characterization of another gene that encodes for a protein with the same type of activity. The complete DNA sequences encode for two putative proteins of 486 and 498 aminoacid. The deduced aminoacid sequences show similarity with lipases from other fungi (*Candida cylindracea*, *Geothricum candidum*) sharing in common the sequence for the interfacial activation site. The lipases from *Yarrowia lipolytica* have two potential N-glycosylation sites and regulating ORE (oleate response element) regions in the promoters of both genes. The proteins do not show clear signal peptide.

Disruption of the genes *YILIP1* and *YILIP3* produces lower lipase activity in olive oil medium when comparing to the wild type.

Key words:

Lipase
Yarrowia sp.
Activity
Cloning
YILIP1
YILIP3

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Joaquim Sampaio Cabral pela orientação e apoio científico, sempre desinteressados.

Ao Professor Doutor Angel Domínguez Olavarri por me ter incluído no seu grupo de investigação e pelo apoio e estímulo constantes.

Ao Professor Doutor Francisco Javier Burguillo Muñoz pela direcção, sempre de forma compreensiva.

À Doutora Encarnación Fermiñan pelos imprescindíveis ensinamentos de Biologia Molecular.

Ao Professor Filipe Estévez Bello pela colaboração e sugestões.

À Doutora Mari Carmen pela visão prática das questões.

Ao Doutor Francisco Javier Gonzalez por ter desbravado o caminho e pelas múltiplas ajudas, principalmente no campo da informática.

Aos colegas de laboratório: Flor, Susana, Ana, Avelino, Isabel, Freida, Johnny, Francisco, Nuria, Caty, José António, Luis Martínez, Manolo, Juan Cabello, Lorena, Rosa e Cristina; mis buenos amigos, por todos los momentos que hemos compartido.

Ao Matías pelo muito trabalho que realizou.

À Doutora Amélia e ao Doutor Mário pela amizade de sempre.

À Doutora Maria José Arabolaza, Coordenadora do Departamento de Biologia da E.S.A.B.

A todos os membros do Departamento de Microbiologia e Genética da Universidade de Salamanca.

A todos os membros do Departamento de Física-Química da Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca.

À Escola Superior Agrária do Instituto Superior Politécnico de Bragança.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo suporte financeiro, na forma de uma bolsa de doutoramento.

Ao PRODEP pelo suporte financeiro para a dispensa de serviço docente.

Este trabalho foi parcialmente financiado pelos projectos: DGICYT (IFD97-2276), União Europeia (Biotech BIO4-CT96-0003) e pela Junta de Castilla y León (SA27/00B).

À Fátima....

Esta tese é dedicada à memória da minha Mãe.

ÍNDICE

| | Página |
|---|-----------|
| <i>Resumo</i> | I |
| <i>Abstract</i> | II |
| <i>Agradecimentos</i> | III |
| <i>Índice</i> | IV |
| <i>Nomenclatura</i> | VIII |
| | |
| 1- Introdução | 1 |
| 1.1- Lipases | 1 |
| 1.1.1- Definição | 1 |
| 1.1.2- Características estruturais | 5 |
| 1.1.3- Características físico-químicas | 11 |
| • Detecção..... | 11 |
| a) Ensaio em placa | 11 |
| b) Fluorescência..... | 12 |
| c) Tensão superficial..... | 12 |
| d) Métodos espectrofotométricos..... | 12 |
| e) Determinação titrimétrica (pH-stat)..... | 13 |
| • Purificação | 13 |
| 1.1.4- Ocorrência biológica. | 14 |
| 1.1.5- Aplicações biotecnológicas. | 15 |
| • Indústria alimentar..... | 16 |
| • Indústria farmacêutica..... | 17 |
| • Produção de pesticidas..... | 18 |
| • Utilização como bio-sensores..... | 18 |
| • Outras aplicações | 19 |
| • Lipases imobilizadas..... | 19 |
| 1.2- Expressão de proteínas heterólogas em leveduras | 22 |
| 1.2.1- Secreção de proteínas | 23 |
| • Sequência de sinal..... | 23 |
| • Glicosilação..... | 23 |
| • Enrolamento e transporte..... | 23 |
| • Processamento proteolítico..... | 24 |
| 1.2.2- Fisiologia da expressão intracelular | 25 |
| • A nível transcripcional..... | 25 |
| • A nível traduccional..... | 26 |
| • Outros factores..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3- A levedura <i>Yarrowia lipolytica</i>..... | 27 |
| 1.3.1- Características biológicas..... | 27 |
| 1.3.2- Manipulação genética..... | 28 |
| • Métodos clássicos..... | 28 |
| • Marcadores..... | 28 |
| • Sistemas de transformação..... | 29 |
| • Vectores integrativos e autónomos..... | 29 |
| 1.3.3- Expressão de proteínas heterólogas em <i>Y. lipolytica</i> | 29 |
| 1.3.4- Metabolismo e aplicações biotecnológicas..... | 33 |
| 1.3.5- Lipases de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 34 |
| 1.4- Objectivos do presente trabalho..... | 36 |
| | |
| 2- Materiais e métodos..... | 37 |
| 2.1- Microrganismos utilizados..... | 37 |
| 2.1.1- Leveduras..... | 37 |
| • <i>Yarrowia lipolytica</i> | 37 |
| • <i>Kluyveromyces lactis</i> | 37 |
| • <i>Sacchromyces cerevisiae</i> | 38 |
| 2.1.2- Bactérias..... | 38 |
| • <i>Escherichia coli</i> | 38 |
| 2.2- Meios de cultura..... | 39 |
| 2.2.1- Meios para o crescimento vegetativo de leveduras..... | 39 |
| • YED..... | 39 |
| • YEPD..... | 39 |
| • YNB..... | 39 |
| 2.2.2- Meios para o crescimento de <i>E. coli</i> | 40 |
| • LB..... | 40 |
| • 2xYT..... | 40 |
| 2.2.3- Meios para análise da actividade lipásica..... | 40 |
| • Agar-Tributirina..... | 40 |
| • Glucose-Agar-Tributirina..... | 40 |
| 2.2.4- Meios de indução com azeite..... | 41 |
| • MM-Azeite..... | 41 |
| • MM-Glucose..... | 41 |
| 2.3- Condições de cultura e conservação dos microrganismos..... | 41 |
| 2.4- Análise de proteínas..... | 42 |
| 2.4.1- Obtenção de extractos celulares de leveduras..... | 42 |
| 2.4.2- Quantificação de proteínas..... | 43 |
| 2.4.3- Separação de proteínas em geis de poliácridamida..... | 43 |
| 2.4.4- Revelação dos geis de proteínas..... | 44 |
| 2.5- Métodos enzimáticos..... | 44 |
| 2.5.1- Determinação da actividade lipásica..... | 44 |
| • Em meio líquido..... | 44 |
| a) Técnica espectrofotométrica..... | 44 |
| b) Técnica titrimétrica (pH-stat)..... | 46 |
| • Em meio sólido..... | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6- Métodos genéticos | 48 |
| 2.6.1- Transformação com plasmídeos replicativos | 48 |
| • Em <i>Escherichia coli</i> | 48 |
| 2.6.2- Transformação integrativa de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 48 |
| 2.7- Plasmídeos utilizados | 50 |
| 2.7.1- Bacterianos | 50 |
| • pBluescript KS ⁺ e SK ⁺ | 50 |
| • pGEM-T | 50 |
| 2.7.2 Plasmídeos funcionais em <i>Yarrowia lipolytica</i> | 51 |
| • pINA240..... | 51 |
| • pINA444..... | 52 |
| 2.8- Manipulação de ácidos nucleicos | 53 |
| 2.8.1- Obtenção de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> | 53 |
| 2.8.2- Isolamento de ADN genómico | 53 |
| • Da levedura <i>Yarrowia lipolytica</i> | 53 |
| 2.8.3- Obtenção de ARN total de levedura..... | 54 |
| 2.8.4- Determinação da concentração de ácidos nucleicos | 54 |
| 2.8.5- Digestão com enzimas de restrição | 55 |
| 2.8.6- Tratamento com fosfatase alcalina..... | 55 |
| 2.8.7- Electroforese de fragmentos de ADN | 55 |
| 2.8.8- Purificação de fragmentos de ADN | 56 |
| 2.8.9- Construção de plasmídeos recombinantes | 56 |
| 2.8.10- Sequenciação de ADN..... | 56 |
| 2.8.11- Construção de genotecas parciais de ADN genómico | 57 |
| 2.9-Reacções de ampliação por PCR | 57 |
| • PCR inversa | 57 |
| • "Touchdown" PCR | 57 |
| A) Selecção de oligonucleotídeos | 58 |
| B) Condições da PCR..... | 59 |
| 2.10- Hibridação de ácidos nucleicos | 60 |
| • Preparação de sondas marcadas radioactivamente..... | 60 |
| • Detecção de sequências específicas de ADN (Southern-blot)..... | 60 |
| • Detecção de clones positivos a partir de genotecas..... | 62 |
| • Detecção de ARNm (Northern-blot)..... | 62 |
| 2.11- Técnica de interrupção genética "Pop Out" | 64 |
| 2.12 Microfotografia | 64 |
| 2.13- Análise mediante tratamento informático dos dados obtidos | 65 |
| • Sequências de ADN e proteínas | 65 |
| a) Programas informáticos locais..... | 65 |
| b) Acesso a servidores da internet..... | 66 |
| • Das pesquisas bibliográficas | 67 |
| 2.14- Outros produtos utilizados | 67 |
| 3- Apresentação e discussão dos resultados | 68 |
| 3.1-Optimização do crescimento celular e da actividade lipásica em <i>Yarrowia lipolytica</i> | 68 |
| 3.1.1- Actividade lipásica em leveduras..... | 68 |

| | |
|--|------------|
| 3.1.2- Selecção da estirpe a utilizar..... | 69 |
| 3.1.3- Condições de crescimento de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 69 |
| 3.1.4- Actividade lipásica em células de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 70 |
| a) Importância dos meios de cultura tamponados | 71 |
| b) Actividade lipásica de diferentes tempos de cultura..... | 72 |
| 3.1.5- Actividade lipásica em fracções celulares de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 72 |
| 3.2- Isolamento do gene <i>YILIP3</i> | 75 |
| 3.2.1- Obtenção de sondas de ADN | 75 |
| 3.2.2- Hibridação tipo "Southern-blot" das sondas com ADN genómico de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 80 |
| 3.2.3- PCR inversa com ADN genómico de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 82 |
| 3.2.4- Construção de uma genoteca parcial de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 83 |
| 3.2.5- Determinação da sequência nucleotídica de <i>YILIP3</i> | 84 |
| 3.2.6- Análise da sequência nucleotídica | 85 |
| • Estudo da região 5' não codificante | 88 |
| • Estudo da região 3' não codificante | 89 |
| • Análise da região codificante | 90 |
| 3.3- Características da proteína <i>YILip3p</i>..... | 92 |
| 3.3.1- Estrutura primária de <i>YILip3p</i> | 92 |
| 3.3.2- Homologias de <i>YILip3p</i> | 96 |
| 3.3.3- Elucidação das estruturas tridimensionais de <i>YILip3p</i> | 101 |
| 3.3.4- Classificação geral da proteína <i>YILip3p</i> | 103 |
| 3.4- Interrupção do gene <i>YILIP3</i>..... | 104 |
| 3.4.1- Caracterização fenotípica das estirpes mutadas..... | 110 |
| 3.4.1.1-Da estirpe <i>FJG1 ($\Delta lip1$)</i> | 110 |
| a) Actividade lipásica em células inteiras..... | 110 |
| • Estudos em meio sólido..... | 110 |
| • Estudos em meio líquido | 111 |
| b) Actividade lipásica em fracções celulares..... | 114 |
| • Estudos em meio líquido | 114 |
| 3.4.1.2-das estirpes <i>ABC1 ($\Delta lip3$)</i> e <i>ABC2 ($\Delta lip1 \Delta lip3$)</i> | 115 |
| a) Actividade lipásica em células inteiras..... | 115 |
| • Estudos em meio sólido..... | 115 |
| • Estudos em meio líquido | 116 |
| b) Actividade lipásica em fracções celulares..... | 118 |
| 3.4.2- Complementação das estirpes mutadas pelos genes <i>YILIP1</i> e <i>YILIP3</i> | 119 |
| 3.5- Análise da expressão do gene <i>YILIP3</i>..... | 122 |
| 3.5.1- Análise tipo "Northern-blot" do gene <i>YILIP3</i> | 122 |
| 4-Considerações finais | 125 |
| 5- Conclusões | 127 |
| 6- Bibliografia | 128 |

NOMENCLATURA

Abreviaturas utilizadas neste trabalho

| | |
|------------------------------|---------------------------------------|
| ADN: | ácido desoxirribonucleico |
| ARN: | ácido ribonucleico |
| ARNm: | ARN mensageiro |
| DEPC: | dietil pirocarbonato |
| DIG: | digoxigenina |
| DNase: | desoxirribonuclease |
| DNTPs : | desoxirribonucleótidos trifosfato |
| DTT: | ditiotreitól |
| EDTA: | etilendiamino teracetato de sódio |
| IPTG: | isopropil- β -D-tiogalactósido |
| kb : | kilobases (1000 pares de bases) |
| kDa: | kiloDalton (1000 Dalton) |
| pb : | pares de bases |
| PCR: | reacção em cadeia da polimerase |
| PEG: | polietilénico |
| RNase: | ribonuclease |
| SDS: | dodecil sulfato de sódio |
| SSC 10X: | cloreto de sódio, citrato de sódio |
| TE: | TRIS, EDTA |
| TRIS: | tri (hidroximetil) aminometano |
| UV: | ultravioleta |
| X-gal: | 5-bromo-4-cloro-3-indol-D-galactósido |
| °C: | graus centígrados |
| g: | grama |
| DO: | densidade óptica |
| L: | litro |
| M: | molar |
| mM: | milimolar |
| min: | minuto |
| mL: | mililitro |
| nm: | nanómetro |
| μmol: | micromole |
| μL: | microlitro |
| μg: | micrograma |
| rpm: | rotações por minuto |
| s: | segundo |
| λ: | comprimento de onda |
| SLS: | sigma lipase substrato |

As restantes abreviaturas correspondem às abreviaturas internacionais e aos sistemas de medidas admitidos (IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada), incluindo os códigos de uma e três letras para designar os aminoácidos.

1 - INTRODUÇÃO

1.1- LIPASES

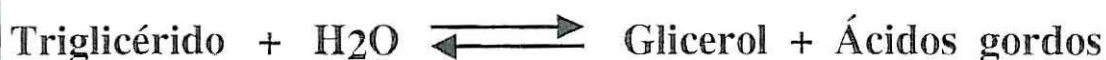
1.1.1- Definição

Na literatura, encontra-se com frequência a utilização indistinta dos termos lipase e esterase. Na realidade, ambas catalizam a hidrólise de ligações éster de ácidos carboxílicos e compreendem o grupo de enzimas pertencentes à sub-subclasse (3.1.1). No entanto, o termo esterase é mais amplo incluindo além das lipases os dois grupos:

-**Carboxilesterases** (EC 3.1.1.1) que inicialmente se denominavam **esterases B** (Medda *et al.*, 1992);

-**Ariesterases** (EC 3.1.1.2) que se denominavam **esterases A** e hidrolizam ésteres aromáticos, tais como o fenil acetato (Chang *et al.*, 1996; Upton *et al.*, 1995).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), na sua edição de 1992, sobre recomendações de nomenclatura, atribuiu às lipases o código EC(3.1.1.3), especificando que se trata de enzimas que hidrolizam ésteres carboxílicos do glicerol, de acordo com a seguinte reacção (Brady *et al.*, 1990; Hide *et al.*, 1992):



Com um substrato como a trioleína na reacção anterior, uma lipase pode ser vista como (a) uma enzima que hidroliza ésteres do glicerol com ácidos gordos ou como (b) uma enzima que hidroliza ésteres de ácidos gordos de cadeia longa. Nenhuma das definições parece ser concludente. Com um substrato como a tributirina a definição (a) seria aplicável mas não a definição (b). Com benzil estearato a definição (a) não é aplicável, mas sim a (b).

Adicionalmente, estabeleceu-se que uma verdadeira lipase actua em substratos heterogêneos ou, se o faz em substratos solúveis em água, será muito lentamente. Além disso as lipases não só hidrolizam um substrato em forma emulsionada como também em estado micelar.

Diversos autores (Polgar, 1992) têm estabelecido classificações para as proteínas segundo diversos critérios incluindo a análise evolutiva das sequências de aminoácidos.

Actualmente uma das classificações estruturais das proteínas mais importante é a estabelecida por Murzin *et al.* (1995). Encontra-se disponível na Internet desde 1995 (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>). Esta classificação inclui as lipases pelas suas características estruturais, que se descrevem na secção seguinte, na superfamília das α/β **hidrolases**. Nesta superfamília existem as subdivisões nas famílias, que se descrevem na Tabela 1.1.

Tabela 1.1- Classificação estrutural de proteínas com actividade lipásica (SCOP) (Murzin *et al.*, 1995).

α/β hidrolases:

1. Acetilcolinesterases (3)

- *Torpedo californica* (5)
- *Electrophorus electricus* (1)
- *Mus musculus* (1)

2. Serina-carboxipeptidase (3)

A-Serina-carboxipeptidase II

- *Triticum vulgare* (5)
- *Saccharomyces cerevisiae* (2)

B-Human 'protective protein', HPP

- *Homo sapiens* (1)

3. Haloalcano dehalogenase (1)

- *Xanthobacter autotrophicus strain gj10* (9)

4. Dienolactona hidrolase (1)

- *Pseudomonas sp. B13* (1)

5. Bromoperoxidase A2 (1)

- *Streptomyces aureofaciens* (1)

6. Tioesterases (1)

Tioesterase miristoil-ACP-especifica

- *Vibrio harveyi* (1)

7. Lipases fúngicas(8)

A-Triacilglicerol lipases

- *Candida antarctica (forma b)* (5)
- *Rhizomucor miehei* (4)
- *Penicillium caembertii* (1)
- *Humicola lanuginosa* (1)
- *Rhizopus delemar* (1)

B-Carboxilesterase/lipase tipo B

- *Geotrichum candidum* estirpe ATCC 34614 (1)
- *Candida rugosa* (também chamada *cylindracea*) (7)
- *Candida rugosa* (colesterol esterase) (1)

8. Lipases bacterianas (1)

- *Pseudomonas glumae*
(conhecida como *Pseudomonas gladioli*) (1)

9. Lipases pancreáticas (domínios N-terminais)(2)

(contém um domínio de união a colipase adicional)

- *Equus caballus* (1)
- *Homo sapiens* (2)

Entre parêntesis indica-se o número de proteínas que se classificaram num primeiro momento em cada secção.

As lipases catalizam várias reacções (Balcão *et al.*, 1996). Apesar de serem sintetizadas pela natureza para quebrar ligações éster de gliceróis com o conseqüente consumo de moléculas de água (**hidrólise**), as lipases também podem catalizar a reacção inversa (**síntese estérica**) em condições especiais de quase ausência de moléculas de água, quer dizer a formação de ligações éster entre grupos alcoólicos e grupos carboxílicos ácidos. Na síntese orgânica, os dois sentidos desta reacção podem-se combinar e modular dando lugar a uma série de reacções denominadas de **interesterificação**. Dependendo do ponto de partida particular em termos de substrato, pode-se falar de **acidólise** (donde um grupo acilo é permutado entre um grupo acilglicerol e um ácido carboxílico), de **alcoólise** (donde um grupo acilo é permutado entre um acilglicerol e um álcool) e **transesterificação** (no qual se intercambiam grupos acilo entre dois acilgliceróis).

Na Figura 1.1 clarifica-se o intercâmbio de radicais acilo em todas estas reacções.

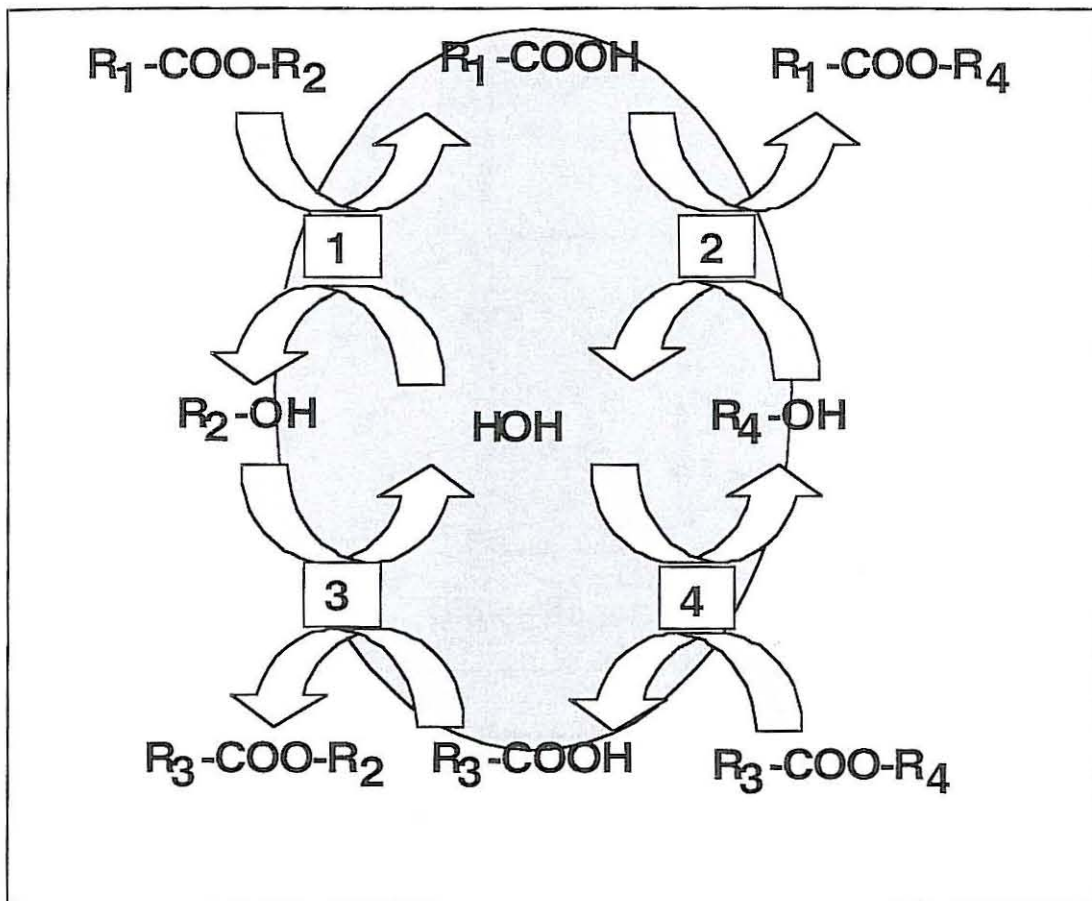


Figura 1.1 – Representação esquemática das reacções catalizadas pelas lipases. 1- Hidrólise, 2- Síntese estérica, 1+2- Alcoólise, 1+3- Acidólise, 1+2+3+4- Transesterificação. Os grupos acilo estão marcados com R_i ($i=1,2,3,4$). A zona sombreada representa a fase aquosa da reacção. (Adaptado de Balcão, Paiva e Malcata, 1996).

Assim a maior diferença entre lipases e esterases parece estar associada com o estado do substrato sobre que actuam. Enquanto que as esterases podem hidrolizar substratos solúveis, as lipases, não. Parece apropriado portanto, definir as lipases como enzimas que hidrolizam ésteres na interface água-lípido num sistema heterogéneo ou insolúvel. É precisamente na interface água-lípido que as lipases exibem outra das suas características: a **activação interfacial**. Enquanto que uma esterase tem um comportamento tipicamente michaeliano num estudo de actividade relativamente à concentração do substrato, uma lipase exibe um ponto de activação com uma concentração de substrato com valor de saturação =1 (quando se começam a formar agregados). Esta diferença pode ser apreciada em qualquer estudo comparativo do comportamento cinético de uma lipase e uma esterase, cujos resultados seriam semelhantes aos observados no gráfico da Figura 1.2 onde se mostra uma adaptação dos resultados publicados por Sarda e Desnuelle (1958) com um substrato como a triacetina. Quando a concentração de substrato alcança o ponto de saturação e o meio passa de homogéneo a heterogéneo, as moléculas de substrato formam agregados moleculares do tipo micelar e a enzima activa-se devido à nova forma do substrato (**activação interfacial**).

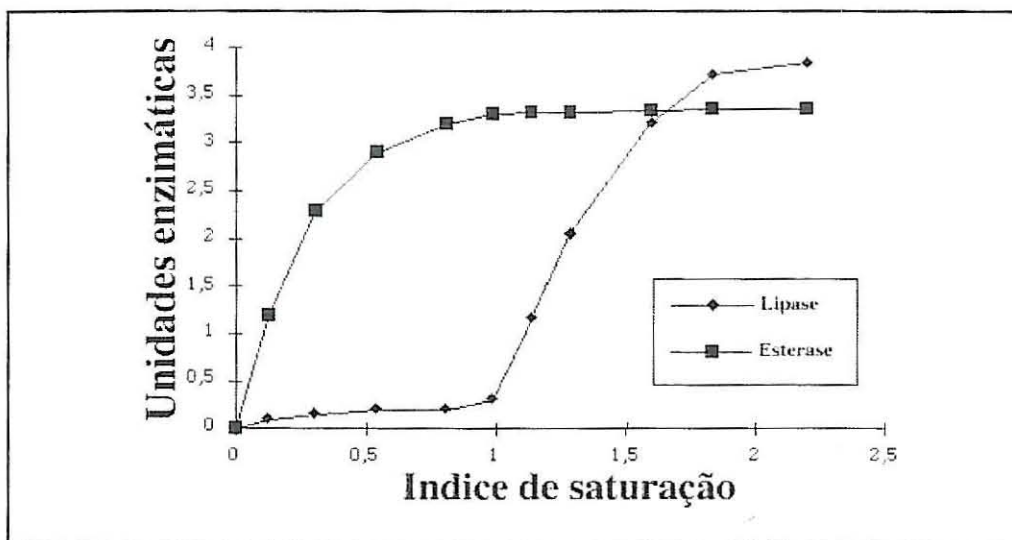


Figura1.2 - Estudo comparativo da velocidade enzimática entre uma lipase e uma esterase. (Baseado em Sarda e Desnuelle, 1958).

Tão importante como este conceito de activação interfacial pode ser o conceito de **inactivação interfacial** (Verger, 1984). Este fenómeno não é apenas estudado nas lipases. Sabe-se, que em maior ou menor grau as proteínas mudam de conformação ao interactuar com uma interface entre dois meios imiscíveis ou parcialmente miscíveis (Tronin *et al.*, 1996). A desnaturação que sofrem as proteínas em presença de SDS (dodecil sulfato sódico) acima da sua concentração micelar crítica é um exemplo de inactivação interfacial (Nascimento e Campos, 1994).

Estes mecanismos de activação e inactivação interfaciais são descritos como essenciais para o mecanismo de reacção de uma lipase.

O mecanismo mais importante para a acção de uma lipase em substratos em emulsão foi proposto por Verger *et al.* (1996) e esquematiza-se na Figura 1.3, na qual se inclui a ideia recente de inactivação interfacial.

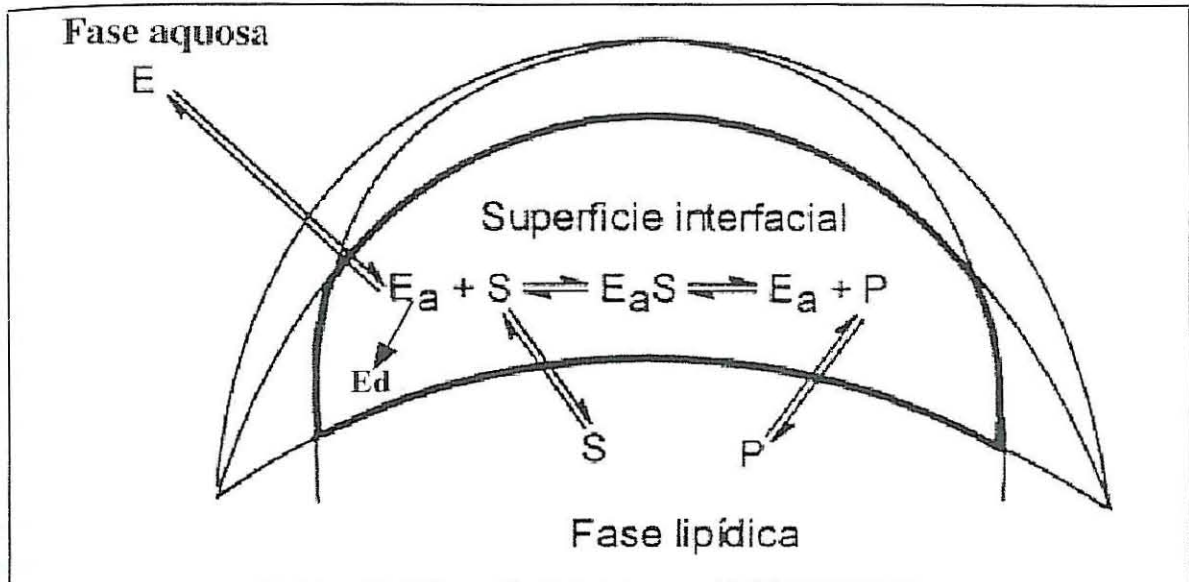


Figura 1.3 – Modelo esquemático de lipólises. E enzima em dissolução, E_a enzima adsorvida sobre a interface, S substrato, P produtos e E_d enzima desnaturada.

1.1.2– Características estruturais

Os estudos por difracção de Raios X de estruturas cristalinas de algumas lipases purificadas, permitiram conhecer a base estrutural para o fenómeno de activação interfacial (Holmquist *et al.*, 1993). Em condições aquosas, em fase homogénea, índice de saturação do substrato baixo, a enzima está inactiva pois o centro activo está protegido por uma tampa ou "lid" formada por uma pequena sequência de aminoácidos com estrutura secundária de α -hélice com características anfipáticas. Em presença de substâncias insolúveis em água (quando o índice de saturação é superior à unidade), essa tampa desloca-se por forma a que o centro activo da enzima fique exposto ao substrato como uma região hidrofóbica que se estabiliza por absorção à interface apolar formada pelo substrato. Esta será a conformação activa da enzima. Brady *et al.* (1990) sugeriram que esta tampa actuará de forma a inibir a actividade proteolítica e portanto protegendo as enzimas de autólise enquanto não estão a reagir.

O sítio activo das lipases é constituído por uma tríade catalítica formada por resíduos de uma **serina**, uma **histidina** e **ácido aspártico** (Brady *et al.*, 1990) que nalguns casos, como por exemplo em *Geotrichum candidum*, está substituído por um resíduo de ácido glutâmico (Schrag *et al.*, 1991). O resíduo de serina está situado entre dois resíduos de glicina à distância de um resíduo de outro aminoácido

qualquer. Parece tratar-se de uma estrutura bastante conservada; o pentapéptido comum tem a seguinte forma: **Gly-X-Ser-X-Gly**.

Outras enzimas relacionadas, incluídas dentro do grupo das hidrolases serínicas e proteinases serínicas têm substituída uma das glicinas pela alanina. Assim, o motivo comum a todas elas será **(Gly-X-Ser-X-Gly-(Ala))**. Este motivo aparece no banco de seqüências do EMBL (European Molecular Biology Laboratory) mais de 1500 vezes (Derewenda *et al.*, 1991). A análise da estrutura secundária da proteína em torno desse pentapéptido revela um motivo estrutural β - ϵ Ser- α que está presente em várias famílias de lipases e esterases (Drewenda *et al.*, 1991). O perfil hidropático em todos os casos revela regiões hidrofóbicas em torno do pentapéptido em todas as lipases com valores de índice hidropático entre 0.7 e 14.3 (Hide *et al.*, 1992).

Esta estrutura que está muito conservada tem a serina ativa localizada no extremo C-terminal de uma região com estrutura secundária de hélice α . Nos estudos de caracterização da estrutura tridimensional destas proteínas, realizados até ao momento, por difracção de Raios X e por modelização molecular (Derewenda *et al.*, 1994; Norin *et al.*, 1994), demonstrou-se que nestes casos a serina adota a conformação ϵ .

A Figura 1.4 mostra esquematicamente um modelo da estrutura secundária conservada pelas lipases de estrutura tridimensional conhecida. Este modelo geral coincide com o de uma lipase de *Pseudomonas aeruginosa* e consta de 8 regiões com estrutura de folha pregueada β intercaladas por regiões com conformações de α -hélice.

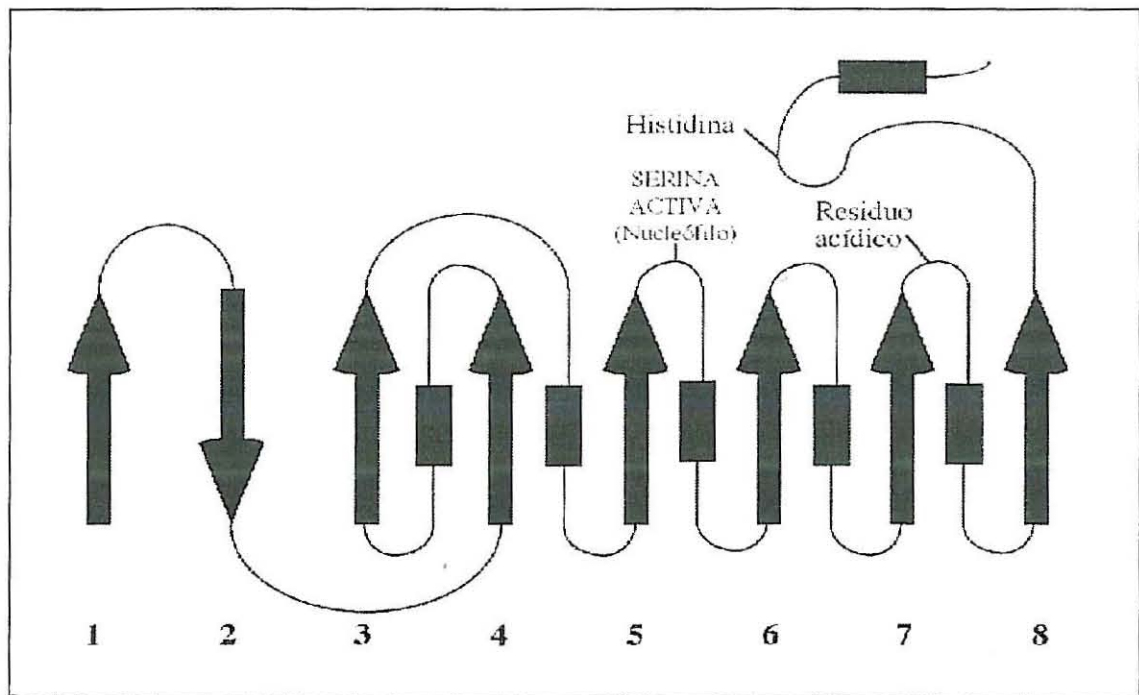


Figura 1.4 –Esquema da estrutura secundária de lipases com estrutura tridimensional conhecida. (Baseado em Jaeger *et al.*, 1993).

Na Figura 1.5 mostra-se com mais detalhe a conformação que adoptam os resíduos que formam parte do sítio catalítico na lipase LIP1 de *Mucor miehei* e na lipase LIP1 de *Candida rugosa*, segundo foi modelado, com base em dados cristalográficos.

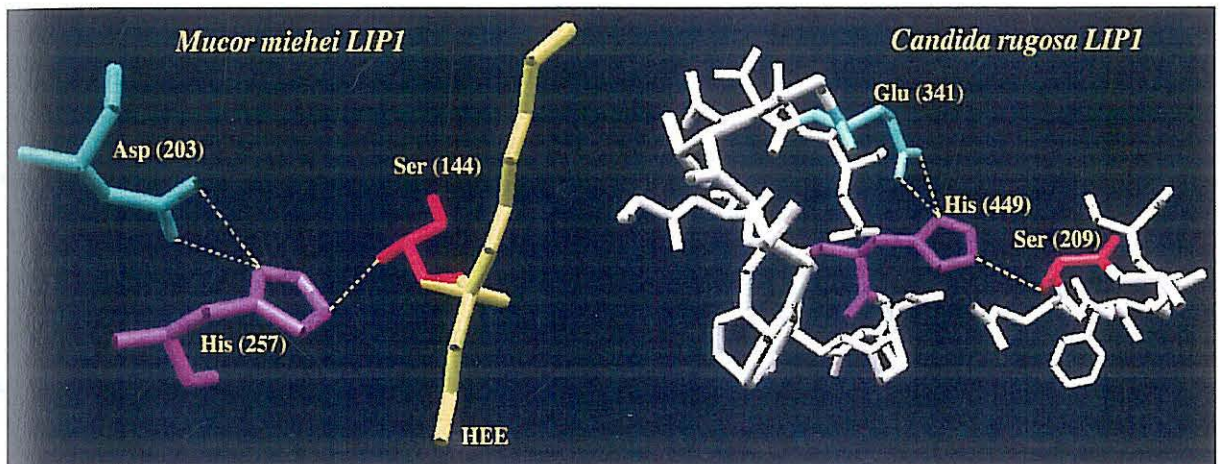


Figura 1.5 - Representação tridimensional da estrutura cristalográfica do sítio catalítico da lipase de *Mucor miehei* (Brady *et al.*, 1990) e de uma lipase de *Candida rugosa* (Grochulski *et al.*, 1994). As linhas ponteadas representam as pontes de H entre os resíduos que formam a triade catalítica. HEE representa uma molécula de N-hexilfosfanato etil-éster, um inibidor (Brzozowski *et al.*, 1991).

O mecanismo de reacção do sítio activo das lipases tem sido proposto (Jaeger *et al.*, 1994) e mostra-se na Figura 1.6. Primeiro, ocorre um ataque nucleofílico do oxigénio do grupo hidróxilo sobre o átomo do carbono do grupo carbonilo da ligação éster. Isto, leva à formação de um intermediário em forma de tetraedro (**reacção 1**). A histidina incrementa as características do grupo hidróxilo da serina. O anel amidizólico da histidina fica carregado positivamente. Esta carga positiva estabiliza-se com a carga negativa do resíduo ácido dos ácidos aspártico e glutâmico. O intermediário em forma de tetraedro estabiliza-se através de duas pontes de hidrogénio formadas com ligações amida de resíduos de aminoácidos que se encontram ao redor da histidina. Finalmente, o álcool é libertado, deixando atrás um complexo acil-enzima (**reacção 2**). Mediante um ataque nucleofílico de um ião hidróxilo, o ácido gordo liberta-se e a enzima regenera-se (**reacção 3**).

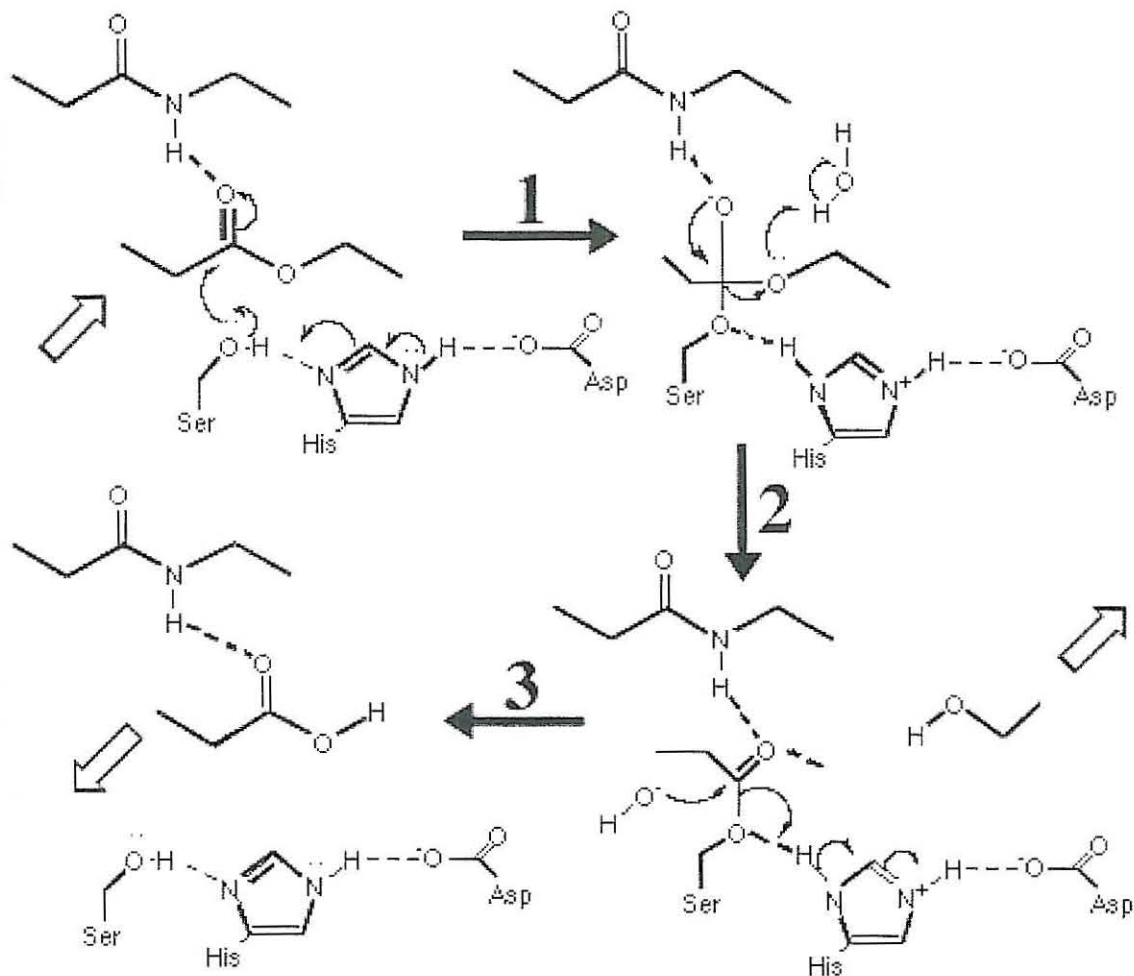


Figura 1.6 - Mecanismo detalhado da hidrólise de uma ligação éster mediante uma lipase (Jaeger *et al.*, 1994).

A comparação das seqüências das proteína com actividade lipásica permite definir 3 regiões consenso muito conservadas que incluem os três elementos relacionados com o sítio catalítico (**serina activa, espaço oxianiónico e resíduo ácido**). A região correspondente à histidina da tríade catalítica é contudo uma região menos conservada.

Na Tabela 1.2 comparam-se as seqüências de aminoácidos de algumas das lipases conhecidas. Pode-se observar como alguns dos resíduos implicados na formação da estrutura catalítica estão altamente conservados entre as espécies.

Tabela 1.2 - Comparação das seqüências de aminoácidos em torno dos resíduos da tríade catalítica em lipases de diversos microrganismos.

| Origem | Serina Activa | | | | | Espaço Oxianiónico | | | | | Resíduo Acídico | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------|-------|-----|-----|--------|--------------------|-----|----|----|---|-----------------|-----|----|---|---|---|---|-------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | LSGQP | VNL | GHS | HGG | PPTI | YPI | VLL | HG | ML | G | F | FDN | TA | M | D | G | V | GTCS |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | ISGKG | VNL | GHS | HGG | PPTV | YPI | VLT | HG | ML | G | F | FDS | EP | M | D | G | V | GRCS |
| <i>Pseudomonas glumae</i> | ATGAT | INL | GHS | QGG | LTLS | YPV | ILL | HG | LA | G | T | TDK | GQ | M | D | C | V | SRCS |
| <i>Bacillus subtilis</i> | ETGAK | VDTVA | HSM | GGA | NT | NPV | VH | HG | IG | G | A | ASF | SS | A | D | M | V | MNYL |
| <i>Bacillus pumilus</i> | KTGAK | VDTVA | HSM | GGA | NT | NPV | VH | HG | IG | G | A | ASY | SS | A | D | M | V | VNSL |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | WEPGK | VHL | GHS | MGG | QTI | YPV | VFL | HG | FL | G | L | LVG | RK | M | D | G | V | PVIS |
| <i>Staphylococcus hyicus</i> | WKPGH | PVH | GHS | MGG | QTI | DPF | VFL | HG | FT | G | F | FVG | RP | M | D | G | V | SEIS |
| <i>Mucor miehei</i> | QYPSY | VAT | GHS | LGG | ATA | TIY | VVR | G | SS | S | IRN | NE | M | D | V | V | H | HLPP |
| <i>Rhizopus delemar</i> | AHPTY | VIT | GHS | LGG | | TIY | VVR | G | TN | S | FRS | HK | B | D | V | V | H | VPPQ |
| <i>Rhizopus niveus</i> | AHPTY | VIT | GHS | LGG | AQA | TIY | VVR | G | TN | S | FRS | HK | B | D | V | V | H | VPPQ |
| <i>Penicillium camembertii</i> | QNPNY | LVV | GHS | LGG | AVA | AVV | VVR | G | SY | S | VRN | HT | M | D | P | | K | LPLL |
| <i>Geotrichum candidum (1)</i> | GGDPD | VM | G | SAG | MSV | PVM | VY | G | GA | F | VYG | QE | B | D | E | T | F | FAPVA |
| <i>Candida rugosa (1)</i> | GGDPT | VT | G | SAG | SMSV | PVM | VY | G | GG | F | EVG | QN | B | D | E | T | F | GTSS |
| <i>Candida rugosa (2)</i> | GGDPS | VT | YGE | L | AGSMST | PVM | VY | G | GG | F | ELG | QN | B | D | E | T | F | LGLL |
| pâncreas humano | GYS | VH | GHS | L | G | HAA | KTR | HG | FI | D | KGE | L | D | P | A | E | P | CFQ |
| pâncreas porcino | GYS | VH | GHS | L | G | SHAA | KTR | HG | FI | D | KGE | L | D | P | A | E | P | CFQ |
| gástrica humana | KTGQK | H | GHS | Q | GTTIG | PVV | R | Q | H | L | L | SAT | N | D | | | A | DPQD |

Os resíduos marcados a negro correspondem a aminoácidos idênticos. Os aminoácidos marcados a cinzento correspondem às substituições conservativas.

As estruturas tridimensionais (3D) da lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana foram determinadas em 1990. Desde então, mais onze estruturas de lipases foram resolvidas, as quais, com excepção da lipase pancreática, são todas de origem microbiana (Jaeger *et al.*, 1994).

Nas Figuras 1.7 e 1.8 comparam-se as estruturas tridimensionais dos sítios catalíticos e os envolventes aminoacídicos de duas lipases já analisadas por difracção de Raios X.

Na Figura 1.7 mostra-se a conformação fechada (**inactiva**) da lipase 1 de *Geotrichum candidum* (Schrag *et al.*, 1993). Todos os domínios correspondentes à tríade catalítica aparecem ocultos pelas duas hélices α da tampa.

Na Figura 1.8 representa-se a zona correspondente ao sítio activo da lipase de *Candida rugosa* (Cygler *et al.*, 1994). Foi cristalizada na conformação aberta (**activa**) com a formação de um complexo com 2-hexadecano sulfonato de sódio.



Figura 1.7- Estrutura tridimensional do sítio catalítico da lipase 1 de *Geotrichum candidum*. Os resíduos corados estão relacionados com o centro activo da enzima. Esta representação corresponde aos dados reais de difracção de Raios X da proteína 1 THG de *G.candidum* em conformação fechada (inactiva) (Schrag *et al.*, 1993).



Figura 1.8- Estrutura tridimensional do sítio catalítico da lipase 1 de *Candida rugosa*. Dados obtidos por difracção de Raios X (que confirmam os existentes por modelização teórica). Os resíduos corados estão relacionados com o centro activo da enzima. Esta representação corresponde aos dados reais de difracção de Raios X da proteína 1CRL de *C. rugosa*, em conformação aberta (activa) (Cylger *et al.*, 1994).

1.1.3 - Características físico-químicas

As lipases microbianas são em geral, glicoproteínas ácidas (as lipases 1 e 2 de *Candida rugosa* possuem pontos isoeléctricos de 4.5 e 4.97 respectivamente) e com uma massa molecular compreendida entre 19 e 60 kDa. Contêm entre 3 e 15% de hidratos de carbono, sendo a manose mais abundante. São enzimas solúveis apesar, de como já se realçou, actuarem sobre emulsões ou micelas.

Estas enzimas apresentam uma grande diversidade quanto aos factores que afectam a sua actividade: especificidade por substrato, valores de pH óptimo, temperatura óptima, inactivação pelo calor, etc. (Tabela 1.3):

Tabela 1.3 – Temperatura, pH óptimos e inactivação pelo calor de várias lipases microbianas.

| Origem | pH óptimo | T óptima (°C) | Inactivação t (min): T (°C) | Referência |
|----------------------------------|-----------|---------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | 6.2-6.8 | 37 | — | [Ramakrishnan <i>et al.</i> , 1952] |
| <i>Pseudomonas fragi</i> | 7.0-7.2 | 32 | 15:72 | [Nashif, <i>et al.</i> , 1953] |
| <i>Rhizopus delemar</i> | 5.6 | 35 | 15:50 | [Fukumoto <i>et al.</i> , 1964] |
| <i>Aspergillus niger</i> | 5.6 | 25 | 15:45 | [Fukumoto <i>et al.</i> , 1963] |
| <i>Penicillium roqueforti</i> | 8.0 | 37 | 10:50 | [Eitenmiller <i>et al.</i> , 1970] |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 8.5 | 45 | 30:70 | [Vadhera, 1974] |
| <i>Geothricum candidum</i> | 8.2 | 37 | 15:60 | [Tsujsisaka <i>et al.</i> , 1973] |
| <i>Achromobacter lipolyticum</i> | 7.0 | 37 | 40:99 | [Khan, <i>et al.</i> , 1967] |

• Detecção

Dos diversos métodos utilizados para determinar a actividade lipásica destacamos:

a) Ensaio em placa

Os ácidos gordos que se libertam pelo desdobramento do substrato formam um halo transparente que pode ser realçado utilizando substâncias corantes, fluorescentes (Converse *et al.*, 1981; Kouker *et al.*, 1987; Samad *et al.*, 1989) ou recorrendo à utilização de substratos cromogénicos (Miles *et al.*, 1992).

Tabela 1.4 - Determinação de actividade lipásica em placa.

| SUBSTRATO | PRODUTO DA REACÇÃO | MÉTODO |
|-------------|----------------------|---|
| Tributirina | Ácidos gordos livres | Com ou sem indicadores de cor (Rodamina, Azul Victória, Fenol etc.) |

b) Fluorescência

Os ácidos gordos libertados formam um complexo com a sonda fluorescente e uma proteína.

Tabela1.5 - Determinação da actividade lipásica por fluorescência.

| SUBSTRATO | PRODUTO DA REACÇÃO | MÉTODO | λ (nm) |
|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------------|
| Trioleína | Ácidos gordos livres | Formação de complexos | 350(ex) 500 (em) |
| Triglicéridos contendo un anel pireno | Análogos de ácidos gordos livres | Alteração da fluorescência | 340(ex) 400(em) |

c) Tensão superficial

Mediante análise das mudanças na tensão superficial de um sistema heterogéneo, formado na interface entre o substrato hidrofóbico e a fase hidrofílica formada pela água. Este efeito estuda-se através da *técnica da monocapa* numa balança de Langmuir.

Tabela1.6 - Medição da actividade lipásica por variação da tensão superficial.

| SUBSTRATO | PRODUTO DA REACÇÃO | MÉTODO |
|-------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| Dicaprina | Ácidos gordos livres | Medição do movimento de barreira |
| Triglicéridos de cadeia longa | Ácidos gordos livres | Diminuição da tensão superficial |

d) Métodos espectrofotométricos

Realizam-se a partir de uma série de reacções enzimáticas de transformação de algum dos produtos da reacção em substâncias coradas (Tabela 1.7). A alteração da carga negativa na interface água-lípido utilizando um corante catiónico como a safranina (Rawlyer *et al.*, 1989), pode resultar num método eficiente e simples. Outros ensaios utilizam para-nitrofenilesteres (Stuer *et al.*, 1986) de ácidos gordos de cadeias mais ou menos longas. No entanto, não são tão específicos para lipases, pois também são hidrolizados por esterases.

Tabela1.7- Determinação da actividade lipásica por espectrofotometria.

| SUBSTRATO | PRODUTO REACÇÃO | MÉTODO | PRODUTO FINAL | λ (nm) |
|----------------------|----------------------|------------------------|------------------|----------------|
| Trioleína | Glicerol | Conversão enzimática | NAD ⁺ | 340 |
| Trioleína | Ácidos gordos livres | Carga negativa | Safranina | 520/560 |
| p-nitrofenil ésteres | p-nitrofenol | O produto final corado | p-nitrofenolato | 410 |

e) Determinação titrimétrica (pH-stat)

Como o pH é um factor importante em catálise enzimática, mantém-se constante através da adição contínua de uma solução diluída de NaOH. O volume adicionado monitoriza-se em função do tempo. Este método denomina-se pH-stat (Desnuelle *et al.*, 1955). A velocidade da reacção é uma função da concentração de lipase e de substrato da emulsão (Tabela 1.8). No capítulo **Materiais e Métodos** (secção 2.5.1), pode observar-se a constituição de um aparelho utilizado na determinação da actividade lipásica por este método.

Tabela1.8 - Determinação titrimétrica da actividade lipásica.

| SUBSTRATO | PRODUTO DA REACÇÃO | MÉTODO |
|---------------|----------------------|---------|
| Triglicéridos | Ácidos gordos livres | pH-stat |

• Purificação

O isolamento das lipases microbianas faz-se habitualmente a partir de precipitações do sobrenadante de cultura de microrganismos crescidos até à fase estacionária (Muderhwa *et al.*, 1985; Rua *et al.*, 1993; Sugihara *et al.*, 1990).

Os procedimentos de purificação baseiam-se de uma forma geral em várias etapas com utilização de técnicas não específicas como a precipitação com sulfato de amónio, cromatografia de filtração sobre gel e cromatografia de troca iónica. Contudo estes procedimentos usuais são muitas vezes difíceis e morosos e com baixos rendimentos finais. Por isso, recentemente tem-se incrementado a utilização de técnicas cromatográficas por afinidade, sistemas de micelas invertidas, sistemas aquosos de duas fases, técnicas de ultrafiltração por afinidade e técnicas de imunopurificação (Taipa *et al.*, 1992).

O bioprocesso mais usual começa com a remoção das células do meio de cultura (filtração ou centrifugação). A solução livre de células é então concentrada por filtração seguida de precipitação com sulfato de amónio ou de extracção com solventes orgânicos. Esta etapa de concentração é habitualmente a primeira etapa do isolamento sendo a enzima bruta concentrada e ao mesmo tempo semi-purificada. Se os microrganismos crescem em meios com abundância de lípidos, normalmente a primeira etapa de isolamento consiste numa extracção ou numa precipitação com solventes orgânicos tais como etanol, acetona ou butanol. Após serem concentradas e parcialmente isoladas as lipases microbianas extracelulares são então altamente purificadas por uma combinação de vários métodos cromatográficos. Para purificar uma lipase microbiana até à homogeneidade com um rendimento global de 30% e factores de purificação de 320x, são necessárias 4 a 5 etapas de purificação.

Todos estes aspectos foram revisados num trabalho publicado por Taipa *et al.* (1992).

1.1.4- Ocorrência biológica

As lipases estão amplamente distribuídas na natureza podendo encontrar-se em animais, como a lipase pancreática, as lipases da língua, do leite, do tecido adiposo, etc.; em plantas principalmente nas sementes oleosas (actuam sobre os corpos lipídicos dos esferossomas); em bactérias fundamentalmente em espécies dos géneros *Chromobacterium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*; em leveduras principalmente em espécies do género *Candida* e na espécie *Yarrowia lipolytica* e em fungos especialmente em espécies dos géneros *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Penicillium*.

As lipases microbianas são bastante diversificadas nas suas propriedades enzimáticas e especificidade para o substrato, o que aliado à sua fácil disponibilidade as torna muito atractivas para múltiplas aplicações industriais.

Muitas das lipases microbianas são extracelulares, sendo excretadas através da membrana externa para o meio de cultura. A optimização das condições de obtenção de lipases microbianas é muito importante uma vez que as condições de cultura influenciam as propriedades e quantidades do produto, bem como a razão entre a produção de lipases extracelulares e intracelulares. A quantidade de lipases produzida depende de vários factores ambientais tais como a temperatura de cultivo, pH, a composição em nitrogénio, as fontes de carbono e de lípidos, a concentração de sais inorgânicos e a disponibilidade de oxigénio. A produção destas lipases é habitualmente induzida pela presença de substratos lipídicos (Taipa *et al.*, 1992).

Algumas das lipases produzidas por leveduras, como as de *Candida rugosa* já têm importantes aplicações biotecnológicas, como se regista na secção seguinte, existindo importantes estudos de engenharia genética e estando muito bem caracterizados os genes que as codificam.

As razões para o enorme potencial biotecnológico das lipases microbianas devem-se às seguintes características:

- ⇒ Fáceis de obter e purificar.
- ⇒ São estáveis em solventes orgânicos.
- ⇒ Não requerem cofactores.
- ⇒ Possuem uma elevada especificidade pelo substrato.
- ⇒ Exibem uma elevada enantio-selectividade.

1.1.5 – Aplicações biotecnológicas

Devido às suas propriedades, já realçadas em páginas anteriores, as lipases são das enzimas mais largamente utilizadas na indústria em geral e na química orgânica em particular (Jaeger *et.al.*, 1998).

As recentes publicações sobre lipases disponíveis comercialmente, referem enzimas provenientes de 34 fontes distintas, sendo a maioria de origem microbiana. A Tabela 1.9 mostra as lipases microbianas que são mais largamente utilizadas em biotecnologia.

Tabela 1.9 - Utilização biotecnológica de lipases.

| Organismo produtor | Utilização | Comercializado por |
|---------------------------------|--------------------------|---|
| <i>Candida rugosa</i> | Síntese orgânica | Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Sigma |
| <i>Candida antarctica A/B</i> | Síntese orgânica | Boehringer Mannheim, Novo Nordisk |
| <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Aditivo para detergentes | Boehringer Mannheim, Novo Nordisk |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | Alimentação | Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano |
| <i>Burholderia glumae</i> | Síntese orgânica | Unilever |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | Síntese orgânica | Amano, Fluka, Boehringer Mannheim |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | Aditivo para detergentes | Genencor |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> | Aditivo para detergentes | Genencor |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Síntese orgânica | Biocatalysts |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Síntese orgânica | Merck |
| <i>Chromobacterium viscosum</i> | Síntese orgânica | Asahi, Biocatalysts |

Das várias aplicações biotecnológicas das lipases destacamos as seguintes:

• Indústria alimentar

Durante o armazenamento dos alimentos, principalmente dos cárneos, uma das maiores alterações ocorre na fracção lipídica por hidrólise dos triglicéridos, a qual é catalizada por lipases, provocando fenómenos de rancificação, que alteram as características organolépticas do alimento. Isto pode ser evitado controlando as reacções de esterificação ou permutando os grupos éster (Langrand *et al.*, 1990).

Em muitos alimentos de uso diário o desenvolvimento de sabores depende da libertação de ácidos gordos voláteis, o que pode ser conseguido pela adição de lipases a estes produtos (Jachmanian *et al.*, 1996; Langrand *et al.*, 1990).

Na Europa e no Japão está a fazer-se um grande esforço para a comercialização de lipases que catalizem reacções de interesterificação e transesterificação de produtos alimentares. A companhia Unilever obteve uma série de patentes para a interesterificação de ácidos gordos e glicerol. Estes processos proporcionam a utilização da interesterificação de ácidos gordos adequada para a sua utilização em emulsões, e derivados lipídicos como manteiga, cremes artificiais e gelados (Benjamin e Pandey, 1998; Jaeger *et al.*, 1994).

A posição, composição da cadeia e grau de insaturação influenciam grandemente, não só as propriedades físicas, mas também o valor nutricional e sensorial de um dado triglicérido. Por exemplo, a manteiga de cacau tem um ponto de fusão de aproximadamente 37°C, conduzindo a que a sua fusão na boca resulte na percepção de uma sensação de arrefecimento. Como se pode observar na Figura 1.9, utilizando uma lipase imobilizada de *Mucor miehei* substitui-se, por transesterificação, o ácido palmítico pelo ácido esteárico, resultando um triglicérido com a desejada sequência esteárico-oleico-esteárico:

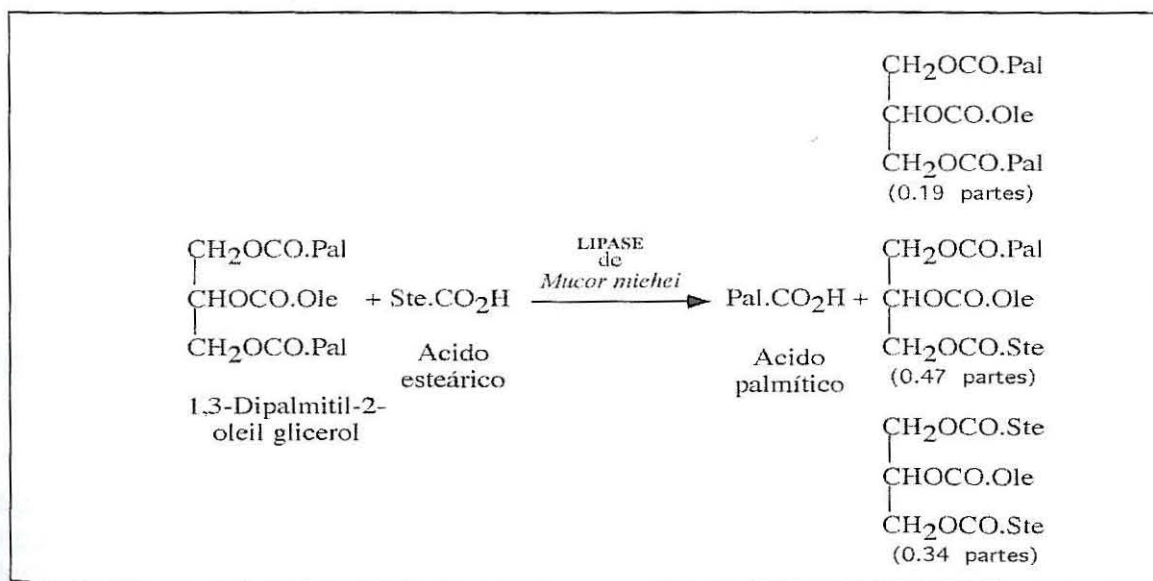


Figura 1.9- Reacção de trans-esterificação na obtenção de sucedâneos de manteiga de cacau.

A produção de determinados ésteres com ácidos gordos de cadeias curtas é importante para a sua utilização na indústria dos gelados (Langrand *et al.*, 1990; Takhata *et al.*, 1993).

• Indústria farmacêutica

A maioria dos fármacos com maior valor terapêutico são obtidos a partir de diversos processos químicos que dão lugar a uma mistura de dois estereoisómeros e em geral um deles possui efeitos secundários residindo no outro a acção farmacológica (Roberts *et al.*, 1995; Wolnak *et al.*, 1990). A separação através de processos convencionais nem sempre é possível.

Uma vez que nas formulações farmacêuticas se deve obter a máxima acção farmacêutica com efeitos secundários mínimos, a enantioselectividade tem neste caso um grande interesse pois a catálise preferencial da reacção de um dos estereoisómeros facilita a separação de ambos pela alteração das propriedades físico-químicas do produto da reacção (González, 1997). Um exemplo claro deste interesse é a separação de L-aminoácidos de misturas racémicas de aminoácidos por biocatálise enzimática utilizando acilases de *Aspergillus oryzae* (Roberts *et al.*, 1995). Outro exemplo interessante é a obtenção de anti-inflamatórios homóquiais a partir das suas misturas racémicas. Assim, Palomer *et al.* (1993) publicaram a obtenção de (S)-cetoprofeno mediante a reacção enzimática catalizada pela lipase de *Mucor miehei* esquematizada na Figura 1.3.

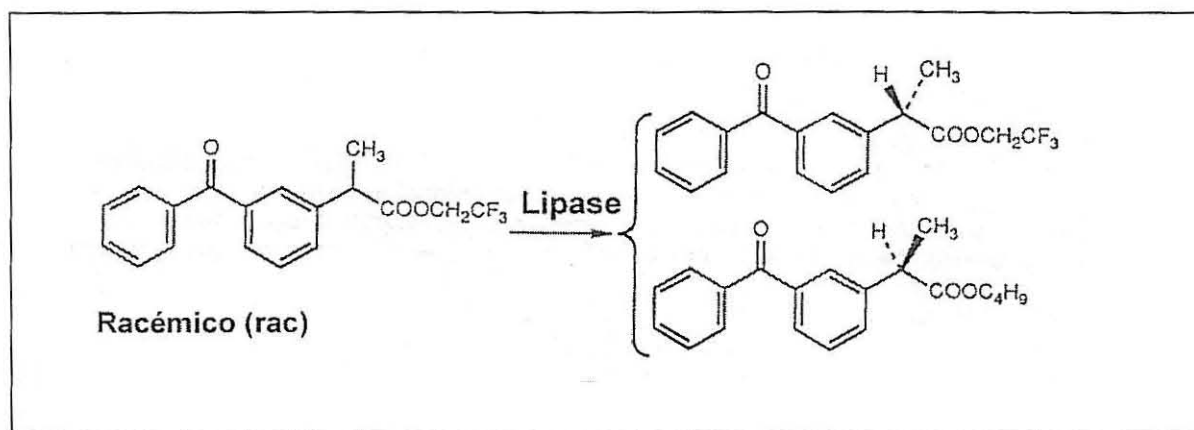


Figura 1.10 - Obtenção de (S)-cetoprofeno butil ester mediante a hidrólise enzimática.

As lipases mais utilizadas na obtenção de fármacos são as de *Candida rugosa*. Elas são capazes de catalizar as reacções de síntese necessárias para a produção de numerosos fármacos como se pode observar na Tabela 1.10. As lipases desta levedura produzem compostos não esteróides anti-inflamatórios, compostos com potencialidades anti-víricas e a síntese enantioespecífica de alcalóides, álcoois secundários, antibióticos, inibidores bioquímicos e precursores de vários fármacos.

Tabela 1.10 – Fármacos obtidos mediante reacções catalizadas por lipases.

| REACTIVO | PRODUTO | REACÇÃO | REFERÊNCIA |
|--------------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------------|
| Ácidos gordos +álcool | S-Ibuprofeno | Esterificação | Gotto <i>et al.</i> , 1996 |
| Ésteres de cloroacetato | Trifluorofeniltril etanol | Alcoólise | Kato <i>et al.</i> , 1996 |
| Acetoxi e fenilbenzoato | Análogo da aspirina | Hidrólise | Cipiciani <i>et al.</i> , 1996 |
| Androstane acetilado | Androstano | Hidrólise | Baldessari <i>et al.</i> , 1996 |
| Acidos gordos poli-insaturados | Prostaglandina | Hidrólise | Wille, 1996 |
| (R,S)-cloroetilcetoprofeno | S-cetoprofeno | Hidrólise | Lalonde, 1995 |
| Epóxido e 2 propil-amina | Propanolamina | Esterificação | Kamal e Rao, 1994 |
| Rac-trifluoroetil-cetoprofeno | S-cetoprofeno butil ester | Alcoólise | Palomer <i>et al.</i> , (1993) |

• Produção de pesticidas

As lipases são industrialmente utilizadas também na resolução de pesticidas racémicos mediante reacções de acetilação e de hidrólise. Assim, por exemplo, as lipases de *Candida rugosa* catalizam a reacção de 2-(4-isoprolaxifenil)propiónico, um intermediário na síntese de um acaricida quiral (Bosetti, *et al.*, 1994) através de uma reacção de hidrólise. Na emulsão do substrato oleoso, mais de 95% é um enantiómero S. O enantiómero S, assim obtido, possui uma forte actividade ovicida contra *Tretranychus urticae*.

Um análogo de hormonas juvenis útil como insecticida, foi obtido com elevado grau de pureza por hidrólise dos respectivos cis e trans-2-(4-metoxibenzil)-1-cicloexilacetato (Zarevaika *et al.*, 1993). De forma semelhante podem-se obter compostos opticamente activos com função insecticida e fungicida.

• Utilização como bio-sensores

Existem numerosos artigos sobre a utilização de lipases na determinação de triglicéridos em gorduras e óleos alimentares (Haalck *et al.*, 1991; Rakhimov, 1986). Um dos métodos usados baseia-se na oxidação do glicerol (liberto pela acção das lipases) pela glicerol-desidrogenase. O NADH formado na reacção pode medir-se através de técnicas espectrofotométricas (Schoemaker *et al.*, 1994).

Outros importantes usos analíticos destas enzimas consistem na determinação de lípidos na indústria alimentar, de bebidas, em análises de poluição e em clínica, especialmente em pacientes com problemas cardiovasculares (Yissum, 1991; Mitsubishi, 1990).

• Outras aplicações

As lipases também podem ser utilizadas como aditivos em detergentes; na produção de aromas para a indústria de cosmética e perfumaria (Miyamoto, *et al.*, 1995 ; Osaka, 1995); na indústria de papel para eliminar determinados compostos hidrofóbicos como triglicéridos e ceras, presentes na polpa de que se obtém o papel (Farell *et al.*, 1997) e em biorremediação para eliminar várias substâncias aquando dos derrames de óleos.

No futuro, uma área de aplicação importante será o aumento do uso de lipases como biocatalisadores na preparação de compostos quirais na forma enantiomérica pura.

Nos últimos anos têm-se desenvolvido intensos programas para obter biocatalisadores termostáveis que possam funcionar durante muitas horas sem perda substancial de actividade (Christensen e Donelyan, 1990). Para se poderem utilizar lipases com os requisitos destes biocatalisadores elas deveriam poder suportar temperaturas até 60°C, pH 7-11 e serem capazes de funcionar na presença de determinados produtos sem perda de actividade. Os avanços em engenharia genética e na tecnologia do ADN recombinado poderão ajudar a produzir enzimas com elevada estabilidade (Kottwitz *et al.*, 1994) com boas consequências especialmente em termos económicos e ecológicos.

• Lipases imobilizadas

Conjuntamente com a importância de estudar novas lipases capazes de catalizar reacções de interesse industrial, tais como a modificação de óleos e gorduras (Malcata *et al.*, 1990), reacções de síntese química em solventes orgânicos (Chen *et al.*, 1989; Parida *et al.*, 1991) resolução de misturas racémicas (Chen, 1993) etc., têm-se realizado muitos esforços no sentido de encontrar bons suportes para a imobilização das lipases (Malcata *et al.*, 1992; Otero *et al.*, 1988; Stark *et al.*, 1989; Shaw *et al.*, 1990). As vantagens das lipases imobilizadas incluem a sua reutilização, a fácil separação dos produtos, o incremento da estabilidade da enzima o aumento da enanteo-selectividade, etc. (Malcata *et al.*, 1990; Malcata *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 1993; Pilone *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 1996).

Os trabalhos publicados sobre diferentes procedimentos de imobilização de lipases (atrapamento, microencapsulação, entrecruzamento, adsorção, união covalente, modificação química etc., foram recentemente revisados pelo grupo de Malcata (Balcão *et al.*, 1996) num trabalho que reúne as principais características das lipases imobilizadas até essa data. Com base nessa publicação construiu-se a tabela 1.11.

Tabela 1.11 - Principais características de alguns biorreactores que utilizam lipases imobilizadas (Balcão *et al.*, 1996).

| Reacção | Substrato(s) | Origem da lipase | Método de imobilização |
|--------------------|---|---|---------------------------|
| Hidrólise | Azeite | <i>Candida rugosa</i> | Ligação covalente |
| Alcoólise | Etanol β -sustituído | <i>Candida rugosa</i> e pâncreas porcino | Precipitação |
| Hidrólise | BFT | <i>Candida rugosa</i> | Adsorção |
| Interesterificação | 1-estearil 1,2-linoleil, 3-oleilglicerol | <i>Mucor miehei</i> , <i>Candida deformans</i> <i>Rhizopus arrhizus</i> | Permuta iónica e adsorção |
| Alcoólise | Tributirina e benzil-alcohol | <i>Candida rugosa</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>Penicillium. roquefortii</i> , pâncreas porcino, <i>Humicola lanuginosa</i> , <i>Mucor javanicus</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Mucor javanicus</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Aspergillus niger</i> | Precipitação |
| Síntese de ésteres | Ácido oleico e mono- e di-oleilglicerol | Semente de colza | Precipitação e adsorção |
| Acidólise | Azeite e ácidos octanóico, decanóico e láurico | <i>Mucor miehei</i> | Precipitação e adsorção |
| Hidrólise | Esteres de triacilgliceróis | <i>Mucor miehei</i> | Adsorção |
| Acidólise | Óleo de soja e ácidos láurico, palmítico e oleico | <i>Mucor miehei</i> e pâncreas porcino | Adsorção |
| Transesterificação | Gordura de manteiga | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Candida rugosa</i> | Adsorção |
| Acidólise | Azeite e ácidos metil-esteárico, esteárico e palmítico | <i>Rhizopus chinensis</i> | Atrapamento |
| Síntese de ésteres | Ácido oleico e oleilalcool; ácido octanóico e octanol; ácido mirístico e propanol | <i>Mucor miehei</i> | Adsorção |
| Transesterificação | Óleo de "coprah" e metil estearato | <i>Candida deformans</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Mucor miehei</i> | Adsorção |
| Síntese de ésteres | 1-dodecanol e ácido n-dodecanóico | <i>Pseudomonas fragi</i> | Precipitação |
| Síntese de ésteres | (R,S)-1-feniletanol e ácido heptanóico | <i>Candida rugosa</i> | Adsorção |
| Síntese de ésteres | Geraniol e ácido laurico | <i>Humicola lanuginosa</i> | Adsorção |

Tabela 1.11 – Continuação da tabela da página anterior.

| | | | |
|--------------------|--|---|--|
| Hidrólise | Azeite e água | <i>Humicola lanuginosa</i> | Adsorção, união covalente ou entrecruzamento |
| Interesterificação | Óleos vegetais (côco, palma, etc) | <i>Mucor miehei</i> | Adsorção |
| Hidrólise | Óleo de soja e água | <i>C. rugosa</i> | Adsorção |
| Acidólise | Óleo de canola e ácido laurico | Pâncreas porcino | Adsorção |
| Interesterificação | Óleo de canola e trilaurina | Pâncreas porcino | Adsorção |
| Hidrólise | Acilglicerol e água | Leite humano | Precipitação |
| Hidrólise | Azeite e água | <i>C. rugosa</i> | Precipitação |
| Síntese de ésteres | Butanol ou etanol e ácido butírico | <i>C. rugosa</i> , <i>Aspergillus niger</i> , pâncreas porcino, <i>Mucor miehei</i> | Precipitação e adsorção |
| Interesterificação | Etil D-glucopiranósido e ácidos gordos C ₈ -C ₁₈ | <i>Mucor miehei</i> , <i>Candida antarctica</i> , <i>Humicola sp.</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> | Intercambio iônico |
| Interesterificação | Óleo de castor | <i>Chromobacterium viscosum</i> | Precipitação |

1.2- EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM LEVEDURAS

Nos últimos anos, tem-se registado um grande incremento na produção de proteínas por engenharia genética. Das inúmeras vantagens deste processo, destacamos as seguintes:

- ⇒ Melhores índices de produção, a baixos custos;
- ⇒ Obtenção de proteínas (enzimas) de interesse por melhoria de:
 - estabilidade (termoestabilidade, pH, resistência à desactivação oxidativa, etc.);
 - actividade (aumento da velocidade da reacção, aumento da afinidade pelo substrato, alteração da especificidade, resistência à inibição pelo substrato e/ou produto).

Os sistemas mais desenvolvidos para a expressão de proteínas utilizam *E. coli* como hospedeiro. Este microrganismo apresenta alguns problemas tais como degradação proteolítica, possíveis contaminações com endotoxinas e a necessidade de ruptura celular para recuperar as proteínas, para além de as proteínas assim expressadas se acumularem em agregados insolúveis denominados *corpos de inclusão*. Alternativamente tem-se utilizado *Bacillus subtilis*, que também secreta proteínas e apresenta menos problemas de toxicidade. No entanto, os transformantes são instáveis e é incapaz de realizar modificações pós-traduccionais como a glicosilação.

Devido a estas dificuldades, têm-se procurado novos organismos, especialmente leveduras, que apresentam as seguintes vantagens:

- ⇒ São organismos seguros para a produção de proteínas de utilização humana;
- ⇒ Consegue-se, à escala industrial, uma produção de proteínas a partir de substratos económicos;
- ⇒ Podem realizar modificações pós-traduccionais nas proteínas (glicosilação, formação de pontes bissulfuradas, maturação proteolítica, etc.);
- ⇒ Rápido crescimento e fácil manipulação genética;
- ⇒ Existe uma ampla gama de sistemas de expressão de ADN heterólogo (variedade de estirpes, vectores, etc.), o qual permite aumentar a capacidade de determinados promotores, incrementar a estabilidade dos vectores de expressão etc..

Apesar de tudo, a expressão génica é um processo muito complexo, de forma que podem aparecer problemas em vários pontos, desde a transcrição até à estabilidade da proteína secretada.

1.2.1 – Secreção de proteínas

Um dos principais objectivos na produção de proteínas é a sua secreção, não só porque a purificação é mais fácil, como se evita a possível instabilidade e toxicidade das proteínas no interior da célula.

A produção de proteínas é dirigida por uma sequência de sinal N-terminal implicada na deslocação dos polipéptidos através da membrana do retículo endoplasmático. Posteriormente o sinal peptídico é eliminado pela peptidase sinal. No lúmen do retículo endoplasmático, as proteínas são glicosiladas e transportadas em vesículas ao complexo de Golgi, onde sofrem modificações das estruturas glicosídicas. Finalmente as proteínas introduzem-se em vesículas de secreção que se dirigem à superfície celular. Neste processo, os determinantes mais importantes são:

• Sequência de sinal

Constituída por um extremo N-terminal carregado, um núcleo central hidrofóbico e uma sequência consenso para a eliminação do sinal peptídico (Ng *et al.*, 1996). Muitos péptidos sinal contêm aminoácidos básicos antes do núcleo hidrofóbico e, por vezes aparecem aminoácidos neutros e pequenos, próximo do sítio de corte da peptidase sinal, dando origem a uma estrutura em α -hélice. Uma vez, utilizam-se sequências sinal da proteína que se vai secretar outras vezes sequências da própria levedura (Zheng *et al.*, 1996). Contudo, tem-se demonstrado, em muitos casos, não ser necessária a presença do péptido sinal para a secreção da proteína (Akatsuka *et al.*, 1994; Blachly-Dyson *et al.*, 1987). Neste caso, a proteína madura deve conter outros motivos que sejam reconhecidos pela maquinaria de secreção (Duong *et al.*, 1994; Micanovic *et al.*, 1990). Nas leveduras, as três sequências sinal mais utilizadas na expressão heteróloga são os genes que codificam para a fosfatase ácida reprimível (*PHO5*) (Fermiñán, 1996), a invertase (*SUC2*) (Roca *et al.*, 1996) e o factor α (*Mf α 1*) (Kolling *et al.*, 1993).

• Glicosilação

Muitas proteínas são glicosiladas uma vez sintetizadas. A porção glicosídica parece estar envolvida em diversos processos como o reconhecimento de células, a interacção de hormonas com os seus receptores, interacções microrganismo-hospedeiro, solubilidade e estabilidade (Rademacher *et al.*, 1988). Apesar de muitas glicoproteínas expressas em leveduras serem activas, (Elliott *et al.*, 1989; Innis *et al.*, 1985), nalguns casos tem-se observado uma hiperglicosilação que pode originar problemas (Schultz *et al.*, 1987).

• Enrolamento e transporte

Tal como a glicosilação, o enrolamento proteico é uma modificação pós-traducciona que ocorre no retículo endoplasmático. Podem aparecer problemas neste processo de se acumularem no retículo endoplasmático proteínas incorrectamente enroladas ou saturação de outras proteínas "acessórias" (Freedman, 1989; Fukui *et al.*, 1987) que contribuíram para o processo. O correcto enrolamento proteico é um factor mais importante se as proteínas são multiméricas (Horwitz *et al.*, 1988). Por outro lado, a presença de parede celular complica o processo de secreção nas leveduras, a permeabilidade é um factor limitante, sendo mais facilmente secretadas as proteínas mais pequenas. Além do tamanho, propriedades como o grau de glicosilação ou a carga da proteína são as características que mais influenciam a passagem através da parede celular.

• Processamento proteolítico

Por vezes podem aparecer processamentos aberrantes, consequência da acção de proteases distintas da peptidase sinal. Nas leveduras, a peptidase sinal é um polipéptido formado pelo produto do gene *SEC11* e uma glicoproteína (YaDeau *et al.*, 1991). Este primeiro processamento proteolítico pode estar saturado dando origem a acumulações das formas precursoras das proteínas (Haguenauer-Tsapis *et al.*, 1982). A presença de outras proteases inespecíficas diminui os níveis da proteína secretada.

Nas Tabelas 1.12 e 1.13, representam-se exemplos de produção de proteínas heterólogas em que se utilizam distintos promotores para induzir a sua síntese com diferentes sequências sinal para favorecer a secreção da proteína, em *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* respectivamente.

Tabela 1.12 - Produção de proteínas heterólogas em *S.cerevisiae* (Fleer, 1992).

| Proteína | Vector | Promotor | Sequência de sinal | mg/L (matraz) | mg/L (Fermentador) |
|---------------------|---------|------------------------------|------------------------------|---------------|--------------------|
| GRF humano | 2 μ | <i>MFα</i> | <i>MFα</i> | | 30 mg |
| apoE humano | 2 μ | <i>PHO5</i> | <i>MFα</i> | 40 mg | |
| IL-6 humana | 2 μ | <i>GAL1</i> | <i>MFα</i> | 30 mg | |
| IL-1 humana | 2 μ | <i>GPD</i> | Amilasa | 20 mg | |
| PTH humana | 2 μ | <i>MFα</i> | <i>MFα</i> | 100 mg | |
| Seroalbúmina humana | 2 μ | <i>Diversos</i> | <i>Diversos</i> | 40-150 mg | |
| Amilase murina | 2 μ | <i>GAL7</i> | - | 60 mg* | 370 mg* |
| Anticoagulante | 2 μ | <i>GAL10</i> | <i>MFα</i> | 250 mg | |
| Toxina C tétanos | 2 μ | <i>GAL/ADH</i> | - | 90 mg* | > 1 g* |

*Quantidade de produto acumulada no interior da célula.

Tabela 1.13 - Produção de proteínas heterólogas em *K.lactis*.

| Proteína | Vector | Promotor | Sequência de sinal | mg/L (matraz) | mg/L (Fermentador) | Referência |
|---------------------------------|-------------|---------------------|---------------------------------|----------------|--------------------|-------------------------------------|
| IL-1 humana | pKD1 | <i>PHO5/PGK</i> | Killer | 80 | | |
| Seroalbúmina humana | pKD1 | <i>LAC4/PGK</i> | Nativo | 400 | 3000 | (Fleer, 1991) |
| HBsAg | Integrativo | <i>LAC4</i> | - | 12* | | |
| Proquimosina bovina | Integrativo | <i>LAC4</i> | MF α | | grama | (van den Berg <i>et al.</i> , 1990) |
| β -galactosidase | KEp6 | <i>KIPHO5</i> | <i>KIPHO5</i> | 100 (U/mg cél) | | (Fermiñán, 1996) |
| Hormona tGH-II | Kep6 | <i>KIPHO5</i> | <i>KIPHO5</i> | | | (Fermiñán, 1996) |
| α -amilase | pKARS | α -amilase | α -amilase | 30 (U/L) | | (Strasser <i>et al.</i> , 1989) |
| Renina de <i>Mucor pusillus</i> | Integrativo | <i>LAC4</i> | Factor α de <i>S. c.</i> | 20 | | (Ferbeyre <i>et al.</i> , 1991) |
| Lisozima humana | Integrativo | <i>GAL7 de K.l.</i> | Toxina killer <i>K. l.</i> | 2.45 | | (Rossolini <i>et al.</i> , 1992) |

*Quantidade de produto acumulada no interior da célula.

1.2.2 – Fisiologia da expressão intracelular

O metabolismo celular é afectado pelo alto nível de expressão de um gene heterólogo, reduzindo a capacidade de crescimento. Alguns genes apresentam uma toxicidade directa. Nos sistemas de expressão constitutiva onde o crescimento e a expressão estão unidos produz-se uma forte selecção a favor das células com uma expressão genética reduzida. Por isso é preferível utilizar promotores regulados, porque se podem separar as fases de crescimento e expressão génica (Henkin, 1996). A toxicidade evidencia-se na dificuldade de obter transformantes, quando se utilizam vectores de expressão constitutivos ou pela diminuição da velocidade de crescimento. A simples existência de plasmídeos com alto número de cópias, já é suficiente para a diminuição do crescimento.

Dos factores que afectam a expressão intracelular de genes heterólogos destacamos:

• A nível transcripcional

Em *Saccharomyce cerevisiae*, a expressão genética está regulada por uma série de sequências de activação nas regiões promotoras dos genes. A sua ausência faz com que o nível de expressão de proteínas heterólogas não seja máxima (Zaman *et al.*, 1992). Estas sequências não são requeridas em leveduras "não convencionais".

Tabela 1.14 -Promotores utilizados em *S.cerevisiae* para a expressão de genes heterólogos.

| | Promotor | Genotipo hospedeiro | Força | Regulação ^a | Referência |
|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------|--------------------------------|--|
| N A T I V O S | <i>PGK^b,GAP,TPI</i> | wt | ++++ | x 20 (glucose) | [Rosenberg <i>et al.</i> , 1990] [Tuite <i>et al.</i> , 1982] |
| | <i>GAL1</i> | wt | +++ ^c | x 1000 (galactose) | [Johnston, 1987] |
| | <i>ADH2</i> | wt | ++ ^d | 1/100 (glucose) | [Price <i>et al.</i> , 1990] |
| | <i>PHO5</i> | wt | + ⁺ | 1/200 (fosfato) | [Hinnen <i>et al.</i> , 1989] |
| | <i>PHO5</i> | pho4 ^{ts} pho80 | + | x 50 (37 a 24° C) | [Kramer <i>et al.</i> , 1984] |
| | <i>CUP1</i> | wt | + | x 20 (Cu ²⁺) | [Etcheverry, 1990] |
| | <i>MFα1</i> | wt | + | Constitutivo (células α) | [Brake <i>et al.</i> , 1984] |
| F O R A N E O S | <i>MFα1</i> | sir3 ^{ts} | + | x 10 ⁵ (37 a 24° C) | [Brake <i>et al.</i> , 1984] |
| | <i>PGK/α2</i> | sir3 ^{ts} | ++++ | x 100 (37 a 24° C) | [Walton <i>et al.</i> , 1989] |
| | <i>TPI/α2</i> | sir3 ^{ts} | ++++? | > x 50 (37 a 24° C) | [Sledziewski, 1988] |
| | <i>GAP/GAL</i> | wt | +++? | x 150-200 (galactose) | [Bitter <i>et al.</i> , 1988] |
| | <i>PGK/GAL</i> | wt | +++? | (galactose) | [Cousens <i>et al.</i> , 1990] |
| | <i>GAP/ADH2</i> | wt | +++? ^d | (glucose) | [Cousens <i>et al.</i> , 1987] |
| | <i>GAP/PHO5</i> | wt | ++++? | x 2-5 (fosfato) | [Hinnen <i>et al.</i> , 1989] |
| S | <i>CYCI/GRE^e</i> | Expressa receptor glucocorticoides | +++? | x 50-100 (deoxicorticosterona) | [Schena <i>et al.</i> , 1991] |
| | <i>PGK/ARE^f</i> | Expressa receptor andrógenos | ++++ | > x 300 (deoxicorticosterona) | [Purvis <i>et al.</i> , 1991] |

^a A proporção de indução depende do "chivato" utilizado, 5% de ^bARNm em cópia única. ^c 1% de ARNm em cópia única, mas muito limitado em multicópia. Incrementa-se pela sub-expressão de GAL4. ^d Incrementa-se pela sub-expressão de ADR1. ^eElemento de resposta a glucocorticoides. ^f Elemento de resposta a andrógenos.

A estabilidade ou vida média dos ARN mensageiros (Brown, 1989) depende da presença ou não de elementos desestabilizantes (Brown *et al.*, 1988). Quando se prevê certa instabilidade no ARN, devem utilizar-se promotores mais fortes, ou com uma cinética de indução mais rápida. Também se pode corrigir sintetizando algumas regiões do gene em que se substitui a utilização de codões ou eliminando alguns elementos não codificantes da região 3' do gene (Demolder *et al.*, 1992).

• A nível traduccional

A informação para o correcto enrolamento das proteínas, e portanto, para o esbecimento da sua conformação funcional activa encontra-se na estrutura

primária do polipéptido (Gething *et al.*, 1992). É possível que velocidades de síntese elevadas ou temperaturas inusuais ao enrolamento sejam factores limitantes na expressão heteróloga (Kiefhaber *et al.*, 1991; Schein *et al.*, 1988).

• Outros factores

A via de secreção das proteínas em cada organismo pode ser um factor limitante na expressão heteróloga de certas proteínas. Têm-se desenvolvido diversas estratégias para a obtenção de estirpes mutantes hipersecretoras (Cha *et al.*, 1996; Jacobs *et al.*, 1995), que tenham desregulada a maquinaria celular de secreção.

1.3- A LEVEDURA *Yarrowia lipolytica*

1.3.1 – Características biológicas

Yarrowia lipolytica é uma levedura dimórfica, que foi isolada pela primeira vez em 1945 pelo *Northern Regional Research Laboratory* (USA). Pertence ao grupo dos ascomicetes, tendo sido inicialmente classificada como *Candida lipolytica* (Wickerham, 1951). Mais tarde, quando se descobriu a sua fase sexual, todas as estirpes desta levedura com capacidade de esporulação foram incluídas no género *Endomycoopsis* (Wickerham *et al.*, 1970). Em 1972 classificou-se por motivos morfológicos como *Saccharomycoopsis lipolytica*. Finalmente em 1980, Van der Walt e Von Arx reclassificaram-na pelas suas características, no novo género *Yarrowia*, definindo *Y. lipolytica* como a espécie tipo deste género. A sua denominação faz referência à sua preferência para crescer em substratos ricos em lípidos.

O crescimento dimórfico aliado ao facto de não ser um organismo patogénico fazem com que esta levedura seja muito adequada para o estudo do dimorfismo, um processo básico da diferenciação celular (Van der Walt e Von Arx, 1980; Barnett *et al.*, 1990; Torres Guzman *et al.*, 1994).

Forma, em meio sólido, colónias brancas ou de cor creme, de aspecto rugoso, que incluem células leveduriformes e micélio verdadeiro formado por hifas septadas (Wickerham, 1951). Na figura 1.11 podem observar-se estes aspectos, numa fotografia de microscopia óptica obtida em laboratório.

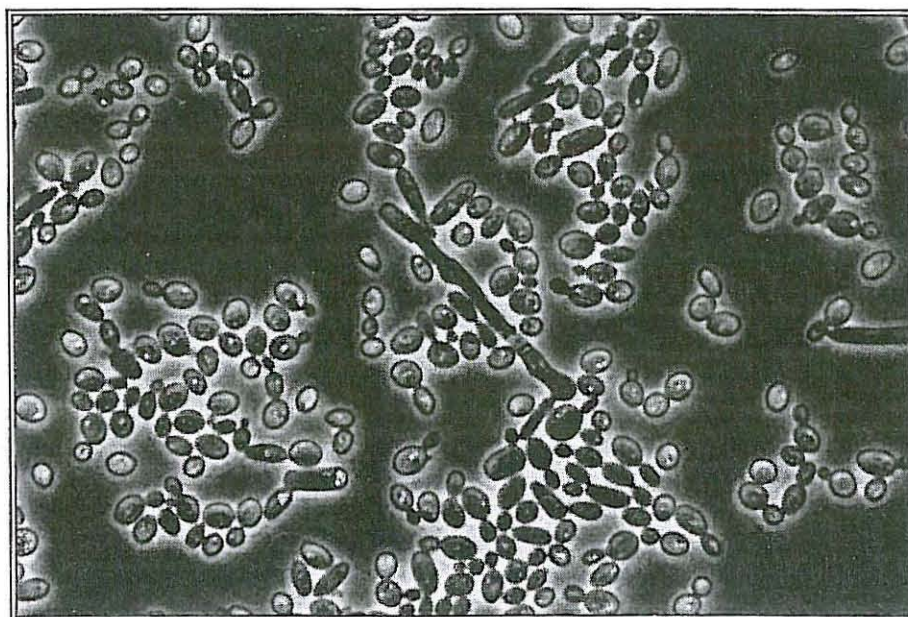


Figura 1.11 - Fotografia de microscopia óptica mostrando células e micélio de *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica apresenta fases haplóide e diplóide estáveis, que alternam por processos de conjugação ou de meiose. A conjugação é heterotática e tem lugar pela união de dois tipos sexuais diferentes determinados pelos alelos *MATA* e *MATB* (Wickerham *et al.*, 1970).

1.3.2 – Manipulação genética

• Métodos clássicos

Os estudos de genética clássica são difíceis com a maioria das estirpes devido à baixa frequência de esporulação e de viabilidade dos esporos. Apesar disso, mediante vários programas de melhoria genética tem-se seleccionado algumas estirpes com maior produção de ascas com quatro esporos viáveis, (Ogrydziak *et al.*, 1978), tendo-se desenvolvido também condições óptimas de conjugação e esporulação. A selecção dos diploides realiza-se por complementação de auxotrofias e a disseção das ascas é laboriosa devido à forma e ao pequeno tamanho dos esporos (Ogrydziak *et al.*, 1978).

• Marcadores

Os marcadores genéticos mais utilizados na manipulação deste organismo são os genes *LEU2* e *URA3*. Este último, permite, também a selecção negativa com 5-fluororótico, apesar de ocasionalmente se utilizarem *LYS5*, *LYS1*, *HIS1* e *ADE1*.

Existem também estirpes mutadas com auxotrofas para triptofano e metionina, entre outros.

• Sistemas de transformação

Os sistemas de transformação mais eficientes nesta levedura baseiam-se na incubação com acetato de lítio e em técnicas de electroporação. A transformação chega a ser bastante eficiente nalgumas estirpes (10^4 transformantes/ μg ADN), apesar de noutras resultar mais difícil a transformação.

• Vectores integrativos e autónomos

A integração nesta levedura ocorre maioritariamente por recombinação homóloga, o que permite a interrupção dirigida de genes mediante "cassetes" contendo as sequências flanqueantes do gene diana, por duplo sobre cruzamento, ou mediante técnicas de "pop out" (Boeke, 1987) por sobre cruzamento simples.

Têm-se desenvolvido vectores de expressão tanto integrativos com replicativos para esta espécie. Os vectores integrativos mais utilizados são baseados no plasmídeo pINA 62, que possui o marcador *LEU2* de *Y. lipolytica* e sequências derivadas do plasmídeo pBR322 e um sítio *Not I* único para a integração no genoma.

Os vectores replicativos, como pINA240 e pINA 444, possuem além disso sequências de replicação autónomas da própria *Y. lipolytica*: ARS18 e ARS68 (Fournier *et al.*, 1991). Existem genotecas de ambos os tipos com estes plasmídeos. Os vectores autónomos mencionados mantêm-se nas células em baixo número de cópias (1-3) e são muito estáveis (perdem-se com uma percentagem de 0.5-5% em cada geração como máximo).

1.3.3 - Expressão de proteínas heterólogas em *Y. lipolytica*

A levedura que tradicionalmente se tem utilizado a nível industrial para produzir proteínas heterólogas, pelo grande conhecimento genético que se tem, tem sido a *S. cerevisiae*. No entanto, a produção com este hospedeiro está muito restringida, por diversos motivos, como por exemplo a secreção e produtividades ineficientes e a hiperglicosilação.

Para se poderem desenvolver modelos alternativos torna-se necessário definir sistemas de transformação e métodos de selecção de transformantes noutras leveduras. De todas as que tem sido investigadas as que são mais eficientes a nível industrial descrevem-se de forma comparativa com *S. cerevisiae* na Tabela 1.15, apresentando-se na Tabela 1.16 os promotores para a expressão heteróloga dessas leveduras.

Tabela 1.15 - Leveduras utilizadas na expressão de genes heterólogos.

| | <i>S. cerevisiae</i> | <i>K. lactis</i> | <i>Y. lipolytica</i> | <i>P. pastoris</i> | <i>H. polymorpha</i> |
|--------------------------------------|----------------------|------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| Produção de enzimas industriais | + | + | + | - | - |
| Status GRAS | + | + | - | - | - |
| Fermentação a alta densidade celular | +/- | + | + | + | + |
| Controlo de explosão do fermentador | - | - | - | + | + |
| Nível de secreção | - | + | + | + | + |
| Hiperglicosilação | + | +/- | +/- | - | - |
| Fácil manipulação genética | + | +/- | + | - | - |
| Vectores estáveis | + | + | +/- | - | - |

Tabela 1.16 - Promotores para a expressão heteróloga de leveduras.

| LEVADURA | PROMOTOR | REFERÊNCIA |
|---------------------------------|------------------------------|---|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>ADH2</i> | Romanos <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>CUP1</i> | Romanos <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>GAL1</i> | Romanos <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>GAL10</i> | Wesolowski-Louvel <i>et al.</i> , 1996 |
| | <i>GAP</i> | Romanos <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>PGK</i> | Romanos <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>PHO5</i> | Romanos <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>Mfα</i> | Wesolowski-Louvel <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | <i>LAC4</i> | Wesolowski-Louvel <i>et al.</i> , 1996 |
| | <i>PHO5</i> | Fermiñán e Domínguez., 1998 |
| | <i>PHO3</i> | Domínguez <i>et al.</i> , (em elaboração) |
| | <i>MAL22</i> | Domínguez <i>et al.</i> , (em elaboração) |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | <i>XPR2</i> | Barth e Gaillardin, 1996 |
| | <i>MTPI/II</i> | Domínguez <i>et al.</i> , (em elaboração) |
| | <i>TEF</i> | Muller <i>et al.</i> , 1998 |
| | <i>RPS7</i> | Muller <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Pichia pastoris</i> | <i>AOX1</i> | Sreekrishna <i>et al.</i> , 1997 |
| | <i>GAP</i> | Waterthan <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Hansenula polymorpha</i> | <i>MOX</i> | Gellisen e Holleberg, 1997 |
| | <i>FMD</i> | Gellisen <i>et al.</i> , 1991 |

Fizeram-se vários estudos comparativos analisando a capacidade destas leveduras como hospedeiros para preferenciar a produção de proteínas heterólogas, utilizando como indicadores mais significativos: a frequência de transformação, possíveis problemas de glicosilação, estabilidade dos plasmídeos e crescimento.

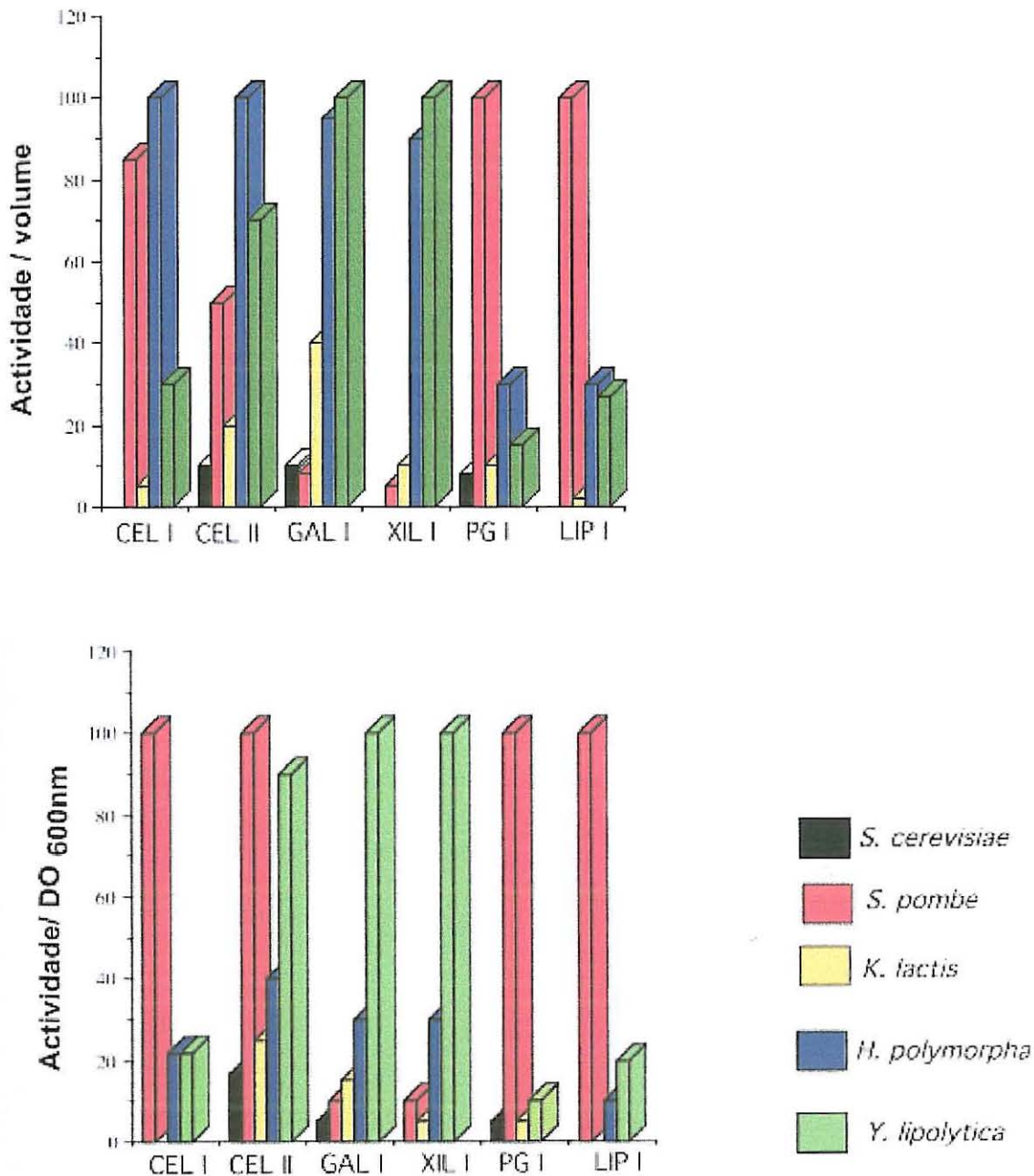


Figura 1.12 - Análise comparativa da capacidade de cinco leveduras para serem utilizadas na expressão de proteínas heterólogas. Como proteínas indicadoras utilizaram-se: CEL1=celulase I de *A. aculeatus*, Cel II=celulase II de *H. insolens*, GAL I=galacturonase de *A. aculeatus*, XIL I= silanase I de *H. insolens*, PG I=poligalacturonase I de *A. aculeatus* y LIP I=lípase I de *T. lanuginosus*. Atividades relativas a volume (gráfico superior) ou a densidade óptica (gráfico inferior) (Muller et al., 1998).

Para a realização destes estudos comparativos utilizaram-se diversos genes indicadores. Assim, por exemplo, Muller *et al.* (1998) utilizaram como proteínas indicadoras: a celulase I de *Aspergillus aculeatus*, a celulase II de *Hemicola insolens*, a galacturonase de *A. aculeatus*, a silanase I de *H. insolens*, a poligalacturonase I de *A. aculeatus* e a lipase I de *Thermomyces lanuginosus*. todas as construções genéticas foram realizadas com plasmídeos replicativos colocando os genes com os seguintes promotores: para *S. cerevisiae* o promotor GAL1, para *K. lactis* LAC4, para *H. Polymorpha* MOX, para *Y. lipolytica* XPR2 e para *S. pombe* o promotor ADH.

Analizando a Figura 1.12 pode-se observar em todos os casos que os valores de produção obtidos com *Y. lipolytica* são em todos os casos superiores aos de *S. cerevisiae*, no caso da galacturonase os valores mais altos das 5 leveduras analisadas e nas restantes proteínas indicadoras os valores são razoavelmente elevados.

Em comparação com *S. cerevisiae* a disponibilidade de promotores em *Y. lipolytica* é escassa. Este é um problema das leveduras "não convencionais" que limita a sua utilização. Na Tabela 1.17 resumem-se os promotores mais utilizados em *Y. lipolytica*.

Tabela 1.17 - Exemplos de proteínas heterólogas expressadas em *Y. lipolytica*.

| PRODUTO | PROMOTOR | LOCALIZAÇÃO | REFERÊNCIA |
|-----------------------------------|----------|-------------|------------------------------|
| S.cerevisiae invertase | XPR2 | Secretada | Nicaud <i>et al.</i> , 1989 |
| IFN porcina | XPR2 | Secretada | Heslot <i>et al.</i> , 1990 |
| Proquimosina bovina | XPR2 | Secretada | Franke <i>et al.</i> , 1988 |
| Factor humano de coagulação XIIIa | XPR2 | Secretada | Tharaud <i>et al.</i> , 1992 |
| Anafilotoxina humana c5a | XPR2 | Secretada | Davidow <i>et al.</i> , 1987 |

Os promotor mais utilizado até ao momento em *Y. lipolytica* tem sido o de XPR2, o gene que codifica para a protease celular alcalina AEP. Esta promotor é fortemente regulado pelo pH e pelas fontes de carbono e nitrogénio e tem-se utilizado para expressar e secretar anafilotoxina C5 α humana e pro-quimosina

bovina, dois produtos de interesse biofarmacêutico (Franke *et al.*, 1988). O gene codifica para uma pro-enzima; a protease madura produz-se depois de eliminar as sequências pre durante a transcrição, para o retículo endoplasmático, pela acção de Xpr6p, uma proteína semelhante a Kex2p. O uso combinado do promotor e da região pre permite dirigir uma proteína heteróloga através de toda a via de secreção até ao exterior da célula, enquanto que as regiões pro por si só não são capazes de o fazer. O rendimento incrementa-se ao empregar um vector autónomo em vez de um replicativo no entanto isto prejudica a regulação do promotor, porque ao nível da expressão basal incrementa-se umas 50 vezes mais que o normal em condições repressoras. Xpr2 promove assim um nível de expressão basal alto e possui uma capacidade de indução baixa.

Promotores em estudo, nesta levedura, são os promotores das metalotioneínas I e II, são promotores muito fortes e induzíveis por cobre, possuem um nível basal muito reduzido, o que os torna excelentes candidatos para a expressão de proteínas heterólogas. O seu maior problema prende-se com a toxicidade do cobre (Garcia, 1999).

Os outros dois promotores em estudo são o promotor do gene *TEF*, que codifica para o factor de alongação 1 a e o promotor do gene *RPS 7* que codifica para a proteína ribossomal S7 (Muller *et al.*, 1998).

Com o exposto pode-se concluir que *Y. lipolytica* possui boas características para ser utilizada na expressão heteróloga de proteínas de uso humano.

1.3.4 – Metabolismo e aplicações biotecnológicas

A partir de 1960, as investigações sobre *Y. lipolytica* adquiriram dimensão industrial devido à sua capacidade para crescer em substratos económicos, como lípidos e alcanos, como fonte de carbono (Malek *et al.*, 1968).

Tem-se utilizado na produção de proteínas com interesse na alimentação animal e emprega-se na indústria para a produção de ácido cítrico a partir de uma gama de substratos muito ampla como parafinas, hexadecanos e ácidos gordos e com uma produção vinte vezes superior à do fungo *Aspergillus niger*. Além disso existem várias patentes para a produção de manitol, eritrol (De Zeeuw *et al.*, 1973) e isopropilmalato (De Zeeuw *et al.*, 1983) entre outras.

O crescimento sobre ácidos oleico conduz à proliferação de peroxissomas, actualmente estudada pelo grupo de Rachubinsky, que utilizam este organismo como sistema modelo para investigações sobre a biogénese deste organito (Titorenko e Rachubinski, 1998).

O isolamento de mutantes incapazes de crescer sobre alcanos permitiu também demonstrar, que *Y. lipolytica*, possui vários sistemas muito específicos para a assimilação de alcanos, assim como mono-oxigenases do citocromo P-450 específicas (Mauersberger, 1991).

Esta levedura não produz etanol, mas é capaz de utilizá-lo como fonte de carbono até concentrações de 3%. Enzimas como a álcool-desidrogenase NAD⁺ dependente relacionam-se com o processo e tem sido estudadas neste organismo (Arth e Kunkel, 1979). Pode crescer em acetato como única fonte de carbono; a via do glioxilato é necessária para a utilização de alcanos, ácidos gordos, álcoois e acetato, o que tem conduzido ao estudo da isocitrato-liase desta levedura, a enzima chave deste ciclo (Barth e Scheuber, 1993).

Também pode utilizar lisina como fonte de carbono e nitrogénio. O gene *LIS1*, que codifica para a primeira enzima reguladora desta rota, a hemocitrato sintetase, foi clonado por Perez Campo *et al.* (1996).

Tem sido utilizada como modelo para o estudo da secreção de proteínas de eucariotas. *Y. lipolytica* secreta altos níveis de uma protease extracelular alcalina (Ogrydziak *et al.*, 1982), proteases ácidas, RNAses (Cheng *et al.*, 1987), lipases e uma fosfatase que permanecem associadas à parede celular (González, 1997; Lopéz *et al.*, 1988).

Encontra-se entre as leveduras com alta capacidade de biossíntese de vitámeros da biotina (Pearson *et al.*, 1986; Pearson *et al.*, 1990). Recentemente está-se a tentar conseguir híbridos intergenéticos desta com outras leveduras, com o fim de conseguir outro microrganismo mais eficaz para a indústria, que conserve características interessantes de *Y. lipolytica* como a capacidade de crescer em substratos económicos e a fácil secreção de proteínas (Nga *et al.*, 1992).

1.3.5 - Lipases de *Y.lipolytica*

As estirpes de *Y.lipolytica* exibem uma actividade lipásica que actua preferencialmente sobre resíduos oleosos nas posições 1 e 3 do glicérido. Diversos investigadores examinaram a actividade das lipases em diferentes estirpes, não sendo claro se as discrepâncias registadas reflectem diferenças nas metodologias utilizadas ou na utilização de diferentes estirpes. Peters e Nelson (1948) descreveram a existência de uma actividade lipásica reprimida por glucose a um pH óptimo à volta de 6.2-6.5 eles também fizeram registo de uma lipase ligada à parede celular, por seu lado Kalle *et al.* (1972) e Zvyagintseva *et al.* (1980) descreveram dois tipos de actividade lipásica ligadas à parede celular: uma constitutiva, lipase independente do teor de glucose, e uma segunda actividade induzida pelo monooleato de sorbitano. Ota *et al.* (1978) descreveram quer a existência de uma actividade lipásica extracelular em culturas suplementadas com uma fracção do tipo proteico derivada da soja, quer lipases ligadas à parede celular a lipase extracelular requer ácido oleico como um estabilizador/activador, enquanto que as lipases ligadas à parede celular não, diferindo também por diversas propriedades da enzima extracelular. Ota *et al.*, (1982) purificaram dois tipos de lipases ligadas à parede celular de *Saccharomycopsis lipolytica* (actualmente *Yarrowia lipolytica*): lipase I com uma recuperação de 3.7% e com uma razão de purificação de 69x e a Lipase II com uma recuperação de 4.6% e uma razão de purificação de 58x. A lipase I foi obtida em CM-Sepharose CL-6B a pH5.0. O método de purificação envolveu cromatografia

em coluna CM- Sepharose CL-6B e coluna Sephadex G-100. SDS-PAGE das lipases purificadas deram uma única banda. A massa molecular das lipases I e II foram estimadas em 39 e 44 kDa respectivamente, e ambas as lipases eram enzimas monoméricas. Gomi *et al.*, (1986) mostraram que a(s) lipase(s) existe(m) na parede celular como um complexo activado o qual é rapidamente dissociado após a purificação da enzima. A actividade extracelular dependente do activador pode então refletir a libertação de (superior a 50%) da actividade ligada à parede celular, talvez sob condições conducentes à indução de protease(s) extracelular(es).

Foram também isolados mutantes incapazes de utilizar a tributirina como fonte de carbono após um enriquecimento com nystatin (Nga *et al.*, 1988), e mostraram definir três grupos complementares.

Algumas lipases de *Yarrowia lipolytica* podem ter interesse na síntese de mono-ésteres de ácido 2,4-dimetilglutárico (Ozegowski *et al.*, 1993), na transesterificação de mesociclopentanodíóis (Theil *et al.*, 1991), ou ainda na indústria de curtumes ou no fabrico de queijo (Patente alemã DD-272867). Já Matthey e Adoga (1991) descreveram uma esterase extracelular termo-estável de baixa massa molecular (10000 Da), específica para a posição 1 dos triglicéridos.

González e Dominguez, (1997) clonaram o primeiro gene que se expressa para uma proteína com actividade lipásica (*YILIP1*) localizado no cromossoma IV desta levedura. Este gene apresenta uma ORF de 1458 pares de bases com informação para codificar uma proteína de 486 aminoácidos, com uma massa molecular calculada de 55.4 kDa, apresentando homologia com lipases de outras leveduras.

Pignède *et al.* (2000) isolaram outro gene (*YILIP2*), numa estirpe desta levedura, que se expressa para uma lipase com características diferentes da anterior quer quanto à homologia (apresenta homologia com fungos do género *Rhizomucor*) quer quanto ao tamanho 334 aminoácidos. Além disso estas duas lipases não apresentam homologia considerável entre si o que nos leva a supor existirem em *Y. lipolytica* diferentes tipos de lipases.

Também muito recentemente, Destain *et al.* (1999) purificaram uma lipase extracelular em estirpes mutantes de *Y. lipolytica*, por cromatografia com Phenyl Sepharose CL6B e Sephadex G75, com uma massa molecular de 37664 daltons, activa a pH ácido e neutro, capaz de hidrolizar triglicéridos com ácidos gordos de pequena e grande cadeia e com especificidade para o ácido oleico.

A *Y. lipolytica* possui, assim potencialidades significativas, para poder ser utilizada como uma fonte para a obtenção de lipases de utilização industrial.

1.4 – OBJECTIVOS DO PRESENTE TRABALHO

O conhecimento da elevada capacidade secretora da levedura *Yarrowia lipolytica* bem como as suas características de manipulação genética, aliadas à importância que o estudo de lipases e dos genes que as codificam estão adquirindo, confirmado por importantes programas de apoio a projectos de investigação em toda a União Europeia, constituíram a motivação para o objectivo geral que se pretende alcançar, contribuir para o estudo do sistema destas enzimas na levedura *Yarrowia lipolytica* e que com base nos conhecimentos anteriormente expostos, sistematizamos nos seguintes objectivos específicos:

- ⇒ Optimização de condições de crescimento celular e actividade lipásica da levedura *Yarrowia lipolytica*.
- ⇒ Caracterização fenotípica do gene *YLIP1* de *Yarrowia lipolytica*.
- ⇒ Isolamento e caracterização de novos genes que se expressam para actividade lipásica nesta levedura.
- ⇒ Análise da expressão destes genes.
- ⇒ Caracterização de propriedades físico-químicas e catalíticas das proteínas codificadas pelos genes isolados.

Para alcançar estes objectivos teve-se a possibilidade de poder trabalhar com pessoas com grande experiência em técnicas genéticas desta levedura e com investigadores com grandes conhecimentos no campo da enzimologia, e em particular, sobre as características das enzimas que se pretendiam estudar.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1-MICROORGANISMOS UTILIZADOS

2.1.1- LEVEDURAS

• *Yarrowia lipolytica*

Esta levedura dimórfica (Van der Walt, 1980) foi o organismo que serviu de modelo de estudo para este trabalho. Na Tabela 2.1 descrevem-se a procedência e o genotipo das diferentes estirpes utilizadas, bem como as estirpes que se obtiveram como resultado da nossa investigação.

Tabela 2.1 - Características das estirpes de *Y. lipolytica* utilizadas durante este trabalho.

| Estirpe | Genotipo | Procedência |
|-------------|--|----------------------------|
| W29 | <i>Mat A</i> | C. Gaillardin ^A |
| P01a | <i>Mat A, leu 2-270, ura 3-302</i> | C. Gaillardin ^A |
| INAG 135668 | <i>Mat B, leu 2-270, ura 3-302, his 1, xpr 2-322</i> | C. Gaillardin ^A |
| INAG 135667 | <i>Mat A, leu 2-270, ura 3-302, lys 11-2 3, xpr 2-322</i> | C. Gaillardin ^A |
| FJG1 | <i>Mat B, leu 2-270, ura 3-302, his 1, xpr 2-322, Δ lip1::LEU2</i> | F. González ^B |
| ABC1 | <i>Mat A, leu 2-270, ura 3-302, lys 11-23, xpr 2-322, Δ lip3</i> | Este trabalho |
| ABC2 | <i>Mat B, leu 2-270, ura 3-302, his 1, xpr 2-322, Δ lip1::LEU2, Δ lip3</i> | Este trabalho |

^A Institute Nationale de la Recherche Agronomique, França

^B Universidade de Salamanca, Espanha.

• *Kluyveromyces lactis*

Utilizou-se uma estirpe de *Kluyveromyces lactis* em estudos de caracterização de actividade lipásica em meio sólido, representando uma referência como controle negativo. Algumas das características desta estirpe representam-se na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Estirpe da levedura *Kluyveromyce lactis*, utilizada durante a realização deste trabalho.

| Estirpe | Genótipo | Procedência |
|---------|---|-------------------------|
| MD2/1 | <i>Mat a, ura A, lys A, arg A, k1⁰, k2⁰, rag2, pKDI⁺</i> | H.Fukuhara ^A |

^A Instituto Curie, Orsay, França.

• *Saccharomyces cerevisiae*

Também foram utilizadas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* em estudos de actividade lipásica. Essas estirpes bem como algumas das suas características especificam-se na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Estirpes da levedura *Saccharomyce cerevisiae*, utilizadas durante a realização deste trabalho.

| Estirpe | Genótipo | Procedência |
|---------|--|-------------------------|
| CG25 | <i>Mat a, ura 3-52, shr 3-102</i> | G. R. Fink ^A |
| CG85 | <i>Mat a/α, ura 3-52/ura 3-52, shr 3-102/shr 3-102</i> | G. R. Fink ^A |

^AWhitehead Institute for Biomedical Research and Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, USA.

2.1.2 - BACTÉRIAS

• *Escherichia coli*

Na Tabela 2.4 referem-se as estirpes bacterianas utilizadas nas experiências de clonagem molecular.

Tabela 2:4 - Estirpes da bactéria *Escherichia coli*, utilizadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

| Estirpe | Marcadores genéticos | Origen |
|---------|--|---------------|
| HB101 | <i>F⁻hsdS20,recA13,ara14,proA2, lacY1,galk2,rpsLB20(Sm^r),xyl5, mtl1, sup44, Δ⁻.</i> | [Boyer, 1969] |
| DH5α | <i>supE44, ΔlacU169, (f80 lacZΔM15), hsdR17,recA, endA, gyrA96, thi-1, relA1.</i> | [Hanahan,198] |
| MV1190 | <i>(F⁺:traD36,proAB,lacI9,lacZΔM15), Δ(lac-proAB),thi,supE,Δ(sr1-recA), 306::Tn10(tet)^r.</i> | Biorad |

2.2 - MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura prepararam-se com água ultrafiltrada (Milli®) e bidestilada, referindo-se todas as percentagens numa relação peso/volume.

Os meios sólidos prepararam-se adicionando 2% de agar aos correspondentes meios líquidos.

Para a selecção de clones por resistência a antibióticos, os meios foram suplementados com ampicilina (50 µg/mL), tetraciclina (15 µg/mL) ou kanamicina (50-100 µg/mL). Quando foi necessário juntaram-se vários antibióticos simultaneamente, sempre momentos antes de verter os meios nas placas.

Nos meios líquidos cuja composição continha azeite, este adicionava-se depois de se esterilizar de forma independente. Em meio sólido, o azeite juntava-se quando a temperatura do meio recém-autoclavado descia a 55°C e homogeneizava-se em recipientes herméticos de vidro de 250 mL de capacidade, mediante forte agitação manual até que o meio adquiria um aspecto leitoso e opaco.

Quando não se menciona a qualidade e a procedência de algum reagente é porque este foi de fornecedores habituais com garantias de qualidade (Merck, Sigma, etc.)

2.2.1- Meios para o crescimento vegetativo de leveduras

A preparação dos meios habituais de crescimento de leveduras fez-se através das seguintes fórmulas:

- **YED**

Extracto de levedura a 1%
D-glucose a 1%

- **YEPD**

YED suplementado com 2% de peptona

- **YNB**

Base nitrogenada sem aminoácidos 0.7% (Difco)
D-glucose a 1%

Os meios foram suplementados com uma mistura de aminoácidos proteinogénicos e uracilo (com uma concentração final de 90 µg/mL cada um) e adenina (25 µg/mL).

Cada meio específico utilizado em análises de auxotrofias foi preparado suprimindo a substância correspondente à auxotrofia a analisar.

2.2.2- Meios para o crescimento de *Escherichia coli*

Utilizaram-se os meios de cultura recomendados como padrões para o crescimento desta bactéria:

- **LB**

Extracto de levedura a 0.5%
Bactotripton a 1%
NaCl a 1%

- **2xYT**

Extracto de levedura a 1%
Bactotripton a 1.6%
NaCl a 1%
Ajustado a pH 7.2 - 7.4 com NaOH

2.2.3- Meios para análise da actividade lipásica

Dependendo do estudo a realizar, requeria uma alta sensibilidade, ou se pelo contrário, a sensibilidade era menos importante que a obtenção de resultados precisos de diferenciação de actividade, utilizaram-se meios sólidos distintos:

- **Agar-Tributirina**

Extracto de levedura 1%
Agar a 2%
Tris-HCl pH 7.5 200mM
Tributirina a 0.2%

A tributirina era esterilizada separadamente. Quando o meio base atingia 55 °C, adicionava-se a tributirina e homogeneizava-se mediante forte agitação manual, durante 5 minutos, até que tomava um aspecto leitoso e opaco.

- **Glucose-Agar-Tributirina**

Extracto de levedura a 1%
D-Glucose a 1%
Agar a 2%
Tris-HCl pH 7.5 200mM
Tributirina a 0.2% (Sigma)

A tributirina era esterilizada separadamente e homogeneizada como no caso anterior, adicionando-se da mesma forma.

2.2.4 - Meios de indução com azeite

A indução da actividade lipásica em *Y. lipolytica* realizou-se utilizando meios líquidos com proporções variáveis de azeite e glucose. Estes meios foram designados por meios mínimos (MM):

- **MM-Azeite**

YNB 0.7%
D-glucose 0.3%
Tris-HCl pH 7.5 200mM
Azeite 0.7%

- **MM- Glucose**

YNB 0.7%
D-glucose 1%
Tris-HCl pH 7.5 200mM

Nos meios que possuíam azeite este adicionava-se separadamente a cada matraz, depois de se repartir o meio base, previamente autoclavado.

2.3- Condições de cultura e conservação dos microrganismos

O crescimento dos microrganismos realizou-se em meio sólido (sobre placas de Petri) ou em meio líquido (em matrizes Erlenmeyer ou em tubos de ensaio). As culturas em meio líquido efectuavam-se com uma agitação a 250 rpm, procurando que o volume do meio de cultura não ultrapassasse um terço do volume do recipiente.

Os crescimentos foram acompanhados medindo a absorvância a um comprimento de onda de 600 nm e pela contagem das células em câmara de Thoma.

As temperaturas de incubação rotineiras foram de 28 °C para as leveduras e 37 °C para *E. coli*.

Os microrganismos conservaram-se através de culturas periódicas (de 30 a 60 dias) em meio sólido e posterior conservação a -4 °C. Adicionalmente, para manter as estirpes viáveis durante longos períodos de tempo, os microrganismos guardavam-se em glicerol a 30% e à temperatura de -70 °C.

A concentração celular das suspensões determinou-se mediante contagem das células numa câmara de Thoma. As relações absorvância a 600 nm

concentração celular de algumas das leveduras utilizadas são apresentadas na Tabela 2.5. Os cultivos foram realizados em meio YNB suplementado com os aminoácidos requeridos por cada uma das estirpes.

Tabela 2.5 – Relação entre a densidade celular e a absorvância a 600 nm dos principais microrganismos utilizados neste trabalho.

| Microrganismo | (células/mL): $A_{600\text{ nm}}$ | r |
|----------------------|---|------|
| <i>Y. lipolytica</i> | $(10^6\text{células/mL}) = 7.61 \cdot A_{600\text{ nm}} - 11.3$ | 0,92 |
| <i>K. lactis</i> | $(10^6\text{células/mL}) = 52.6 \cdot A_{600\text{ nm}} - 0.02$ | 0.98 |
| <i>S. cerevisiae</i> | $(10^6\text{células/mL}) = 10.1 \cdot A_{600\text{ nm}} + 8.33$ | 0.89 |

Estas relações lineares são válidas para valores de $A_{600\text{ nm}}$ inferiores a 0.7.

2.4 - ANÁLISE DE PROTEÍNAS

2.4.1 - Obtenção de extractos celulares de leveduras

Para a obtenção de extractos celulares de leveduras seguiram-se os seguintes passos:

- 1.- Recolheram-se as células mediante centrifugação a 4500 g.
- 2.- Lavaram-se e ressuspenderam-se as células em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4.3.
- 3.- Posteriormente adicionaram-se esferas de vidro "Ballotini" (de 0.45-0.50 μ de diâmetro). Juntaram-se por grama de peso húmido de células 1.5 mL de tampão e 3.5 g de "Ballotini".
- 4.- Quando os volumes das amostras eram grandes, estas submeteram-se a ruptura num desintegrador Braun MSK, com um sistema de refrigeração por neve carbónica. Os tratamentos foram de 5 ou 6 períodos de 1 minuto separados por intervalos de 30 segundos para conseguir uma ruptura total das células (observação posterior ao microscópio de contraste de fases).

Para pequenos volumes de amostras, a ruptura mecânica das células fez-se submetendo as referidas amostras a vibrações num agitador tipo "vortex" durante 5 ou 6 períodos de 2 minutos separados por intervalos de 30 segundos. O processo realizava-se numa câmara refrigerada a 5-10 °C.

Para aquelas experiências em que o número de amostras de pequeno volume era elevado, utilizou-se um homogeneizador automático, modelo *FastPrep™ FP120* de SAVANT Instruments Inc. (Flamingdale, N. Y.). Neste último método seguiu-se o seguinte protocolo:

- 1.-Recolheram-se de $3 \cdot 10^8$ a 10^9 células de cultivo mediante centrifugação a 4500 g.
- 2.- Lavaram-se as células suspensas uma vez num tampão adequado, recolhendo-se de novo em tubos de polietileno de 1500 μ L e retirando todo o sobrenadante.
- 3.- Juntaram-se 750 mg de esferas de vidro "Ballotini".
- 4.-Os tubos com as amostras introduziam-se no respectivo suporte do homogeneizador, mantendo as seguintes condições:

Temperatura = 4 °C

Velocidade de agitação = 5.5 a 6 m/s

Tempo de ruptura = 15 s

Uma vez rebentadas as células, as pérolas de vidro separaram-se, no primeiro caso por decantação; no segundo e terceiro casos, mediante centrifugação. Por último, as pérolas de vidro lavavam-se com tampão para evitar perdas de material.

2.4.2 – Quantificação de proteínas

O teor em proteínas de cada amostra foi determinado mediante a técnica colorimétrica descrita por Peterson em (1977) e que é uma modificação do método de Lowry. Diluíam-se as amostras em diferentes volumes de água e juntavam-se 150 μ L de NaOH 1 M e 1250 μ L de um reagente preparado com 1 mL de uma solução Na_2CO_3 a 2% em NaOH e 50 mL de uma outra solução com 1 % de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 2% de tartarato duplo de sódio e potássio. Após 10 minutos à temperatura ambiente juntavam-se 250 mL de "Foling reagent" (Merck). As amostras agitavam-se e incubavam-se durante 30 minutos a 37 °C, após os quais se lia a absorvância a um comprimento de onda de 600 nm.

Na maioria dos casos eram preparadas 7 repetições por amostra. Para obter a recta-padrão absorvância/ μ g de proteína, utilizaram-se diferentes diluições de albumina de soro bovino.

2.4.3 – Separação de proteínas em geis de poliacrilamida

As amostras para electrofórese em geis de poliacrilamida prepararam-se misturando extratos de proteínas com tampão de carga 4X (SDS 8%, DTT 40 mM, glicerol 40%, Tris/HCl 1.5 M pH 6.8 e azul de bromofenol em quantidades vestigiais), diluindo convenientemente em água até se obter uma concentração final do tampão de 1X. Após esse procedimento, as amostras eram fervidas durante 5 minutos e depositadas nos orifícios do gel.

A separação das proteínas realizou-se mediante electrofórese em geis de poliacrilamida (12% acrilamida : bis acrilamida 29:1) com 1 % de SDS segundo um protocolo descrito por Leammli (1970).

Utilizaram-se dispositivos de electrofórese do tipo " Mini Protean II " da BIORAD seguindo as recomendações do fabricante. O tampão utilizado continha 0.25 % de Tris 0.1 M, 14 % de glicina e 0.1% de SDS. Utilizou-se uma corrente com uma intensidade constante de 30 mA/ gel durante 1-2 horas .

2.4.4 - Revelação dos geis de proteínas

A revelação dos geis de proteínas realizou-se por imersão destes numa solução de "Coomassie Brilliant Blue" R-250 a 0.25% em metanol/ácido acético/água (5/1/4) durante 15-30 minutos. Depois disso, retirou-se o excesso de corante submergindo o gel na mesma solução, mas sem corante. Uma vez tingido adequadamente, fixou-se por imersão durante duas horas numa solução com 10 % de glicerol.

Por vezes estes geis também se revelaram com prata seguindo-se um protocolo descrito por Morrissey (1981). O gel era primeiro incubado durante 20 minutos em DTT 0.25mM para provocar a redução (S-S) e depois durante 30 minutos numa solução de Ag NO_3 0.1%. A seguir era tratado com uma solução de revelado preparada da seguinte forma: 7,5 g de Na_2CO_3 +0.125 mL de foraldeído +250mL de água Milli@. Quando as bandas adqueriam a intensidade desejada parava-se a reacção juntando 2.5 mL de ácido cítrico 2.3 M por cada 50 mL de solução de revelado agitando vigorosamente até deixar de borbulhar.

2.5 - MÉTODOS ENZIMÁTICOS

2.5.1- Determinação da actividade lipásica

• Em meio líquido

As técnicas utilizadas nesta determinação dependeram do tipo de substrato utilizado. Sempre que foi possível, utilizaram-se ambas as técnicas para quantificar a mesma actividade com distintos substratos. As características destas técnicas são as que se resumem de seguida:

a) Técnica espectrofotométrica

Como substratos da enzima, utilizaram-se monoésteres de p-nitrofenol com ácidos de cadeias hidrocarbonadas de diferentes tamanhos. Estes substratos foram fornecidos por SIGMA Chemical Co. e descrevem-se na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Substratos utilizados nas medidas de avaliação espectrofotométrica da actividade lipásica.

| Substrato | nº de C | Massa molecular (g/mol) |
|-----------------------|---------|-------------------------|
| p-nitrofenil acetato | 2 | 181.1 |
| p-nitrofenil butirato | 4 | 209.2 |

Estes substratos prepararam-se a uma concentração de 4.17×10^{-4} M em tampão fosfato 0.2 M, pH 7.3. O substrato p-nitrofenil butirato era ainda dispersado com acetona com uma concentração final de acetona na mistura de 4%. A adição de acetona não foi necessária para o caso do p-nitrofenil acetato porque é ligeiramente solúvel em água. A concentração final do substrato no meio de reacção foi de 4.0×10^{-4} M.

A quantificação espectrofotométrica realizou-se mediante a técnica seguinte:

1) Adicionaram-se 2400 μ L da emulsão de substrato numa cuveta de poliestireno de um único uso (Elkay) de 10 mm de passo óptico para medidas espectrofotométricas de luz visível.

Termoestabilizava-se a 25 °C num banho externo (Selecta 389) que fazia circular água no interior do suporte da cuveta .

2) Introduzia-se na cuveta um microagitador magnético de 2 mm que mantinha a amostra em agitação constante mediante um dispositivo automático (Helma Cuv-O-Stir 333).

3) De seguida adicionavam-se 100 μ L da uma suspensão de extrato celular ou de uma solução da concentração de células adequada para que no meio de reacção a concentração de células fosse de 10^7 cél/mL.

4) A curva cinética era seguida em contínuo durante 15 minutos registando-se a absorvância a 410 nm. Esta curva era registada num espectrofotómetro Beckman DU-7 e a pendente inicial de cada curva (absorvância/tempo) calculava-se automaticamente com o aparelho através do programa de regressão linear.

5) A actividade enzimática foi obtida dividindo a pendente inicial da curva (absorvância/tempo) pelo coeficiente de extensão do p-nitrofenol ao pH de trabalho de acordo com a equação:

$$V = (1/\epsilon) \cdot (dA_{410}/dt) = m/\epsilon$$

b) Técnica titrimétrica (pH-stat)

Com esta técnica foram estudados os substratos não cromogénicos como são os triglicéridos. Os substratos escolhidos foram a tributirina, a trioleína e o azeite (mistura de triglicéridos).

Tabela 2.7 - Substratos utilizados na determinação titrimétrica da actividade lipásica.

| Substrato | nº de C | massa molecular (g/mol) |
|------------------------------|---------------|-------------------------|
| Tributirina | 4 | 302,4 |
| (SLS) Sigma lipase substrato | 18:1, (cis)-9 | 885,4 |
| Trioleína | 18:1, (cis)-9 | 885,4 |

A tributirina e a trioleína foram emulsionados no nosso laboratório antes de cada experiência mediante a seguinte técnica:

Pipetavam-se 15 mL do triglicérido desejado misturando-se com 50 mL do agente emulsionante e adicionando 250 mL de água Milli-Q.

Como agente emulsionante utilizou-se uma solução preparada da seguinte forma (para o volume de 1L)

17.9 g de NaCl
 0.41 g de KH₂PO₄
 400 mL de água Milli-Q
 540 mL de glicerol

Agitou-se vigorosamente e adicionou-se 6 g de goma arábica.

Relativamente ao substrato azeite, optou-se por trabalhar com azeite já emulsionado pela fornecedor Sigma um produto com a designação de Sigma lipase substrato e cujas características são as seguintes:

- Composição em azeite 50%
- Agente emulsionante da casa fornecedora
- Estável por vários meses.

A partir deste produto preparou-se o reagente de trabalho dissolvendo-o a uma percentagem de azeite desejada com água Milli-Q, agitando-se a mistura durante 5 minutos e agitando sempre antes da toma de amostra. As dissoluções assim preparadas apresentam um aspecto leitoso e são estáveis durante 4 horas.

A hidrólise destes substratos lipídicos realizou-se num aparelho pH-stat com um quantificador modelo TTT80, ligado a uma auto-bureta, modelo ABU80 e a um registador modelo REA160 de Radiometer (Copenhague), representado na Figura 2.1. O sistema consta de uma auto-bureta que deposita sobre o reactor a quantidade necessária de NaOH para neutralizar os iões de hidrogénio libertados pela hidrólise dos substratos lipídicos, mantendo constante o pH da reacção, mediante a integração de um potenciómetro, cujos eléctrodos permanecem

constantemente submersos no meio da reacção. A adição de NaOH fica registada através de uma curva cinética contínua de 7 a 28 minutos.



Figura 2.1 - Aspecto do sistema utilizado nas técnicas de medida de actividade lipásica mediante quantificação titrimétrica em pH-stat.

A técnica cinética utilizada neste caso, incluía os seguintes passos:

- 1-Juntaram-se 4.7 mL de solução de reserva que continha o substrato na cuveta do reactor do pH-stat.
- 2-Pré-aqueceu-se a emulsão fazendo circular água termoestatizada à temperatura da reacção pelas paredes do reactor, e manteve-se com agitação constante com um agitador incorporado.
- 3-Com a ajuda da auto-bureta ajustou-se o pH exactamente a 7.21 mediante adição de NaOH, inferior a 1 % do volume total. A $t=0$ adicionaram-se 100 μL da uma suspensão de extrato celular ou de uma solução da concentração de células adequada para que no meio de reacção a concentração de células fosse de 10^7 cél/mL aproximadamente.
- 4-A curva cinética seguia-se em contínuo durante períodos de tempo variáveis (7,14 ou 28 minutos) com um módulo registador que anota a quantidade de NaOH adicionado pela bureta em função do tempo de reacção.
- 5- O cálculo da actividade enzimática fez-se de acordo com a seguinte equação:

$$V(\mu\text{mol/L/min}) = (x/y) \cdot M \cdot f$$

Em que:

V- Velocidade

$\Delta x/\Delta y$ - inclinação da recta inicial

M- molaridade de NaOH

f- factor dependente da velocidade do papel no registador

• Em meio sólido

Nos ensaios de comparação de actividade lipásica entre estirpes utilizaram-se os meios **Agar-Tributirina** ou **Glucose-Agar-Tributirina** (descritos em meios de cultivo) conforme fosse necessário. Estes meios reflectiam com mais precisão as diferenças de actividade lipásica de distintos preparados.

Em todos os casos, verteram-se 25 mL de cada meio, a 50 °C, preparado mediante esterilização em autoclave, sobre placas de Petri de plástico de 90 mm de diâmetro. Deixavam-se solidificar à temperatura ambiente, extremando as precauções de ausência de vibrações do suporte das placas. Sobre as placas com o meio distribuído e solidificado depositavam-se 10 μ L contendo 10^7 células de forma a evitar que a gota se expandisse demasiado, colocando-se de seguida numa estufa a 28 °C.

2.6- MÉTODOS GENÉTICOS

2.6.1 - Transformação com plasmídeos replicativos

• Em *Escherichia coli*

Transformaram-se células competentes de *E.coli* com plasmídeos purificados, misturas de ligação ou com ADN total de leveduras (para recuperar moléculas plasmídicas), por vezes previamente digerido com uma enzima de restrição e circularizado com a enzima T4 DNA ligase (quando se tratava de recuperar ADN plasmídico integrado em ADN cromossomal). O método de transformação realizou-se segundo um procedimento experimental padrão descrito previamente por (Kushner, 1988). Para incorporar plasmídeos purificados em estirpes de *E.coli* receptoras também se realizou a transformação de "um minuto" seguindo um protocolo proposto por (Golub, 1988).

2.6.2 -Transformação integrativa de *Yarrowia lipolytica*

A transformação de *Y.lipolytica* realizou-se utilizando células intactas tratadas com acetato de lítio (Xuan *et al*, 1988):

1. Semeou-se um pré-inóculo de 5 mL de meio YPD, pH 4.0 e incubou-se com agitação a 28 °C durante 12 horas.

2. Passado esse tempo, contaram-se as células e inocularam-se 12 mL de YPD, pH 4.0 em 3 matrizes de 250 mL em distintas concentrações celulares ($5 \cdot 10^4$, 10^5 e $2 \cdot 10^5$ células/mL) incubando-se a 28 °C, com agitação, durante 13 horas.
3. Depois desta incubação seleccionamos a cultura que continha entre $8 \cdot 10^7$ e $1.5 \cdot 10^8$ células/mL para preparar células competentes.
4. Recolheram-se as células mediante centrifugação a 1500 g durante 5 minutos e lavaram-se duas vezes com tampão TE pH 8.0 (10 mM Tris·HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA).
5. De seguida, ressuspenderam-se numa solução de acetato de lítio (LiAc) 0.1 M, pH 6.0 a uma concentração de $5 \cdot 10^7$ células/mL e incubaram-se durante 1 hora a 28 °C, a 50 rpm num matraz de 250 mL.
6. Recolheram-se novamente por centrifugação a 1500 g e ressuspenderam-se na solução de acetato de lítio numa concentração final de 10^8 células/mL.
7. Transferiram-se 100 µL dessa suspensão de células para um tubo de 10 mL de polipropileno onde se juntaram 5 µL de ADN "carrier" (ADN de esperma de salmão, sonificado, a uma concentração de 5 mg/mL) e 250-500 ng de ADN plasmídico, linearizado previamente com uma endonuclease de restrição para aumentar a eficiência de transformação (Davidow, 1985).
8. Depois de se incubar o conteúdo deste tubo durante 15 minutos a 28 °C, sem agitação, juntaram-se 700 µL de polietilenoglicol (PEG) 4000 a 40 % preparado em acetato de lítio 0.1 M incubando-se novamente a 28 °C, durante 1 hora com agitação suave (70 rpm).
9. As células foram submetidas depois, a um choque térmico a 39 °C durante 10 minutos.
10. Finalmente juntaram-se 1.2 mL de TE pH 8.0 a cada tubo e semearam-se 200 ou 400 µL desta mistura em placas de Petri com meio selectivo.
11. As colónias provenientes das células transformantes podiam observar-se ao fim de 3 ou 4 dias de incubação a 28 °C.

Por vezes, sempre que era necessária uma alta eficiência de transformação (plasmídeos replicativos) e o número de estirpes a transformar era elevado, seguimos um método rápido aperfeiçoado por (Nicaud *et al*, 1988).

Retiravam-se duas ansas de células crescidas durante um dia em meio sólido YEPD e ressuspenderam-se em 1 mL de TE pH 8.0 dentro de um "eppendorf". De seguida, centrifugaram-se estas células e ressuspenderam-se em 0.6 mL de acetato de lítio 0.1 M pH 6.0. Após uma hora de incubação a 28 °C e 100 rpm, as células centrifugavam-se e ressuspenderam-se em 60 µL do mesmo tampão. A 20 µL destas células competentes juntávamos 2.5 µL de ADN "carrier" e 2-4 µL de ADN plasmídico (100-200 ng). Depois de uma incubação de 15 minutos a 28 °C

juntavamos 300 µL de PEG 40% em tampão acetato de lítio, e após uma hora de incubação a 28 °C e posterior choque térmico a 39 °C durante 10 minutos, juntavam-se 600µL de tampão, acetato de lítio, semeando por placa 100µL da solução resultante.

A vantagem deste método relativamente ao anterior deve-se ao facto de não ser necessário um momento óptimo para a cultura celular.

2.7 - PLASMÍDEOS UTILIZADOS

2.7.1 – Bacterianos

- pBluescript KS⁺ e SK⁺

Plasmídeos bacterianos autorreplicativos (Short, 1988) de 2.95 kb derivados de pUC18/19, cuja estrutura contém os seguintes elementos (Figura 2.2).

O gene de resistência a ampicilina; a origem de replicação relaxada de col E1; um fragmento do operão *lac* de *E.coli* que codifica para o péptido α da β-galactosidase (*lac Z'*); um oligonucleotídeo de 108 pares de bases com 21 sítios de restrição reconhecidos por endonucleases específicas, inserido na fase de leitura do péptido alfa sem a alterar (a única diferença entre pBluescript KS⁺ e SK⁺ é a orientação deste oligonucleótido); os promotores das ARN polimerases T3 e T7, que flanqueiam o fragmento de ADN portador de sítios múltiplos de clonagem e que podem utilizar-se para a síntese de ARN "in vitro"; um fragmento de 454 pares de bases da região intergénica do fago f1 que codifica para as funções requeridas para a replicação e o empacotamento e, possibilita que estes vectores possam recuperar-se como ADN circular monocatenário uma vez infectada uma população de células adequada portadora de algum destes plasmídeos com o fago modificado M13K07.

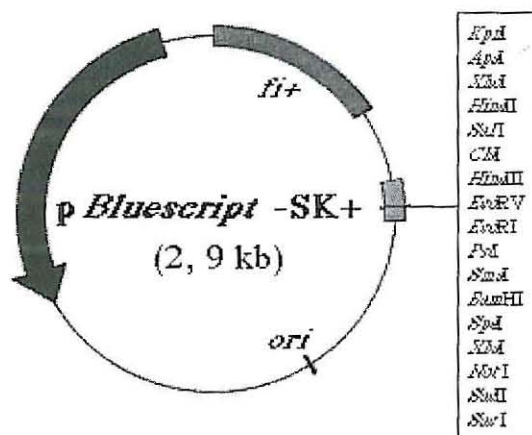


Figura 2.2 - Estrutura do vector bluescript SK+.

• pGEM-T

É um vector linearizado com 3.0 kb preparado pela "Promega" mediante a digestão com *Eco* RV do vector pGEM-5Z f(+) (semelhante a pGEM-T, mas circular) e com posterior adição de uma timidina na posição 3' em cada um dos extremos gerados. A adição destas duas timidinas na posição 3' aumenta a eficiência da ligação dos produtos de PCR neste vector devido a que a Taq polimerase deixa duas deoxiadenosinas nos extremos 3' do fragmento de DNA sintetizado na reacção de PCR.

O vector pGEM-T (Figura 2.3) contém o gene de resistência a ampicilina e a origem de replicação do fago filamentosso *f1*. Também possui os promotores das ARN polimerases T7 e SP6 flanqueando uma região de sítios múltiplos de clonagem incluída na região codificante do péptido α da β -galactosidase.

Os clones que contêm enxertos nesta região (o enxerto inactiva o péptido α) identificam-se directamente pela ausência de cor azul em placas com X-Gal e IPTG (a cor azul é consequência da actividade do péptido α da β -galactosidase).

Este plasmídeo utilizou-se principalmente para clonar os produtos de PCR.

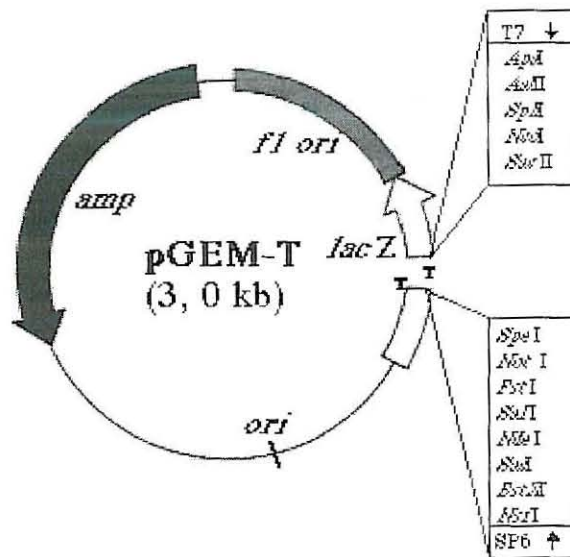


Figura 2.3 - Estrutura do vector pGEM-T.

2.7.2 - Plasmídeos funcionais em *Yarrowia lipolytica*

• pINA240

Trata-se de um plasmídeo de 8 kb, funcional em *E. coli* e em *Y. lipolytica*. Resulta da subclonagem de dois fragmentos de ADN de *Y. lipolytica* no vector pBR322. Pode replicar-se autonomamente em *Y. lipolytica* porque tem enxertado,

no sítio *Pvu* II desse vector, um fragmento que contém a sequência ARS18; essa sequência permite que se mantenham de forma autónoma 1 a 3 cópias plasmídicas por célula. Possui também o gene *LEU2* de *Y. lipolytica* enxertado no sítio *EcoRI*. Este plasmídeo foi cedido pelo Dr. C. Gaillardin (INRA, França).

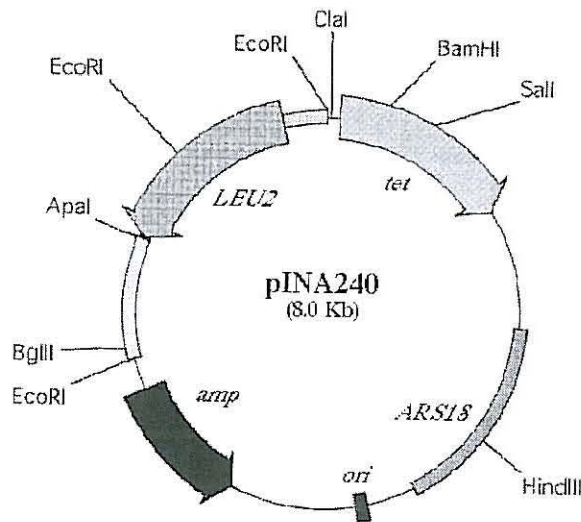


Figura 2.4 - Estrutura do plasmídeo replicativo pINA240 de *Y. lipolytica*.

• pINA444

É um plasmídeo de 8.3 kb funcional em *E. coli* e em *Y. lipolytica*, aparecendo também em multicópia nesta levedura. Pode replicar-se autonomamente em *Y. lipolytica* porque possui enxertado um fragmento que contém a sequência ARS68. Também possui o gene *URA3* de *Y. lipolytica* no sítio *Sal* I (Fournier *et. al.*, 1991). Este plasmídeo também foi cedido pelo Dr. C. Gaillardin (INRA, França).

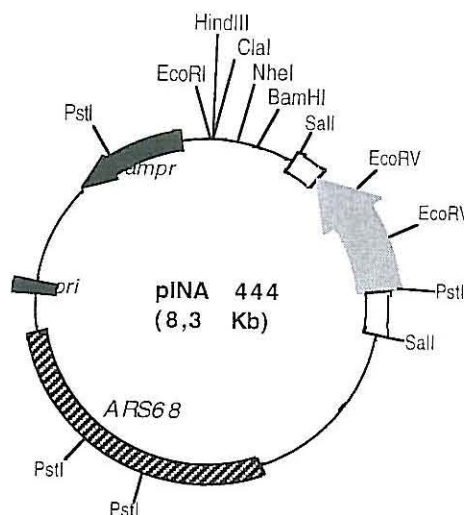


Figura 2.5- Estrutura do plasmídeo replicativo pINA444 de *Y. lipolytica*.

2.8- MANIPULAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

2.8.1 - Obtenção de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

O método utilizado com maior frequência para as preparações rápidas e a pequena escala de ADN plasmídico de *E.coli* foi o método de lise alcalina descrito por Maniatis *et al*, (1982). A obtenção de ADN plasmídico de alta qualidade a pequena escala realizou-se utilizando o “Kit” Wizard[®] plus SV minipreps de Promega.

Para a obtenção de ADN a grande escala utilizou-se o “Kit” de Quiagen ou o “kit” Wizard[®] plus Midipreps de Promega, seguindo em qualquer dos casos as recomendações dos fabricantes.

2.8.2 - Isolamento de ADN genómico

• Da levedura *Yarrowia lipolytica*

A obtenção de ADN de alto peso molecular de *Y.lipolytica* realizou-se seguindo um protocolo experimental cedido por J.M. Beckerich (Institute National de la Recherche Agronomique, França).

- 1.- Partiu-se de uma cultura de 10 mL de YEPD a uma concentração de 5×10^7 - 10^8 células/mL.
- 2.- Centrifugaram-se as células e ressuspenderam-se em 0.5 mL de água estéril. De seguida passaram-se para um tubo “ependorf” e voltaram-se a centrifugar durante uns segundos para eliminar o sobrenadante.
- 3.- Seguidamente, juntaram-se 200 μ L de tampão de extracção (triton 2% , SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM), 0.2 mL de uma mistura 1:1 de fenol:cloroformio e 0.3 g de Ballotini (0.5 mm).
- 4.- As células romperam-se em vortex durante 3-4 minutos a 4 °C e juntaram-se 200 μ L de TE.
- 5.- Depois de se centrifugar durante 5 minutos transferiu-se a fase aquosa para um novo eppendorf e precipitou-se o ADN com 1 mL de etanol absoluto.
- 6.- Este precipitado foi centrifugado durante 2 minutos e ressuspendido em 400 mL de TE-ARNse A (30 ug) para eliminar o ARN.
- 7.- Após incubação a 37 °C durante 5 minutos, juntaram-se 10 mL de NH₄Ac 4 M e 1 mL de etanol absoluto.

8.- O precipitado de ADN foi recuperado por centrifugação durante 2 minutos. Finalmente este precipitado foi lavado com etanol a 70%, e uma vez seco, ressuspenso em 30 μ L de tampão TE.

2.8.3 - Obtenção de ARN total de levedura

O ARN total da levedura *Y. lipolytica* foi obtido através de um protocolo semelhante ao descrito por (Percivall-Smith e Segall, 1984).

- 1.- Recolheram-se por centrifugação aproximadamente 2×10^9 células e lavaram-se com água estéril.
- 2.- Romperam-se mediante agitação em fast-prep por 3 vezes durante 15 segundos, a uma intensidade de 5.5 (com intervalos de 30 segundos em gelo) numa mistura que continha 50 μ L de tampão de lise (Tris/HCl 50 mM pH 6.8; EDTA 10 mM, NaCl 100 mM), 50 μ L de fenol e 3 g de pérolas de vidro (Ballotini 0,45-0,50 mm de diâmetro).
- 3.- Depois da ruptura, adicionaram-se 500 μ L de fenol, 500 μ L de tampão de lise e 20 μ L de SDS 10%. A fase aquosa separou-se mediante centrifugação a 4 °C e extraiu-se por 3 vezes com fenol-clorofórmio (1:1), e uma vez com clorofórmio-álcool isoamílico (1:1).
- 4.- De seguida, o ARN precipitou-se pela adição de 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5.2 e com 2.5 volumes de etanol; depois de manter a mistura a -20 °C, o ARN foi recolhido por centrifugação e ressuspenso em 2 mL de H₂O-DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) a 0.1%).
- 5.- Voltou-se a precipitar juntando igual volume de LiCl 5 M e 2 volumes de etanol. Finalmente o ARN era ressuspendido em 1 mL de H₂O-DEPC e armazenava-se em alíquotas a -70°C.

Com o objectivo de inactivar as ARNases, todos os tampões e soluções utilizados na extracção e manipulação do ARN (à excepção dos tampões Tris/HCl), eram tratados com DEPC a 0.1% durante uma noite a 37°C, autoclavando-se posteriormente para eliminar o DEPC.

2.8.4 - Determinação da concentração de ácidos nucleicos

Esta determinação foi efectuada medindo a absorvância a 260 nm no espectrofotómetro e considerando a relação de absorvância 260/280 para estimar o grau de pureza da preparação (1,8 no caso de ADN puro e 2.0 para o ARN). Utilizaram-se dois modelos de espectrofotómetros: GeneQuant de Pharmacia e Shimadzu UV-Visible, modelo UV-160. Por vezes, a fluorescência da amostra misturada com brometo de etídio (1 μ g/mL) e irradiada com luz ultravioleta era comparada com a de amostras de ADN preparadas da mesma forma e de concentração conhecida. Em ambos os casos seguiram-se os critérios descritos nos manuais de laboratório (Sambrook, 1989).

2.8.5 - Digestão com endonucleases de restrição

A digestão com endonucleases de restrição permite a caracterização física de fragmentos de ADN e é uma etapa necessária para a construção de moléculas recombinadas.

O tratamento das amostras de ADN com enzimas de restrição realizou-se seguindo as recomendações especificadas pelos fornecedores comerciais (Boehringer Mannheim, Amersham, Promega e Fermentas) e as generalidades descritas nos manuais de laboratório (Sambrook, 1989; Maniatis, 1982).

A análise dos fragmentos foi realizada em electrofórese com geis de agarose.

2.8.6 - Tratamento com fosfatase alcalina

Este tratamento foi levado a cabo para eliminar os grupos fosfato dos extremos 5' dos plasmídeos linearizados, impedindo assim a sua religação. Para tal, utilizou-se o seguinte método:

O plasmídeo linearizado foi incubado com fosfatase alcalina (Boehringer), numa proporção de uma unidade de enzima por μg de ADN, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.0 durante 30 minutos a 37 °C, ou então adicionando uma unidade da enzima à mistura de digestão do ADN com endonucleases de restrição durante os 30 minutos finais da incubação a 37 °C.

O plasmídeo desfosforilado foi submetido a electrofórese em gel de agarose e recuperou-se a banda desejada mediante fixação do ADN a uma matriz de sílica, utilizando o "kit" *Gene clean II* como se descreve na secção 2.8.8.

2.8.7 - Electrofórese de fragmentos de ADN

A separação dos fragmentos de ADN em função do seu tamanho realizou-se mediante electrofórese em geis de agarose, preparados na concentração adequada ao tamanho dos fragmentos a separar (entre 0.6 e 2%, segundo os casos). A migração realizou-se a corrente constante (40-100 V). Os tampões usados foram TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM) ou TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM pH 8.0) e nos geis adicionou-se brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para visualizar as bandas de ADN através de iluminação ultravioleta. Nalgumas aplicações a tensão foi posterior ao desenvolvimento da electroforese, colocando-se o gel numa solução de brometo de etídio e TAE durante 20-30 minutos com posterior lavagem durante uns instantes em água. Os geis foram iluminados com luz ultravioleta e fotografados para uma película Polaroid 667. Para o registo de estudos mais rotineiros, ou sempre que foi necessário, as imagens eram captadas com uma câmara digital, manipuladas mediante um analisador de imagem, e impressas em papel térmico.

2.8.8 - Purificação de fragmentos de ADN

O isolamento e a purificação de fragmentos específicos de ADN, de tamanhos compreendidos entre 0.2 e 5 kb, realizaram-se cortando a banda de agarose que continha o fragmento de interesse, a partir de geis feitos com TAE e bem processados. Os fragmentos eram depois submetidos a um tratamento com o "Gen Clean Kit" (Bio101, La Jolla, California) seguindo as instruções do fabricante. Para os fragmentos entre 50 e 400 pb o seguiu-se o "Kit" "MEraid^R kit" do mesmo fabricante.

O fundamento deste método é, resumidamente, o seguinte: o ADN adere primeiro por adsorção a uma matriz de sílica e fica depois livre, em condições controladas.

2.8.9 - Construção de plasmídeos recombinados

As moléculas recombinadas obtiveram-se mediante a combinação de fragmentos de ADN purificados (sendo sempre um deles um vector molecular). Quando os extremos do vector eram compatíveis, este tratava-se sempre com fosfatase alcalina ("Calf Intestine Alkaline Phosphatase", Boehringer) para eliminar os grupos fosfato da extremidade 5' de cada filamento e impedir assim a religação do vector. Quando foi de interesse converter os extremos rombos em extremos protuberantes, utilizou-se o fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli* ou a nuclease S1 de *Aspergillus oryzae*. Na reacção de ligação utilizou-se a ADN ligase do fago T4 (Boehringer).

A mistura da ligação utilizou-se para transformar directamente *E. coli* e recuperar os plasmídeos recombinados.

Os tratamentos com as enzimas anteriormente referidas levaram-se a cabo seguindo os protocolos habituais (Maniatis *et al.*, 1982) e as recomendações dos fornecedores.

2.8.10 - Sequenciação de fragmentos de ADN

A sequenciação dos fragmentos de ADN descritos ao longo deste trabalho realizou-se com um equipamento de sequenciação automática da Universidade de Salamanca, utilizando um sistema ABI PRISM 377 DNA sequencer de Perkin Elmer.

2.8.11- Construção de genotecas parciais de ADN genómico

A construção de genotecas parciais da levedura *Y. lipolytica* realizou-se clonando moléculas de ADN de diferentes tamanhos nos plasmídeos pBluescript KS⁺ ou SK⁺. Para isso, digeriu-se o ADN total com as enzimas adequadas, e os produtos da digestão separaram-se por electrofórese em geis de agarose preparados a 0.8% em TAE. A fracção, que continha os tamanhos de interesse, purificou-se por *GeneClean*TM. Por outro lado, digeriu-se o vector com a mesma enzima e defosforilou-se com CIP para impedir a sua religação, purificando-se depois da mesma forma que se fez com o ADN genómico.

A reacção de ligação fez-se com diferentes relações enxerto/vector e transformaram-se células competentes de *E.coli*. Os transformantes seleccionaram-se e guardaram-se em glicerol da mesma forma descrita anteriormente.

2.9- REACÇÕES DE AMPLIAÇÃO POR PCR

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) converteu-se numa ferramenta de grande valor para os biólogos moleculares. No nosso trabalho, a PCR utilizou-se com várias finalidades com diferentes modificações. Embora a seguir se descreva o protocolo geral utilizado, os diferentes parâmetros variaram em cada caso para otimizar a reacção em função da temperatura de anilhamento dos oligonucleotídeos, do tamanho do fragmento a ampliar, etc..

Das variações ao protocolo geral destacamos as seguintes:

• PCR inversa

A PCR pode ser utilizada para clonar um fragmento de ADN genómico que possua uma seqüência conhecida. Para isso digeriu-se o ADN genómico com uma enzima de restrição que não corte na seqüência. De seguida, religou-se o produto dessa digestão de modo a obterem-se uma série de fragmentos circulares de ADN genómico. Ao efectuar uma PCR utilizando oligos divergentes nos extremos da seqüência conhecida, ampliou-se um fragmento de ADN que possui as zonas de ADN adjacentes à seqüência de partida, mas unidas ambas pelo sítio de corte reconhecido pela enzima de restrição utilizada.

• “Touchdown” PCR

A PCR é uma técnica muito utilizada para clonar genes por homologia. Baseia-se no mínimo tamanho das regiões homologas de uma família de proteínas, necessário para desenhar os cebadores e na possibilidade de construir oligos degenerados. O seu maior inconveniente relaciona-se com o considerável número de seqüências artefactuais que se podem produzir. Para evitar este problema, os dois aspectos que tem maior importância são os seguintes:

Seleção de oligonucleotídeos

Os princípios gerais que se seguiram para o desenho de oligonucleotídeos foram (Latchman, 1992):

- 1.- Seleccionar seqüências altamente conservadas na família de proteínas para o desenho de oligonucleotídeos.
- 2.- Elegir degenerações mínimas. Fragmentos que contenham Metionina ou Triptofano são muito adequados porque são codificados por codões únicos. Pelo contrário, fragmentos ricos em Leucina, Arginina ou Serina (codificados por 6 codões) podem incrementar enormemente a degeneração do oligonucleotídeo.
- 3.- Estudar a utilização preferencial de codões do organismo com que trabalhamos. Estatisticamente nem todos os possíveis tripletos que podem codificar um aminoácido são utilizados com a mesma frequência. Alguns desses tripletos apenas são utilizados e podem ser desprezados.
- 4.- O mais importante para a especificidade do oligonucleotídeo é o extremo 3', pelo que se deve procurar que seja o menos degenerado possível.
- 5.- Quando existem várias zonas de homologia numa família de proteínas, podem desenhar-se vários pares de oligos e utilizá-los de forma cruzada.

Tabela 2.8 - Lista das sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

| Nome | Sequência | | | | | | | | |
|--------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| LIP-1↓ | TTC | AAG | GGA | ATC | CCA | TTT | GCT | | |
| | T | C | C | T | C | C | C | | |
| | | | T | | T | | | | |
| LIP-2↓ | CCC | GTC | ATG | GTC | TGG | ATC | TAC | GGA | GG |
| | T | T | | T | | T | T | C | |
| | A | G | | G | | | | T | |
| LIP-3↑ | GAC | CIT | GTC | TGG | GTC | ICC | ICC | GAA | |
| | A | G | A | G | A | | | A | |
| | C | | | A | | | | | |
| LIP-4↑ | TGG | CIT | AAA | CTG | TGG | GGT | | | |
| | G | G | G | T | G | A | | | |
| | A | | | | A | | | | |
| AL-1 ↑ | | | ACT | CGC | ACC | GAC | TCT | GCC | |
| AL-2 ↓ | | | GGG | TCT | CGC | GGG | CIT | CCT | |
| AL-3 ↓ | | | ATC | ACA | TGA | CCA | GCA | GCC | |
| AL-4 ↑ | | | GTC | GCC | AGG | CAT | GGC | GAC | |
| AL-5 ↓ | | | GGA | GCT | GTT | GGC | AAA | GGT | |
| AL-6 ↓ | | | TGG | ACG | AGT | TAC | AGG | GAG | |
| AL-7 ↓ | | | GTT | CCA | AGG | AGT | CCA | CTG | |
| AL-8 ↓ | | | TGG | AAC | GGC | GCG | GAG | ATC | |
| AL-9 ↓ | | | TGT | GCC | TGT | GIG | CAT | GAC | |

Na Tabela 2.8 representa-se a sequência dos oligonucleotídeos utilizados no nosso trabalho e indica-se o nome utilizado como referência e a sequência no sentido 5' a 3'. As setas indicam o sentido em que hibridam com a cadeia que contém o marco de leitura aberto (indica 5' a 3' para baixo e 3' a 5' para cima).

Os oligos LIP 1 a LIP 4 foram utilizados em reacções de PCR; os oligos AL 3 a AL 9 utilizaram-se em reacções de sequênciação, enquanto que os oligos AL 1 e AL 2 se utilizaram em ambas as reacções.

B) Condições da PCR

Em geral, a menor temperatura de anilhamento produz-se uma maior ampliação não específica, dependendo da degeneração dos oligos. O método chamado "Touchdown PCR" (Don *et al.*, 1991 citado em Latchman, 1992) reduz esta ampliação inespecífica. Neste procedimento, os ciclos de ampliação começam com uma temperatura de anilhamento superior à calculada para os oligos utilizados. A temperatura de anilhamento diminui depois 0.5 ou 1 °C em cada ciclo até completar a PCR. Este método favorece uma ampliação muito específica nos primeiros ciclos da PCR conferindo vantagem à sequência ampliada relativamente a outras sequências que possam ampliar-se de forma não específica nos restantes ciclos.

A reacção de ampliação com a enzima *Taq* polimerase (conhecida como "Reacção de polimerização em cadeia" ou PCR) realizou-se num termociclador *Perkin Elmer*® 2400. As condições programadas foram:

1. Desnaturação do ADN molde a 93 °C durante 3 minutos.
2. 30 ciclos com os seguintes passos:
 - ⇒ anilhamento (1 minuto a 40 °C, na maioria dos casos)
 - ⇒ extensão (1 minuto a 72 °C)
 - ⇒ desnaturação (1 minuto a 95 °C).
3. Extensão prolongada a 72 °C durante 5 minutos.
4. Conservação da reacção indefinidamente a 4°C.

Estas condições foram modificadas ligeiramente em função da temperatura de fusão média calculada para cada par de oligonucleótidos segundo uma fórmula aconselhada pelos manuais de laboratório (Innis, 1990; Maniatis, 1982):

$$T_f = 81.5 + 16.6 \cdot \log I + 0.41 (\% G + C) - (600/N)$$

Em que:

T_f = Temperatura de fusão

I = Força iónica do meio de reacção (neste caso 0.006 (M))

G e C = número de cada uma destas bases em cada oligonucleotídeo

N = Comprimento da cadeia a ampliar.

Geralmente, na reacção de ampliação, aconselha-se a utilização de uma temperatura 10 °C inferior à calculada por esta fórmula.

A reacção continha 100 picomoles de cada oligonucleotídeo iniciador, 50 ng de ADN molde, 20 picomoles de cada dNTP e 1,5 unidades de *Taq* polimerase de *Thermus aquaticus* (Boehringer Mannheim), em 100 µL de solução tamponada.

O resultado da reacção de ampliação analisou-se mediante electroforese em geis de agarose. O ADN ampliado era purificado a partir de um gel de agarose mediante "GeneClean Kit" anteriormente descrito (secção 2.8.8).

2.10 - Hibridação de ácidos nucleicos

• Preparação de sondas marcadas radioactivamente

A marcação radioactiva dos fragmentos de ADN realizou-se mediante o procedimento de "Random priming" utilizando o "kit" de Boehringer "Random primed ADN labelling kit" [^{32}P] dCTP (radioactividade específica > 3.000 Ci/mmol), como nucleotídeo marcado e um "kit" de marcação da Boehringer Mannheim, seguindo as recomendações dos fornecedores.

• Detecção de sequências específicas de ADN (Southern-blot)

As hibridações ADN-ADN realizaram-se mediante um método descrito por Southern (Southern, 1975):

1. Depois de digerir o ADN genómico (2-5 µg) ou plasmídico (1-10 ng) com as enzimas de restrição adequadas, os fragmentos separaram-se mediante electroforese em geis de agarose preparados a 0,7%.
2. O gel com os fragmentos separados tratou-se com HCl 0.25 N durante 15 minutos para romper os fragmentos de maior tamanho de ADN em fragmentos de menor comprimento e depois desnaturalizou-se com NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M durante 30 minutos.
3. Seguidamente realizou-se por capilaridade, durante 12 horas com NaOH 0.25 M, NaCl 1.5 M, a transferência dos fragmentos de ADN para uma membrana de

Nylon (HYBOND, Amersham®). Após a transferência, a membrana foi lavada brevemente com 2x SSC (NaCl 15 M, citrato de sódio 1.5 M).

Por vezes, a transferência foi realizada a vácuo com um sistema *Vacugene XL*TM de *Pharmacia-LKB*® ligado a uma bomba de vácuo de 60 mBar de pressão. Neste caso fizeram-se passar de maneira sequencial, através do gel e da membrana de Nylon, as seguintes soluções:

- ⇒ HCl 0.25M durante 6 minutos.
- ⇒ NaOH 1M; NaCl 1.5 M durante 8 minutos.
- ⇒ Tris/HCl 0.5 M, pH7.2; NaCl 1.5 M durante 6 minutos.
- ⇒ 20 X SSC (NaCl 3 M, citrato trissódico 0.3 M) durante 60 minutos.

4. O ADN fixou-se à membrana secando esta numa estufa a 60 °C durante 5 minutos e expondo-a posteriormente à luz ultravioleta com 120 mJ (numa câmara de ultravioleta UV *Stratalinker*TM 2400 de *Stratagene*®).

Quando estávamos seguros de que o ADN estava fixado à membrana começou-se a pré-hibridação e o método de hibridação com uma sonda de ADN. As incubações realizaram-se colocando a membrana e as soluções em tubos cilíndricos de *Amersham/LIFE SCIENCE*, e estes em fornos de hibridação com um suporte rotativo:

1. A pré-hibridação levou-se a cabo com uma solução que continha 4X SSC, SDS 0.1%, 5x Reagente Denhardt (Ficoll 0,02%, polivinilpirrolidona 0.02% e albúmina de soro bovino 0.02%), Tris/HCl pH 7.5, ADN de esperma de salmão 100 µg/mL e formamida a 50%. As membranas com o ADN fixo eram então colocadas, juntamente com a solução de pré-hibridação, nos tubos cilíndricos, onde se incubaram durante um período mínimo de 1 hora a 42 °C.

2. A hibridação levou-se a cabo com uma solução que continha a mesma composição da solução de pré-hibridação mais 10 % de dextrano sulfato. A esta solução adicionou-se a sonda radioactiva desnaturada (por aquecimento a 100 °C durante 5 minutos) e incubou-se posteriormente a 42 °C durante pelo menos 6 horas.

3. Depois da hibridação as membranas lavavam-se 2 vezes com 2XSSC, SDS 2% e 2 vezes com 2XSSC, SDS 0.2%, durante 15 minutos a 42 °C.

4. A presença dos fragmentos de ADN que hibridavam especificamente com a sonda foi visualizada pela impressão que produz a radiação β, que emite o isótopo radioactivo da sonda, sobre uma película Hiperfilm HP (Amersham®).

• Detecção de clones positivos a partir de genotecas

Para analisar clones de genotecas, as células foram crescidas em placas de LB suplementadas com ampicilina, e fizeram-se réplicas em filtros de nitrocelulose (Millipore).

1. As colónias transferidas para os filtros lisaram-se mediante sucessivas incubações de 5 minutos destes filtros sobre papel Whatman 3MM, saturados com as seguintes soluções:

- ⇒ SDS a 10%.
- ⇒ Solução de desnaturação (0.5 N NaOH, NaCl 1.5 M).
- ⇒ Solução de neutralização (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.4).
- ⇒ SSC 2X.

Evitou-se, tanto quanto foi possível, a mistura das soluções mediante secagens intermédias das membranas.

2. Posteriormente, o ADN fixou-se por aquecimento a 80 °C durante uma hora a vácuo.
3. Os filtros lavaram-se com 5X SSC, 0.5% SDS e 1 mM EDTA durante 30 minutos a 50 °C, para eliminar os restos celulares e a seguir procedeu-se à sua hibridação tal como foi descrito anteriormente.

• Detecção de ARNm (Northern-blot)

As análises de "Northern-blot" (Vrati, 1987) levaram-se a cabo com o seguinte procedimento:

1. As amostras de ARN (10 µg) obtidas como se descreve no secção 2.8.3 liofilizaram-se e ressuspenderam-se, cada uma delas, em 16 µL de tampão desnaturante (para 10 mL de solução misturaram-se: 5 mL de formamida, 1.62 mL de formaldeído a 37 %, 1 mL de tampão MOPS 10 X e 2.4 mL de H₂O Milli-Q estéril tratada com DEPC).
2. Aqueceram-se a 65 °C, durante 10 minutos para desnaturar as estruturas secundárias formadas pelo ARN e adicionaram-se, em gelo, 4 µL de tampão de carga 5 X (Azul de bromofenol, 0.1 mg/mL e Glicerol a 50 % em H₂O) .
3. Seguidamente submeteram-se as amostras a electrofórese em geis de agarose preparados a 1% em tampão MOPS-Formaldehido, obtido da seguinte forma:

- ⇒ Misturaram-se 2.5 g de agarose, 25 mL de tampão MOPS 10 X (MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico) 0.4 M, pH 7.0; acetato de sódio 0.1 M; EDTA 10 mM) em 196.4 mL de H₂O mMilli-Q estéril tratada com DEPC.
- ⇒ Aqueceu-se esta mistura até à ebulição para fundir completamente a agarose, agitando constantemente.
- ⇒ Deixou-se arrefecer a mistura até aos 50 °C e misturou-se com 28.6 mL de formaldeído a 37%. Quando a mistura pareceu estar suficientemente homogénea, verteu-se sobre a bandeja do dispositivo de electroforese.
- ⇒ Deixou-se solidificar o gel à temperatura ambiente durante pelo menos 30 minutos.

4. Seguidamente as amostras foram submetidas a electroforese, aplicando uma corrente constante de 5 a 7 volt/cm durante 5 horas e à temperatura ambiente. A resistência do gel e a do tampão garantiam que com essa voltagem se dissipava o calor necessário para manter suficientemente alta a temperatura da cuveta de electroforese evitando assim que a renaturalização do ARN.
5. Ao fim de duas horas interrompeu-se brevemente a electroforese, para remover manualmente, com a ajuda de um pequeno copo de precipitação, o tampão, a fim de assegurar uma força iónica homogénea no tampão.

Depois da electroforese, o ARN era transferido por capilaridade para membranas de nylon (Hybond-N™, Ammersham/LIFE SCIENCE), utilizando como solução salina de arraste 20 x SSC.

6. As membranas de nylon pré-hibridaram-se durante 4 horas com 20 mL/100 cm² de um tampão que continha:
 - ⇒ 50% de formamida desionizada
 - ⇒ 10 x Denhardt's
 - ⇒ TRIS/HCl, pH 7.5, 50 mM
 - ⇒ NaCl 1M
 - ⇒ 0.1% de pirofosfato de sódio
 - ⇒ 1% de SDS
 - ⇒ 10% de Dextrano sulfato (adicionado no final, incubando 20 minutos a 65 °C para conseguir dissolvê-lo).
 - ⇒ 0.1 mg/mL de ADN de esperma de salmão submetido a 100 °C durante 10 minutos.
7. A hibridação desenrolou-se durante 16 a 36 horas, a 42 °C, com 10 mL/100 cm² de um tampão igual ao de pré-hibridação, mas que continha, além disso, dextrano sulfato para além da sonda marcada e desnaturada.

8. A limpeza dos filtros efectou-se com 2 lavagens de 150 mL de 2 X SSC durante 5 minutos à temperatura ambiente, seguidas por outras duas lavagens de 45 minutos a 65 °C em 2 X SSC e SDS a 1%. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente durante 5 minutos e efectuou-se outras duas lavagens finais de 30 minutos com 0.1 X SSC, auto-radiografando-se de seguida.

Por vezes, estes filtros eram submetidos a processos de hibridação com várias sondas diferentes, pelo que foi necessário eliminar a sonda anteriormente utilizada, sendo isto possível apenas quando a membrana permanecia humedecida. Para recuperar as membranas, verteram-se sobre os filtros 200 mL/100 cm² de uma solução de SDS a 0.1% em ebulição, e deixaram-se arrefecer à temperatura ambiente mantendo uma agitação constante.

2.11- TÉCNICA DE INTERRUPTÃO GENÉTICA “POP OUT”

A técnica de interrupção genética designada por “pop out” utiliza-se para interromper um fragmento genómico de ADN sem necessidade de que exista uma substituição genética. Para isso utilizou-se um método descrito por Boeke, (1987). Nesta técnica, faz-se a integração no genoma de um plasmídeo que possui o gene URA3 como marcador de selecção, e uma cópia deleccionada do gene que se pretende interromper. A integração produz-se por recombinação homóloga sendo favorecida pela linearização do plasmídeo.

Fizeram-se crescer os transformantes que possuíam a integração correcta, em meio rico, onde a ausência de pressão selectiva faz com que sobrevivam os casos em que se produzem fenómenos de recombinação que conduzem à perda do marcador URA3.

A recombinação pode ocorrer de tal forma que deixa no genoma a cópia salvagem do gene ou a cópia interrompida. A selecção destes clones efectua-se crescendo os transformantes num meio com ácido 5 fluororótico (5.FOA), que resulta tóxico para as células que possuem o gene URA3. Assim, neste meio, só crescerão os recombinantes que expulsaram o gene URA3.

2.12 - MICROFOTOGRAFIA

As microfotografias que ilustram este trabalho foram tiradas num microscópio Leica DRMXA, ligado a um sistema de digitalização de imagens Leica Q550CW.

2.13- ANÁLISE MEDIANTE TRATAMENTO INFORMÁTICO DOS DADOS OBTIDOS

• Sequências de ADN e proteínas

A análise das sequências de ADN e das sequências de proteínas derivadas a partir da região codificante do gene correspondente, realizou-se por duas vias:

a) Programas informáticos locais

Para a edição básica das sequências utilizaram-se os programas DNASIS™ e PROSIS™ (Pharmacia®, Hitachi®) (Pustell, 1982), enquanto que para a edição detalhada das sequências, assim como para as comparações de sequências, etc. utilizou-se o programa DNASTAR™, (cópia de demonstração enviada por DNASTAR, Ltd. Abacus House®, Manor Rd., West Ealing London W130AS Reino Unido).

As características físico-químicas das proteínas, tais como os pontos isoelétricos e a previsão de sítios de processamento do péptido sinal e outros sítios de processamento típicos analisaram-se com o programa PC/Gene™ (Intelligenetics® Inc.).

Também se utilizaram vários pacotes informáticos de domínio público, distribuídos por diversas Universidades, para analisar outras características menos importantes das sequências.

As árvores filogenéticas representaram-se e calcularam-se utilizando o programa Phylip (Felsenstein, 1995), a partir dos dendrogramas obtidos das comparações mediante o algoritmo de CLUSTAL.

Os parâmetros relacionados com o desvio ao uso de códons em cada gene calcularam-se com o programa CODONS (Lloyd, 1992) e com o programa CodonBiasIndex, distribuído pelo EBI (European Bioinformatics Institute).

Para a representação das estruturas tridimensionais das proteínas, a partir dos dados cristalográficos depositados no Protein Data Bank, ou aqueles elucidados pelo sistema SwissModel, utilizaram-se os programas Molview 1.1 (Smith, 1995), Swisspdbviewer e Rasmol 2.5.

Os esquemas das construções plasmídicas realizaram-se com Gene Construction Kit™ (Textco® Inc.).

b) Acesso a servidores da Internet

Utilizou-se o pacote informático GCG-Wisconsin do Centro Nacional de Biotecnología da Universidade Autónoma de Madrid (<telnet://samba.cnb.uam.es>) para localizar domínios de união a factores de transcrição e para fazer algumas comparações simples.

Recorreu-se ao European Bioinformatics Institute sempre que foi necessário obter dados de alguma sequência registada nas bases de dados de ADN (EMBL) ou proteínas (SWISS-PROT), em <http://www.ebi.ac.uk>. Neste mesmo servidor, levaram-se a cabo comparações de sequências de ADN e proteínas mediante o algoritmo implementado (Pearson, 1988) no programa FASTA, assim como as predicções da estrutura secundária das proteínas. Também se efectuou neste servidor um registo "on line" da sequência de ADN do gene *YLIP3*.

Para a localização teórica de domínios transmembranares nas sequências de proteína, assim como domínios envolvidos nas vias de secreção, utilizaram-se programas de análise em:

- ⇒ "**Psort**" em <http://psort.nibb.ac.jp/index.html>
- ⇒ "**Tmpred**" em http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_form.html
- ⇒ <http://absalpha.dcrf.nih.gov:8008/otherservers.html>
- ⇒ "**Tmap**" em http://www.embl-heidelberg.de/tmap/tmap_sin.html

Alguns sítios de união a factores de transcrição localizaram-se analisando a região promotora do gene *YLIP3* em:

- ⇒ "**TESS**" em <http://agave.humgen.upenn.edu/tess/index.html>
- ⇒ "**TRANSFAC**" em <http://transfac.gbf-braunschweig.de/>

As previsões das estruturas secundárias das proteínas realizaram-se num sistema de redes neurais do EMBL:

- ⇒ "**PredictProtein**".em.<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>.

A elucidação da estrutura terciária das proteínas realizou-se no servidor de GLAXO do Biomedical Research Institute da Suíça.

- ⇒ "**SwissModel**" em <http://expasy.hcuge.ch/swissmod/SWISSMODEL.html>

Os dados referentes ao uso de codões de cada microorganismo actualizaram-se periodicamente desde:

- ⇒ "**CUTG**" em <http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html>

Outros sistemas de análise foram localizados a partir de:

- ⇒ "Amo's" em http://expasy.hcuge.hk/www/amos_www_links.html
- ⇒ Pedro's" em http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html

•Pesquisas bibliográficas

As referências bibliográficas foram-se recopilando periodicamente a partir das bases de dados centrais (MEDLINE™, Current Contents™, Life Sciences™) da Universidade de Salamanca, acedendo a elas através dos sistemas de busca Macspirs™ y Winspirs™ (Silverplatter® Inc.).

Alguns dados de referências bibliográficas com mais de 10 anos obtiveram-se na Internet, através de:

- ⇒ "Healthgate" em <http://www.healthgate.com/>
- ⇒ "Entrez" em <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin/enf/entrezmCOMPLEX>
- ⇒ "CARL" em <http://www.carl.org/>
- ⇒ "UnCoverWeb" em <http://uncweb.carl.org/>

Apesar das direcções URL da Internet referidas se poderem conservar durante algum tempo, é provável que, por diversas razões, mudem de localização. Por isso, recomendamos que se actualizem acedendo directamente à direcção antiga ou através de algum motor de pesquisas como "Altavista" (<http://altavista.digital.com>) o qual ficará registado colocando a palavra chave à frente de cada direcção.

2.14 - OUTROS PRODUTOS UTILIZADOS

A ampicilina utilizada foi de Boehringer Mannheim (Alemanha) e a tetraciclina de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

As enzimas utilizadas para as experiências de restrição ou modificação de ácidos nucleicos, foram obtidas de Boehringer Mannheim (Alemanha) ou de Amersham (Inglaterra). A agarose que utilizámos era de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

Os produtos necessários para preparar geis de acrilamida (acrilamida, bisacrilamida e TEMED) foram fornecidos por Biorad (Richmond, USA). A ureia foi de IBI (New Haven, USA) ou de Boehringer Mannheim (Alemanha).

Os restantes produtos e reagentes químicos utilizados foram sempre de qualidade analítica.

3 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3.1- OPTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DE ACTIVIDADE LIPÁSICA DE *Yarrowia lipolytica*

A existência de actividade lipásica em *Yarrowia lipolytica* está bem registada na bibliografia como se descreve na secção 1.3.4 da **Introdução**, no entanto, as discrepâncias observadas devidas à utilização de diferentes estirpes e/ou metodologias levaram-nos a realizar alguns estudos preliminares sobre condições de crescimento celular e de actividade lipásica e esterásica em meios sólidos e líquidos com o fim de estabelecermos as metodologias e os meios de indução mais adequados aos objectivos que nos propunhamos alcançar.

3.1.1 – Actividade lipásica em leveduras

Num desses estudos foi comparada a actividade lipásica entre estirpes selvagens de *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Em placas de Petri com o meio de cultura, **Glucose-Agar-Tributirina**, descrito em **Materiais e Métodos**, foram semeadas gotas de 10 μ L de suspensões que continham 10^7 células e que tinham sido recolhidas de meios líquidos definidos.

Incubaram-se a 28 °C e ao longo do crescimento foram analisados os aspectos das colónias fazendo-se medições dos halos de actividade.

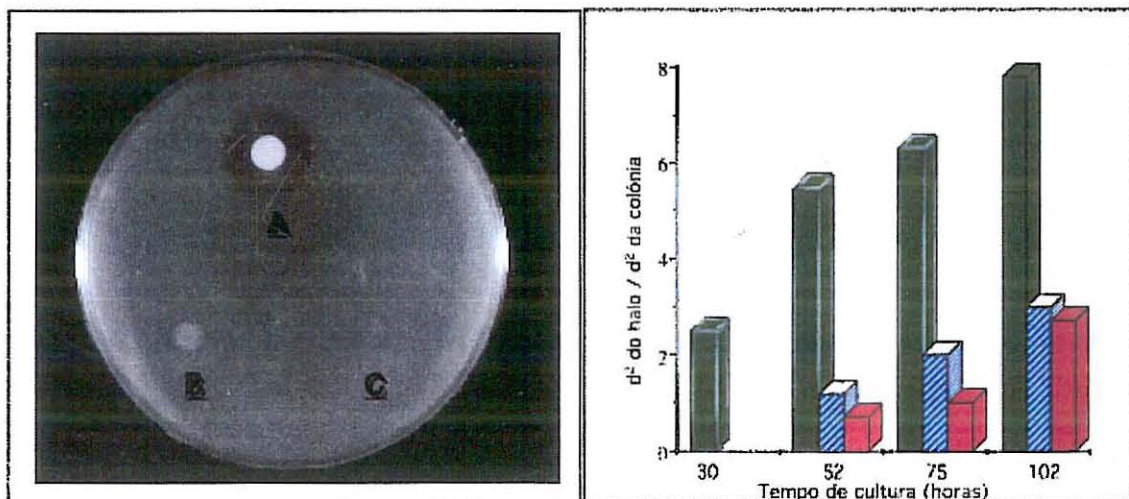


Figura 3.1 – Placa de culturas em meio sólido com: A) *Yarrowia lipolytica*, B) *Kluyveromyces lactis* e C) *Saccharomyces cerevisiae*. O gráfico ao lado representa as medições ao longo do crescimento de: *Yarrowia lipolytica* (■), *Saccharomyces cerevisiae* (□) e *Kluyveromyces lactis* (▨).

Ao romper-se a emulsão opaca formada pela tributirina e pela água forma-se um halo translúcido cujo tamanho depende do tempo de incubação. A actividade foi quantificada medindo o diâmetro da colónia e o diâmetro do halo calculando-se a seguir o cociente entre o diâmetro ao quadrado do halo e o diâmetro ao quadrado da colónia, aceitando-se este valor como uma estimativa da actividade enzimática reactiva das células da colónia. Os diâmetros elevaram-se ao quadrado por se tratar de uma comparação de áreas de círculos.

Como se pode observar na Figura 3.1 as estirpes de *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentam uma actividade lipásica muito residual. Por seu lado, as colónias de *Yarrowia lipolytica*, não só, apresentam um crescimento muito superior como um halo de actividade lipásica considerável.

3.1.2- Selecção da estirpe a utilizar

Em estudos realizados pelo grupo de investigação foram inoculadas em iguais condições diferentes estirpes de *Yarrowia lipolytica* em meios sólidos de diferente composição **Glucose-Agar-Tributirina** e **Agar-Tributirina** (Secção 2.3.3 de **Materiais e Métodos**). Semearam-se gotas de 5 μ L de suspensões celulares, de cada uma das estirpes, contendo $5 \cdot 10^6$ células e fizeram-se medições de halos de actividade após 48 horas de crescimento a 28 °C. Os resultados desses estudos representam-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Valores dos diâmetros ao quadrado de halos de actividade divididos pelo diâmetro ao quadrado das colónias de várias estirpes de *Yarrowia lipolytica*.

| Estirpe | d^2 halo/ d^2 colónia (com Glucose) | d^2 halo/ d^2 colónia (sem Glucose) |
|------------|--|--|
| JM-12 | 2.4 | 4.4 |
| INAG135668 | 2.3 | 4.3 |
| INAG135667 | 2.3 | 2.6 |
| W29 | 2.4 | 5.2 |
| SA-1 | 2.3 | 2.6 |

As diferenças de actividade observadas entre as diferentes estirpes analisadas não são muito significativas e a repressão que se observa por parte da glucose parece afectar na mesma medida a todas as estirpes (Kawasaki *et al*, 1995; Ruschen *et al.*, 1982; González, 1997). Em trabalhos futuros decidiu-se utilizar a estirpe INAG 135668 por ter sido utilizada para isolar o primeiro gene que codifica para lipases nesta levedura e assim poderem-se estabelecer melhores comparações.

3.1.3 - Condições de crescimento de *Yarrowia lipolytica*

Com o objectivo de determinar a influência da fonte de carbono no crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* a estirpe INAG 135668 desta levedura foi crescida nas mesmas condições em dois meios contendo um glucose (MM-

Glucose) e o outro azeite (**MM-Azeite**), cuja composição se descreve na secção 2.2.4 de **Materiais e Métodos**. Esperava-se um crescimento mais retardado no substrato azeite por se tratar de um substrato que tem de ser hidrolizado previamente, antes de penetrar no interior celular e por isso mais difícil de assimilar. Como se pode observar nas curvas de crescimento da Figura 3.1 não se registam diferenças significativas nos crescimentos nestes dois meios. O resultado observado pode ser explicado pelo facto de o azeite e as gorduras em geral poderem ser substratos naturais desta levedura .

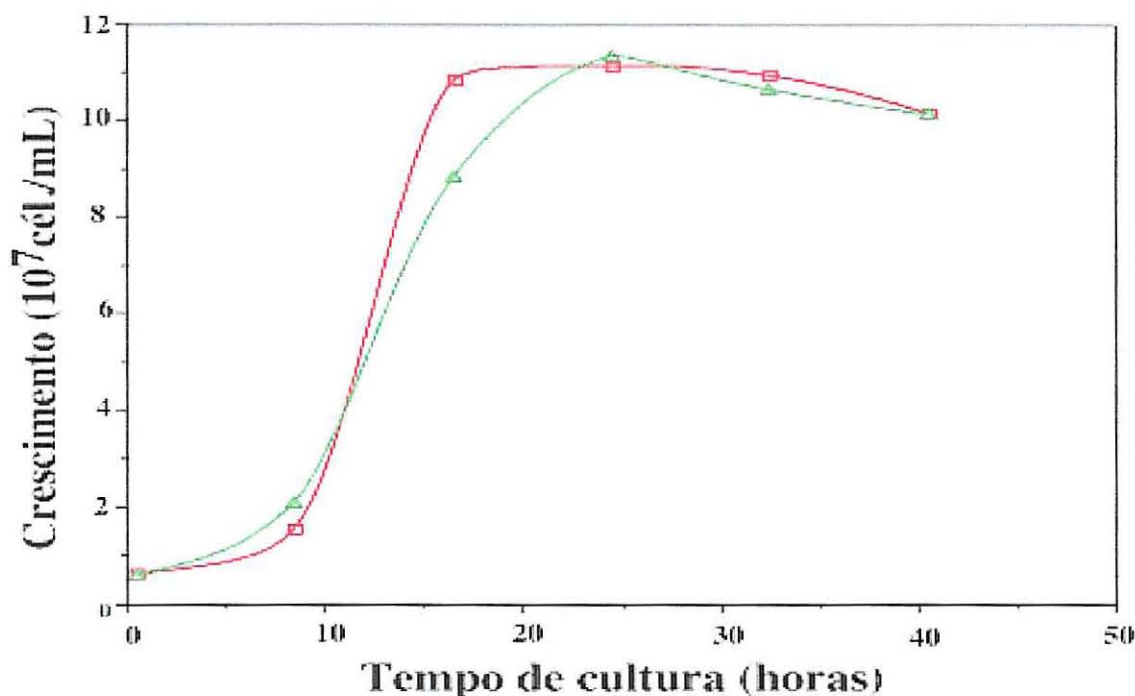


Figura 3.1 – Crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* (INAG 135668) no meio MM-Glucose (□) e no meio MM-Azeite (△).

3.1.4 – Actividade lipásica em células de *Yarrowia lipolytica*

Com o objectivo de determinar se a actividade lipásica era induzida com azeite, cresceram-se células de *Yarrowia lipolytica* em meios de cultura com glucosa **MM-Glucose** e com azeite **MM-Azeite** (ver **Materiais e Métodos**). Em ambos os casos foram utilizadas como pré-inóculo células pré-cultivadas no meio **YED** até à fase exponencial de crescimento (16-18 horas). As células eram recolhidas, lavadas com água ultrafiltrada estéril e ressuspensas, nos matrizes com os meios de cultivo definidos, numa concentração de 10^7 células/mL.

As células recolhidas em diferentes tempos de crescimento eram separadas do sobrenadante de crescimento por centrifugação e após lavagem com tampão fosfato pH 7.2, 10mM, repartidas em alíquotas.

Algumas destas alíquotas eram utilizadas para obter extractos celulares, separando-se o sobrenadante de ruptura das células rebentadas (paredes celulares).

Quando se recolhiam as amostras acompanhavam-se também os crescimentos celulares por contagem das células em câmara "Thoma" ou por medição da densidade óptica a um comprimento de onde de 600 nm. Estes valores eram depois relacionados utilizando uma recta padrão.

a) Importância de tamponar os meios de cultura

Pode-se comprovar em repetidas experiências que a indução da actividade lipásica verificada quando as células crescem em meio com azeite só se mantêm se o meio de cultura estiver tamponado com Tris/HCl, pH 7.2, 200mM. Provavelmente porque a proteína com actividade lipásica sofre desnaturação quando se encontra livre em meios de cultura não tamponados que resultam ser reactivamente ácidos. Na Figura 3.3 representam-se graficamente os valores de pH em sobrenadante de crescimento de *Y. Lipolytica* crescida num meio de cultura com azeite (MM-Azeite) sem tamponar e no mesmo meio tamponado com Tris-HCl 200mM pH 7.2.

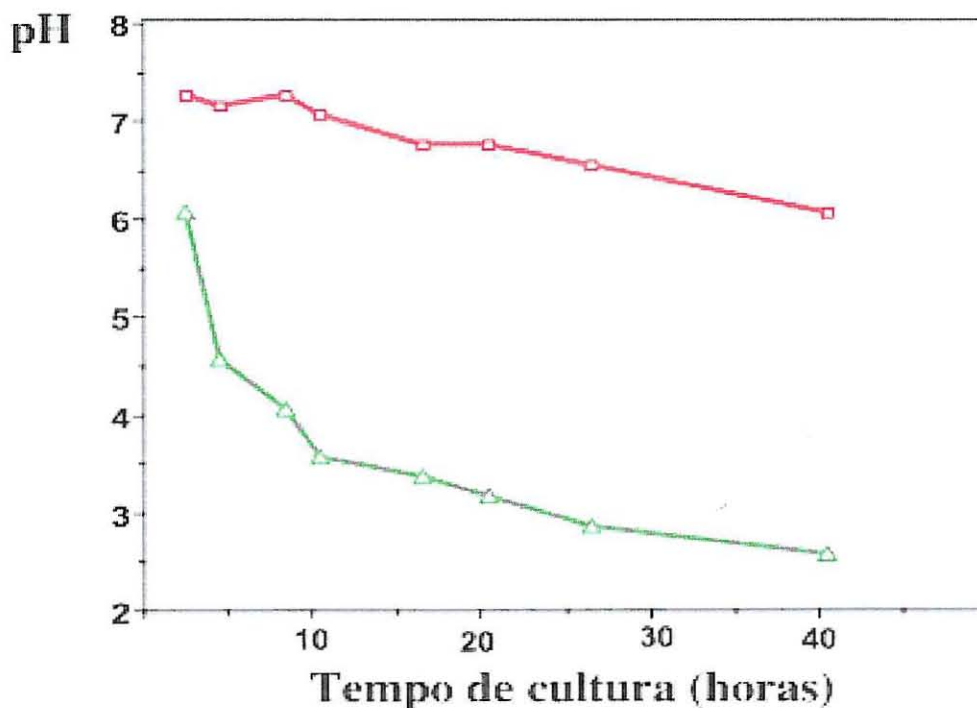


Figura 3.3 – Medida de pH de sobrenadante de crescimento de *Yarrowia lipolytica* crescida num meio com azeite (MM-Azeite) sem tamponar (Δ) e no mesmo meio tamponado com Tris-HCl 200mM pH 7.2 (□).

b) Actividade lipásica em diferentes tempos de cultura

Foi medida a actividade lipásica em células de *Yarrowia lipolytica* de diferentes tempos de cultura crescidas em **MM-Azeite** e em **MM-Glucose**. Os resultados destas actividades obtidos mediante técnica titrimétrica com substratos emulsionados *sigma lipase substrato* (SLS) e tributirina apresentam-se nos gráficos da Figura 3.4. O *sigma lipase substrato* (SLS) era diluído até se obter uma concentração de 20.6 %. Pode observar-se, em ambos os casos, que existe uma indução de actividade lipásica em células de crescimentos com azeite enquanto nas células dos crescimentos com glucose mantêm uma actividade basal insignificante.

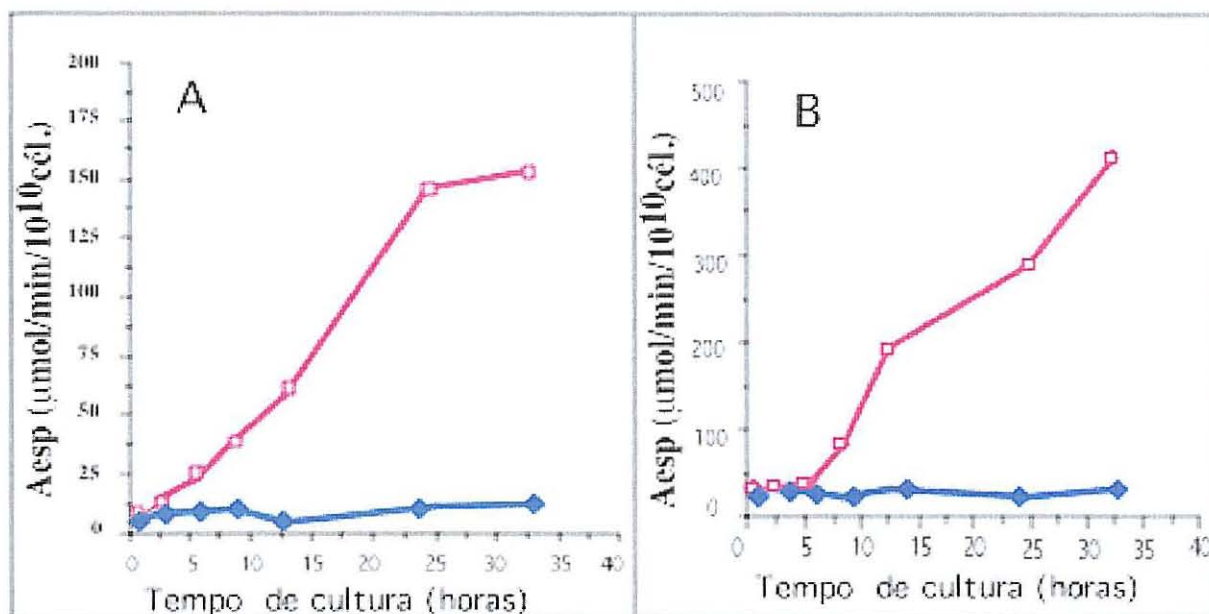


Figura 3.4 – Actividades lipásicas com o substrato azeite (SLS) (A) e com substrato tributirina (B), em células de *Yarrowia lipolytica* (INAG 135668) crescidas em MM-Glucose (—◆—) e MM-Azeite (—□—).

Em todos os casos os resultados são repetitivos quando se trata de amostras provenientes do mesmo crescimento, apresentando pequenas variações sempre que se comparam resultados de amostras de diferentes crescimentos, provavelmente devido à dinâmica de cada crescimento.

3.1.5 – Actividade lipásica em fracções celulares de *Yarrowia lipolytica*

A fim de determinar a distribuição da actividade lipásica nas diferentes fracções celulares de *Yarrowia lipolytica* realizaram-se vários ensaios com diferentes substratos.

As fracções celulares e a sua concentração proteica foram obtidas de acordo com os procedimentos descritos nas secções 2.4.2 e 2.4.1, respectivamente, de **Materiais e Métodos**. Nos primeiros ensaios o sobrenadante de crescimento era concentrado com um “centricon” por centrifugação ou por precipitação com ácido

tricloroacético. Em ensaios posteriores deixou de se concentrar já que se conseguiam actividades significativas com medições directas, sem concentrar.

Fizeram-se controles negativos, com amostras fervidas em todos os ensaios.

A indução nos crescimentos com azeite também se observa em fracções celulares como se pode observar nas actividades com o substrato tributirina, a uma concentração de 0.16M, representadas nos gráficos da **Figura 3.5**. Neste caso foi utilizada a tributirina emulsionada por se tratar de um composto puro de fácil manipulação que permite a obtenção de resultados muito precisos.

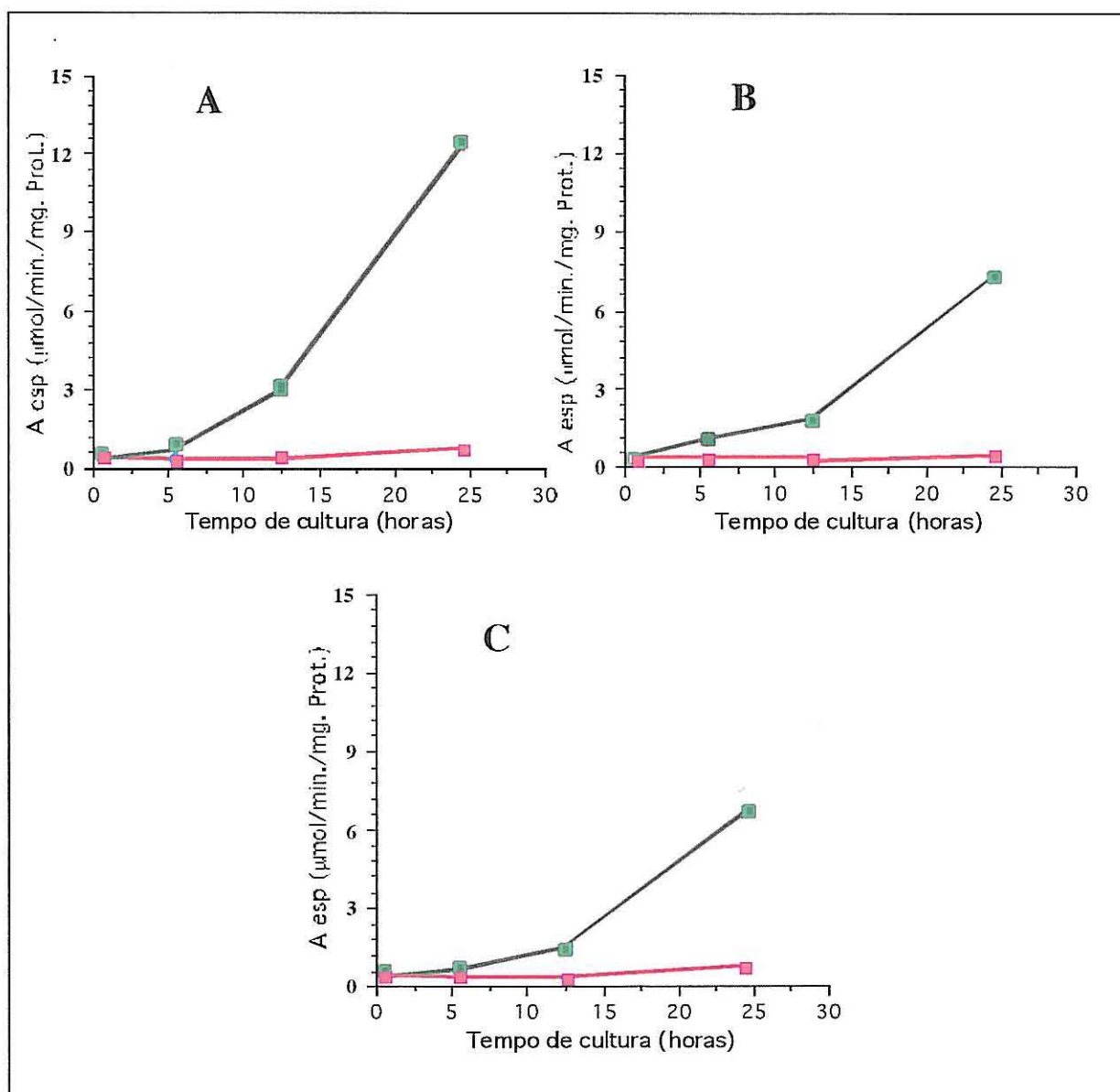


Figura 3.5 - Actividades lipásicas com o substrato tributirina em fracções celulares de *Yarrowia lipolytica*: (A) Sobrenadante de crescimento, (B) Sobrenadante de ruptura e (C) paredes celulares. Em crescimentos celulares com MM-Azeite (■) e com MM-Glucose (■).

Da análise dos gráficos da figura 3.5 também se pode observar que a distribuição da actividade lipásica em fracções celulares segue a seguinte sequência: Sobrenadante de crescimento, sobrenadante de ruptura e paredes celulares. Para quantificar esta distribuição calcularam-se as proporções nas três localizações no tempo de cultura de 24 horas tendo-se obtido os resultados que se representam na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Distribuição de actividade lipásica em fracções celulares de *Yarrowia lipolytica*.

| Fracção | Tempo de cultura (horas) | A específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg.prot.}$) | % |
|------------------------|---------------------------------|---|-----------|
| Sobre. de cres. | 24 | 13.2 | 61 |
| Sobre. de Rupt. | 24 | 7.3 | 20 |
| Paredes | 24 | 7.0 | 19 |

Como se pode apreciar na Tabela 3.2, nas condições experimentais de crescimento, a maior actividade lipásica às 24 horas regista-se no sobrenadante de crescimento o que sugere que as lipases de *Yarrowia lipolytica* tendem a secretar-se para o meio de cultura.

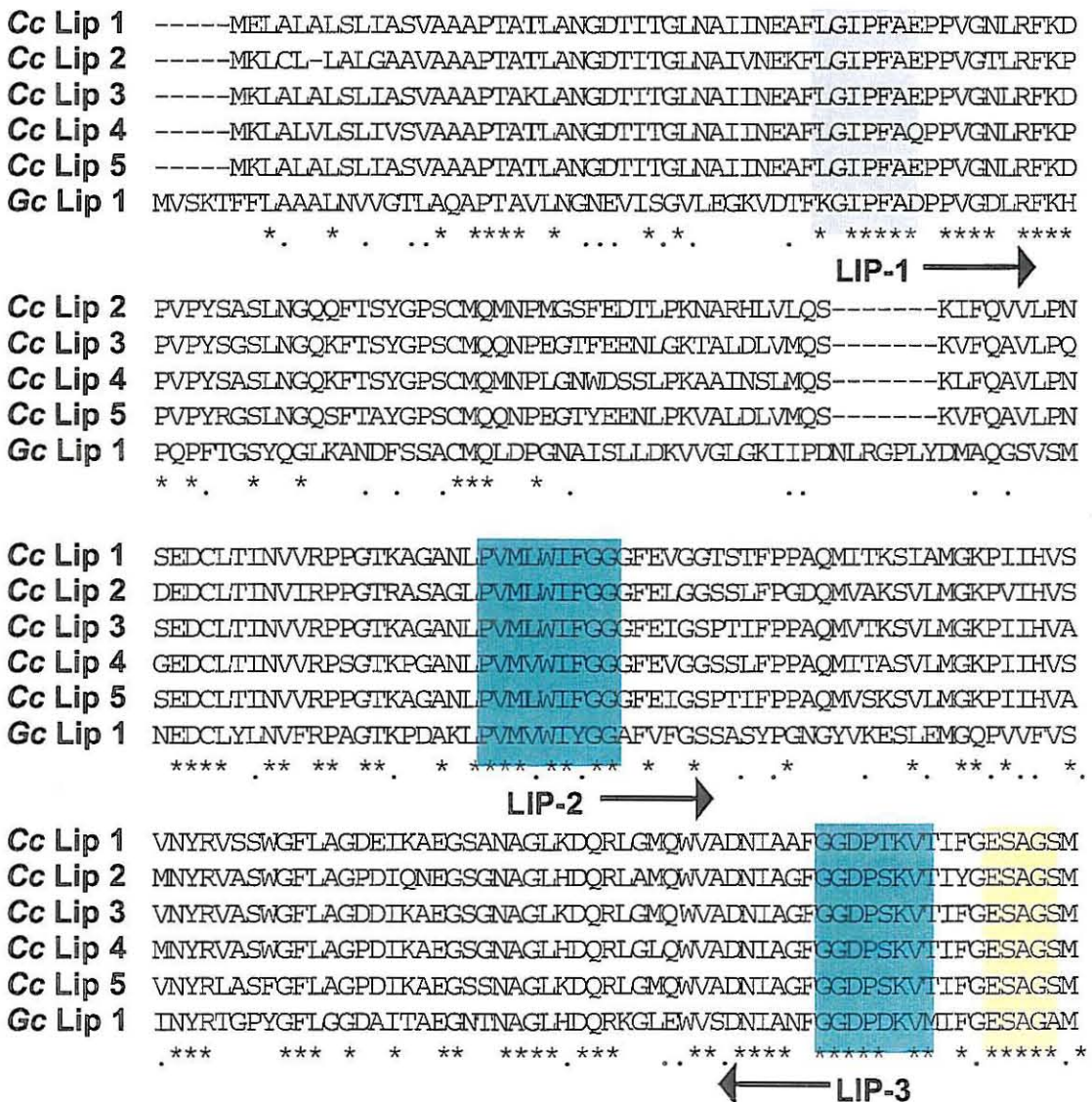
Resultados semelhantes (que não são apresentados) foram obtidos com o substrato azeite (SLS) e com paranitrofenil butirato, enquanto que com o substrato paranitrofenil acetato não se obtiveram resultados expressivos pelo que deixou de se utilizar em futuras experiências..

Uma vez confirmada a existência de actividade lipásica em *Yarrowia lipolytica* procedeu-se ao isolamento de genes que codificam para enzimas com essa actividade nesta levedura.

3.2- ISOLAMENTO DO GENE YILIP3

3.2.1 - Obtenção de sondas de ADN

Obtiveram-se as sequências de aminoácidos deduzidas para proteínas com actividade lipásica em *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* microrganismos evolutivamente próximos de *Yarrowia lipolytica*. Estas sequências compararam-se mediante o algoritmo de CLUSTAL (Higgins *et al.*, 1988). Na **Figura 3.6** evidenciam-se as regiões mais conservadas que foram eleitas como modelo para a síntese dos oligonucleotídeos (Lip1-lip4) cujas sequências degeneradas se detalham na **Tabela 2.8** (secção 2.9 de **Materiais e Métodos**).



Cc Lip 1 SVMCHLLWINDGDNTYK GKPLFRAGIMQSGAMVPSDAVDGTYGNEIFDILLASNAGCGSAS-
 Cc Lip 2 STFVHLVWINDGDNTYNGKPLFRAAIMQSGCMVPSDPVDGTYGTETYNQVVASAGCGSAS-
 Cc Lip 3 SVLCHLLWINDGDNTYK GKPLFRAGIMQSGAMVPSDPVDGTYGNEIYDLFVSSAGCGSAS-
 Cc Lip 4 SVMCQLLWINDGDNTYNGKPLFRAAIMQSGAMVPSDPVDGPFYGTQIYDQVVASAGCGSAS-
 Cc Lip 5 SVLCHLLWINDGDNTYK GKPLFRAGIMQSGAMVPSDPVDGTYGTQIYDTLVASTGCCSSAS-
 Gc Lip 1 SVAHQLVAYGGDNTYNGKQLFHSAILQSGGPLPYFDSTSVGPESAYS SRF AQYAGCDASAG
 * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . .

Cc Lip 1 --DKLAACLRGVSSDTLEDATN--NTPGFLAYSSLRLSYLPRPDGVNITDDMYALVREGKY
 Cc Lip 2 --DKLAACLRGLSQDTLYQATS--DTPGVLAYPSLRLSYLPRPDGTFITDDMYALVRDGKY
 Cc Lip 3 --DKLAACLR SASSDTLLDATN--NTPGFLAYSSLRLSYLPRPDGKNIITDDMYKLV RDGKY
 Cc Lip 4 --DKLAACLR SINDKLFQATS--DTPGALAYPSLRLSFLPRPDGTFITDDMFKLV RDGKC
 Cc Lip 5 --NKLACLRGLSTQALLDATN--DTPGFLSYTSLRLSYLPRPDGANITDDMYKLV RDGKY
 Gc Lip 1 DNETLACLR SKSSDVLHSAQNSYDLKDLFGLLPQFLGFGPRPDGNIIPDAAVELYRSGRY
 * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . .

Cc Lip 1 ANIPVLIIGDQNDGTFIFGTSSLNVTTDAQAREYFKQSFVHASDAEIDITLMTAYPGDITQG
 Cc Lip 2 AHVPVLIIGDQNDGTFIFGLSSLNVTTDAQARAYFKQSFTHASDAEIDITLMAAYTSDITQG
 Cc Lip 3 ASVPVLIIGDQNDGTFIFGLSSLNVTTNAQARAYFKQSFTHASDAEIDITLMAAYPQDITQG
 Cc Lip 4 ANVPVLIIGDQNDGTFIFALSSLNVTTDAQARQYFKESFTHASDAEIDITLMAAYPSDITQG
 Cc Lip 5 ASVPVLIIGDQNDGTFIFGLSSLNVTTEADAEAYLRKSFTHATDADITALKAAYP SDITQG
 Gc Lip 1 AKVPYITGNQEDEGTFILAPVAINATTTPHVKKWLKYICSEASDASLDRVLSLYPGSWSEG
 * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . .

Cc Lip 1 SPFDTGILNALTPQFKRISAVLGD LGFTLARRYFLNHYTG GIKYSFLSKQLS-GLPVLGT
 Cc Lip 2 SPFDTGIFNATTPQFKRISALIGDLAFTLARRYFLNYYQGGIKYSFLSKQLS-GLPVLGT
 Cc Lip 3 SPFDTGIFNATTPQFKRISAVLGD LAFTHARRYFLNHFQGGIKYSFLSKQLS-GLPIMGT
 Cc Lip 4 SPFDTGIFNATTPQFKRIAAVLGD LAFTPRRYFLNHFQGGIKYSFLSKQLS-GLPVI GT
 Cc Lip 5 SPFDTGILNALTPQLKRINAVLGD LFTL SRRYFLNHYTG GPKYSFLSKQLS-GLPI LGT
 Gc Lip 1 APFRTGILNALTPQFKRIAAIFD LLLFQSPRRVMLNATKDVNRWYTLATQLHNLV PFLGT
 * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . .

← LIP-4

Cc Lip 1 FHSNDIVFQDYLLGSGSLIYNNAFIAFATDLDPNTAGLLVKWPEY TSSSQSGNNLMINA
 Cc Lip 2 FHGNDIIVQDYLVGSGSVIYNNAFIAFANDLDPNKAGLWLNWPTY TSSSQSGNNLMQING
 Cc Lip 3 FHANDIIVQDYLLGSGSVIYNNAFIAFATDLDPNTAGLLVNWPKYTSSSQSGNNLMINA
 Cc Lip 4 HHANDIIVQDFLVSHSSAVYNNAFIAFANDLDPNKAGLLVNWPKYTSSSQSGNNLLOINA
 Cc Lip 5 FHANDIIVQHFLGSGSVIYNNAFIAFATDLDPNTAGLSVQWPKYSTSSSQAGDNLMOISA
 Gc Lip 1 FHGSDLLFQYYAGPWSSSAYRRYFISFANHDPNVGTINLKQWDMYTDS---GKEMLQIHM
 * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . .

Cc Lip 1 LGLYTGKDNFRTAGYDALF SNPPSFFV
 Cc Lip 2 LGLYTGKDNFRPDAYSALF SNPPSFFV
 Cc Lip 3 LGLYTGKDNFRTAGYDALMINPSSFFV
 Cc Lip 4 LGLYTGKDNFRTAGYDALF TNPSSFFV
 Cc Lip 5 LGLYTGKDNFRTAGYNALFADPSHFFV
 Gc Lip 1 IGNSMRTDDFRIEGISNFESDVTILFG-
 * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . .

Figura 3.6 – Anilhamento mediante o algoritmo de Clustal (Higgins *et al.*, 1988) das estruturas primárias das lipases de *Candida rugosa* (Cc lip1-5) e *Geotrichum candidum* (Gc lip1).

Na **Figura 3.6** os asteriscos marcam os resíduos aminoacídicos totalmente conservados e os pontos as substituições semi-conservativas. Aparecem sombreadas as regiões consenso eleitas para o desenho dos oligonucleotídeos. A região consenso correspondente ao centro activo da proteína aparece requadrada. A direcção das setas indica o sentido em que foram utilizados os oligonucleotídeos nas reacções de ampliação.

No "desenho" dos oligonucleotídeos teve-se ainda em consideração a frequência média do uso de codões em *Yarrowia lipolytica*. Os oligonucleotídeos centrais foram desenhados próximo do centro ativo englobando uma zona de máxima homologia.

Realizaram-se reacções de ampliação por (PCR) utilizando ADN genómico de *Yarrowia lipolytica* com as quatro combinações úteis possíveis dos oligonucleotídeos referidos. Os produtos da reacção de ampliação foram analisados mediante electróforese em geis de agarose. De todas as reacções realizadas só as correspondentes às combinações dos oligonucleotídeos Lip2 e Lip3 deram lugar a produtos definidos como se mostra na fotografia da **Figura 3.7** as restantes combinações deram lugar a um barrido de fragmentos de diferente tamanho e pouco abundantes.

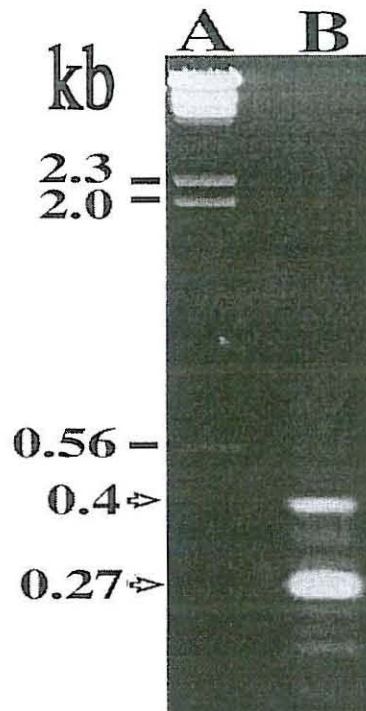


Figura 3.7 – Electróforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5X do produto de ampliação por PCR de ADN genómico de *Yarrowia lipolytica*, utilizando conjuntamente os oligonucleotídeos Lip-2 e Lip-3. A) marcador de peso molecular (λ - *HindIII*), B) produto de ampliação. Os números na margem esquerda indicam o tamanho molecular em kilobases.

O produto maioritário em torno dos 270 pares de bases foi isolado pelo procedimento descrito na secção 2.8.8 de **Materiais e Métodos** e clonado no vector pGem-T (**Figura 2.3** de **Materiais e Métodos**). Na reacção de ligação utilizou-se a ADN ligase do fago T4 e com o produto dessa ligação transformaram-se células competentes de *E.coli*. Após se ter extraído o ADN plasmídico de alguns destes transformantes sequenciaram-se os plasmídeos que possuíam um enxerto com um tamanho próximo dos 270 pares de bases.

| | | |
|-----|---|-----|
| 1 | CCC GTT ATG GTT TGG ATT TAC GGC GGC TCC AAT ATT GAG GGC AGT ATC | 48 |
| 1 | P V M V W I Y G G S N I E G S I | 16 |
| 49 | TAC AAC CTC ATC TAT GAG CCC CAG TTC CTG GTG GCA GAG TCG GTG CGA | 96 |
| 17 | Y N L I Y E P Q F L V A E S V R | 32 |
| 97 | GTA GGC AAG CCG ATT GTG CAC GTG TGT ATC GAG TAC CGA CTG GGT CTC | 144 |
| 33 | V G K P I V H V C I E Y R L G L | 48 |
| 145 | GCG GGC TTC CTC ACC AAG AAC GGC AAG GGC AAC TGG GGC ACG TGG GAT | 192 |
| 49 | A G F L T K N G K G N W G T W D | 64 |
| 193 | CAG TAC ACG GGC TGC CAG TGG GTC AAC CGC CAC ATT CAG GAC TTC GGC | 240 |
| 65 | Q Y T G C Q W V N R H I Q D F G | 80 |
| 241 | GGC GAC CCA GAC AGG TGT | 258 |
| 81 | G D P D R C | 86 |

Figura 3.8 – Sequência nucleotídica e sequência deduzida de aminoácidos do fragmento de 258 pares de bases ampliado por PCR com os oligos Lip-2 e Lip-3 a partir de ADN genómico de *Yarrowia lipolytica*.

Duas dessas sequências possuíam um marco de leitura aberta de 258 e 270 pares de base respectivamente e incluíam os oligonucleotídeos Lip-2 e Lip-3 que tinham sido usados na sua ampliação (na Figura 3.8 representa-se a sequência do fragmento de 258 pares de base).

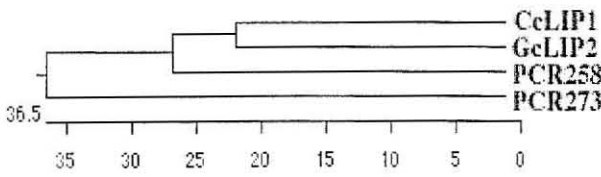
O anilhamento múltiplo (Higgins *et al.*, 1988) mediante o algoritmo de CLUSTAL de fragmentos das sequências das lipases de *C.rugosa* e *G. candidum* e destes dois fragmentos isolados por PCR mostravam significativa homologia sendo os domínios mais conservados aqueles a partir dos quais se desenharam os oligonucleotídeos como se pode observar na Figura 3.9.

```

1 P U M L W I F G G G F E V G G - - T S T F P P A Q M I T K S I A M G K P I I H V CcLIP1
1 P U M V W I Y G G A F U Y G S - - S A A Y P G N S V U K E S I N M G Q P V U F U GcLIP2
1 P U M U W I Y G G G N L A G N G Y C F R S Q P R S F - R Q A L H C G W K T R S S PCR273
1 P U M V W I Y G G S N I E G S I Y N L I Y E P Q F L V A E S V R V G K P I U H V PCR258

39 S V N Y R V S S W G F L A G D E I K A E G S A N A G L K D Q R L G M Q W V A D N CcLIP1
39 S I N Y R T G P F G F L G G D A I T A E G N T N A G L H D Q R K G L E W V S D N GcLIP2
40 C D D - R U P S Q C L W V S C C S G H K W Q L G W Q L - G C P R P I H S L A M D PCR273
41 C I E Y R L G L A G F L - - - - - T K N G K G N W G T W D Q Y T G C Q W V N R H P PCR258

79 I A - - - A F G G D P T K V CcLIP1
79 I A - - - N F G G D P D K V GcLIP2
78 L Q T Y R E F G G D P D N V PCR273
76 I I Q - - - D F G G D P D R C PCR258
    
```



| | | Identidade | | | | |
|-------------|---|------------|------|------|------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| Divergencia | 1 | ■ | 56.2 | 22.5 | 34.9 | 1 CcLIP1 |
| | 2 | 43.8 | ■ | 21.3 | 41.9 | 2 GcLIP2 |
| | 3 | 74.4 | 75.5 | ■ | 22.1 | 3 PCR273 |
| | 4 | 57.1 | 50.0 | 71.1 | ■ | 4 PCR258 |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | |

Figura 3.9 – Comparação mediante o algoritmo de CLUSTAL (Higgins *et al*, 1988) de fragmentos de seqüências de aminoácidos deduzidos das lipases de *Candia rugosa* (CcLIP1), *Geotrichum candidum* (GcLIP2) e dos fragmentos obtidos por PCR, a partir de ADN genómico de *Yarrowia lipolytica* (273 e 258 pares de bases). Os blocos marcados representam regiões de aminoácidos identicamente conservados entre as quatro seqüências. A tabela e o dendrograma refletem a percentagem de homologia e a divergência evolutiva entre elas.

O fragmento de 273 pares de bases foi utilizado como sonda para isolar o gene *YILIP1* mediante genotecas parciais de ADN genómico da estirpe INAG 135668 de *Yarrowia lipolytica* e clonado no vector pBluescript (González, 1997).

Mais tarde o marco de leitura aberta deste gene foi interrompido na estirpe donde foi isolado. A interrupção fez-se por recombinação homóloga do promotor e do terminador deste gene sendo o marco de leitura aberta substituído pelo gene *LEU2* dando origem à estirpe FJG1 cujo genotipo se permenoriza na Tabela 2.1 de **Materiais e Métodos** (González, 1997).

Por seu lado o fragmento de 258 pares de bases serviu de sonda para isolar o gene *YILIP3* de que nos ocuparemos ao longo desta secção.

É importante referir que a seqüência de nucleotídeos destes fragmentos pode não coincidir exactamente com as seqüências genómicas de *Yarrowia lipolytica*, pois o produto de ampliação por PCR pode conter algum erro proveniente da reacção de polimerização da polimerase de *Thermus aquaticus*.

3.2.2 – Hibridação tipo “Southern-blot” das sondas com ADN genómico de *Yarrowia lipolytica*

Uma vez que os fragmentos de 258 e 273 pares de bases apresentam uma grande homologia, como se pode observar na **Figura 3.10**, torna-se necessário confirmar que não provêm do mesmo gene devido a uma ampliação errónea que casualmente pudesse ocorrer. Por outro lado para isolar um fragmento de ADN genómico de *Yarrowia lipolytica* que inclua um gene é necessário obter um sinal de hibridação de ADN genómico digerido com uma enzima de restrição cujo tamanho seja o mais adequado.

```

258 pb   CCCGTTATGGTTTGGATTTACGGCGGCTCCAATATGAGGGCAGTATCTACAACCTCATC
273 pb   CCCGTTATGGTGTGGATTTATGGTGGAGGAAATCTGGCTGGAAATGGGTACTGTTTCCGA
          ***** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

258 pb   TATGAGCCCCAGTTCCTG-GTGGCAGAGTCGGTGCAGTAGGCAAGCCGATTGTGCACGT
273 pb   TCACAACCCCGTTCCCTTCGTCAAGCACTCCATTGTGGCTGGAAGACCCGTTCTTCATGT
          * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

258 pb   GTGTATCGAGTACCGACTGGGTCTCGCGGGCTTCCTCAC-----CAAGAACGGCAA
273 pb   GATGATCGAGTACCGTCTCAGTGCCTTTGGGTATCTTGCTGTTCCGGACACAAATGGCAA
          * ***** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

258 pb   G-----GGCAACTGGGGCACGTGGGATCAGTACACGGGCTGCCAGTGGGTCAACCGCCA
273 pb   CTGGGTTGGCAATTGGGGTGCCCGAGACCAATACACAGCCTTGCAATGGATCTCCAAACA
          ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

258 pb   CATTTCAGGACTTCGGCGGGCGACCCAGACAGGTGT
273 pb   TAT-CGTGAGTTTGGCGGGCGACCCGATAACGTT
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 3.10 – Comparação mediante o algoritmo de CLUSTAL das sequências nucleotídicas dos fragmentos de 258 e 273 pares de bases. O nucleotídeos idênticos aparecem marcados com um asterísco.

Para satisfazer os objectivos acima referidos digeriu-se ADN genómico da estirpe selvagem INAG 135668 de *Yarrowia lipolytica* e da estirpe com o gene *YLIP1* interrompido (FJG1) com as mesmas enzimas de restrição. Os produtos destas digestões foram separados em electrofórese com geis de agarose e o ADN carregado positivamente transferido a filtros de nylon (secção 2.10).

Após pré-hibridação os filtros foram hibridados por separado com os fragmentos de 258 e 273 pares de bases previamente marcadas com ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP. A presença dos fragmentos que hibridavam especificamente com as sondas foram visualizadas pela impressão que produziavam numa película que se pode observar na Figura 3.11.

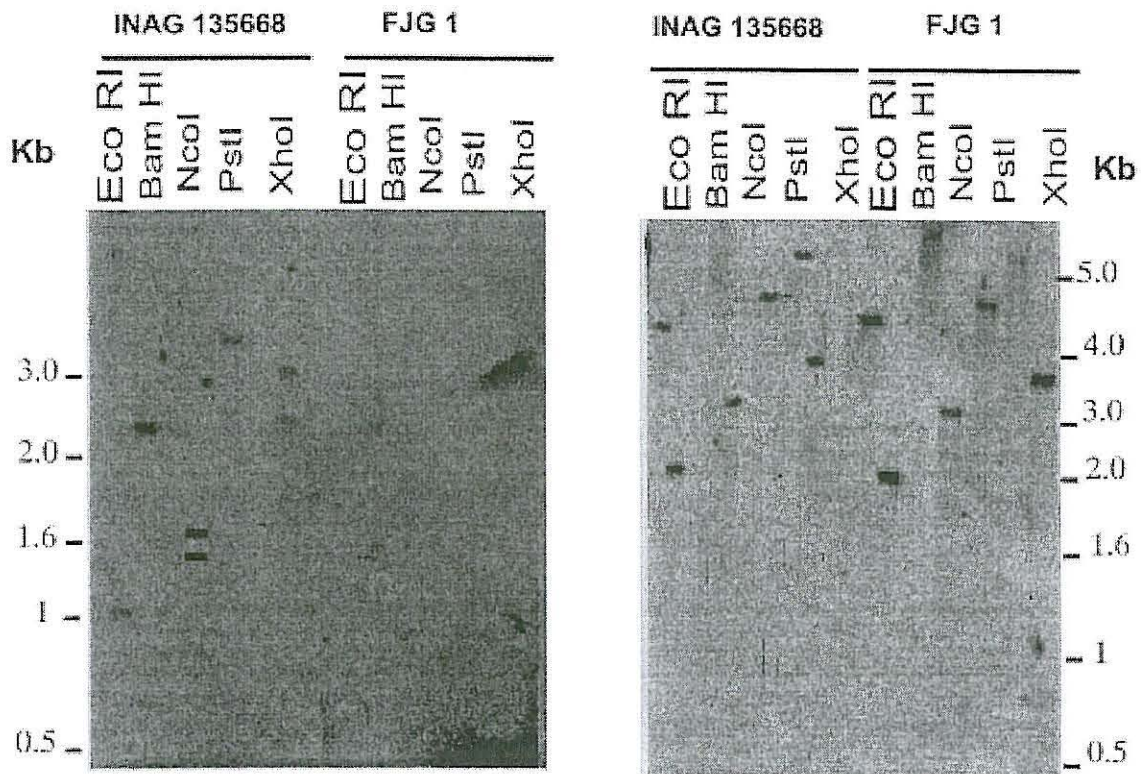


Figura 3.11 – Hibridação do tipo “Southern-blot” de ADN genómico das estirpes INAG 135668 e FJG1 com as sondas de 273 (Southern da esquerda) e 258 pares de bases (Southern da direita).

As sondas apresentam sinais de hibridação diferentes além disso pode-se observar que a sonda de 273 pares de bases não apresenta sinais de hibridação com qualquer das amostras do ADN digerido da estirpe interrompida com o gene *YILIP1* (FJG1) enquanto que com a sonda de 258 pares de bases apresenta os mesmos sinais de hibridação nas digestões das duas estirpes, como se esperava.

A partir dos resultados assumiu-se que o gene que codifica para a lipase a isolar com a sonda de 258 pares de bases em *Yarrowia lipolytica* se podia encontrar no fragmento genómico digerido pela enzima *Nco* I com um sinal de hibridação de cerca de 3.5kb. Além de corresponder a uma banda de hibridação única, poderá ter um tamanho suficiente para incluir toda a fase de leitura do gene se, o seu tamanho for semelhante ao do gene *YILIP1* (1458 pares de bases) ou dos genes das lipases descritas de *Candida rugosa* (1650 pares de bases) e de *Geotrichum candidum* (1689 e 1632 pares de bases).

O seguinte passo consistiu em clonar o fragmento *Nco* I de ADN genómico de 3.5 kb em *E.coli*. Para o conseguir podiam desenhar-se duas hipóteses de trabalho:

- ⇒ Por PCR inversa
- ⇒ Através de uma genoteca parcial de *Yarrowia lipolytica*.

Seguiram-se as duas hipóteses de trabalho simultaneamente realizando as reacções de PCR nos intervalos de tempo permitidos pelas tarefas experimentais da genoteca parcial de ADN genómico de *Yarrowia lipolytica*.

Para ambos os casos purificaram-se os fragmentos de ADN genómico da estirpe FJG1 resultantes da digestão com a endonuclease *Nco* I de tamanho esperado (secção 2.8.8 de **Materiais e Métodos**).

3.2.3 – PCR inversa com ADN genómico de *Y. lipolytica*

Para a PCR inversa os fragmentos de ADN genómico da estirpe FJG1 resultantes da digestão com a endonuclease *Nco* I, previamente purificados, foram religados com a ADN ligase do fago T4 de modo a obter fragmentos circulares de ADN genómico. De seguida realizou-se a PCR utilizando os oligos divergentes AI1 e AI2 (secção 1.9) desenhados nos extremos da sequência da sonda de 258 pares de bases.

Os produtos resultantes da reacção de ampliação foram tratados em eletrofórese com gel de agarose. Na Figura 3.12 esquematiza-se este procedimento e mostra-se uma fotografia com o resultado da PCR onde se pode observar a existência de uma banda maioritária de tamanho esperado, cerca de 3.5 kb.

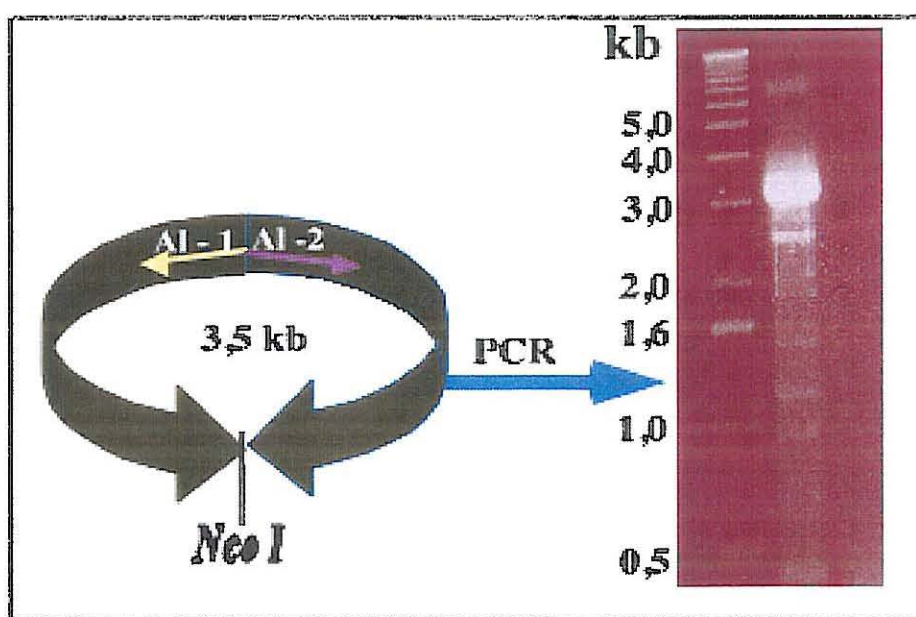


Figura 3.12 – Esquema e gel da electrofórese da PCR inversa, com o fragmento de ADN *Nco* I. A posição dos oligonucleotídeos AI-1 e AI-2 usados na PCR é aleatória.

3.2.4 – Construção de uma genoteca parcial de ADN de *Yarrowia lipolytica*

Na realização da genoteca os fragmentos resultantes da digestão com a enzima *Nco* I previamente purificados, como descrito, ligaram-se ao vector pGem-T previamente digerido com a mesma enzima de restrição e desfosforilado com fosfatase alcalina para evitar a sua própria religação.

Com a mistura desta ligação transformaram-se células competentes de *E.coli* DH5 α , tendo-se obtido 1200 colónias transformantes. Transferiram-se todos estes clones a filtros de nitrocelulose onde se deixaram crescer. Posteriormente lisaram-se e restrearam-se mediante hibridação, utilizando como sonda a banda de 258 pares de bases marcada radioativamente.

Dos 1200 clones analisados apareceram 2 que consideramos positivos por apresentarem um sinal com uma intensidade semelhante à colónia usada como controlo (uma colónia que possuía o vector com a sonda de 258 pares de bases clonada) como se observa na Figura 3.13. Após purificação dos plasmídeos que cada um dos dois transformantes continha comprovou-se mediante análise com enzimas de restrição que possuíam o fragmento com o tamanho esperado.

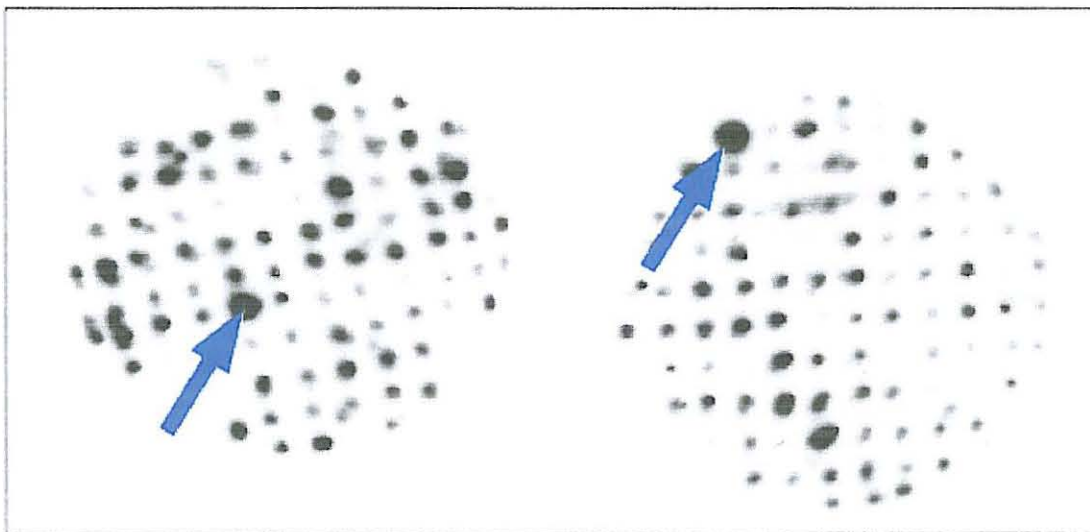


Figura 3.13 – Fotografia de dois dos filtros utilizados no rastreio da genoteca parcial *Nco*I de 3.5 kb. Os sinais de hibridação mais intensos correspondem aos transformantes positivos.

Uma vez conseguidos estes clones positivos decidiu-se proceder à sua sequência abandonando o produto obtido por PCR inversa pois o ADN dos plasmídeos procede do genoma da própria levedura enquanto que com a PCR o que se pode obter é sempre uma cópia desse mesmo ADN.

3.2.5 – Determinação da sequência nucleotídica de *YILIP3*

Foram sequenciados 3630 pares de bases, que correspondem ao fragmento *Nco* I, que incluem o fragmento de 258 pares de bases isolado por PCR e que serviu de sonda na minigenoteca.

Na sequenciação utilizaram-se primeiro os “primer universal” e o “primer reverso” para sequenciar o enxerto a partir dos extremos pois estes dois oligonucleotídeos anilham de forma divergente nas partes terminais do vector .

Nas sequências que se iam obtendo desenhavam-se por homologia novos oligonucleotídeos que se usavam nas reacções seguintes de sequenciação e assim sucessivamente até se conseguir a sequencia completa, que analisada nos programas “Edit Seq” e “Map Draw” do pacote informático DNASTAR, incluía um total de 3630 pares e bases. Cada sequência foi repetida pelo menos duas vezes. As sequências e o sentido de hibridação dos oligonucleotídeos utilizados nas reacções de sequenciação representam-se na secção 2.9 de **Materiais e Métodos**.

Na figura 3.14 representa-se o plasmídeo pACLIP3 que possui clonado o fragmento *Nco* I-*Nco* I, este plasmídeo foi utilizado nas reacções de sequenciação do gene *YILIP3* cuja estratégia se representa esquematicamente na Figura 3.15.

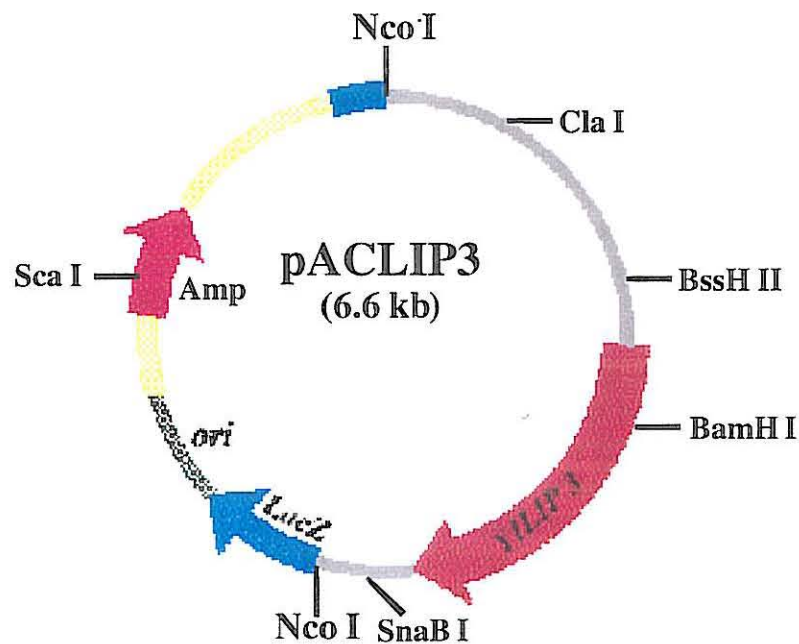


Figura 3.14 – Esquema do plasmídeo pACLIP3 que possui o gene *YILIP3* clonado em *Nco* I.

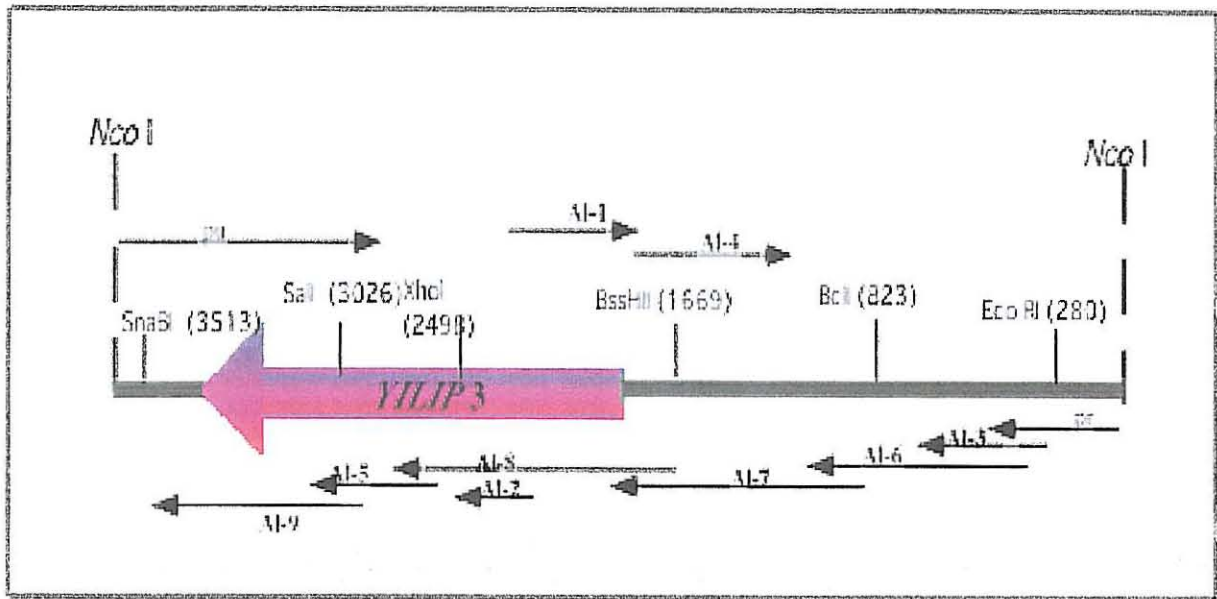


Figura 3.15 – Estratégia seguida para a determinação da sequência nucleotídica do gene *YLLIP3* de 3630 pares de bases. As setas indicam a extensão e o sentido de leitura das diferentes experiências de sequenciamento. A seta central, de maior dimensão, indica a fase de leitura aberta do referido gene.

3.2.6 – Análise da sequência nucleotídica

Depois de se obter a sequência completa do fragmento isolado, fez-se uma pesquisa das possíveis fases de leitura aberta de mais de 100 códons nas duas cadeias de ADN, pondo-se em evidência uma única fase de leitura aberta com informação para codificar uma proteína de 498 aminoácidos com uma massa molecular estimada de 55 836 Dalton.

Na Figura 3.16 representa-se a estrutura detalhada do fragmento *Nco I*, clonado no plasmídeo pACLIP3, que possui 3630 pares de bases. A numeração a negro está referida à Adenina do codão de iniciação como nucleotídeo número 1. A sequência de aminoácidos deduzida encontra-se representada pelo código universal de uma letra. As regiões requadradas correspondem aos oligonucleotídeos utilizados na reacção de ampliação. A localização da serina activa da proteína está assinalada com um rectângulo sombreado a amarelo. O codão de "STOP" e os elementos da sequência tripartida de finalização da transcrição aparecem com letras negras. Com letra negra em itálico representam-se os possíveis sinais de poliadenilação.

A sequência do gene *YLLIP3* encontra-se depositada na base de dados do Laboratório Europeu de Biologia Molecular "EMBL library", à qual se pode aceder com o número de acesso AJ249751 a partir de 30 de Junho de 2001.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| -1804 | CGA | CAC | TGA | AAC | AGA | CTC | CCG | TCT | TCG | TCT | GCG | ATA | CAT | GGC | TTC | GAG | AGT | CGC | -1756 |
| -1755 | ATT | TCC | ACA | CTC | AGC | GGT | AGA | TGC | ACC | TGC | GAC | GGC | AAG | GCT | TCA | GTC | CGA | CTC | -1702 |
| -1701 | ACA | TPC | CCG | CGT | CTG | ATC | TCC | CAG | AGA | ACT | CCG | GAG | TGG | TCT | ACA | CAA | TGT | TAT | -1648 |
| -1647 | CGA | TAC | CCC | CGG | CAA | ATG | ACT | CCA | TTC | TGC | CCA | CAA | AAC | TTT | GAC | AAA | TTC | CAC | -1574 |
| -1573 | CCC | CAG | TCC | CCG | AAT | AAG | ATA | TCA | CGG | GAC | TCA | AGC | AAT | CGC | TCT | CTA | GCA | TGT | -1540 |
| -1539 | TTC | AGT | TCT | TTG | AAT | TCA | TAT | TCT | GAC | TAT | CGC | CCA | AAA | AGT | CAC | GTT | ACG | GAC | -1486 |
| -1485 | CAA | ACG | AAA | TCA | CAT | GAC | CCA | TGA | AAC | GAA | ATC | ACA | TGA | CCA | GCA | GCC | ATT | TAG | -1432 |
| -1431 | ATC | GTC | GTT | TTG | GTC | ACA | TGA | CAT | ATC | GCT | TTC | ACC | CCT | CCG | AAA | TGT | CTC | CGG | -1378 |
| -1377 | AAC | CTG | CCT | CTA | GTA | CCC | TAA | CCC | TGT | TCA | GAT | GCA | TCG | GTT | TTA | ACG | GTT | TTT | -1324 |
| -1323 | CGG | CCG | ACT | TTA | TTT | GTG | TGG | GGT | AAG | GAT | GAG | CCG | AGG | TTG | TGA | ATT | GCG | GTT | -1270 |
| -1269 | TAG | GAT | CAA | GTA | TTT | CAG | GGT | TAG | GCA | AGT | AAA | TGG | AGT | GGG | CAA | AGG | GGT | TGG | -1216 |
| -1215 | GGT | TGA | TAT | GAG | GAA | AAA | AAT | TGG | TCT | CCA | CAA | GTC | TCC | GTT | GTT | CCA | GCA | GAG | -1162 |
| -1161 | ATC | GAG | TCT | GTA | TTT | TTC | ACA | TTT | GTT | TCT | AAT | TTT | GAT | TAC | TAA | CAA | ACA | TTA | -1108 |
| -1107 | AAT | ATA | TCG | GTT | ATA | GAA | ATA | TAC | ATA | AAT | GGC | GTC | ATT | ATG | AGT | GAG | TTG | TAG | -1054 |
| -1053 | TTG | ATA | TAT | ACA | AGA | AAA | TCG | GCG | AAA | AAA | GTC | AAT | ATG | AAA | ACG | AGC | AAG | AAC | -1000 |
| -999 | TCC | CCG | ACG | TAA | TCT | GAT | CAT | TAT | TGG | ACG | AGT | TAC | AGG | GAG | TAG | GAT | GTG | GTT | -946 |
| -945 | GAG | GTC | TAT | GGT | TGG | AGT | AAT | TGT | AGT | ATG | GAA | GAA | GTT | ACA | GAG | GTT | GAA | GAG | -892 |
| -891 | CCT | CCG | CTG | GAA | CTT | GGA | ATG | TGT | TAA | TTG | GGG | TGG | TAT | ATT | TCT | ACT | GAA | GTA | -838 |
| -837 | AAT | TCA | TCA | AAA | TCC | GAT | GGG | AAT | TGG | GGT | GAT | TGC | CGA | TAT | GCG | ATT | TTC | GAC | -784 |
| -783 | GCA | TGT | CTT | GTG | GTC | TTT | GCT | ATC | GCT | TGA | TAG | GAA | GAC | GAT | AAA | GAC | TGG | AAC | -730 |
| -729 | TAG | GTC | CAA | TGA | CAC | ATT | ATA | CTA | CGA | GAA | AAT | TGG | ATT | GAG | ACC | AAT | AAC | GGG | -676 |
| -675 | CAC | TTT | TGA | GTA | TTC | TTT | ATT | CCA | TGA | GAG | GAG | ATT | TAC | ATG | TTG | GAA | ACA | GAA | -622 |
| -621 | CAG | GGG | TTT | TAA | GAG | TCT | AAG | TAC | TTC | AGA | ATC | GTC | ATT | TTT | GAC | GCT | GAA | AAC | -568 |
| -567 | TGT | GAA | AAA | AAC | GTT | AGC | TAT | AAT | TGC | TGC | CGT | TGT | GGA | GAC | ATA | TCT | GAT | CAA | -514 |
| -513 | CTT | CAA | ACC | CCA | GAA | TGT | CTC | TCA | TTT | ACG | TCA | TCT | GAA | TCG | GAT | CTC | ATT | TTT | -460 |
| -459 | CTC | CAT | GAA | ATC | TCC | AAC | TTT | AAT | GAT | TAG | CCG | AGA | GAT | TGC | GGT | CAG | ACG | GAC | -406 |
| -405 | GCA | AGT | TGC | CGA | AAA | ACG | GTC | CTA | TAG | CGG | ATA | TTA | AAG | TGG | GAT | TCA | ATT | CTC | -352 |
| -351 | CTA | GTT | CCA | AGG | AGT | CCA | CTG | AAC | CTC | TCT | CAT | CTC | CTA | CAT | TTT | CCC | CCA | AAA | -298 |
| -297 | CCC | TTC | AAA | ATG | GAG | CAT | CTA | TTT | CAC | CCC | CGA | TTC | CAC | ATG | CAC | CCC | ACA | CGC | -244 |
| -243 | ATG | CAT | GCA | TGC | AGC | TGC | ATA | AAC | CGA | AAA | ACG | CAC | CGA | AAT | AAA | AGA | TAG | AGA | -190 |
| -189 | AAG | AAG | TTG | ACT | TCC | TCT | CCA | TTT | TTT | GTG | ACG | AGT | TAA | ACA | AAT | ACC | ACG | CGC | -136 |
| -135 | GCG | AAA | ACG | GCC | GAG | AAA | CAA | CTC | GAA | TCG | ACT | TGC | AAT | CCG | CCC | AGC | GAG | TCT | -82 |
| -81 | CAC | AGA | CGC | AAA | CCA | ATA | GAC | ACA | CCA | ATC | GAC | ACC | ACA | CCA | AAC | GAC | ACT | ACC | -28 |
| -27 | CCA | ATA | GAC | GGT | CTT | TCC | CCA | GTC | GCC | ATG | CCT | CTC | GAA | CTC | CCC | TCG | CTC | AAC | 27 |
| | | | | | | | | | | M | P | L | E | L | P | S | L | N | 9 |
| 28 | GCC | TCG | ATT | GTC | GGC | AAC | ACC | GTT | CAG | AAC | GGC | GCT | GTT | GAG | CAG | TTT | CTC | AAC | 81 |
| 10 | A | S | I | V | G | N | T | V | Q | N | G | A | V | E | Q | F | L | N | 27 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 82 | ATC | CGA | TAC | GCC | GAC | ATT | CCT | GGC | AAG | TTT | GAG | AAG | CCC | GTG | CTC | AAG | AAC | GAT | 135 |
| 28 | I | R | Y | A | D | I | P | G | K | F | E | K | P | V | L | K | N | D | 45 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 136 | TGG | AAC | GGC | GCG | GAG | ATC | GAC | GCC | ACC | AAG | GTC | GGT | CCC | GTG | TGC | CCC | CAA | CCC | 189 |
| 46 | W | N | G | A | E | I | D | A | T | K | V | G | P | V | C | P | Q | P | 63 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 190 | CGC | ACC | CCA | TTC | AAC | TTC | TTC | TCC | GTG | CCA | GAC | GAC | CTC | TGG | GAG | AAA | GTC | AAT | 243 |
| 64 | R | T | P | F | N | F | F | S | V | P | D | D | L | W | E | K | V | N | 81 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 244 | GTG | GAC | ACG | TAC | CAG | GAC | GGT | CTG | CTG | TGC | GAC | AAC | CTG | ATT | GTG | ACG | CGA | CCG | 297 |
| 82 | V | D | T | Y | Q | D | G | L | L | C | D | N | L | I | V | T | R | P | 99 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 298 | AAG | GGC | GTG | TCT | GCC | AAC | GCC | CGG | CTG | CCC | ACT | GTT | GTG | TGG | ATC | CAC | GGC | GGC | 351 |
| 100 | K | G | V | S | A | N | A | R | L | P | T | V | V | W | I | H | G | G | 117 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 352 | TCC | AAT | ATT | GAG | GGC | AGT | ATC | TAC | AAC | CTC | ATC | TAT | GAG | CCC | CAG | TTC | CTG | GTG | 405 |
| 116 | S | N | I | E | G | S | I | Y | N | L | I | Y | E | P | Q | F | L | V | 135 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 406 | GCA | GAG | TCG | GTG | CGA | GTA | GGC | AAG | CCG | ATT | GTG | CAC | GTG | TGT | ATC | GAG | TAC | CGA | 459 |
| 136 | A | E | S | V | R | V | G | K | P | I | V | H | V | C | I | E | Y | R | 153 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 460 | CTG | GGT | CTC | GCG | GGC | TTC | CTC | ACC | AAG | AAC | GGC | AAG | GGC | AAC | TGG | GGC | ACG | TGG | 513 |
| 154 | L | G | L | A | G | F | L | T | K | N | G | K | G | N | W | G | T | W | 171 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 514 | GAT | CAG | TAC | ACG | GGC | TGC | CAG | TGG | GTC | AAC | CGC | CAC | ATT | CAG | GAC | TTT | GGA | GGC | 567 |
| 172 | D | Q | Y | T | G | C | Q | W | V | N | R | H | I | Q | D | F | G | G | 189 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 568 | GAT | CCT | TTG | AAC | GTG | ACA | TTG | ACC | GGT | GAG | TCT | GCC | GGC | TCT | GTA | GCA | GTC | CAT | 621 |
| 190 | D | P | L | N | V | T | L | T | G | E | S | A | G | S | V | A | V | H | 207 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 622 | AAC | ATG | CTC | ATC | AAG | GAC | TCC | ATG | AAC | GGC | CGA | AAG | TTG | TTC | CGA | AAT | GCC | GTC | 675 |
| 108 | N | M | L | I | K | D | S | M | N | G | R | K | L | F | R | N | A | V | 225 |

```

676 ATG ATG AGT GGC ACT CTC GAG ACC ATC ACT CCT CAG CCT CCC AAG TGG CAT GCT 729
226 M M S G T L E T I T P Q P P K W H A 243

730 CGT TTG GAG GAG AAG GTG GCC AAG GTC ACT GGC AAG GAA GTG GCC GAC CTT GCT 783
244 R L E E K V A K V T G K E V A D L A 261

784 TCT CTG TCC GAT AAG GAG CTG CTC GAC GCC CAG ATC AAG CTC AAT GTG GCT GTG 837
262 S L S D K E L L D A Q I K L N V A V 279

838 TGC ATG ACT TGC GAC GAC GGC GAC TTT TTC GAG CCC GGA TGG AAG CAG CAT CTG 891
280 C M T C D D G D F F E P G W K Q H L 297

892 ACT CCT GAC TGG CTC GAC AAG CTC ATC ATC TCC GAT TGC AAG GAC GAG GGC ATG 945
298 T P D W L D K L I I S D C K D E G M 315

946 CTG TAT TTC CTG CCA GTC AAC GCG CAG GAC GAC GAG GAG CTG TTG GCA AAG GTG 999
316 L Y F L P V N A Q D D E E L L A K V 333

1000 GCC AAG TCG CCC GTG GGT AAG GAG ATT TCC GAG CTT TAC GGC ATC AAG GAG GGT 1053
334 A K S P V G K E I S E L Y G I K E G 351

1054 GGC GAT ATC AAG TCT GCG TGT CTC GAT CTC AAG ACT GAC GCC ACC TTC AAT TAC 1107
352 G D I K S A C L D L K T D A T F N Y 369

1108 TTT AAC CAT CTG CTG TTC AAG AAG ATG GAG GAG GCC CGA AAC AAC GGC TCC ACT 1161
370 F N H L L F K K M E E A R N N G S T 387

1162 TCT CGA GTT TAC CGT CTG GCC GTC GAT GAG CCC AAC CCC CAC AAC CCC GAC CAG 1215
388 S R V Y R L A V D E P N P H N P D Q 405

1216 CGG GCC CAC CAC GCC GTC GAC GTG CTG TAC ATG TTC AAC TCG ACC AAG TTC AAC 1269
406 R A H H A V D V L Y M F N S T K F N 423

1270 GAG CAC GGC GAC AAG CTG TCT CGG CTG TTC CAG AGC CAC TTT TTG CGG CTG GCG 1327
424 E H G D K L S R L F Q S H F L R L A 441

1328 TAT GGC CTG GAG CCC TGG GAC CAT CGA AAC TTT GGA GTG TAC AGA AAC GGC GGC 1377
442 Y G L E P W D H R N F G V Y R N G G 459

1378 TAC CAG CAG CTG CCG CTG AGT GAG TTG AAC AAG GTC CGA CCC GTC GAG CCG TAC 1431
460 Y Q Q L P L S E L N K V R P V E R Y 477

1432 GAG GCG CTG TCC AAG ATG GAC TTT GGC CAG GTT GGG CGT TTG TCC AAT GCG CTT 1485
478 E A L S K M D F G Q V G R L S N A L 495

1486 TCG CGC CTA TGA ATC GCG GAT GAA TAT CTG GAC ACG TAT CAC TAT GAA ATT GCC 1539
496 S R L * 498

1540 ATT GAT GAA ATC GGG CTT AGT GAA TGT GAG CCA GGG GAT GAG ATG GTA GAT GTT 1593
1594 GAT GTG CGT TCA AGT GAT TCG GTT GAT GTT GGA GGA CAG GCC GAG CCG CGA AGA 1647
1648 TAG ATA GAT TTG TAA ATG AGT GTT TTG TTG ATC TTA TCG AAT ATC TCC CAT TCT 1701
1702 CTA CTG TAC GTA CTG CAG CGC AAT GTA GTT GCT GGA GGT GGT TGG GCG ACT TGT 1755
1756 TGA GCA TCA GGA CCA GCT GAT CCG GAT ATA CAA TAC ATG GTT GTG GTC GGC TTG 1809
1890 ACG GCA GTT TTC 3' 1821

```

Figura 3.16 – Fragmento *Nco* I de 3630 pares de bases de ADN genómico de *Yarrowia lipolytica* que inclui o marco de leitura aberto do gene *YILIP3*.

• Estudo da região 5' não codificante

Na Figura 3.17 está representada a sequência da região promotora do gene *YILIP3*.

```

-1804 CGA CAC TGA AAC AGA CTC CCG TCT TCG TCT GCG ATA CAT GGC TTC GAG AGT CGC -1756
-1755 ATT TCC ACA CTC AGC GGT AGA TGC ACC TGC GAC GGC AAG GCT TCA GTC CGA CTC -1702
-1701 ACA TTC CCG CGT CTG ATC TCC CAG AGA ACT CCG GAG TGG TCT ACA CAA TGT TAT -1648
-1647 CGA TAC CCC CGG CAA ATG ACT CCA TTC TGC CCA CAA AAC TTT GAC AAA TTC CAC -1574
-1573 CCC CAG TCC CCG AAT AAG ATA TCA CGG GAC TCA AGC AAT CGC TCT CTA GCA TGT -1540
-1539 TTC AGT TCT TTG AAT TCA TAT TCT GAC TAT CGC CCA AAA AGT CAC GTT ACG GAC -1486
-1485 CAA ACG AAA TCA CAT GAC CCA TGA AAC GAA ATC ACA TGA CCA GCA GCC ATT TAG -1432
-1431 ATC GTC GTT TTG GTC ACA TGA CAT ATC GCT TTC ACC CCT CCG AAA TGT CTC CGG -1378
-1377 AAC CTG CCT CTA GTA CCC TAA CCC TGT TCA GAT GCA TCG GTT TTA ACG GTT TTT -1324
-1323 CGG CCG ACT TTA TTT GTG TGG GGT AAG GAT GAG CCG AGG TTG TGA ATT GCG GTT -1270
-1269 TAG GAT CAA GTA TTT CAG GGT TAG GCA AGT AAA TGG AGT GGG CAA AGG GGT TGG -1216
-1215 GGT TGA TAT GAG GAA AAA AAT TGG TCT CCA CAA GTC TCC GTT GTT CCA GCA GAG -1162
-1161 ATC GAG TCT GTA TTT TTC ACA TTT GTT TCT AAT TTT GAT TAC TAA CAA ACA TTA -1108
-1107 AAT ATA TCG GTT ATA GAA ATA TAC ATA AAT GGC GTC ATT ATG AGT GAG TTG TAG -1054
-1053 TTG ATA TAT ACA AGA AAA TCG GCG AAA AAA GTC AAT ATG AAA ACG AGC AAG AAC -1000
-999 TCC CCG ACG TAA TCT GAT CAT TAT TGG ACG AGT TAC AGG GAG TAG GAT GTG GTT -946
-945 GAG GTC TAT GGT TGG AGT AAT TGT AGT ATG GAA GAA GTT ACA GAG GTT GAA GAG -892
-891 CCT CCG CTG GAA CTT GGA ATG TGT TAA TTG GGG TGG TAT ATT TCT ACT GAA GTA -838
-837 AAT TCA TCA AAA TCC GAT GGG AAT TGG GGT GAT TGC CGA TAT GCG ATT TTC GAC -784
-783 GCA TGT CTT GTG GTC TTT GCT ATC GCT TGA TAG GAA GAC GAT AAA GAC TGG AAA -730
-729 TAG GTC CAA TGA CAC ATT ATA CTA CGA GAA AAT TGG ATT GAG ACC AAT AAC GGG -676
-675 CAC TTT TGA GTA TTC TTT ATT CCA TGA GAG GAG ATT TAC ATG TTG GAA ACA GAA -622
-621 CAG GGG TTT TAA GAG TCT AAG TAC TTC AGA ATC GTC ATT TTT GAC GCT GAA AAC -568
-567 TGT GAA AAA AAC GTT AGC TAT AAT TGC TGC CGT TGT GGA GAC ATA TCT GAT CAA -514
-513 CTT CAA ACC CCA GAA TGT CTC TCA TTT ACG TCA TCT GAA TCG GAT CTC ATT TTT -460
-459 CTC CAT GAA ATC TCC AAC TTT AAT GAT TAG CCG AGA GAT TGC GGT CAG ACG GAC -406
-405 GCA AGT TGC CGA AAA ACG GTC CTA TAG CCG ATA TTA AAG TGG GAT TCA ATT CTC -352
-351 CTA GTT CCA AGG AGT CCA CTG AAC CTC TCT CAT CTC CTA CAT TTT CCC CCA AAA -298
-297 CCC TTC AAA ATG GAG CAT CTA TTT CAC CCC CGA TTC CAC ATG CAC CCC ACA CGC -244
-243 ATG CAT GCA TGC AGC TGC ATA AAC CGA AAA ACG CAC CGA AAT AAA AGA TAG AGA -190
-189 AAG AAG TTG ACT TCC TCT CCA TTT TTT GTG ACG AGT TAA ACA AAT ACC ACG CGC -136
-135 GCG AAA ACG GCC CAG AAA CAA CTC GAA TCG ACT TGC AAT CCG CCC AGC GAG TCT -82
-81 CAC AGA CGC AAA CCA ATA GAC ACA CCA ATC GAC ACC ACA CCA AAC GAC ACT ACC -28
-27 CCA ATA GAC GGT CTT TCC CCA GTC GCC ATG

```

Figura 3.17 – Região promotora do gene *YILIP3*. Os 3 últimos nucleotídeos corresponde ao codão de iniciação. Os elementos possivelmente relacionados com o início da transcrição, assim como as possíveis caixas TATA aparecem a negro. Em itálico aparecem marcados os blocos de pirimidinas. A amarelo aparecem os elementos de resposta ao ácido oleico.

Nas leveduras a sequência TATA (T/A)(T/A) encontra-se habitualmente entre as posições -30 e -300 (Guarent, 1984; Ferguson *et al.*, 1986) e intervem no reconhecimento pelo factor geral de transcrição TFIID. No entanto têm-se encontrado genes com esta sequência numa posição mais distante do codão de iniciação (Greenblatt, 1991), encontrando-se genes com múltiplas sequências TATA (Guarent, 1984; Ferguson *et al.*, 1986). No gene *YILIP3*, aparece este motivo ou um motivo similar nas posições -369 e -544. Em *Yarrowia lipolytica* a transcrição inicia-se normalmente a partir de um elemento CA, situado entre as posições 26-30 na direcção 3' da caixa TATA (Gallardin *et al.*, 1988; Treton *et al.*, 1992). O gene *YILIP3* apresenta um elevado número de dinucleotídeos CA marcados a negro na

Figura 3.15. Além disso a zona compreendida entre o **ATG** iniciador e o elemento **TATA** apresenta geralmente sequências ricas em **CT** e pobres em **G**, denominadas "blocos de pirimidinas" (Dobson *et al.*, 1982; Davidow *et al.*, 1987). Na Figura 3.15 podem observar várias sequências **CT** marcadas a itálico.

O elemento **CAAT** aparece na região 5' não codificante dos genes de *Yarrowia lipolytica* (Davidow *et al.*, 1987) e de outras leveduras (Dobson *et al.*, 1982; Ferguson *et al.*, 1986), localizando-se na direcção 5' da caixa **TATA**, na Figura citada está marcado com a cor vermelha.

Nas regiões promotoras dos genes que codificam enzimas que estão relacionadas com o metabolismo dos lípidos encontram-se elementos de resposta ao ácido oleico ("oleate response elements", ORE), (Einerhand *et al.*, 1992; Einerhand *et al.*, 1995; Rottensteiner *et al.*, 1996) cuja sequência consenso de nucleotídeos é: **CGG-N₍₁₆₋₁₈₎-CCG** e que se representam com a cor amarela no promotor do gene *YILIP3*. É provável que alguma destas regiões seja funcional pois é natural que a expressão do gene esteja regulada por factores de transcrição dependentes da presença de substratos típicos da enzima.

Ao realizar uma pesquisa geral de possíveis sítios de união a factores de transcrição utilizando a base de dados TRANFAC (Wingender *et al.*, 1996; Wingender *et al.*, 1997) com o servidor TESS ("Transcription Element Search Software") (Wei *et al.*, 1989), registaram-se um total de 27 coincidências na região promotora de gene *YILIP3*. De todas elas só foi possível identificar um possível sítio de união a GCN4 que estará relacionado com a activação transcricional deste gene.

• Estudo da região 3' não codificante

Muitos genes de microrganismos possuem uma estrutura tripartida descontínua que se relaciona com o controle dos processos de transcrição e poliadenilação (Henkin, 1996; Osborne *et al.*, 1989; Wilhelm *et al.*, 1996; Zaret *et al.*, 1982). A sua estrutura consenso é a seguinte: codão de terminação região rica em **T...TAG...TA(T)GT...**(região rica em **A/T**)...TTT.

Nos vários genes sequenciados de *Yarrowia lipolytica* as sequências consenso diferenciam-se por não aparecerem regiões ricas em **T** e **A/T** (Gaillardin *et al.*, 1988; Lopez *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1995; Sánchez, 1996; Treton *et al.*, 1992).

Na região 3' não codificante do gene em estudo encontram-se motivos consenso de terminação da transcrição nas posições 1495, 1506 (**TGA**), 1557, 1648 (**TAG**) e (**TTT**)T na posição 1668.

Na posição 1787 aparece um elemento **AATA** que poderá actuar como sinal de poliadenilação (Oliver *et al.*, 1989).

Em todo o caso reconhecemos que o terminador deste gene possui poucos pares de base, é possível que na sua continuação se encontrem outras sequências típicas da região 3' não codificante.

• Análise da região codificante

O fragmento de *Nco* I possui 3630 pares de bases com uma fase de leitura aberta de 1494 nucleotídeos, que codificam uma proteína de 498 aminoácidos.

Está descrito que em *Yarrowia lipolytica* (Gaillardin *et al.*, 1988) o tripleto iniciador podera ser formado pelas sequências **A(T/C)AATG(A/G)**, semelhante à sequência **(A/Y)A(A/Y)AATGTCT**, comum em *S.cerevisiae* (Cigan *et al.*, 1987); Hamilton *et al.*, 1987). O nucleotídeo de Citosina é pouco frequente (Lopez *et al.*, 1994; Sánchez, 1996), sendo a base mais conservada a adenina na posição -3 que se mantém em 75 % dos genes estudados.

A proporção de nucleotídeos da região codificante do gene *YILIP3* é bastante equilibrada (A,21.58%; C,29.12%; G,28.52%; T,20.77%) sobressai ligeiramente a proporção de Citosina como é característico dos genes de *Yarrowia lipolytica* (Davidow, *et al.*, 1987). No entanto a percentagem A+T é de 42.35%, um pouco inferior à média descrita para os genes desta levedura, 49.6% (Kurtzman *et al.*, 1983).

Os genes altamente expressados utilizam uma série restringida de codões sinónimos que correspondem aos que são descodificados pelos tARNs isoreceptores mais abundantes na célula, enquanto que os genes de baixo nível de expressão podem utilizar todos os codões sinónimos alternativos, o que provoca uma descida da velocidade de tradução dos correspondentes mensageiros (González, 1997).

Como se pode ver na Tabela 3.3 os codões mais utilizados no gene *YILIP3* são AAC,AAG,GAC,GAG e GGC. Estes codões também são dos mais utilizados nos outros genes que se expressam para proteínas com actividade lipásica em *Yarrowia lipolytica* (González, 1997).

Tabela 3.3 – Utilização de codões (n) e percentagem reactivamente ao total de codões (%) do gene *YILIP3*.

| | | n | % | | | n | % |
|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|
| Phe | TTT | 8 | 1.6 | Tyr | TAT | 3 | 0.6 |
| | TTC | 13 | 2.6 | | TAC | 12 | 2.4 |
| Leu | TTA | 0 | 0 | --- | TAA | 0 | 0.0 |
| | TTG | 8 | 1.6 | --- | TAG | 0 | 0.0 |
| | CTT | 3 | 0.6 | His | CAT | 5 | 1 |
| | CTC | 17 | 3.4 | | CAC | 8 | 1.6 |
| | CTA | 1 | 0.02 | Gln | CAA | 1 | 0.02 |
| | CTG | 23 | 4.6 | | CAG | 16 | 3.2 |
| Ile | ATT | 7 | 1.4 | Asn | AAT | 6 | 1.2 |
| | ATC | 13 | 2.61 | | AAC | 27 | 5.5 |
| | ATA | 0 | 0 | Lys | AAA | 1 | 0.02 |
| Met | ATG | 10 | 2 | | AAG | 31 | 6.2 |
| | Val | GTT | 5 | 1 | Asp | GAT | 8 |
| GTC | | 12 | 2.4 | GAC | | 25 | 5 |
| GTA | | 2 | 0.4 | Glu | GAA | 2 | 0.4 |
| GTG | | 20 | 4 | | GAG | 28 | 5.6 |
| Ser | TCT | 7 | 1.4 | Cys | TGT | 2 | 0.4 |
| | TCC | 9 | 1.8 | | TGC | 6 | 1.2 |
| | TCA | 0 | 0 | --- | TGA | 0 | 0.0 |
| | TCG | 6 | 1.2 | Trp | TGG | 10 | 2 |
| Pro | CCT | 6 | 1.2 | Arg | CGT | 3 | 0.6 |
| | CCC | 15 | 3 | | CGC | 3 | 0.6 |
| | CCA | 3 | 0.6 | | CGA | 10 | 2 |
| | CCG | 3 | 0.6 | | CGG | 5 | 0.1 |
| Thr | ACT | 8 | 1.6 | Ser | AGT | 3 | 0.6 |
| | ACC | 8 | 1.6 | | AGC | 0 | 0.0 |
| | ACA | 1 | 0.02 | Arg | AGA | 3 | 0.6 |
| | ACG | 4 | 0.8 | | AGG | 10 | 2 |
| Ala | GCT | 4 | 0.8 | Gly | GGT | 6 | 1.2 |
| | GCC | 16 | 3.2 | | GGC | 29 | 5.82 |
| | GCA | 3 | 0.6 | | GGA | 3 | 0.6 |
| | GCG | 7 | 1.4 | | GGG | 1 | 0.02 |

3.3 - CARACTERÍSTICAS DA PROTEÍNA YILip3p

3.3.1- Estrutura primária de YILip3p

A estrutura primária da proteína codificada pelo gene *YILIP3* consta de **498** aminoácidos, dos quais **54** são básicos (Lisina e Arginina), **63** são ácidos (Ácido aspártico e Ácido glutâmico), **172** são hidrofóbicos (Alanina, Fenilalanina, Isoleucina, Leucina, Triptofano e Valina) e **120** são polares (Asparagina, Cisteína, Glutamina, Serina, Tirosina, e Trionina). Tem uma massa molecular calculada em **55836 Daltons**. O seu ponto isoelétrico global calculado tem um valor de 6.063 adquirindo uma carga global de -7.122 a um pH 7.0. A composição em aminoácidos não apresenta nenhuma preferência claramente marcada, sendo a **Glicina e a Leucina** os aminoácidos mais frequentes tal como na proteína YILip1p (González, 1997), (ver Tabela 3.4).

Tabela 3.4 -Composição em aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes *YILIP3*, *YILIP1* e *YILIP2*. "n" indica o número total de cada aminoácido e % a percentagem relativamente ao total de aminoácidos.

| Aminoácido | YILIP3 | | YILIP1 | | YILIP2 | | Aminoácido | YILIP3 | | YILIP1 | | YILIP2 | |
|---------------|--------|------|--------|-----|--------|-----|------------|--------|-----|--------|-----|--------|-----|
| | n | % | n | % | n | % | | n | % | n | % | n | % |
| Alanina | 30 | 6 | 23 | 4.7 | 23 | 6.9 | Metionina | 10 | 2 | 13 | 2.7 | 28 | 8.4 |
| Cisteína | 8 | 1.6 | 7 | 1.4 | 10 | 3 | Asparagina | 33 | 6.6 | 27 | 5.6 | 20 | 6.0 |
| Ác. Aspártico | 33 | 6.6 | 38 | 7.8 | 18 | 5.4 | Prolina | 27 | 5.4 | 24 | 4.9 | 19 | 5.7 |
| Ác. Glutâmico | 30 | 6 | 31 | 6.4 | 12 | 3.6 | Glutamina | 17 | 3.4 | 18 | 3.7 | 19 | 5.7 |
| Fenilalanina | 21 | 4.2 | 28 | 5.8 | 17 | 5.1 | Arginina | 22 | 4.4 | 18 | 3.7 | 8 | 2.4 |
| Glicina | 39 | 7.8 | 40 | 8.2 | 25 | 7.5 | Serina | 26 | 5.2 | 23 | 4.7 | 21 | 6.3 |
| Histidina | 13 | 2.6 | 17 | 3.5 | 12 | 3.6 | Tirosina | 15 | 4.2 | 21 | 4.3 | 13 | 3.9 |
| Isoleucina | 20 | 4 | 30 | 6.2 | 24 | 7.2 | Treonina | 21 | 7.8 | 24 | 4.9 | 19 | 5.7 |
| Lisina | 32 | 6.4 | 25 | 5.1 | 13 | 3.9 | Triptofano | 10 | 2 | 11 | 2.3 | 3 | 0.9 |
| Leucina | 52 | 10.4 | 37 | 7.6 | 28 | 8.4 | Valina | 39 | 3 | 31 | 6.4 | 27 | 8.1 |

Como se pode ver na Tabela 3.5, estes valores são muito semelhantes aos da proteína YILip1p (González, 1997), mas bastante diferentes dos da YILip2p (Pignède *et al.*, 2000), que são as outras lipases já isoladas em *Yarrowia lipolytica*.

Tabela 3.5 – Características físico-químicas estimadas das proteínas deduzidas das regiões codificantes dos genes *YILIP1*, *YILIP2* e *YILIP3*.

| Propriedades | YILIP3 | YILIP1 | YILIP2 |
|-------------------|--------|--------|--------|
| Massa molecular | 55 836 | 55 489 | 36 717 |
| Nº de aminoácidos | 498 | 486 | 334 |
| Ponto isoelétrico | 6.1 | 4.93 | 5.91 |
| Carga a pH 7 | -7.1 | -23.4 | -7.38 |

O centro activo da proteína YILip3p está localizado entre os resíduos 198 e 202, posição relativa à metionina inicial, semelhante a outras lipases e esterases de diversos microrganismos. A sua estrutura primária coincide com o consenso G-X-S-X-G, descrito como centro activo de lipases (Brady *et al.*, 1990; Brumlik *et al.*, 1996; Derewenda *et al.*, 1991). Os outros resíduos que conformam a triada catalítica podem localizar-se por comparação com as sequências de outras lipases na posição **311 residuo ácido** que neste caso é de **Ácido aspártico** e o resíduo de **Histidina** na posição **409** (ver Figura 3.18).

A proteína codificada pelo gene *YILIP3* apresenta 4 possíveis sítios de N-glicosilação nos resíduos de asparagina nas posições **9, 193, 384 e 418**. As proteínas codificadas pelos genes *LIP1*, *LIP2*, *LIP3*, *LIP4* e *LIP5* de *C.rugosa* têm respectivamente **3, 1, 3, 1, e 2** sítios potenciais de N-glicosilação, contudo a lipase YILip1p possui 2 sítios. Nas proteínas eucarióticas a união do núcleo oligossacarídico estabelece-se através de uma ligação N-glicosídica com o átomo de um dos grupos amino de um resíduo de Asparagina incluído na sequência tripeptídica Asparagina-X-(Serina/Treonina), em que X pode ser qualquer aminoácido excepto Prolina (Hubbard *et al.*, 1981; Murzin *et al.*, 1995). Nas lipases de *C.rugosa* o hidrato de carbono unido ao resíduo de Asparagina na posição 351 tem uma grande importância na estabilização da conformação aberta (**activa**) da proteína (Grochulski *et al.*, 1994). O resíduo de Asparagina na posição 384 de YILip3p poderá desempenhar um papel semelhante.

A serina activa esta localizada no final de uma estrutura de folha pregueada β , o que é típico deste tipo de centro activo.

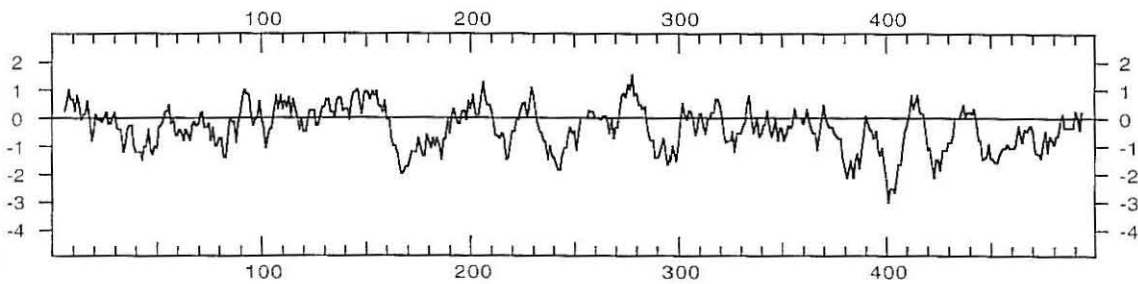
Os 3 últimos aminoácidos **SRL** formam uma região consenso conhecida como sinal de localização peroxisomal de algumas proteínas. O consenso comum (**Ser/Al**)-(Lys/Arg/His)-Leu é conhecido como motivo **SKL** (López *et al.*, 1996; Trelease *et al.*, 1996). Na proteína YILip1p este sinal encontra-se na posição **387**. No entanto atendendo aos resultados obtidos nos estudos de comparação de actividade lipásica entre as estirpes selvagens e as estirpes interrompidas com os genes *YILIP1* e *YILIP3* tanto em meio líquido como em meio sólido podemos afirmar que, de alguma forma estas proteínas são excretadas para o meio exterior da célula, ou pelo menos ficam unidas ao exterior da parede celular o que nos leva a afirmar não possuem estas proteínas um sinal claro de localização celular ou que provavelmente utilizam uma via de secreção diferente das descritas habitualmente.

1 Met Pro Leu Glu Leu Pro Ser Leu Asn Ala Ser Ile Val Gly Asn Thr Val Gln 18
 19 Asn Gly Ala Val Glu Gln Phe Leu Asn Ile Arg Tyr Ala Asp Ile Pro Gly Lys 36
 37 Phe Glu Lys Pro Val Leu Lys Asn Asp Trp Asn Gly Ala Glu Ile Asp Ala Thr 54
 55 Lys Val Gly Pro Val Cys Pro Gln Pro Arg Thr Pro Phe Asn Phe Phe Ser Val 72
 73 Pro Asp Asp Leu Trp Glu Lys Val Asn Val Asp Thr Tyr Gln Asp Gly Leu Leu 90
 91 Cys Asp Asn Leu Ile Val Thr Arg Pro Lys Gly Val Ser Ala Asn Ala Arg Leu 108
 109 Pro Thr Val Val Trp Ile His Gly Gly Ser Asn Ile Glu Gly Ser Ile Tyr Asn 126
 127 Leu Ile Tyr Glu Pro Gln Phe Leu Val Ala Glu Ser Val Arg Val Gly Lys Pro 144
 145 Ile Val His Val Cys Ile Glu Tyr Arg Leu Gly Leu Ala Gly Phe Leu Thr Lys 162
 163 Asn Gly Lys Gly Asn Trp Gly Thr Trp Asp Gln Tyr Thr Gly Cys Gln Trp Val 180
 181 Asn Arg His Ile Gln Asp Phe Gly Gly Asp Pro Leu Asn Val Thr Leu Thr gly 198
 199 Glu Ser Ala Gly Ser Val Ala Val His Asn Met Leu Ile Lys Asp Ser Met Asn 216
 217 Gly Arg Lys Leu Phe Arg Asn Ala Val Met Met Ser Gly Thr Leu Glu Thr Ile 234
 235 Thr Pro Gln Pro Pro Lys Trp His Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Ala Lys Val 252
 253 Thr Gly Lys Glu Val Ala Asp Leu Ala Ser Leu Ser Asp Lys Glu Leu Leu Asp 270
 271 Ala Gln Ile Lys Leu Asn Val Ala Val Cys Met Thr Cys Asp Asp Gly Asp Phe 288
 289 Phe Glu Pro Gly Trp Lys Gln His Leu Thr Pro Asp Trp Leu Asp Lys Leu Ile 306
 307 Ile Ser Asp Cys Lys Asp Glu Gly Met Leu Tyr Phe Leu Pro Val Asn Ala Gln 324
 325 Asp Asp Glu Glu Leu Leu Ala Lys Val Ala Lys Ser Pro Val Gly Lys Glu Ile 342
 343 Ser Glu Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Gly Gly Asp Ile Lys Ser Ala Cys Leu Asp 360
 361 Leu Lys Thr Asp Ala Thr Phe Asn Tyr Phe Asn His Leu Leu Phe Lys Lys Met 378
 379 Glu Glu Ala Arg Asn Asn Gly Ser Thr Ser Arg Val Tyr Arg Leu Ala Val Asp 396
 397 Glu Pro Asn Pro His Asn Pro Asp Gln Arg Ala His His Ala Val Asp Val Leu 414
 415 Tyr Met Phe Asn Ser Thr Lys Phe Asn Glu His Gly Asp Lys Leu Ser Arg Leu 432
 433 Phe Gln Ser His Phe Leu Arg Leu Ala Tyr Gly Leu Glu Pro Trp Asp His Arg 450
 451 Asn Phe Gly Val Tyr Arg Asn Gly Gly Tyr Gln Gln Leu Pro Leu Ser Glu Leu 468
 469 Asn Lys Val Arg Pro Val Glu Arg Tyr Glu Ala Leu Ser Lys Met Asp Phe Gly 486
 487 Gln Val Gly Arg Leu Ser Asn Ala Leu Ser Arg Leu 498

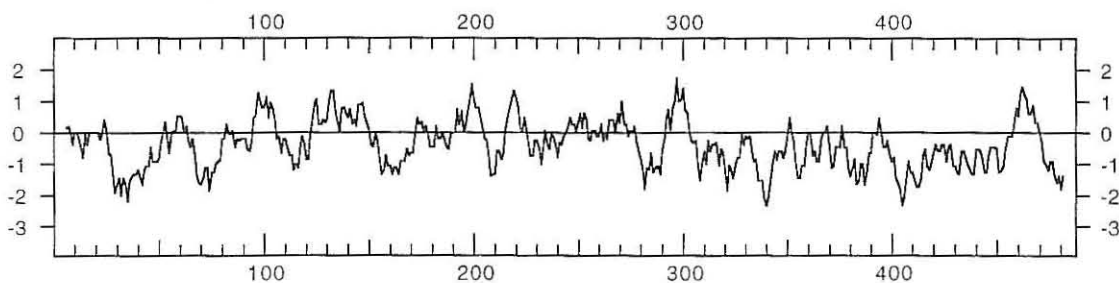
Figura 3.18 – Sequência deduzida de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *YILIP3*. Relativamente à estrutura secundária da proteína, aparecem marcadas com requadros vermelhos as sequências das conformações de hélice α e com requadros cor do ouro as conformações estendidas tipo folha pregueada β .

Os perfis hidropáticos, segundo o algoritmo de Kyte e Doolittle, (Kyte *et al.*, 1982) das proteínas com actividade lipásica em *Yarrowia lipolytica* estão representados na Figura 3.19.

YlLip3p



YlLip1p



YlLip2p

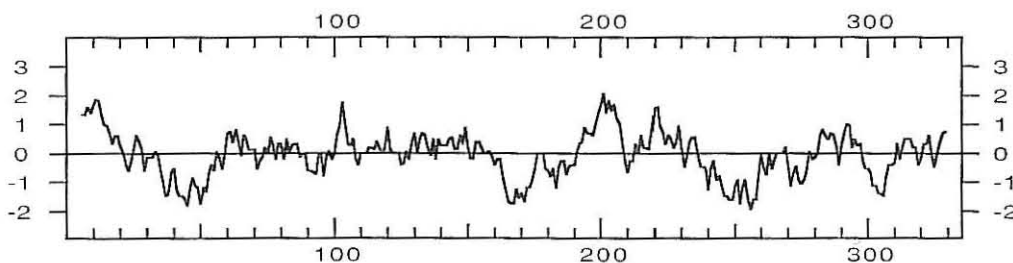


Figura 3.19 – Representação gráfica dos perfis hidropáticos das proteínas com actividade lipásica em *Yarrowia lipolytica*: YlLip3p, YlLip1p e YlLip2p.

Geralmente as proteínas cujo destino final na célula é o retículo endoplasmático possuem uma sequência sinal no extremo amino terminal com características marcadamente hidrofóbicas. Quer as previsões deste algoritmo quer as do algoritmo de von Heijne (Heijne, 1983; Guarent, 1984), para as proteínas YlLip1p e YlLip3p indicam que estas proteínas não incluem uma sequência sinal que implique a entrada destas proteínas no retículo endoplasmático (Larriba, 1993). Por exemplo as lipases codificadas pelos genes de *C. rugosa* possuem um sítio de processamento mediante peptidase sinal cuja estrutura primária (Ala-Ala-Ala-Pro) está

completamente conservada. Pode observar-se também na figura que o centro activo destas duas proteínas bem como a região que os antecede possuem as mesmas características hidropáticas.

A sequência da proteína YILip3p possui ainda, 5 sítios de fosforilação, pela proteína kinase C, nas posições 138, 253, 264, 387 e 419; 7 sítios de fosforilação pela caseína kinase II nas posições 71, 84, 118, 253, 262, 282 e 481 e um sítio de amidação na posição 216.

3.3.2 – Homologias de YILip3p

A comparação da estrutura primária da proteína codificada pelo gene *YILIP3*, utilizando o algoritmo de FASTA, com as sequências de proteínas depositadas no banco de dados SWISS-PROT (EMBL) permitiu estabelecer homologias com 50 lipases e esterases de vários organismos principalmente leveduras.

A extensão dessa homologia com algumas lipases pode ser observado na Tabela 3.6. Como se esperava verifica-se uma grande homologia com a proteína codificada pelo gene *YILIP1* constatando-se também uma elevada homologia com as lipases de *G.candidum* e de *C.rugosa*.

Tabela 3.6 – Comparação da sequência de YILip3p com sequências da base de dados SWISS-PROT mediante o algoritmo FASTA.

| Código de identificação | Nome na base de dados | Número de aminoácidos | Extensão da homologia |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Lip1_YARLI | lipase 1 precursor | 486 | 29% em 480 |
| SASB_ANAPL | FATTY ACYL-COA H | 557 | 26% em 485 |
| LIP4_CANRU | lipase 4 precursor | 549 | 32% em 355 |
| LIP5_CANRU | lipase 5 precursor | 549 | 32% em 375 |
| LIP3_CANRU | lipase 3 precursor | 549 | 36% em 286 |
| 000882 | lipase | 544 | 26% em 543 |
| 000890 | lipase | 544 | 34% em 251 |
| P79066 | lipase 1 precursor | 563 | 34% em 251 |
| LIP2_GEOCN | lipase 2 precursor | 563 | 35% em 253 |

Na Figura 3.20 é estabelecida mediante o algoritmo de CLUSTAL uma comparação múltipla de sequências de aminoácidos entre lipases de *Y. lipolytica* e lipases de microrganismos evolutivamente próximos desta levedura. Destas comparações pode concluir-se que YILip3p compartilha com as outras proteínas com actividade lipásica as características fundamentais da estrutura primária relacionadas com as domínios que conferem actividade enzimática como sejam a serina activa o espaço oxianiónica e o resíduo ácido, que se destacam na Tabela 3.7.

Os resíduos de cisteína que formam as pontes dissulfeto encontram-se na lipase 1 de *G.candidum* nas posições (Cys₆₁/Cys₁₀₅ e Cys₂₇₆/Cys₂₈₈) estando conservadas em todas as lipases de *G. Candidum*. Em YILip1p só aparecem conservados os resíduos da primeira ponte de enxofre (Cys₅₁/Cys₈₂). Na proteína YILip3p as pontes dissulfuradas localizam-se nas posições (Cys₅₉/Cys₉₁ e Cys₁₈₃/Cys₃₁₀). É sabido que a primeira destas pontes em *C.rugosa* intervem no encaixe da "tampa" do centro activo à proteína (Grochulski *et al.*, 1994).

```

1  M-----S V T S T S L N G T F N G - - I S E D G I E I P K G I K Y A N YILIP1
1  M-----P L E L P S L N A S I V G N T V Q N G A V E Q F L N I R Y A D YILIP3
1  M E-----L A L A L S L I A S V A A A P T A T L A N G D T I T G L N A I V N E K F L G I P F A E CRL1
1  M K-----L C L - L A L G A A V A A A P T A T L A N G D T I T G L N A I V N E K F L G I P F A E CRL2
1  M V S K T F F L A A A L N V V G T L A Q A P T A V L N G N E V I S G V L E G K V D T F K G I P F A D GCL1
1  M V S K S L F L A A A V N L A G V L A Q A P R P S L N G N E V I S G V L E G K V D T F K G I P F A D GCL2
1  M K L S T I L F T-----A C A T A A A L P S P S P I T P S E A A V L Q K-----YILP2

31  R R Y - - - R W A Y A E R I D D Y D M G V F D C T Q E G M A C P Q V - L P F D Y - - - - - N YILIP1
33  I P G - - - K F E K P V L X N D M N G A E I D A T K V G P V C P Q P R T P F N F - - - - - F S YILIP3
46  P P V G N L R F K D P W P Y S G S L D G Q - K F T S Y G P S C M Q Q N P E G T Y E E N L P X A A L D CRL1
45  P P V G T L R F K P P W P Y S S L M G Q - Q F T S Y G P S C M Q M N P M G S F E D T L P K N A R H CRL2
51  P P V G D L R F K H P Q P F T G S Y Q G L - K A N D F S S A C M Q L D P G N A I - - S L L O K V V G GCL1
51  P P L N D L R F K H P Q P F T G S Y Q G L - K A N D F S S A C M Q L D P G N S L - - T L L O K A L G GCL2
34  -----R V Y T S T E T S H I D Q E S Y M-----F F E K Y A R YILP2

68  I E K G P K E - N P F D E F E - - - - - C S N L M I T R P Q G A T N - - - L P V F W W I YILIP1
72  Y P D D L W E K V N V D T Y Q D G L L - - - - - C D N L I V T R P K G V S A N A R L P T V W W I YILIP3
95  L V - - - - W Q S K V F E A V S P S - - - S E D C L T I N V V R P P G T R A G A H L P V M L W I CRL1
94  L V - - - - L Q S K I F O V V L P N - - - D E D C L T I N V I R P P G T R A S A G L P V M L W I CRL2
98  L G K I I P D N L R G P L Y D H A Q G S V S H N E D C L Y L N V F R P A G T K P D A K L P V M V M I GCL1
98  L A K V I P E E F R G P L Y D H A K G T V S H N E D C L Y L N V F R P A G T K P D A K L P V M V M I GCL2
58  L A N T G - - - - - Y C V G P G T - - - - - K I F K P - - - - - YILP2

123 H G G G N L A G N G Y C S D H N P V P F V K H S I V A G R P V L H V N I E Y R L S A F G Y L A V P D YILIP1
115 H G G S N I E G S I Y N L I Y E P Q F L W A E S I V A G K P I H V V C I E Y R V S L A G F L T K N G YILIP3
136 F G G G F E W G G T - - S T F P P A Q M I T K S I A N G K P I H V S V N Y R V S W G F L A G D E CRL1
135 F G G G F E L G G S - - S L F P G Q M V A K S V L M G K P V I H V S H N Y R V A S W G F L A G P D CRL2
148 Y G G A F V F G S S - - A S Y P G N G Y V K E S L E M G Q P V V F V S I N Y R T G P Y G F L G G D A GCL1
148 Y G G A F V Y G S S - - A A Y P G N S Y V K E S I N M G Q P V V F V S I N Y R T G P F G F L G G D A GCL2
75 E K G L Q - - - - - C A H F P N V E L I E E - - - F H D P R L I F D V S - - - - - G Y L A V D H YILP2

153 T N G N M V G N W G A R D Q Y T A L Q W I S K H I V E F G G D P S Q I T I G G E S A G S I G L H A L YILIP1
165 K - - - - G N W G T M D Q Y I G C Q W V N R H I Q D F G G D P L N V T L I G E S A G S V A V H N W YILIP3
184 I K A E G S A N A G L K D Q R L G N Q W V A D N I A A F G G D P T K V T I F G E S A G S M S V H C H CRL1
183 I Q N E G S G N A G L H D Q R L A H Q W V A D N I A A F G G D P S K V T I Y G E S A G S M S T F V H CRL2
196 I T A E G N T W A G L H D Q R K G L E W V S D N I A N F G G D P D K V M I F G E S A G A M S V A H Q GCL1
196 I T A E G N T W A G L H D Q R K G L E W V S D N I A N F G G D R D K V M I F G E S A G A M S V A H Q GCL2
111 A S K Q - - - - - I Y L V I R G T H S L E D V I T D I R I N Q A P L T N F O L A A N YILP2

283 M V - - - - H E S M K P R E E C I I H N V I L S S G T M D R M G T G T I S E D A F - - K P I Y D - - YILIP1
210 L I - - - - K D S M N G R K - - - L F R N A V N M S G T L E T I T P Q P P K W H A R L E E K V A K - - YILIP3
234 I L W N D G D N T Y X G K P - - - L F R A G I M Q S G A M V P S D A V D G I Y G N E I F D L L A S N A CRL1
233 L V W N D G D N T Y N G R P - - - L F R A A I M Q S G C M V P S D P V D G T Y G T E I Y N Q V V A S A CRL2
246 L V A Y G G D N T Y N G R D - - - L F H S A I L Q S G G P L P Y F D S T S V G P E S A Y S R F A Q Y A GCL1
246 L I A Y G G D N T Y N G K K - - - L F H S A I L Q S G G P L P Y H D S S S V G P D I S Y N R F A Q Y A GCL2
148 I S S T A T C D - - - - - D C L V H N G F - - - - - Q S Y N N T Y N Q I G P R L D S V I E Q Y P YILP2

```



Figura 3.20 – Comparação múltipla das seqüências de aminoácidos de várias lipases de microrganismos relacionados com *Yarrowia lipolytica*. YILip1, YILip2 e YILip3 lipases de *Y.lipolytica*; GCL1 e GCL2 lipases de *G.candidum* (Shimada *et al.*, 1989; Shimada *et al.*, 1990) ; CRL1 e CRL2 lipases de *C.rugosa* (Longhi *et al.*, 1992; Lotti *et al.*, 1993). Os blocos a negro marcam os resíduos idênticos. Os resíduos sobre fundo branco correspondem a substituições conservativas. À esquerda de cada seqüência aparece o número de ordem de cada resíduo na estrutura primária da proteína codificada.

Outro domínio altamente conservado em todas as lipases encontra-se nas posições 140 e 160. As características deste domínio fazem pensar numa possível implicação na interacção com as interfaces lipídicas pois mantêm as posições relativas e características fisico-químicas de aminoácidos fundamentais no funcionamento do centro activo (Gonzalez, 1997).

Tabela 3.7 – Comparação das sequências de aminoácidos entorno ao centro activo em lipases e esterases de diversos microrganismos.

| Origem | Serina Activa | | | | | | | | | | Espaço Oxianiónico | | | | | Residuo Acídico | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------------------|---|---|---|---|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>Rhizomucor miehei</i> | QYPSY | K | V | A | V | T | G | H | S | L | E | G | A | T | T | I | V | F | R | G | S | S | I | R | N | N | E | R | D | I | V | P | H | L | P | P | | | |
| <i>Rhizopus delemar</i> | AHPTY | K | V | I | V | T | G | H | S | L | E | G | | | T | I | V | F | R | G | T | N | S | F | R | S | H | K | R | D | I | V | P | H | V | P | P | | |
| <i>Rhizopus niveus</i> | AHPTY | K | V | I | V | T | G | H | S | L | E | G | A | Q | T | I | V | F | R | G | T | N | S | F | R | S | H | K | R | D | I | V | P | H | V | P | P | | |
| <i>Penicillium camembertii</i> | QNFNY | E | L | V | V | V | G | H | S | L | E | G | A | V | A | A | V | A | F | R | G | S | S | V | R | N | H | F | N | D | P | V | P | K | L | P | L | | |
| <i>Geotrichum candidum</i> (1) | GGDPD | K | V | M | T | E | G | E | S | A | G | A | M | S | V | P | M | V | W | I | Y | G | C | A | F | V | Q | E | D | E | G | T | A | F | A | P | V | | |
| <i>Candida rugosa</i> (1) | GGDPT | K | V | T | E | E | G | E | S | A | G | S | M | S | V | P | M | L | W | I | F | G | G | F | E | V | Q | N | D | E | G | T | P | F | G | I | S | | |
| <i>Candida rugosa</i> (2) | GGDPS | K | V | T | L | Y | G | E | L | A | G | S | M | S | T | P | M | L | W | I | F | G | G | F | E | L | Q | N | D | E | G | T | L | F | G | L | L | | |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> (1) | GGDPS | Q | I | T | E | E | G | E | S | A | G | S | I | G | L | P | V | F | V | W | I | H | G | G | N | L | A | G | V | I | V | D | E | G | T | N | F | K | N |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> (3) | GGDPL | | V | T | L | E | G | E | S | A | G | S | V | A | V | P | I | V | W | I | H | G | G | S | N | I | E | G | C | K | E | E | M | L | Y | F | L | P | |

Os aminoácidos marcados a negro correspondem a aminoácidos idênticos, os marcados a cinzento correspondem a substituições semiconservativas.

Nas posições 179 a 191 de YILIP3 precisamente na região que antecede o centro activo da proteína encontra-se uma sequência muito conservada com excepção do resíduo de asparagina com o motivo consenso **W-X-X-X-N-X-X-X-FGG-X-P** que se encontra na maioria das lipases assim como na proteína YILip1p (172-184) (Anthonsen *et al.*, 1995). Este motivo parece ter importância na formação da volta inicial que antecede a folha β na qual se encontra o centro activo. Esta substituição do resíduo de Asparagina também aparece na proteína YILip1p podendo ser uma característica deste tipo de lipases de *Yarrowia lipolytica*.

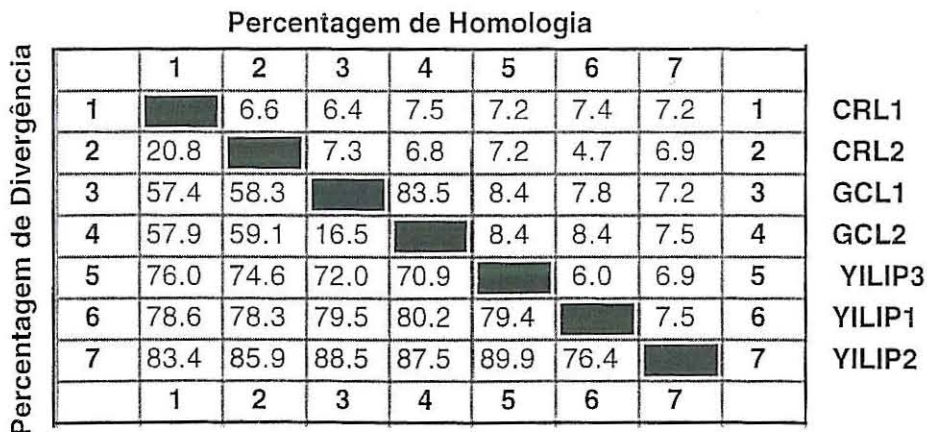


Figura 3.21 – Percentagem de homologia e percentagem de divergência entre lipases de *Y. lipolytica* e lipase de microrganismos relacionados com esta levedura. YILip1, YILip2 e YILip3 lipases de *Y. lipolytica*; GCL1 e GCL2 lipases de *G. candidum* (Shimada *et al.*, 1989; Shimada *et al.*, 1990); CRL1 e CRL2 lipases de *C. rugosa* (Longhi *et al.*, 1992; Lotti *et al.*, 1993).

A homologia entre as proteínas com actividade lipásica de *Yarrowia lipolytica* e entre estas e as lipases de outros microrganismos evolutivamente próximos também pode ser avaliada na Figura 3.21. Esta homologia é suficiente para estabelecer uma estreita relação entre elas. Provavelmente possuem uma ascendência comum, conservando as regiões que conferem actividade enzimática como o centro activo e o sistema de activação interfacial. As distâncias evolutivas entre estas lipases podem ser observada na árvore filogenética da Figura 3.22. Das lipases de *Yarrowia lipolytica*, YILip2p é a que se encontra mais afastada desta escala evolutiva sendo YILip3p a que se encontra mais próxima das lipases dos outros microrganismos, também se pode observar uma grande aproximação entre as lipases YILip1p e YILip3p de *Yarrowia lipolytica*.

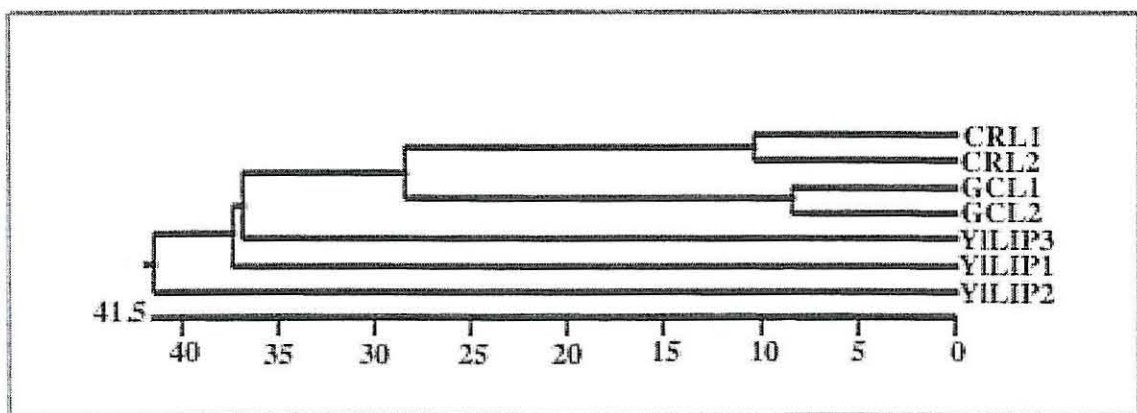


Figura 3.22 – Dendrograma das distâncias evolutivas entre as lipases de *Y. lipolytica* e as lipases de microrganismos relacionados. YILip1, YILip2p e YILip3 lipases de *Y. lipolytica*; GCL1 e GCL2 lipases de *G. candidum* (Shimada *et al.*, 1989; Shimada *et al.*, 1990); CRL1 e CRL2 lipases de *C. rugosa* (Longhi *et al.*, 1992; Lotti *et al.*, 1993).

Um domínio altamente conservado que possuem as proteínas com actividade lipásica é a tampa ou "lid", que participa na activação interfacial da proteína. A identificação deste domínio só é possível através de estudos cristalográficos da proteína mediante difracção de raios X, em presença de inibidores que bloquem o centro activo numa determinada conformação.

Alguns autores (Svendsen, 1994) referem como região homóloga à tampa, da lipase de *Mucor miehei* o domínio altamente conservado em todas as lipases de leveduras que está presente também nas proteínas YILip1p e YILip3p de *Yarrowia lipolytica* nas posições 132 e 144 respectivamente e que se detalha na Figura 3.23. Contudo, a região homóloga proposta para *C. rugosa* e *G. candidum* (Holmquist *et al.*, 1993) e que também se detalha na Figura 3.23, não coincide com o domínio que após estudos cristalográficos foi proposto como tampa do centro activo destas duas leveduras (Gradillas *et al.*, 1996; Schrader *et al.*, 1996). No entanto certas características deste domínio fazem pensar numa possível implicação na interacção com interfaces lipídicas uma vez que mantém as posições relativas e características fisico-químicas de alguns aminoácidos fundamentais no funcionamento da tampa do centro activo como, por exemplo, a existência de resíduos hidrofóbicos volumosos.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|---------|
| 144 | P | I | V | H | V | C | I | E | Y | R | L | G | L | A | G | F | L | T | K | N | G | YLLIP3 |
| 132 | P | V | L | H | V | M | I | E | Y | R | L | S | A | F | G | Y | L | A | V | P | D | YLIP1 |
| 163 | P | I | H | V | S | V | N | Y | R | V | S | S | W | G | F | L | A | G | D | E | CrL1 | |
| 162 | P | V | I | H | V | S | M | N | Y | R | V | A | S | W | G | F | L | A | G | P | D | CrL2 |
| 163 | P | I | I | H | V | A | V | N | Y | R | V | A | S | W | G | F | L | A | G | D | D | CrL3 |
| 163 | P | I | I | H | V | S | M | N | Y | R | V | A | S | W | G | F | L | A | G | P | D | CrL4 |
| 163 | P | I | I | H | V | A | V | N | Y | R | L | A | S | F | G | F | L | A | G | P | D | CrL5 |
| 175 | P | V | V | F | V | S | I | N | Y | R | T | G | P | Y | G | F | L | G | G | D | A | GcL1 |
| 175 | P | V | V | F | V | S | I | N | Y | R | T | G | P | F | G | F | L | G | G | D | A | GcL2 |
| 175 | P | V | V | F | V | S | I | N | Y | R | S | G | P | Y | G | F | L | G | G | D | G | GgECLR |
| 157 | P | V | V | F | V | S | I | N | Y | R | T | G | P | Y | G | F | L | G | G | D | A | Gc02387 |
| 175 | P | V | V | F | V | S | I | N | Y | R | T | G | P | F | G | F | L | G | G | D | A | TFAB260 |

Figura 3.23 – Alinhamento de um domínio altamente conservado em várias lipases fúngicas. (YLip1 e YLip3: *Y.lipolytica*; CrL1 a CrL5: *C.rugosa*; GcL1, GcL2, TFAB260 e GgECLR: género *Geotricum*). As substituições conservativas aparecem a cinzento. O número da primeira coluna indica a posição desde a metionina inicial em cada lipase. Sobre fundo negro encontram-se os resíduos totalmente conservados. A seta assinala o alinhamento de um resíduo volumoso.

3.3.3 – Elucidação das estruturas tridimensionais de YLip3p

As pontes dissulfureto que se estabelecem entre os resíduos de Cisteína nas posições 59/91 e 188/310, da proteína YLip3p, estão altamente conservados na família das lipases e das esterases. Sabe-se que estas pontes originam a formação do laço a nível da estrutura terciária da proteína com uma importância fundamental na união da enzima ao substrato (Cygler *et al.*, 1993) e que estabelece o encaixe da capa à superfície da proteína.

A previsão teórica da estrutura tridimensional das proteínas é possível hoje em dia através de sistemas automáticos de comparação de dados que possibilitam este tipo de cálculos (Plou *et al.*, 1996; Pobjecky *et al.*, 1990). Os resultados são fiáveis em função do grau de homologia da sequência de aminoácidos da proteína a analisar com outras proteínas cuja estrutura foi analisada previamente por difracção de Raios X e que se encontra representada na base de dados ("Protein Date Bank", Brookhaven National Laboratory).

Recentemente tem aumentado o número de lipases e esterases cristalizadas cujos dados de análise por difracção de Raios X aparecem nesta base de dados. Comparando a estrutura primária da proteína YLip3p com proteínas da base de dados encontra-se uma região muito conservada de máxima homologia principalmente com lipases e esterases de outras leveduras. Através de SWISS_MODEL (*Automated Protein Modelling Server*) foi possível estabelecer homologia com proteínas com a seguinte referência na base de dados: 1CLEA (lipase), 1CLEB (lipase), 1C00A (Thermophilic pNB esterase), 1QE8 (PNB esterase 56C8) e 1MAH (Complex-Hydrolase/toxin, Fasciculin2 – Mouse Acetylcholinesterase complex), verificando-se como se esperava maior homologia com lipases. A elevada

homologia com as seqüências destas proteínas permitiu ao sistema elaborar uma estrutura tridimensional para a proteína YILip3p a partir de um total de 190 aminoácidos desde uma Asparagina na posição 93 até uma Cisteína na posição 283.

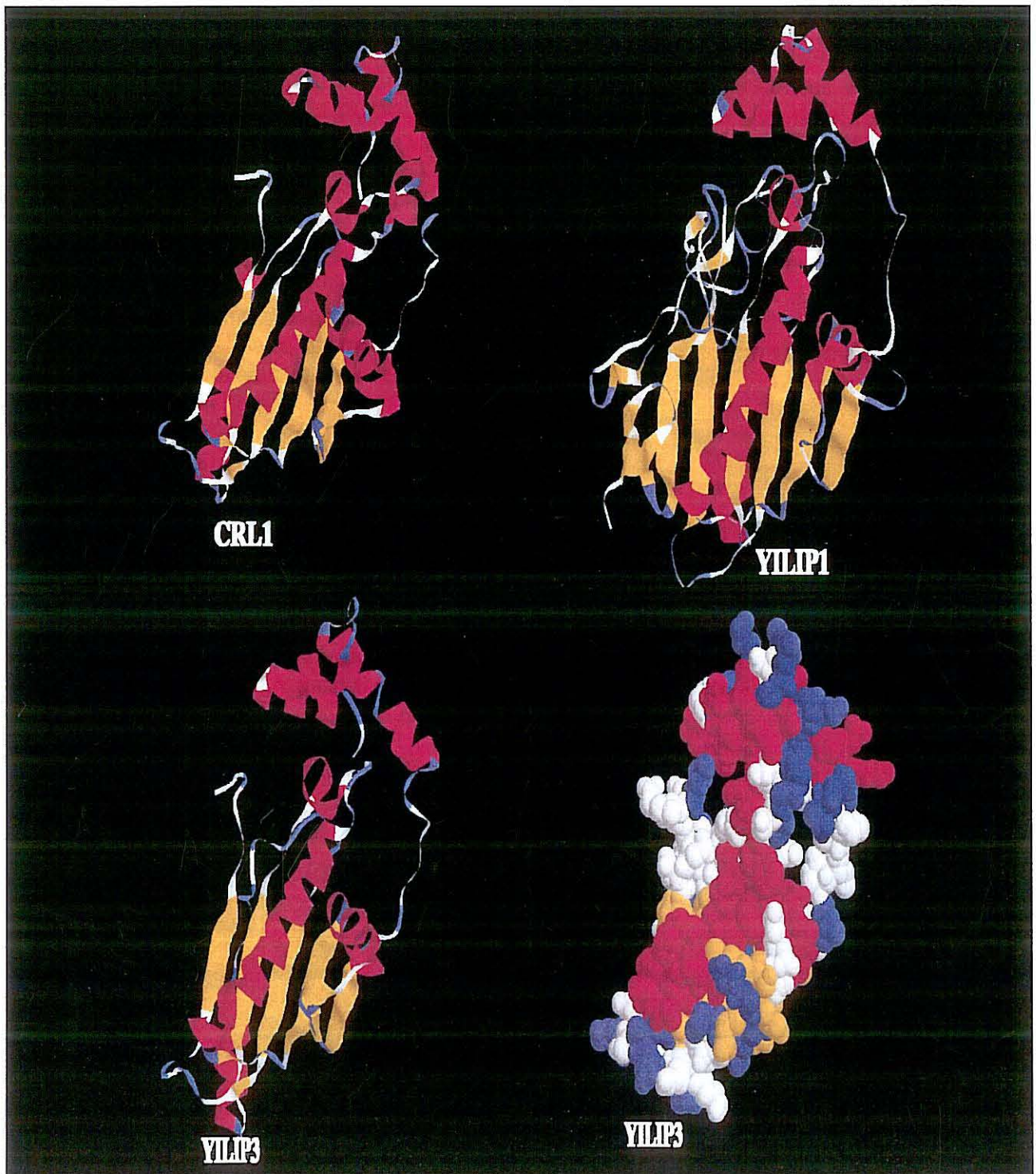


Figura 3.24 – Comparação das estruturas tridimensionais de regiões correspondentes ao centro activo e à capa de lipases: YILip1 e YILip3 lipases 1 e 3 de *Yarrowia lipolytica* e CRL1 lipase 1 de *Candida rugosa*.

Na Figura 3.24 podem ser observadas a posição relativa de alguns dos aminoácidos mais representativos entre os 190 utilizados nesta previsão. Observa-se claramente a serina do centro activo localizada no motivo estrutural β - ϵ Ser-a e relativamente próximo o motivo altamente conservado descrito na Figura 3.23. Para permitir a comparação com a estrutura tridimensional da proteína YILip3p as estruturas mostram-se desde o mesmo ângulo e assinalam-se os mesmos resíduos conservados o centro activo (serina) e outros resíduos pertencentes ao bloco de homologia importante. Os números correspondentes a cada resíduo são os que aparecem na base de dados PDB ("Protein Date Bank", Brookhaven National Laboratory). No caso da proteína YILip3p a numeração corresponde à da estrutura proposta neste trabalho. As estruturas onduladas representam as regiões com conformação de folha β e as espirais representam as conformações de hélice α . As zonas das dobras ou "loop" aparecem representadas como elementos tubulares.

A representação das estrutura tridimensionais das proteínas YILip1p e YILip3p foram realizada a partir dos dados experimentais de difracção de Raios X, utilizando o programa Molview (Smith, 1995).

3.3.4- Classificação geral da proteína YILIP3p

Como conclusão da análise comparativa das estruturas primária, secundária e terciária da proteína codificada pelo gene *YILIP3* esta proteína poderia classificar-se como uma **lipase fúngica do tipo carboxilesterase/ lipase do tipo B**.

Esta classificação foi adoptada pelo Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL), que a registou nas suas bases de dados com entrada através de um número do acesso AJ 249571 com o qual se pode aceder a partir de 30 de Junho de 2001.

Nesta subclasse encontram-se várias lipases de *Geotrichum candidum* e *Candida rugosa*, assim, como a lipase YILip1p de *Yarrowia lipolytica*.

Trata-se de um grupo de α/β **hidrolases** com uma estrutura secundária semelhante em que alternam mais ou menos uniformemente domínios em conformação de folha pregueada β com outros de hélice α .

3.4 - INTERRUPTÃO DO GENE *YILIP3*

A fim de determinar a importância do gene *YILIP3* na levedura *Yarrowia lipolytica* e caracterizar o tipo de actividade da proteína para que se expressa interrompeu-se o marco de leitura aberta deste gene.

Para a sua interrupção construímos o plasmídeo que contém este gene com a fase de leitura aberta deleccionada ($\Delta lip3$) e a "cassete" de *URA3* que servirá de marcador de selecção.

Para isso digeriu-se o plasmídeo pACLIP3 (Figura 3.14) com as enzimas de restrição *Sal I* e *BssH II* que cortam respectivamente nas posições 3026 e 1669 do enxerto de 3630 pares de bases que corresponde ao gene *YILIP3*. Com a enzima *Sal I* foi necessário fazer digestões parciais pois esta enzima também corta noutras posições do plasmídeo. Os produtos destas digestões foram tratados em electróforese com geis de agarose sendo a banda de interesse cortada e purificada pelo procedimento descrito na secção 2.8.8 dos **Materiais e Métodos**. Esta banda de 5273 pares de bases, após sofrer um tratamento com a enzima S1, para transformar os extremos coesivos em extremos cegos, já que os extremos resultantes das digestões de *Sal I* e *BssH II* não são compatíveis, foi religada com a enzima T4 DNA ligase.

Com o produto desta ligação transformaram-se células competentes de *E.coli* (DH5 α). Depois de terem sido crescidas em 2xYT, extraiu-se o ADN plasmídico que foi observado em electróforese com geis de agarose. A selecção do plasmídeo com a fase de leitura aberta interrompida (pALT2) foi realizada mediante estudos de análise de restrição com as enzimas adqueadas cujo posição sequência de reconhecimento era conhecida. Seguindo o mesmo procedimento integrou-se neste plasmídeo, previamente desfosforilado para evitar a sua própria religação, o gene *URA3* no sítio de corte da enzima de restrição *Sal I*, obtendo-se um novo plasmídeo que designamos por pALT3. Na Figura seguinte representa-se esquematicamente todo este processo.

Na técnica de interrupção designada por "pop out" ocorre uma primeira recombinação com um sobre cruzamento simples ao nível da enzima com que se lineariza a "cassete" de interrupção. Desta forma fica integrada num ponto do gene a interromper o gene *URA3* e a versão deleccionada desse mesmo gene integrada na "cassete"; neste primeiro passo a eficiência da integração é muito maior do que no processo de reemplacamento, uma vez que só é necessário um sobre cruzamento.

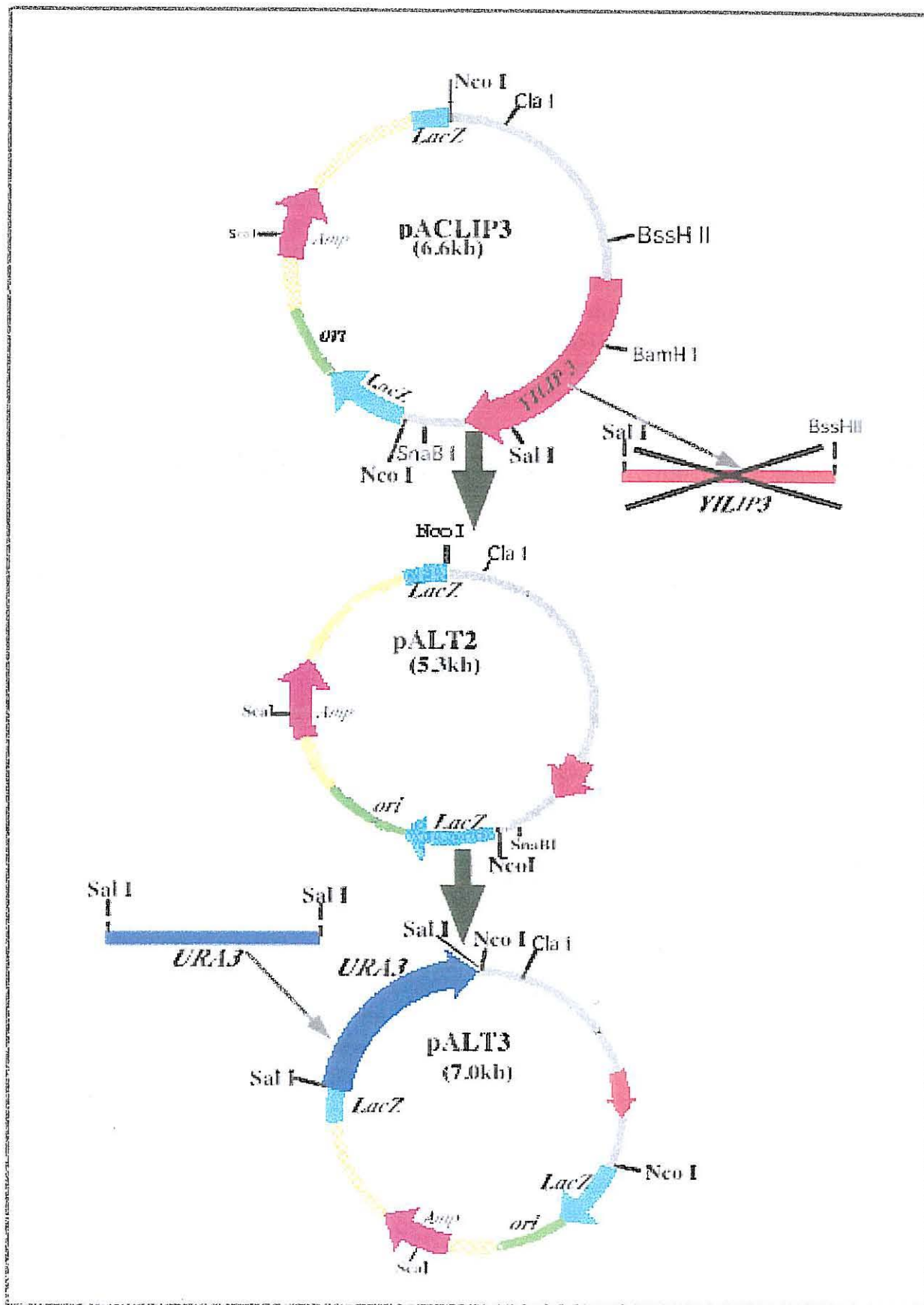


Figura 3.25 –Esquema representativo da formação da “cassette” utilizada para interromper o gene *YILIP3*.

No passo seguinte os transformantes URA^+ são crescidos em meio rico e de seguida num meio mínimo suplementado com 5' FOA, de forma que se seleccionaram os transformantes que perderam o gene *URA3*. Uma vez que este gene fica flanquado por sequências homólogas do gene a interromper, a perda de *URA3* acontece geralmente por recombinação entre estas sequências. Assim segundo se processe a recombinação numa ou noutra zona desaparece a cópia delecionada do gene ou a cópia genómica. Esta técnica permite assim interromper diferentes genes sem perder marcadores, uma vez que a estirpe interrompida continua a ser auxotrófica para o uracilo. Além disso permite a integração da primeira cópia do gene delecionado apesar da interrupção do gene resultar letal. O fenotipo da interrupção apenas se verifica no segundo passo da recombinação.

Com plasmídeo pALT3, linearizado com a enzima *SnaBI*, que possui um único sítio de corte, para favorecer a integração, transformaram-se células de *Y. lipolytica* (a estirpe selvagem INAG 135668 e a estirpe já delecionada com o gene *YILIP1* estirpe FJG1) tendo-se comprovado ser a estirpe selvagem a mais difícil de transformar. A integração comprovou-se analisando os transformantes que cresciam em meio mínimo (MM) sem uracilo e com "Southern", utilizando como sondas fragmentos do promotor do gene *YILIP3* e do gene *URA3*.

Os transformantes com o plasmídeo correctamente integrado cresceram em meio mínimo (MM) com 5' FOA, comprovando-se a recombinação Ura^- com "Southern" utilizando como sondas fragmentos do promotor e uma sonda interna (da ORF), do gene *YILIP3*, digerindo previamente o DNA genómico dos transformantes com a enzima de restrição *Nco I*. Em todos os "Southern" realizados foi sempre utilizado como controle ADN genómico da estirpe selvagem INAG 135668 e da estirpe já delecionada com o gene *YILIP1* estirpe (FJG1) digerido com a mesma enzima de restrição que se utilizava na análise com o ADN genómico dos transformantes.

O esquema da Figura 3.26 representa a metodologia utilizada para interromper o gene *YILIP3* podendo-se observar como podem ocorrer os processos de integração e recombinação acima descritos.

Em todos os casos procedeu-se sempre à comprovação das auxotrofias dos transformantes obtidos por crescimento em meios mínimos sem o(s) aminoácido(s) utilizados para a análise tanto no processo de integração como de recombinação.

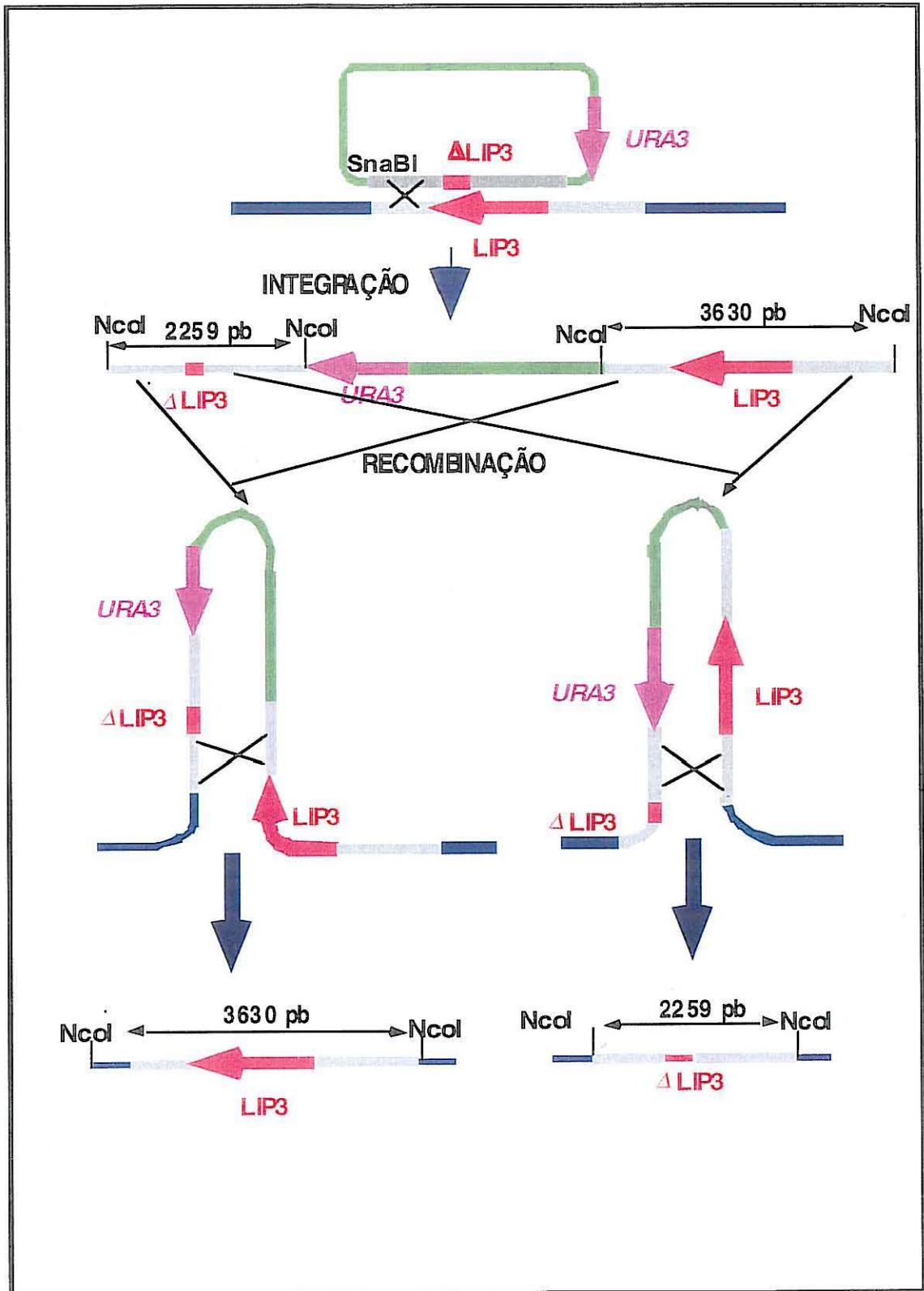


Figura 3.26 - Esquema representativo da interrupção do gene *YILIP3*.

Nos "Southern-blot" da hibridação do ADN genómico da estirpe selvagem INAG 135668 e da estirpe já deleccionada com o gene *YILIP1* (FJG1), digerido com a enzima *Nco I* esperava-se quer com a sonda do promotor quer com a sonda interna (da ORF) uma banda de 3630 pares de bases já que corresponde ao tamanho do gene *YILIP3* sem interromper tal como se observa nas linhas **1** e **4** de **A**) e **B**) na Figura 3.27.

Após o processo de integração esperavam-se em ambas as estirpes e com a sonda do promotor uma banda de 3630 pares de bases que corresponde ao gene sem interromper e uma outra de cerca de 2300 pares de bases correspondendo à hibridação com a "cassete" integrada no genoma das estirpes, linhas **2** e **5 A**). No entanto com a sonda interna apenas se deveria observar a banda de 3630 pares de bases pois a "cassete" integrada não possui o fragmento de que se obteve a sonda interna, **2** e **5 B**) da mesma Figura.

Da hibridação da sonda do promotor com o ADN genómico dos transformantes obtidos após o processo de recombinação deveria visualizar-se apenas a banda de 2300 pares de bases correspondente ao gene *YILIP3* interrompido com o fragmento da digestão *BssH III/Sal I*, linhas **3** e **6 A**), concluindo-se a efectividade da interrupção se esse mesmo ADN genómico hibridado com a sonda interna não apresenta-se qualquer sinal de hibridação linhas **3** e **6 B**) da Figura seguinte. Foram realizados ainda outros "Southern" utilizando digestões com outras enzimas de restrição e utilizando outras sondas de ADN como por exemplo sondas de *URA3*. Após esta análise genética pode-se concluir que o gene *YILIP3* está interrompido tanto na estirpe selvagem INAG 135668 como na estirpe que já tinha sido deleccionada com o gene *YILIP1* estirpe(FJG1) de *Yarrowia lipolytica*.

Da interrupção do gene *YILIP3* na estirpe selvagem, (INAG135668), de *Y. lipolytica* foi obtida a estirpe que se designou por ABC1, a interrupção do gene *YILIP3* na estirpe que já possuía o gene *YILIP1* interrompido estirpe (FJG1), originou a estirpe designada ABC2.

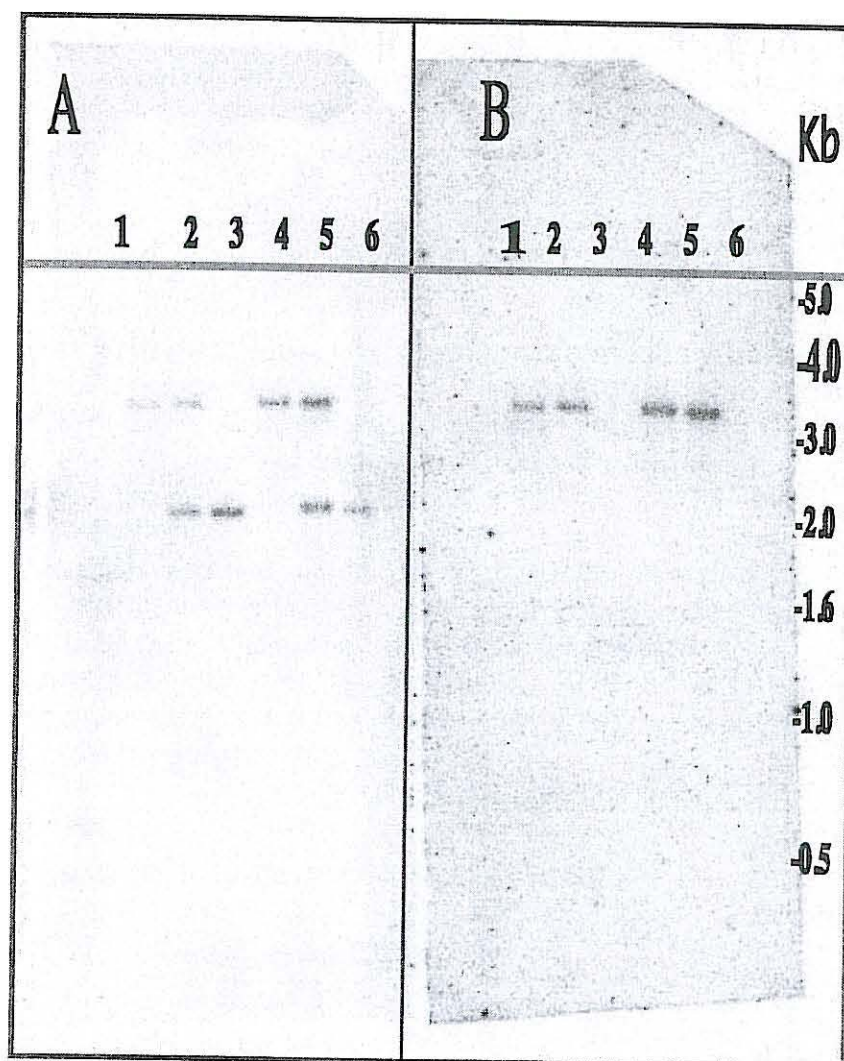


Figura 3.27 – Southern da interrupção do gene *YILIP3*: (A) utilizando como sonda um fragmento do promotor do gene *YILIP3* e (B) utilizando como sonda um fragmento da “ORF” do gene *YILIP3*; 1-Estirpe selvagem; 2-Estirpe selvagem com a “cassete integrada; 3- Estirpe ABC1 ($\Delta lip3$); 4- Estirpe FJG1 ($\Delta lip1$); 5- Estirpe FJG1 ($\Delta lip1$) com a “cassete” integrada, 6 – Estirpe ABC2 ($\Delta lip1 \Delta lip3$).

3.4.1 – Caracterização fenotípica das estirpes mutadas

As alterações que as interrupções dos genes *YILIP1* e *YILIP3* originaram nas estirpes mutadas foram analisadas através de estudos de actividade lipásica em células inteiras utilizando meios sólidos e líquidos e em diferentes fracções celulares com diferentes substratos em meio líquido.

3.4.1.1- Da estirpe FJG1 ($\Delta lip1$)

Muitas destas actividades foram realizadas com a estirpe selvagem e com a estirpe deletada com o gene *YILIP1* enquanto se isolava e interrompia o gene *YILIP3*. Mais tarde quando se interrompeu o gene *YILIP3* estas estirpes foram novamente utilizadas para se poder comparar a sua actividade com as das estirpes resultantes da interrupção deste gene.

Como se descreveu no capítulo de **Introdução** (secção 1.3.4) *Yarrowia lipolytica* possui várias lipases entre as quais alguma com actividade constitutiva, outra(s) com actividade reprimida por glucose e alguma(s) lipase(s) com actividade induzida por substratos lipídicos como também se pode concluir nos estudos de padronização de actividade lipásica realizados com a estirpe selvagem e descritos na primeira secção deste capítulo.

a) Actividade lipásica em células inteiras

• Estudos em meio sólido

Em meios **Glucose-Agar-Tributirina** com diferentes concentrações de glucose foram semeados 10 μ L de suspensões celulares com uma quantidade de 10^7 células das estirpes selvagem e da estirpe com o gene *YILIP1* interrompido FJG1 ($\Delta lip1$). Após crescimento a 28 °C observaram-se o aspecto das colónias e mediram-se os halos resultantes da actividade enzimática e da colónia.

Procurou-se também obter este tipo de resultados em meios sólidos com azeite em vez de tributirina, no entanto, não se conseguiu obter uma emulsão suficientemente opaca para se poder diferenciar os halos do meio de cultura, por isso esta opção foi abandonada.

Como se pode observar na Figura 3.28, a estirpe interrompida com o gene *YILIP1* (FJG1) apresenta sempre menor actividade que a estirpe selvagem o que prova que o gene *YILIP1* codifica para uma verdadeira lipase. Nas duas estirpes a actividade diminui com o aumento da concentração de glucose no meio de cultura, por isso, também se pode concluir que a expressão das restante(s) lipase(s) que todavia permanecem na levedura, parece estar controlada de alguma forma pela concentração de glucose.

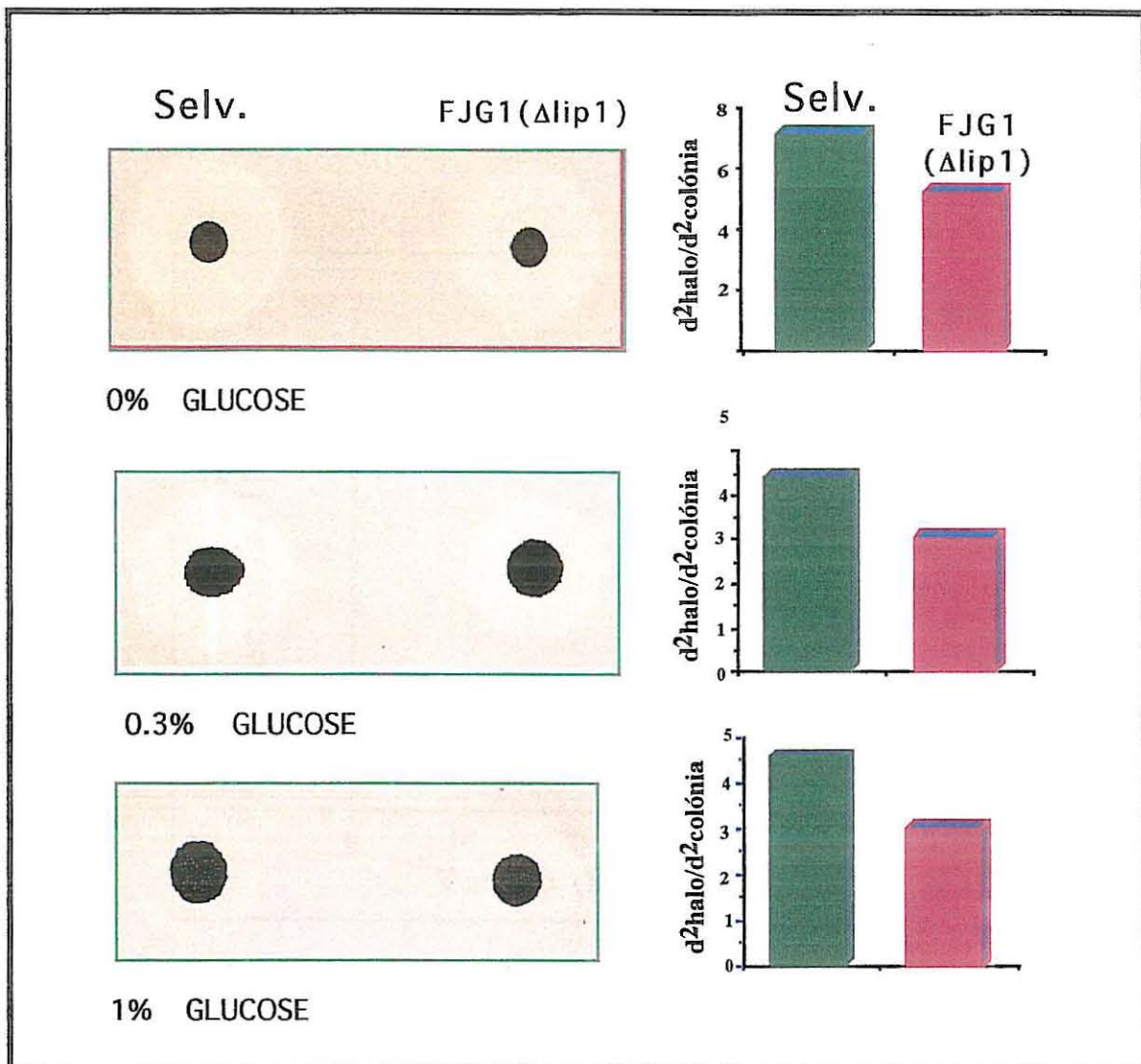


Figura 3.28 – Actividade lipásica da estirpe selvagem e da estirpe delecçãoada com a gene *YILIP1* em meios sólidos com diferentes concentrações de glucose. À direita representam-se os halos produzidos por ambas as estirpes crescidas num meio **Agar-Glucose-Tributirina e à esquerda os gráficos da relação diâmetro ao quadrado do halo/diâmetro ao quadrado da colónia.**

• Estudos em meio líquido

As diferenças de actividade observadas em meio sólido também foram detectadas em meio líquido. A estirpe selvagem e a estirpe $\Delta lip1$ foram crescidas em iguais condições nos meios **MM-Glucose** e **MM-Azeite** descritos na secção 2.2.4 de **Materiais e Métodos**. Em diferentes tempos de crescimento foram recolhidas amostras para medir actividade lipásica. Como se pode observar na Figura 3.29, que traduz os resultados dessas medições em técnica titrimétrica com o substrato tributirina, as células de ambas as estirpes apresentam uma actividade residual

muito semelhante, quando crescem em **MM-Glucose** enquanto que no crescimento com o meio **MM-Azeite** esses valores são significativamente maiores, registando-se também uma diferença de actividade significativa entre as duas estirpes, o que confirma que o gene interrompido codifica realmente para uma proteína com actividade lipásica.

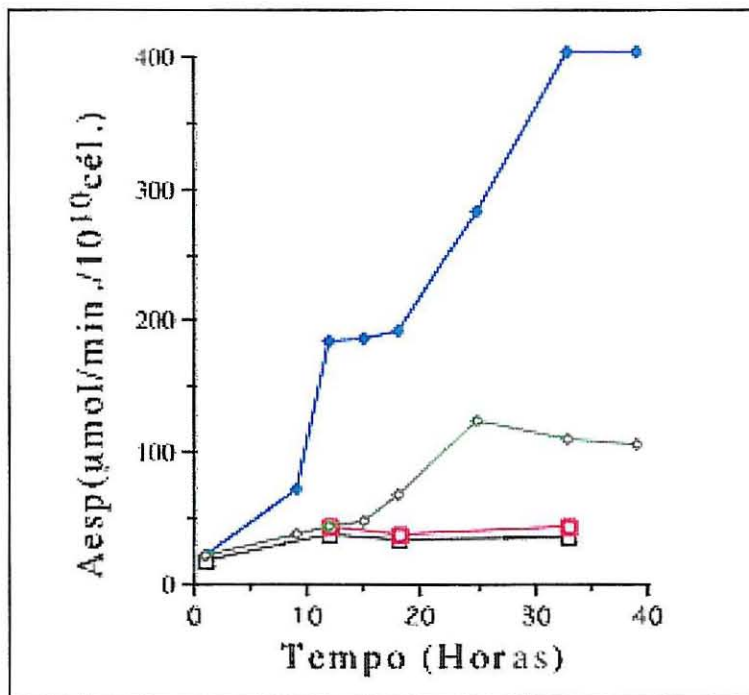


Figura 3.29 – Atividades enzimáticas com o substrato tributirina de células das estirpes de *Yarrowia lipolytica*: Selvagem crescida em **MM-Glucose** (□) e em **MM-Azeite** (◆); e de células da estirpe FJG1 ($\Delta Lip1$) crescida em **MM-Glucose** (□) e em **MM-Azeite** (◇).

Das actividades medidas com azeite (SLS) em células das duas estirpes após 32 horas de crescimento nos meios de **MM-Glucose** e **MM-Azeite** e com a técnica titrimétrica, registadas na Tabela 3.8, pode observar-se uma diminuição de 80% de actividade lipásica na estirpe interrompida pelo gene *YILIP1* confirmando-se de uma forma quantitativa a importância deste gene na actividade lipásica da estirpe selvagem.

Tabela 3.8 – Actividades lipásicas em células das estirpes selvagem e da estirpe interrompida com o gene *YILIP1 FJG1 ($\Delta Lip1$)* de *Yarrowia lipolytica* com o substrato *sigma lipase substrate* (SLS).

| ESTIRPE | MEIO DE CULTURA | TEMPO (Horas) | A.específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/10^{10}\text{cél.}$) | Act. Relativa | % Interrompida |
|-----------------------|-----------------|---------------|--|---------------|----------------|
| INAG 135668 | MM-glucosa | 32 | 9.8 | | |
| FJG1($\Delta lip1$) | MM-Glucose | 32 | 11.1 | | |
| INAG 135668 | MM-Azeite | 32 | 142 | 100 | 0.0 |
| FJG1($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 32 | 28.8 | 20 | 80 |

b) Actividade lipásica em fracções celulares

• Estudos em meio líquido

Esta diferença de actividade também foi detectada em fracções celulares destas duas estirpes, em crescimentos **MM-Azeite** utilizando neste caso tributirina como substrato e a técnica de pH-stat, como se pode observar nos valores registados na Tabela 3.9. Nestas fracções e em crescimentos em **MM-Glucose** as actividades ou foram muito residuais ou não foram registadas.

Da análise destes resultados verifica-se que em ambas as estirpes a maior actividade é registada no sobrenadante de crescimento. Nesta fracção celular a diminuição da actividade por interrupção do gene *YILIP1* atinge valores de 78% para tempos mais avançados de crescimento até valores de 90% na fase exponencial desse mesmo crescimento. Esta diminuição da percentagem de actividade interrompida nos tempos mais avançados do crescimento celular também se verifica em paredes celulares, sendo esta tendência invertida na fracção sobrenadante de ruptura que expressa as actividades no interior da célula em que os valores se situam entre os 75% em 32 horas de cultura até valores de 81% nas 11 horas do crescimento. Em todos os casos é verificada uma grande diminuição de actividade enzimática na estirpe interrompida com este gene.

Analisando os resultados de todas estas experiências pode-se concluir que a interrupção do gene *YILIP1* provocou uma descida de actividade superior a 70% em tempos longos de crescimento comparativamente com a estirpe selvagem, em crescimentos com azeite e em medições de actividade com os substratos tributirina e *sigma lipase substrate*, no entanto parece manter-se na estirpe interrompida uma actividade incrementada em crescimentos com azeite.

Tabela 3.9 – Actividades lipásicas em extratos celulares da estirpe selvagem e da estirpe interrompida com o gene *YILIP1* ($\Delta lip1$) de *Yarrowia lipolytica* com o substrato tributirina.**SOBRENADANTE DE CRESCIMENTO**

| ESTIRPE | MEIO DE CULTURA | TEMPO (Horas) | A.específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg.prot.}$) | Act. Relativa | % Interrompida |
|------------------------|-----------------|---------------|---|---------------|----------------|
| Selvagem (INAG135668) | MM-Azeite | 11 | 4.2 | 100 | 0.0 |
| Selvagem (INAG135668) | MM-Azeite | 24 | 15 | 100 | 0.0 |
| Selvagem (INAG135668) | MM-Azeite | 32 | 13 | 100 | 0.0 |
| Selvagem (INAG135668) | MM-Azeite | 38 | 12.5 | 100 | 0.0 |
| FJG1 ($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 11 | 0.43 | 10 | 90 |
| FJG1 ($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 24 | 0.88 | 15 | 85 |
| FJG1 ($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 32 | 1.7 | 33 | 67 |
| FJG1 ($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 38 | 1.1 | 22 | 78 |

SOBRENADANTE DE RUPTURA

| ESTIRPE | MEIO DE CULTURA | TEMPO (Horas) | A.específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg.prot.}$) | Act. Relativa | % Interrompida |
|------------------------|-----------------|---------------|---|---------------|----------------|
| Selvagem (INAG135668) | MM-Azeite | 11 | 0.89 | 100 | 0.0 |
| Selvagem (INAG135668) | MM-Azeite | 24 | 5.31 | 100 | 0.0 |
| Selvagem (INAG135668) | MM-Azeite | 32 | 9.3 | 100 | 0.0 |
| FJG1 ($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 11 | 0.29 | 33 | 67 |
| FJG1 ($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 24 | 0.72 | 14 | 86 |
| FJG1 ($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 32 | 1.32 | 14 | 86 |

PAREDES CELULARES

| ESTIRPE | MEIO DE CULTURA | TEMPO (Horas) | A.específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg.prot.}$) | Act. Relativa | % Interrompida |
|------------------------|-----------------|---------------|---|---------------|----------------|
| Selvagem (INAG135668) | MM-Azeite | 11 | 0.5 | 100 | 0.0 |
| Selvagem (INAG135668) | MM-Azeite | 24 | 3.5 | 100 | 0.0 |
| Selvagem (INAG135668) | MM-Azeite | 32 | 3.9 | 100 | 0.0 |
| FJG1 ($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 11 | 0.095 | 19 | 81 |
| FJG1 ($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 24 | 0.95 | 27 | 73 |
| FJG1 ($\Delta lip1$) | MM-Azeite | 32 | 0.99 | 25 | 75 |

3.4.1.2- Das estirpes ABC1 ($\Delta lip 3$) e ABC2 ($\Delta lip 1.\Delta lip 3$)

Depois de se ter comprovado por análise genética a interrupção do gene *YILIP3* na estirpe selvagem INAG135668 e na estirpe interrompida com o gene *YILIP1* (INAG135668 $\Delta lip 1$) procedeu-se à determinação das actividades enzimáticas das estirpes resultantes destas interrupções. Da interrupção da estirpe selvagem resultou a estirpe ABC1 ($\Delta lip 3$) e da interrupção da estirpe interrompida com o gene *YILIP1* (FJG1) resultou a estirpe ABC2 ($\Delta lip 1.\Delta lip 3$).

a) Actividade lipásica em células inteiras

• Estudos em meio sólido

Nestas análises dos fenótipos das estirpes mutadas seguiram-se os procedimentos que já vinham a ser utilizados com a estirpe selvagem e com a estirpe $\Delta Lip 1$. Inicialmente cresceram-se as 4 estirpes em meio sólido **Glucose-Agar-Tributirina**, observando-se as colónias e medindo-se os halos de actividade após 120 horas de crescimento. Como se pode observar-se na Figura 3.30 a relação entre o diâmetro ao quadrado do halo e o diâmetro ao quadrado da colónia diminuiu de (6.8 ± 0.58) da estirpe selvagem para, (4.4 ± 0.15) na estirpe ABC1, (3.2 ± 0.54) na estirpe FJG1 e (1.95 ± 0.29) na estirpe ABC2, o que permite concluir que a actividade eliminada é considerável sendo mais significativa nas estirpes com o gene *YILIP1* interrompido.

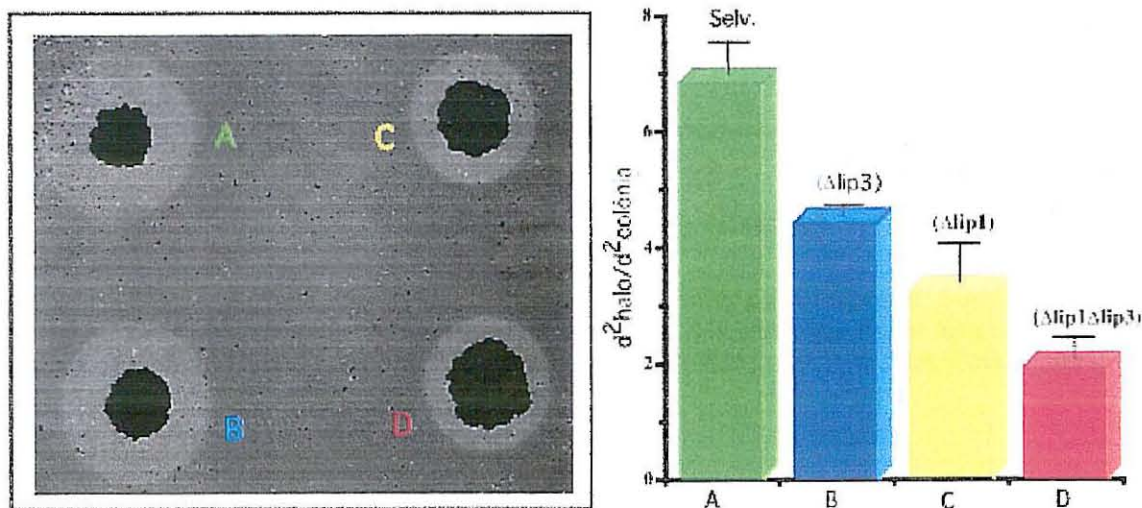


Figura 3.30 – Halos de actividade em Glucose-Agar-Tributirina e gráfico com medições dessa actividade de estirpes de *Yarrowia lipolytica*: A) Estirpe selvagem, B) ABC1 ($\Delta lip 3$), C) FJG1 ($\Delta lip 1$), e D) ABC2 ($\Delta lip 1.\Delta lip 3$). As barras de erro referem-se a um desvio padrão de 3 réplicas.

• Estudos em meio líquido

As medições em meio líquido com células de crescimentos das quatro estirpes (selvagem, $\Delta lip1$, $\Delta lip3$ e $\Delta lip1, \Delta lip3$), em meio de cultura **MM-Azeite**, com o substrato paranitrofenil butirato registam-se no gráfico da Figura 3.31. Neste caso utilizou-se a técnica espectrofotométrica com este substrato por ser mais fácil e mais rápida de realizar já que se dispunha de um elevado número de amostras.

Tal como em meio sólido observa-se uma diminuição de actividade nas estirpes interrompidas comparativamente com a estirpe selvagem, confirmando-se também que essa diminuição é maior nas estirpes interrompidas com o gene *YILIP1* do que com o gene *YILIP3*.

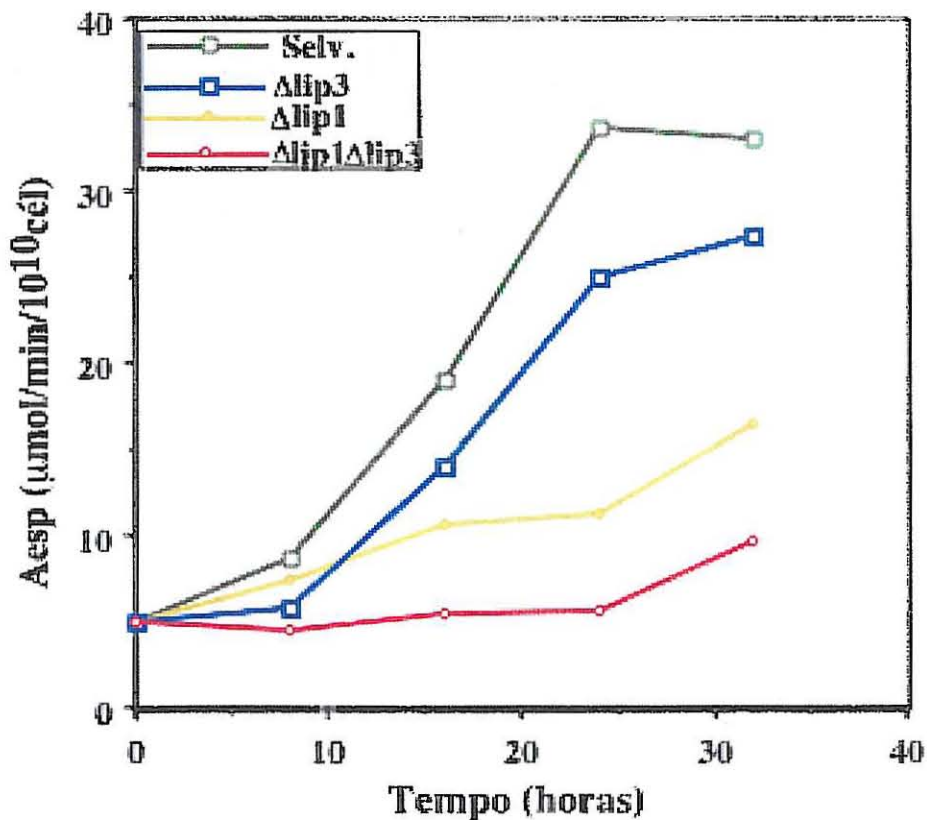


Figura 3.31 – Actividade lipásica com o substrato paranitrofenil butirato em células de crescimentos em MM-Azeite da estirpe selvagem e das estirpes desta levedura interrompidas com os genes *YILIP1* e *YILIP3*: Selvagem (INAG 135668), ABC1 ($\Delta lip3$), FJG1 ($\Delta lip1$) e ABC2 ($\Delta lip1, \Delta lip3$).

Para confirmar os resultados anteriores realizou-se um ensaio com células dos crescimentos de 32 horas utilizando neste caso a tributirina como substrato, dado o seu carácter de verdadeiro lípido e a precisão das medidas de actividade com este substrato. Os resultados destes ensaios apresentam-se graficamente na Figura 3.32.

A interrupção do gene *YILIP3* apenas produz uma diminuição de actividade lipásica de cerca de 20% enquanto que a interrupção do gene *YILIP1* produz uma redução da actividade lipásica superior a 50%, no entanto não se pode rejeitar a ideia que a proteína codificada pelo gene *YILIP3* possua mais afinidade por outros substratos diferentes dos utilizados neste trabalho.

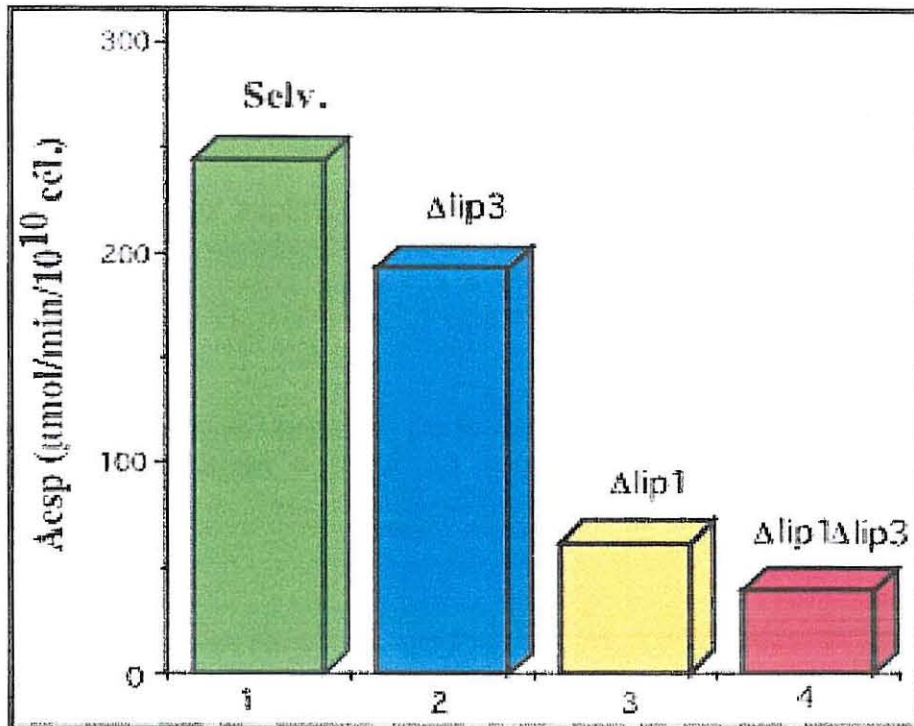


Figura 3.32 – Actividade lipásica com o substrato tributirina em células de 32 horas de crescimento em MM-Azeite da estirpe selvagem e das estirpes desta levedura interrompidas com os genes *YILIP1* e *YILIP3* : 1) Estirpe selvagem 2) ABC1 ($\Delta lip3$) 3) FJG1 ($\Delta lip1$), e 4) ABC2 ($\Delta lip1, \Delta lip3$).

Destes estudos pode-se também concluir que, a estirpe que possui os dois genes interrompidos conserva actividade lipásica, se admitirmos que a proteína codificada pelo gene *YILIP2*, devido à grande diferença estrutural que apresenta comparativamente com estas proteínas deverá por isso apresentar um tipo de actividade diferente, nesse caso seria de admitir a existência de outros genes, que codificam para proteínas com actividade lipásica em *Y. lipolytica*.

Esta actividade verificada na estirpe que possui os dois genes interrompidos não é suficiente para explicar a indução que se observa nas restantes estirpes pelo que se poderia concluir através destes estudos de actividade lipásica que os genes *YILIP1* e *YILIP3* são de alguma forma induzidos quando as estirpes que os possuem crescem em substratos com azeite, este facto é ainda mais notório se atendermos à indução verificada nas estirpes Selvagem e ABC1, que possuem o gene *YILIP1* sem interromper.

b) Actividade lipásica em fracções celulares

Para se verificar se havia mais actividade lipásica em células ou sobrenadante de crescimento cresceram-se em meio **MM-Azeite** a estirpe nativa, a estirpe $\Delta lip1$ e a estirpe, $\Delta lip3$. Após 24 horas de crescimento guardou-se 1 mL de células juntamente com o meio de crescimento (Extracto Total) que foi congelado. Retirou-se dos matrazes ao mesmo tempo outro mL de extracto total que se centrifugou separando as células do sobrenadante de crescimento, posteriormente estas células ressuspenderam-se em 1mL de água estéril. Mediram-se actividades com 200 μ L de cada uma destas amostras utilizando como substrato paranitrofenil butirato pois sendo um substrato cromogénico permite que as actividades se possam realizar de forma mais simples e reprodutiva.

Os resultados destas experiências representam-se no gráfico da Figura 3.33. Observa-se em todas as estirpes maior actividade no sobrenadante de crescimento do que em células e em todos os casos a diminuição da actividade na estirpe interrompida com o gene *YILIP1* é maior que na estirpe interrompida com o gene *YILIP3*.

Os resultados destes estudos poderão ser úteis na purificação destas proteínas, pois a purificação a partir do sobrenadante é mais fácil e menos dispendiosa.

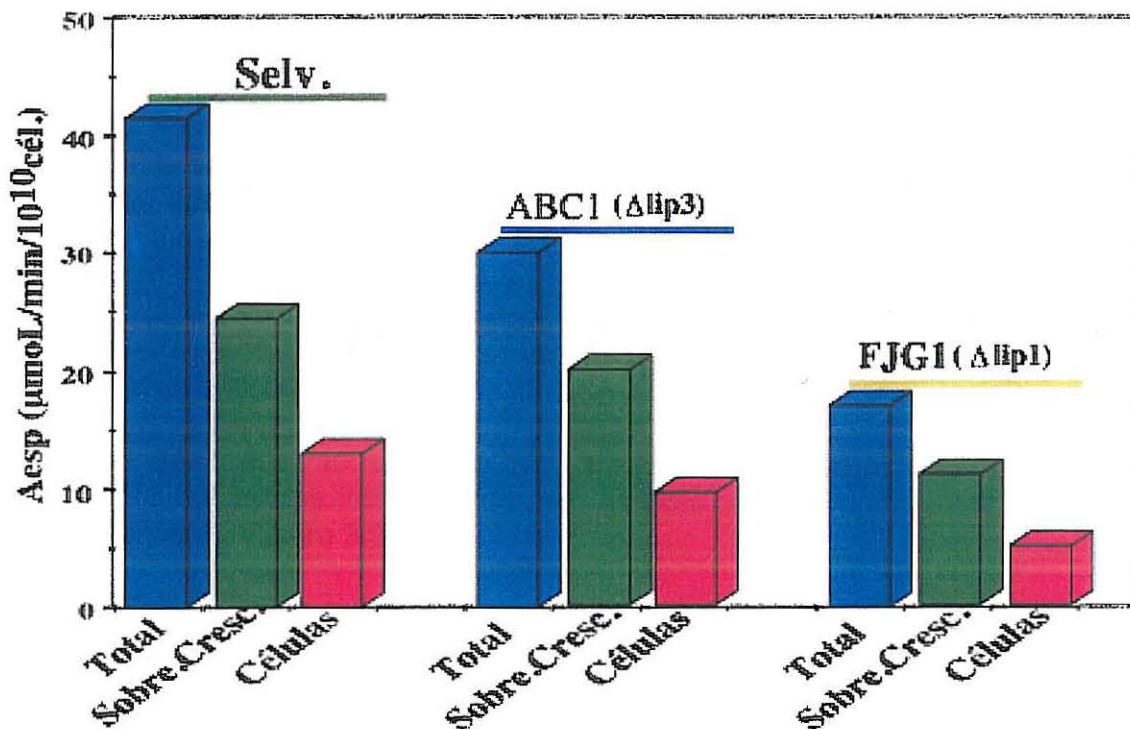


Figura 3.33 – Actividades lipásicas com o substrato paranitrofenil butirato em extracto total, células e sobrenadante de crescimento da estirpe silvestre e das estirpes interrompidas com os genes *YILIP1* (FJG1) e *YILIP3* (ABC1) de *Y. lipolytica*.

3.4.2 – Complementação das estirpes mutadas pelos genes *YILIP1* e *YILIP3*

Com o objectivo de determinar se as perdas de actividade são consequência das interrupções dos genes *YILIP1* e *YILIP3* em colaboração com Morín, (2000), do grupo de investigação, complementara-se as estirpes que possuíam estes genes interrompidos.

Para complementar a interrupção do gene *YILIP1* construiu-se o plasmídeo pYILIP1, que possui o gene *URA3*, um sítio de replicação autónoma (ARS 68) e o gene *YILIP1*.

Para esta construção digeriu-se o plasmídeo que possui o gene *YILIP1*, pFGLIP7, com as enzimas de restrição *Spe I* e *Hind II*. Purificou-se a banda de 3.2kb mediante "Gen Clean" (**Materiais e Métodos** secção 2.8.8), enxertando-se depois o fragmento purificado no plasmídeo pINA444, previamente digerido com as enzimas *She I* e *Hind III* (das digestões de *Spe I* e *Nhe I* formam-se extremos compatíveis). Mediante digestões com diversas enzimas de restrição comprovou-se que a construção estava correcta.

Com o plasmídeo resultante transformaram-se a estirpe interrompida com o gene *YILIP1* ($\Delta lip1$), a estirpe com os genes *YILIP1* e *YILIP3* ($\Delta lip1.\Delta lip3$) e a estirpe selvagem de *Yarrowia lipolytica*.

De forma semelhante, para complementar as interrupções do gene *YILIP3* foi construído o plasmídeo pYILIP3. Este plasmídeo possui o gene *YILIP3*, o sítio de replicação autónoma (ARS 18) e o gene marcador de selecção *LEU2*. Para a construção deste digeriu-se o plasmídeo pACLIP3 (que possui o gene *YILIP3* completo) com as enzimas de restrição *Spe I* e *Cla I*, purificando-se de seguida a banda de 4.4 kb. A seguir purificou-se o ADN desta banda para ser ligado ao plasmídeo pINA240 digerido previamente com as enzimas de restrição *Spe I* e *Cla I*. Após digestões com várias enzimas de restrição comprovou-se que a fusão estava correctamente efectuada.

Este plasmídeo foi utilizado para transformar a estirpe interrompida com o gene *YILIP3* e a estirpe interrompida com os dois genes (*YILIP1* e *YILIP3*) como se pode observar na Figura 3.34.

Sempre que se achou necessário e para comprovar que as transformações das estirpes de *Yarrowia lipolytica* estavam bem efectuadas, além de se fazerem várias sementeiras em meios selectivos, extraia-se o ADN plasmídico dessas estirpes de *Yarrowia lipolytica* e transformavam-se com ele células competentes de *E.coli*. Uma vez extraído o ADN plasmídico da bactéria era digerido de seguida com endonucleases de restrição. Os padrões das bandas resultantes dessas digestões foram observados em electrofórese com geis de agarose.

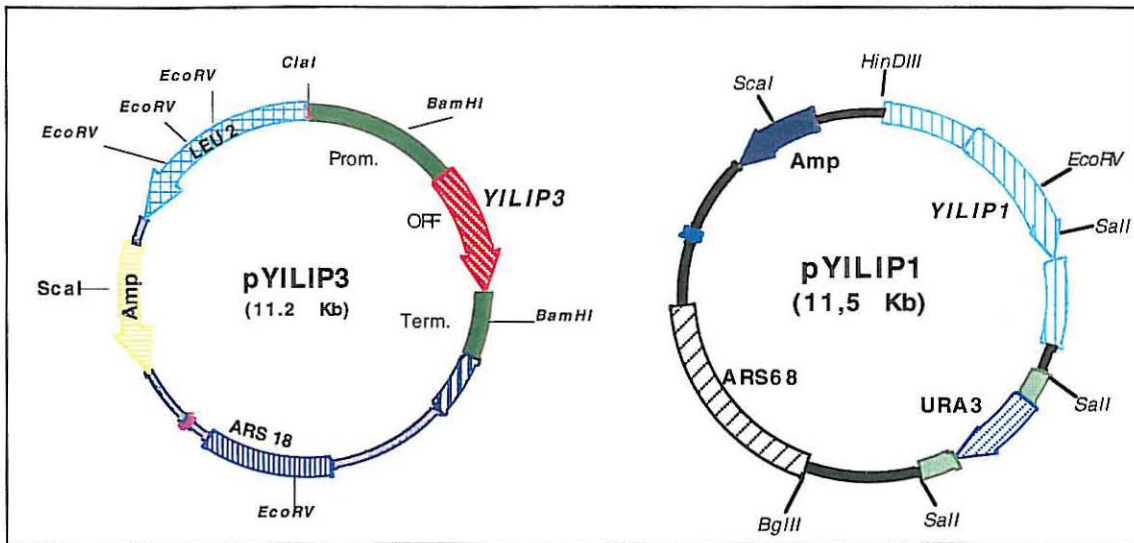


Figura 3.34 – Representação esquemática dos plasmídeos pYILIP3 e pYILIP1 (Morín, 2000).

De seguida procedeu-se ao crescimento das estirpes transformadas com os plasmídeos pYILIP1 e pYILIP3 nos meios de cultura **MM-Azeite** e **MM-Glucose**. Após 32 horas de crescimento recolheram-se amostras e foi medida actividade enzimática com o substrato paranitrofenil butirato. Os resultados destas actividades estão representados nos gráficos da Figura 3.35.

Em todos os casos pode-se observar que as estirpes com os genes interrompidos recuperaram a actividade perdida após transformação com os plasmídeos respectivos. Além disso a estirpe selvagem e a estirpe com dupla interrupção quando transformadas com o plasmídeo pYILIP1 mostraram um incremento de actividade lipásica da mesma ordem que o da estirpe interrompida com o gene *YILIP1*.

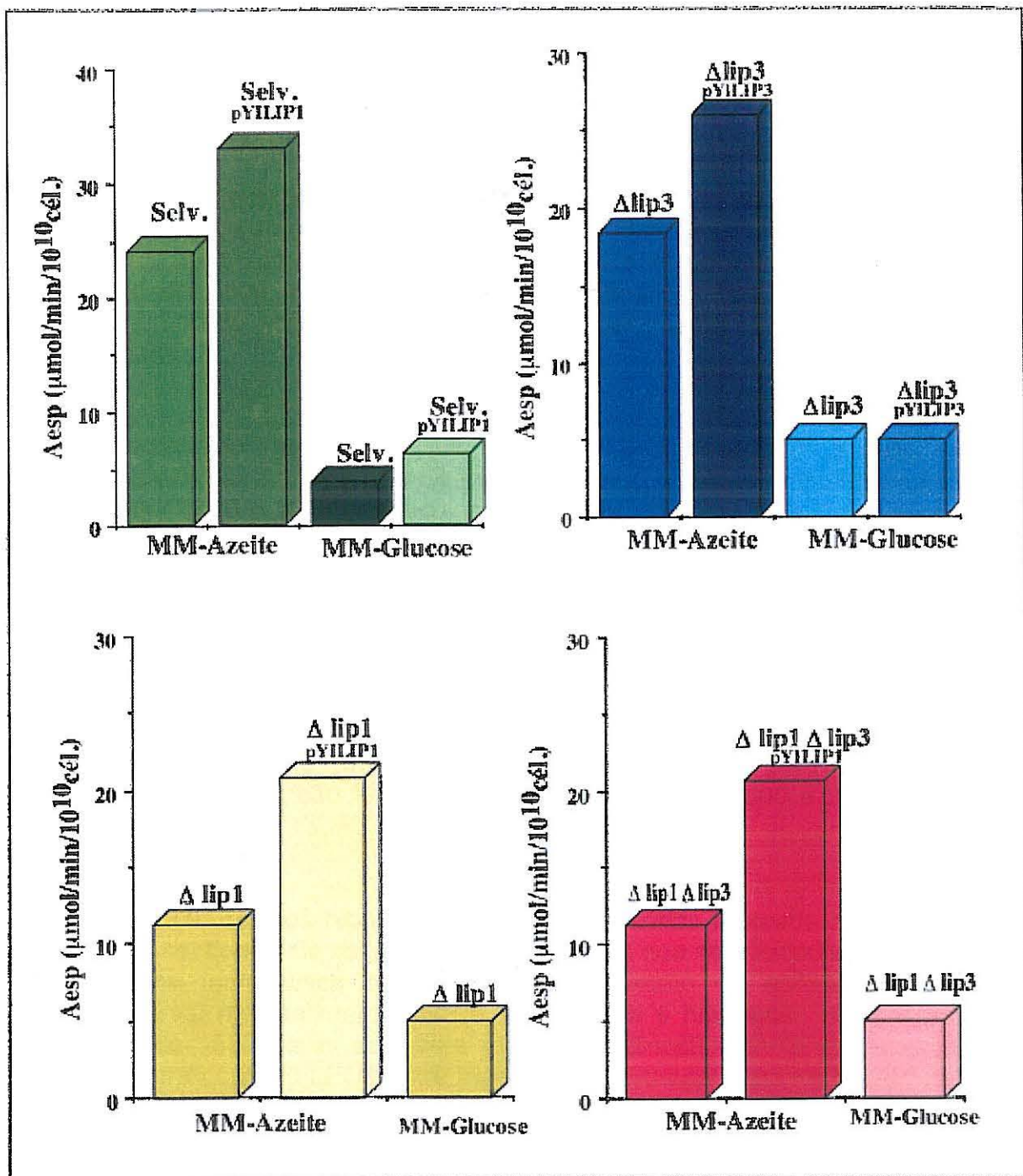


Figura 3.35 - Análise da actividade, com paritrofenil butirato como substrato, em células das estirpes transformadas com os plasmídeos pYILIP1 e pYILIP3. Selv.- estirpe selvagem, Δlip1 - estirpe com o gene *YILIP1* interrompido, Δlip3-estirpe com gene *YILIP3* interrompido e Δlip1, Δlip3-estirpe com os dois genes interrompidos.

3.5 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *YILIP3*

3.5.1 – Análise tipo “Northern-blot” do gene *YILIP3*

Com base nos resultados observados nas medições de actividade enzimática, em que se verifica uma indução de actividade, quando *Yarrowia lipolytica* cresce em meios com azeite como fonte carbono, e com o objectivo de analisar o tipo de expressão do gene *YILIP3* foram realizadas análises tipo “Northern-blot”. Além disso, este tipo de análises, permitem estabelecer o tamanho do ARN transcrito do referido gene.

A estirpe de *Yarrowia lipolytica* INAG135668 foi crescida em simultâneo e nas mesmas condições no meio MM-Glucose (com glucose) e no meio MM-Azeite (com azeite). Às 10, 20 e 30 horas recolheram-se amostras dos dois crescimentos para extrair ARNs totais de acordo com o método descrito na secção 2.8.3 dos **Materiais e Métodos**. Após se ter determinado a sua concentração, 15 µg de cada um destes ARNs foram desnaturados e separados num gel de agarose a 1% transferindo-se de seguida a uma membrana de nitrocelulose.

Como sonda foi utilizado um fragmento de 472 pares de bases de ADN obtido do plasmídeo pACLIP3 (possui o gene *YILIP3* clonado) pela digestão com a endonuclease de restrição *Xho* I, que corta nas posições 2500 e 2972 da fase de leitura aberta do gene *YILIP3*.

Os ARNs fixados hibridaram-se com esta sonda marcada radioactivamente detectando-se, depois de se ter revelada a película que se colocou em contacto com a membrana, uma única banda de ARN transcrito de aproximadamente 2.5 kilobases. Esta mesma membrana foi desibridada e hibridada de novo com um fragmento de 1552 pares de bases marcado radioactivamente correspondente à fase de leitura do gene *LEU2* entre os sítios de restrição *Apa* I e *EcoR* I, tendo-se detectado também um único transcrito de aproximadamente 0.7 kilobases. A intensidade das diferentes bandas obtidas nesta hibridação poderá ser utilizada como controlo de carga da hibridação anterior. Os resultados deste estudo podem ser observados na Figura 3.39.

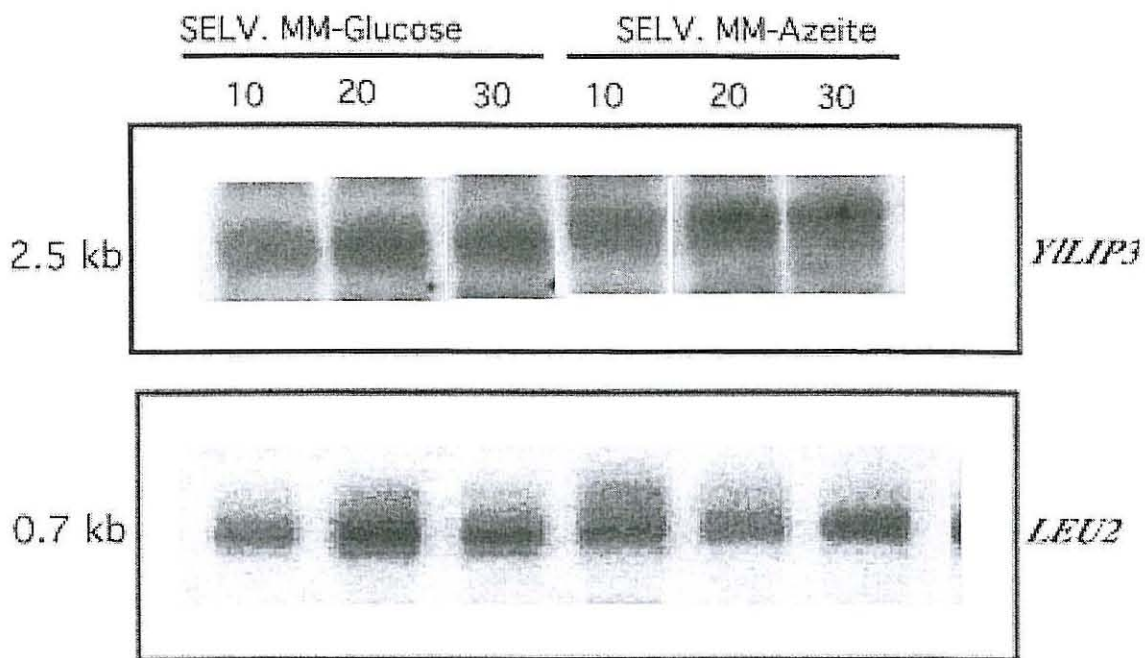


Figura 3. 39 – “Northern-blot” da expressão do gene *YILIP3* durante o crescimento da estirpe selvagem de *Yarrowia lipolytica* (INAG 135668) em MM-Glucose e em MM-Azeite.

O sinal de hibridação de 0.7 kilobases corresponde à cópia cromossômica do gene *LEU2* na estirpe INAG 135668, auxotrófica para a leucina por estar interrompida aproximadamente a 0.7 kb do início da transcrição, o que origina que não seja funcional e as células necessitem de leucina para crescer.

Relativamente à expressão do gene *YILIP3* pode-se concluir que:

⇒ Possui níveis de transcrição relativamente baixos como se pode observar, nas bandas superiores da Figura 3.39. As bandas da parte superior da figura correspondem à autorradiografia com uma exposição prolongada de 80 horas do filtro hibridado com a sonda de 472 pares e bases do gene *YILIP3*. Quando comparadas com os sinais da sonda do gene *LEU2*, que possui apenas 24 horas de exposição verifica-se que apesar disso estes possuem maior intensidade.

⇒ Em amostras de ambos os crescimentos, com glucose ou com azeite, não existe uma variação significativa da expressão ao aumentar o tempo de cultura. Por isso pode-se afirmar que a expressão deste gene a nível transcricional, não depende da fonte de carbono no meio de cultura e que portanto se trata de um gene com uma expressão constitutiva a este nível.

Resultados semelhantes já tinham sido obtidos com o gene *YILIP1* de *Yarrowia lipoytica* quer através de análises do tipo "Northern-blot" (González, 1997), quer através de estudos realizados com o seu promotor (Morín, 2000).

Nestes estudos foi estudado o efeito do azeite a nível transcricional por se tratar de um composto de composição conhecida e de composição pouco variável que pode ser um dos substratos naturais da levedura *Yarrowia lipolytica*. No entanto não se pode rejeitar a possibilidade de que exista algum outro composto na natureza que possa actuar como indutor da expressão destes genes.

Comparando estes resultados com os obtidos em medições de actividade lipásica em que é verificada indução quando as células crescem em meios com azeite como única fonte de carbono, pode concluir-se que a regulação destes genes se produz a nível pós-transcricional.

Processos de regulação pós-transcricional foram já descritos por Tsuzuki *et al.*, (1999). Segundo este autor, determinadas concentrações de glucose podem produzir uma diminuição da actividade lipásica, devido a uma mudança estrutural provocada pela glucose na molécula da lipase. Pensa-se que neste fenómeno intervêm resíduos de Triptofano situados nas proximidades do centro activo que estão presentes na maioria das lipases e que também se encontram nas proteínas YILip1p e YILip3p. No entanto, este fenómeno por si só não explica a indução registada nas medições de actividade lipásica de crescimentos com azeite. Provavelmente outros fenómenos de regulação desconhecidos até ao momento possam intervir na regulação destes genes.

Foram ainda realizados ensaios em electrofórese com geis de poliacrilamida de acordo com o protocolo descrito na secção 2.4.3 de **Materiais e Métodos**. Nestes ensaios utilizaram-se amostras da estirpe selvagem e amostras das estirpes resultantes da interrupção dos genes *YILIP1* e *YILIP3*, crescidas em **MM-Glucose** e em **MM-Azeite**. Apesar das inúmeras repetições realizadas não foi possível obter dados conclusivos, já que o número de bandas obtidas devidas à presença de outras proteínas não permitiu identificar com clareza as bandas correspondentes às lipases em estudo quer se tratasse de geis revelados com prata quer nos geis revelados com azul de Coomassie.

Para estes ensaios as amostras foram precipitadas com acetona e com ácido tricloroacético (TCA). Provavelmente estes dois tipos de precipitações não foram adequadas pelo que em trabalhos futuros se pensa repetir estes ensaios utilizando amostras precipitadas com outros produtos como sejam o sulfato de amónio ou semi-purificadas através de processos como a cromatografia de exclusão em gel.

4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Demonstrou-se que a levedura dimórfica *Yarrowia lipolytica* possui uma elevada capacidade para produzir diferentes proteínas com actividade lipásica: proteínas com características estruturais semelhantes, YILip1 e YILip3, e outras, com algumas diferenças estruturais relativamente a estas, como a proteína YILip2.

As proteínas que foram objecto de estudo ao longo deste trabalho – YILip1 e YILip3- não apresentam um sinal peptídico característico. Este facto é muito surpreendente, já que os substratos sobre os quais actuam, devido ao seu tamanho, não podem penetrar no interior celular. Se o seu transporte para o exterior se realiza pelas vias habituais de secreção, então deve processar-se mediante algum sinal diferente, ou então seguem uma via de secreção distinta das propostas até ao momento. Sendo assim, os genes que codificam para estas proteínas seriam bons modelos para este tipo de estudos. A purificação destas proteínas permitiria a obtenção de anticorpos, e posteriormente, com técnicas imunocitoquímicas seria possível a localização celular destas proteínas.

Os estudos de biologia molecular que permitiram a caracterização dos genes *YILIP1* e *YILIP3*, foram realizados prioritariamente à caracterização físico-química mais detalhada das proteínas por eles expressas. A identificação dos substratos preferenciais destas enzimas e as condições apropriadas à sua acção, a caracterização de aspectos funcionais como a enantioselectividade e as actividades destas enzimas quando imobilizadas, de entre outros aspectos, poderão permitir uma avaliação do seu potencial uso industrial em diferentes processos já descritos na introdução deste trabalho. A purificação destas proteínas e o recurso posterior a técnicas como a cristalografia, poderão contribuir para um conhecimento mais profundo destas enzimas. A produção deste tipo de enzimas parece estar assegurada, na levedura *Yarrowia lipolytica*, a custos relativamente baixos dada a sua capacidade para crescer com substratos baratos.

Uma vez que a estirpe resultante da interrupção dos dois genes *YILIP1* e *YILIP3* (*ABC2*) ainda apresenta actividade lipásica, decidiu-se proceder à pesquisa dos genes que possivelmente existem nessa levedura responsáveis por essa actividade.

O grupo de investigação (Morín, 2000) conseguiu isolar por PCR um novo fragmento de ADN genómico de *Yarrowia lipolytica* que apresenta homologia com as lipases desta e de outras leveduras.

Em futuros trabalhos será construída uma minigenoteca parcial de *Yarrowia lipolytica* a fim de isolar o referido gene utilizando este fragmento como sonda. O isolamento deste gene e a sua posterior interrupção na estirpe selvagem e nas estirpes obtidas pela interrupção dos genes *YILIP1* e *YILIP3* dará lugar a uma estirpe quase carente de actividade lipásica ou com uma actividade lipásica e/ou esterásica diferente devida a proteínas distintas de YILip1 e YILip3 como parece ser

a da proteína YILip2. Estudos com essas estirpes interrompidas também permitirão um melhor esclarecimento sobre o tipo de expressão dos genes estudados neste trabalho e conseqüentemente sobre o sistema de lipases da levedura *Yarrowia lipolytica*.

Os resultados expostos poderão contribuir para a caracterização a nível genético do sistema de assimilação de gorduras pela levedura *Yarrowia lipolytica* e são compatíveis com os de outros autores (Demolder *et al.*, 1992; González, 1997; Matthey *et al.*, 1978; Otta *et al.*, 1982; Ruschen *et al.*, 1982).

5- CONCLUSÕES

Primeira – A levedura *Yarrowia lipolytica* apresenta várias actividades lipásicas codificadas por diferentes tipos de genes. A maior parte dessas actividades são catalizadas por proteínas codificadas pelos genes *YILIP1* e *YILIP3*. Estes genes são induzidos por azeite e reprimidos por glucose.

Segunda – A estirpe de *Yarrowia lipolytica* com o gene *YILIP1* interrompido apresenta uma actividade lipásica de aproximadamente 70% menor que a estirpe selvagem.

Terceira - Foi isolado o gene *YILIP3* mediante técnicas de PCR e bibliotecas de ADN genómico. Este gene apresenta uma fase de leitura aberta de 1494 pares de bases que codificam uma proteína constituída por 498 aminoácidos com uma massa molecular estimada de 55.8 kDa. Os seus extremos 5' e 3' possuem as sequências consenso características das leveduras, e que se relacionam com o início e a terminação da transcrição.

Quarta – A transcrição do gene *YILIP3* dá lugar a uma única espécie de mRNA com um tamanho aproximado de 2.5 kilobases.

Quinta - A sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *YILIP3* apresenta homologia com a sequência do gene *YILIP1* e com sequências de genes que codificam para lipases em fungos.

Sexta- As proteínas codificadas pelos genes *YILIP1* e *YILIP3* possuem conformações espaciais muito semelhantes entre si e semelhantes às de outras lipases da família das carboxilesterases de leveduras.

Séptima - Foram obtidas duas novas estirpes de *Yarrowia lipolytica* resultantes da interrupção do gene *YILIP3* na estirpe selvagem e na estirpe que já possuía o gene *YILIP1* interrompido.

Oitava – A interrupção do gene *YILIP3* produziu uma diminuição da actividade lipásica de aproximadamente 20% relactivamente ao total verificado na estirpe selvagem.

6 - BIBLIOGRAFIA

- Academic Press, I. (1992) Enzyme nomenclature: Recommendations of the nomenclature committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. *En: I. Academic Press* (ed.). Harcourt Brace Jovanovich, New York.
- Akatsuka, H., E. Kawai, K. Omori, S. Komatsubara, T. Shibatani e T. Tosa. (1994) The lipA gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *J Bacteriol* **176**:1949-1956.
- Alberghina, L., R. Grandori, S. Longhi, M. Lotti, F. Fussetti e M. Vanoni. (1990) Molecular cloning of a lipase and of a lipase-related gene from *Candida cylindracea*, p. 231-235. *En: L. Alberghina, R. D. Schmid y R. Verger* (ed.), Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering, vol. **16**. VCH, New York.
- Alberghina, L., R. D. Schmid e R. Verger. (1991) Lipases: Structure, Mechanism, and Genetic Engineering (Contributions to the CEC-GBF International Workshop; September 13-15 '90, Braunschweig, Germany), p. 440. *En: L. Alberghina, R. D. Schmid y R. Verger* (ed.), GBF-Monographs, vol. **16**. Verlag Chemie, Weinheim.
- Anthonsen, H. W., A. Baptista, F. Drabløs, P. Martel, S. B. Petersen, M. Sebastiao e L. Vaz. (1995) Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. *Biotech Ann Rev* 315-370.
- Arai, T., K. Kirimura e S. Usami. (1997) Cloning and sequencing of cDNA encoding lipase I from *Trichosporon fermentans* WU-C12. *Por publicar*
- ATCC. (1995) American Type Culture Collection Catalogue of Fungi/Yeast. *En: S. C. Jong y M. J. Gantt* (ed.), Reference Guide. ATCC, Maryland.
- Baba, T., D. Downs, K. W. Jackson, J. Tang e C. S. Wang. (1991) Structure of human milk bile salt activated lipase. *Biochemistry* **30**:500-510.
- Backlund, S., F. Eriksson, G. Hedstrom, A. Laine e M. Rantala. (1996) Lipase catalyzed enantioselective esterifications using different microemulsion based gels. *Col And Pol Sci* **274**:540-547.
- Balcao, V. M., A. L. Paiva, e F. X. Malcata. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme And Microbial Technology*. May **18**:392-416.
- Baldessari A. Bruttlmese A.C., Gros E.G. (1996). Lipase-catalyzed region selective deacylation of androstane derivatives. *Helv. Chim. Acta*. **79**:999-1004.
- Barth G., Gaillardin C. (1996) . *Yarrowia lipolytica*. In worf K (ed). Non-conventional yeast in biotechnology. Berling Springer pp313-338.
- Barth, G., and H. Weber. 1985. Improvement of sporulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **51**:167-177.

- Barth G., Kunkel W. (1979). Alcohol deshidrogenasa (ADH) in yeast. II NADH⁺ and NADP⁺ dependent alcohol deshidrogenasa in *Saccharomycopsis lipolytica*. *Z. Allg. Mikrobiol.* **19**: 381-390.
- Baker, S. M., Okkema, P. G. e Jaehning, J. A. (1984) Expression of the *Sacharomyces cerevisiae* GAL7 gene on autonomously replicating plasmids. *Mol Cell Biol* **4**:2062-2071.
- Ballot, C., G. Favre-Bonvin e J. M. Wallach. (1984) Lipase assay in duodenal juice using a conductimetric method. *Clin Chim Acta* **143**:109-114.
- Barnett, J. A., R. W. Payne e D. Yarrow. (1985) Yeasts: characteristics and identification. *En: J. A. Barnett* (ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Barth, G. e H. Weber. (1985) Improvement of sporulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **51**:167-177.
- Bati, N., E. G. Hammond e B. A. Glatz. (1984) Biomodification of fats and oils: trials with *Candida lipolytica*. *J Am Oil Chem Soc* **11**:1743-1746.
- Bello, M., D. Thomas e M. D. Legoy. (1987) Interesterification and synthesis by *Candida cylindracea* lipase in microemulsions. *Biochem Biophys Res Commun* **146**:361-367.
- Benjamin S., Pandey A. (1998). *Candida rugosa* and its lipases a retrospect. *J. Sci. Ind. Res.* **57**:1-9.
- Bosetti A., Branchi O., La-Porta P., Bettarini F., Massimini S.(1994). Chemo-enzymatic syntthesis of optically pure 1,2,3,4,-oxadiol-2(3H)-ones with acaricidad activity. *J. Agric. Chem.* **42**:2596-2599.
- Benjamin, S. e A. Pandey. (1996) Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. *Biores. Tech* **55**:167-170.
- Benjamin, S. e A. Pandey. (1998) *Candida rugosa*: Molecular biology and Versatility in biotechnology. *Yeast* **14**:1069-1087.
- Bergo, M., G. Olivecrona e T. Olivecrona. (1996) Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem J* **3**:893-898.
- Bitter, G. A. e K. M. Egan. (1988) Expression of interferon-gamma from hybrid yeast *GPD* promoters containing upstream regulatory sequences from the *GAL1-GAL10* intergenic region. *Gene* **69**:193-207.
- Blachly-Dyson, E. e T. H. Stevens. (1987) Yeast carboxypeptidase Y can be translocated and glycosylated without its amino-terminal signal sequence. *J Cell Biol* **104**:1183-1191.
- Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G. e Fink, G.R. (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymol*, 154-174.
- Boland, W., C. Frossl e M. Lorenz. (1991) Estereolytic and Lipolytic Enzymes in Organic Synthesis. *Synthesis* **101**:1049.
- Boyer, H. e D. Roulland-Dussoix. (1969) A complementary analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**:459-472.

- Brady, L., A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Nørskov, L. Thim e U. Menge. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**:767-770.
- Brake, A. J., Merryweather, J. P., Coit, D. G., Herbelein, U. A., Masiarz, F. R., Mullenbach, G. T., Urdea, M. S., Valenzuela, P. e Barr, P. J. (1984) α -factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:4642-4646.
- Branden, C. e J. Tooze. (1991) Introduction to protein structure, p. 302. En: C. Branden (ed.), Introduction to protein structure. Garland Publishing, Inc., New York.
- Brown, A. J. P. (1989) Messenger RNA stability in yeast. *Yeast* **5**:239-257.
- Brown, A. J. P., I. J. Purvis, T. C. Santiago, A. J. E. Bettany, L. Loughlin e J. Moore. (1988) Messenger RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **72**:151-160.
- Brumlik, M. J. e J. T. Buckley. (1996) Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol* **178**:2060-2064.
- Brzozowski, A. M., U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, J. B. Høge, S. A. Patkar e L. Thim. (1991) A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**:491-494.
- Caras, I. W., G. N. Weddell e S. R. Williams. (1989) Analysis of the signal for attachment of a glycopospholipid membrane anchor. *J Cell Biol* **108**:1387-1396.
- Cha, H. J. e Y. J. Yoo. (1996) Novel method using antibiotics for the determination of the rate limiting step in the secretion pathway of glucoamylase from recombinant yeast. *Biotech Tech* **10**:257-262.
- Chabane, B. H. P. J. e P. Mazliak. (1985) Lipases in oil seeds. *Ann Biol* **24**:201-232.
- Chang, R. C., J. C. Chen e J. F. Shaw. (1996) Site-directed mutagenesis of a novel serine arylesterase from *Vibrio mimicus* identifies residues essential for catalysis. *Biochem Biophys Res Commun* **221**:477-83.
- Chen, C. S. e Sih, C.J. (1989) general aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: The use of lipases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28**:695-707
- Chen, X.-J., M. Saliola, C. Falcone, M. M. Bianchi e H. Fukuhara. (1986) Sequence organization of the circular plasmid pKD1 from the yeast *Kluyveromyces-drosophilorum*. *Nucl Acids Res* **14**:4471-4481.
- Cheng, S. C. e D. M. Ogrydziak. (1987) Processing and secretion of the *Yarrowia lipolytica* RNase. *J Bacteriol* **4**:1433-1440.
- Choupina, A., F. González, M. Morín, F. Burguillo, E. Fermiñan e A. Dominguez. (1999) The lipase system of *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genet.* **35**:297.
- Cigan, A. M. e T. F. Donahue. (1987) Sequence and structural features associated with translational initiator regions in yeast-a review. *Gene* **59**:1-18.

- Cipiciani A., Fringuelli F., Scappini A.M. (1996). Enzymatic hydrolysis of acetoxy and phenethyl benzoates by *Candida cylindracea* lipases. *Tetrahedron* **52**:9869-9876.
- Converse, C. A., A. Cooper e M. A. Nutley. (1981) A radial diffusion assay for serum lipase. *Biochem Soc Trans* **9**:320-321.
- Cousens, D. J., M. J. Wilson e E. Hinechcliffe. (1990) Construction of a regulated PGK expression vector. *Nucleic Acids Res* **18**:1308.
- Cousens, L. S., J. R. Shuster, C. Gallegos, L. Ku, M. M. Stempien, M. S. Urdea, R. Sánchez-Pescador, A. Taylor e P. Tekamp-Olson. (1987) High level expression of proinsulin in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **61**:265-275.
- Cregg, J. M. e D. R. Higgins. (1995) Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Can J Bot Rev Can Bot* **73**:S891-S897.
- Christensen P.N. e Donelyan V. (1990). Detergent enzymes. *Chim Oggi* **8**:41-43.
- Cygler, M., J. D. Schrag, J. L. Sussman, M. Harel, I. Silman, M. K. Gentry e B. P. Doctor. (1993) Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci* **2**:366-82.
- Cygler, M., P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serreqi e A. K. Gupta. (1994) A structural basis for the chiral preferences of lipases. *J Am Chem Soc* **116**:3180-3186.
- Dalphin, M. E., C. M. Brown, P. A. Stockwell e W. P. Tate. (1997) The translational signal database, transterm: organisms, complete genomes. *Nucleic Acids Res* **25**:246-247.
- Davidow, L. S., D. Apostolakos, M. M. O'Donnell, A. R. Proctor, D. M. Ogrydziak, R. A. Wing, I. Stasko e J. R. DeZeeuw. (1985) Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **9**:39-48.
- Davidow, L. S. e J. R. DeZeeuw. (1985) Transformation of *Yarrowia lipolytica*. *EP Patent 138508*
- Davidow, L. S., F. S. Kaczmarek, J. R. DeZeeuw, S. W. Conlon, M. R. Lauth, D. A. Pereira e A. E. Franke. (1987) The *Yarrowia lipolytica* LEU2 gene. *Curr Genet* **11**:377-383.
- Davidow, L. S., D. M. M. O', F. S. Kaczmarek, D. A. Pereira, J. R. DeZeeuw e A. E. Franke. (1987) Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **169**:4621-4629.
- De Zeeuw, J. R. e I. Stasko. (1983) *US Patent 4407953* **4**:953.
- De Zeeuw, J. R. e E. J. Tyan. (1973) *US Patent 3736229* **3**:917.
- Delacasa, R. M., J. M. Sanchezmontero e J. V. Sinisterra. (1996) Water adsorption isotherm as a tool to predict the preequilibrium water amount in preparative esterification. *Biotechnol Lett* **18**:13-18.
- Destain, J., Swiatkowski T., Beumen, J. e Thonart, P. (1999) Purification and characterization of *Yarrowia lipolytica* extracellular lipasell. *Yarrowia lipolytica International meeting*. Castellón Spain.

- Dell'Angelica, E. C., C. A. Stella, M. R. Ermacora, E. H. Ramos e J. A. Santome. (1992) Study on fatty acid binding by proteins in yeast. Dissimilar results in *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem* 6:261-265.
- Demolder, J., W. Fiers e R. Contreras. (1992) Efficient synthesis of secreted murine interleukin-2 by *Saccharomyces cerevisiae*: influence of 3' untranslated regions and codon usage. *Gene* 111:207-213.
- Derewenda, U., L. Swenson, R. Green, Y. Wei, S. Yamaguchi, R. Joerger, M. J. Haas e Z. S. Derewenda. (1994) Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng* 7:551-557.
- Derewenda, Z. S. e U. Derewenda. (1991) Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochem Cell Biol* 69:842-851.
- Desnuelle, P. (1961) Pancreatic lipase. *Adv Enzymol* 23:129-161.
- Desnuelle, P., M. J. Constantin e J. Baldy. (1955) Potentiometric technique for measuring the activity of pancreatic lipase. *Bull Soc Chim Biol* 37:285-290.
- Dobson, M. J., M. F. Tulte, N. A. Roberts, A. J. Kingsman, S. M. Kingsman, R. E. Perkins, S. C. Conroy, B. Dunbar e T. Fothergill. (1982) Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 10:2625-2637.
- Domínguez A., Fermiñán E., Sánchez M., González Francisco J., Pérez-Campo M.F., García S., Herrero A.B; San Vicente A.,cabello J., Prado M., Iglesias F.J., Choupina A, Burguillo F.J., Fernandez-Lago I., López M.C. (1998). Non-conventional yeast as host for heterologus protein production. *Internatl. Microbiol.* 1:131-142.
- Duong, F., C. Soscia, A. Lazdunski e M. Murgier. (1994) The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter. *Mol Biol* 11:1117-1126.
- Einerhand, A. W., D. L. I. Van, W. T. Kos, B. Distel e H. F. Tabak. (1992) Transcriptional regulation of genes encoding proteins involved in biogenesis of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochem Funct* 10:185-91.
- Einerhand, A. W. C., W. Kos, W. C. Smart, A. J. Kal, H. F. Tabak e T. G. Cooper. (1995) The upstream region of the FOX3 gene encoding peroxisomal 3-oxoacyl-coenzyme A thiolase in *Saccharomyces cerevisiae* contains ABF1- and replication protein A-binding sites that participate in its regulation by glucose repression. *Mol Cell Biol* 15:3405-3414.
- Einerhand, A. W. C., W. T. Kos, B. Distel e H. F. Tabak. (1993) Characterization of a transcriptional control element involved in proliferation of peroxisomes in yeast in response to oleate. *Eur J Biochem* 214:323-331.
- Einerhand, A. W. C., B. T. M. Voorn, R. Erdmann, W. H. Kunau e H. F. Tabak. (1991) Regulation of transcription of the gene coding for peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 200:113-122.
- Eitenmiller, R. R., J. R. Vakil e K. M. Shahani. (1970) *J Food Sci* 35:130.
- Elliott, S., J. Giffin, S. Suggs, E. P. Lau e A. R. Banks. (1989) Secretion of glycosylated human erythropoietin from yeast directed by the a-factor leader region. *Gene* 79:167-180.

- Etcheverry, T. (1990) Induced expression using yeast copper metallothionein promoter. *Meth Enzymol* **185**:319-329.
- Farell R. L.; Hata K. Wall M.B. (1997). *Adv Biochem. Eng. Biotechnol* **57**:197-212.
- Fascher, K. D., J. Schmitz e W. Hörz. (1990) Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the *PHO5* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **9**:2523-2528.
- Favier, C. e D. Bourdon. (1983) Methods of evaluation of energy and protein values for pigs of three yeasts grown on alkanes (*Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida paraffinica*), p. 182-184. Em: M. P. Ferranti y A. Fiechter (ed.), Production and feeding of single cell protein. Applied Science Publishers, London.
- Feinberg, A. P. e B. Vogelstein. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**:6-13.
- Felsenstein, J. (1995) PHYLIP (Phylogeny Inference Package). *University of Washington*. versión 3.57c.
- Ferbeyre, G., E. Martínez, I. Torrens, J. Aguilar, A. Villarreal, T. Gonzáles, A. Silva e J. Morales. (1991) Secreción de renina de hongo recombinante en *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol Aplic* **8**:335-344.
- Ferguson, J., J. Y. Ho, T. A. Peterson e S. J. Reed. (1986) Nucleotide sequence of the yeast cell division cycle start genes CDC 28, CDC 36 y CDC 39, and a structural analysis of the predicted products. *Proc Nat Acad Sci USA* **14**:6681-6697.
- Fermiñán, E. (1996) Secreción de proteínas heterólogas en *Kluyveromyces lactis*. Aislamiento y caracterización del gen *KIPHO5* que codifica para una fosfatasa ácida reprimible. Departamento de Microbiología y Genética, *Tesis doctoral*, Universidad de Salamanca.
- Ferrante, G. e M. Kates. (1983) Pathways for desaturation of oleoyl chains in *Candida lipolytica*. *Can J Biochem Cell Biol* **11**:1191-1196.
- Fleer, R. (1992) Engineering yeast for high level expression. *Curr Op Biotech* **3**:486-496.
- Fleer, R., X. J. Chen, N. Amellal, P. Yeh, A. Fournier, F. Guinet, N. Gault, D. Faucher, F. Folliard, H. Fukuhara e J.-F. Mayaux. (1991) High level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1b in *Kluyveromyces lactis*. *Gene* **107**:285-295.
- Fleer, R., P. Yeh, I. Maury, N. Amellal, A. Fournier, F. Bacchetta, P. Baduel, G. Jung, H. L'Hôte, J. Becquart, H. Fukuhara e J.-F. Mayaux. (1991) Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serumalbumin in *Kluyveromyces yeasts*. *Bio/Tech* **9**:968-975.
- Fossati, P., M. Ponti, P. Paris, G. Berti e G. Tarenghi. (1992) Kinetic colorimetric assay of lipase in serum. *Clin Chem* **38**:211-215.
- Fournier, P., L. Guyaneux, M. Chasles e C. Gaillardin. (1991) Scarcity of ars sequences isolated in a morphogenesis mutant of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **7**:25-36.

- Franke, A. E., F. S. Kaczmarek, M. E. Eisenhard, K. F. Geoghegan, D. E. Danley, Z. J. R. De, M. M. O'Donnell, M. G. J. Gollaher e L. S. Davidow. (1988) Expression and secretion of bovine prochymosin in *Yarrowia lipolytica*. *Dev Ind Microbiol* **29**:43-47.
- Freedman, R. B. (1989) Protein disulphide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* **57**:1069-1072.
- Fukui, K., F. Watanabe, T. Shibata e Y. Miyake. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding porcine kidney D-aminoacid oxidase. *Biochemistry* **26**:3612-3618.
- Fukumoto, J., M. Iwai e Y. Tsujisaka. (1963) *J Gen Appl Microbiol* **9**:353.
- Fukumoto, J., M. Iwai e Y. Tsujisaka. (1964) *J Gen Appl Microbiol* **10**:257.
- Gaillardin, C. e H. Heslot. (1988) Genetic engineering in *Yarrowia lipolytica*. *J Basic Microbiol* **28**:161-174.
- García S. (1999). Resistencia al cobre en *Yarrowia lipolytica*: utilización de los promotores de los gene MTP para la expresión heteróloga de proteínas. *Tesis Doctoral*. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.
- Ge, K., D. H. Liu, K. Chen, L. H. Nie e S. H. Yao. (1996) Determination of lipase activity in porcine pancreas and clinical analysis of lipase in human serum with surface acoustic wave enzyme sensor system. *Fresenius J Anal Chem* **354**:118-121.
- Gellisen, G., Z. J. Janowicz, A. Merckelbach, M. Piontek, P. Keup, U. Weydemann, C. P. Hollenberg e W. M. Strasser. (1991) Heterologous gene expression in *Hansenula polymorpha*: Efficient secretion of glucoamylase. *Bio/Tech* **9**:291-295.
- Gething, M. J. e S., J. (1992) Protein folging in the cell. *Nature* **355**:33-45.
- Gilbert, E. J. (1993) *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb Technol* **15**:634-45.
- Golub, E. (1988) "One-minute" transformation of competent *Escherichia coli* by plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **16**:1641.
- Gomi, K., Ota, Y., e Minoda, Y. (1986) *Agrc. Biol. Chem.* **48**: 1061-1062.
- González-Ramos F.J. (1997) Aislamiento y caracterización de dos genes que codifican para enzimas enantioselectivas de interés industrial: lipasa de *Y. lipolytica* y D-aminoácido oxidasa de *Trigonopsis variabilis*. *Tesis Doctoral*. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca
- Goto M., Noda S., Katmiya N., Nakaashio F. (1996). Enzymatic resolution of racemic isoprofen by surfactant coated lipase in organic media. *Biotechnol. Lett.* **18**:839:844.
- Gradillas, A., C. Delcampo, J. V. Sinisterra e E. F. Llama. (1996) Alteration of the reaction rate in the esterification of (r,s) ibuprofen by addition of crown ether or porphyrin. *Biotech Lett* **18**:85-90.
- Greenblatt, J. (1991) Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell* **66**:1067-1070.

- Grochulski, P., F. Bouthillier, R. J. Kazlauskas, A. N. Serreqi, J. D. Schrag, E. Ziomek e M. Cygler. (1994) Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry* **33**:3494-3500.
- Grochulski, P., L. Yunge, J. D. Schrag e M. Cygler. (1994) Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Prot Sci* **3**:82-91.
- Guarente, L. (1984) Yeast promoters: positive and negative elements. *Cell* **36**:799-800.
- Haalck, L., Kallabis, B., Schoemaker, M., Cammann, K. e spener, F. (1991) Lipases for biosensors. *Fat Sci. Technol.* **93**: 415-416.
- Haguenaer-Tsapis, R. e A. Hinnen. (1984) A deletion that includes the signal peptidase cleavage site impairs processing, glycosylation and secretion of cell surface yeast acid phosphatase. *Mol Cell Biol* **4**:2668-2675.
- Hamilton, R., C. K. Watanabe e H. A. DeBoer. (1987) Compilation and comparison of the sequence context around the AUG start codons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *NuclAcidsRes* **15**:3581.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
- Heijne, G. (1983) On the hydrophobic nature of signal sequences. *Eur J Biochem* **116**:419-422.
- Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**:351-359.
- Henkin, T. M. (1996) Control of transcription termination in prokaryotes. *Ann Rev Genet* **30**:35-57.
- Heslot, H., J.-M. Nicaud, E. Fabre, J.-M. Beckerich, P. Fournier e C. Gaillardin. (1990) Cloning of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica* and its use to express foreign genes, p. 27-45. *En: B. H. Nga y Y. K. Lee* (ed.), *Microbiology Applications in Food Biotechnology*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Hide, W. A., L. Chan e W. H. Li. (1992) Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* **33**:167-78.
- Higgins, D. G. e P. M. Sharp. (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene* **73**:237-244..
- Hinnen, A., B. Meyhack e J. Heim. (1989) Heterologous gene expression in yeast, p. 193-213. *En: P. J. Barr, A. J. Brake y P. Valenzuela* (ed.), *Yeast Genetic Engineering*. Butterworths.
- Holmes, D. e M. Quigley. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**:193-197.
- Holmquist, M., M. Martinelle, P. Berglund, I. G. Clausen, S. Patkar, A. Svendsen e K. Hult. (1993) Lipases from *Rhizomucor miehei* and *Humicola lanuginosa*: Modification of the lidcovering the active site alters enantioselectivity. *J Protein Chem* **12**:749-757.

Holmquist, M., M. Martinelle, I. G. Clausen, S. Patkar, A. Svendsen e K. Hult. (1994) Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase is important for efficient hydrolysis of tributyrin. *Lipids* **29**:599-603.

Holmquist, M., M. Norin e K. Hult. (1993) The role of arginines in stabilizing the active open-lid conformation of *Rhizomucor miehei* lipase. *Lipids* **28**:721-726.

Horwitz, A. H., C. P. Chang, M. Better, K. E. Hellstrom e R. R. Robinson. (1988) Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:8678-8682.

Huang, K. S. e C. C. Akoh. (1996) Enzymatic synthesis of structured lipids: transesterification of triolein and caprylic acid ethyl ester. *JAOCS* **73**:245-250.

Hubbard, S. C. y R. J. Ivatt. (1981) Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann Rev Biochem* **153**:555-583.

Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky e T. J. White. (1990) PCR protocols. *Em: M. A. Innis* (ed.). Academic Press, New York.

Innis, M. A., M. J. Holland, P. C. McCabe, G. E. Cole, V. P. Wittman, R. Tal, K. W. K. Watt, D. H. Gelfand, J. P. Holland e J. H. Meade. (1985) Expression, glycosylation and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **228**:21-26.

Isogai, T., H. Ono e H. Kojo. (1990) Patente número EP 0 364 275 A2. *European Patent Application*

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. e Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**:163-168.

Jachmanian, I., E. Schulte e K. D. Mukherjee. (1996) Substrate selectivity in esterification of less common fatty acids catalysed by lipases from different sources. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**:563-567.

Jacobs, M. F., J. B. Andersen, T. V. Borchert e V. P. Kontinen. (1995) Identification of a *Bacillus subtilis* secretion mutant using a beta-galactosidase screening procedure. *Microbiology* **141**:1771-1779.

Jaeger, K.-E. e S. Wohlfarth. (1993) Bacterial lipases: biochemistry, molecular genetics and applications in biotechnology. *Bioengineering* **9**:39-46.

Jaeger, K. E., S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, H. M. Van e O. Misset. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**:29-63.

Jaeger, K. E., S. Ransac, H. B. Koch, F. Ferrato e B. W. Dijkstra. (1993) Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **332**:1-2.

Johnston, M. (1987) A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **51**:458-476.

Jwanny, E. W., M. M. Rashad, K. I. Fayek e A. H. M. Ghazy. (1982) Carbohydrates from hydrocarbons. V. Substrate effect on type of polysaccharides produced by *Candida lipolytica* (Strain 4124). *Res Bull Ain Shams* **11**:35-39.

- Kalle, G. P., S. V. Gadkari e S. Y. Deshpande. (1972) Inductibility of lipase in *Candida lipolytica*. *Indian J Biochem Biophys* 9:171-175.
- Kamal A., Rao M.V. (1994). Enzyme catalyzed synthesis of (S) propanolamines. *Tetrahedron Asymmetry* 5:1881-1882.
- Kanerva, L. T., J. Vihanto, M. H. Halme, J. M. Loponen e E. K. Euranto. (1990) Solvent effects in lipase-catalysed transesterification reactions. *Acta Chem Scand* 44:1032-5.
- Karl-Erich, J. and Reetz, M., t. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Tibtech* 16:396-403
- Kato, K., Katayama, M., Fugii, S., Fukaya, H. Kimoto, H. (1996). Optical resolution of 2,2-trifluoro-1-(9-phenatryl) ethano via enzymatic hydrolysis of its activated ester. *J. Ferment. Bioeng.* 81:206-211.
- Kawasaki, L., A. Farres e J. Aguirre. (1995) *Aspergillus nidulans* mutants affected in acetate metabolism isolated as lipid nonutilizers. *Exp Mycol* 19:81-85.
- Khan, I. M., C. W. Dill, R. C. Chandan e K. M. Shahani. (1967) *Biochim Biophys Acta* 132:68.
- Kiefhaber, T., R. Rudolph, H.-H. Kohler e J. Buchner. (1991) Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of kinetic competition between folding and aggregation. *Bio/Tech* 9:825-829.
- Kolling, R., B. Bottner e C. P. Hollenberg. (1993) Synthesis and farnesylation of α -factor fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 336:129-32.
- Kos, W., A. J. Kal, W. S. van e H. F. Tabak. (1995) Expression of genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by different circuits of transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* 1264:79-86.
- Kottwitz, B., upadek, H. e Carrer, G. (1994). Application and benefits of enzymes in detergents. *Chim. Oggi* 12:21-24.
- Kouker, G. e K.-E. Jaeger. (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol* 53:211-213.
- Kozak, M. (1986) Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell* 44:283-292.
- Kramer, R. A., T. M. DeChiara, M. D. Schaber e S. Hilliker. (1984) Regulated expression of a human interferon gene in yeast: control by phosphate concentration or temperature. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:367-370.
- Kurtzman, C. P., H. J. Phaff e S. A. Meyer. (1983) Nucleic acid relatedness among yeasts. *En: J. F. T. Spencer, D. M. Spencer y A. R. W. Smith (ed.)*, Yeast Genetics. Springer-Verlag, Nueva York.
- Kushner, S. (1988) An improved method for transformation of *Escherichia coli* with *colEI* derived plasmid, p. 17-24. *En: H. Boyer, Nicosia, S. (ed.)*, Genetic engineering. Elsevier, Amsterdam.

- Kyte, J. e R. Doolittle. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Biol Chem* **157**:105-132.
- Larriba, G. (1993) Translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum: a place for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**:441-463.
- Lalonde J. (1995). The preparation of homochiral drugs and peptides using cross-linked enzyme crystals. *Chim.Oggi* **13**:33-37.
- Langrand G., Rondot N., Triantaphides C., Baratti S. (1990). Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. *Biotechnol. Lett.* **12**:581-586.
- Latchman, A.D. (1992) Transcription factor, a practical approach. IRL Press.
- Lazarow P.B., Fujiki Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **1**:489-530.
- Longhi, S., F. Fusetti, R. Grandori, M. Lotti, M. Vanoni e L. Alberghina. (1992) Cloning and nucleotide sequences of two lipase genes from *Candida cylindracea*. *Biochim Biophys Acta* **1131**:227-232.
- Longhi, S., M. Lotti, F. Fusetti, E. Pizzi, A. Tramontano e L. Alberghina. (1992) Homology-derived three-dimensional structure prediction of *Candida cylindracea* lipase. *Biochim Biophys Acta* **1165**:129-33.
- Lopez, M. C. e Domínguez A. (1988). Purification and propertiss of a glycoprotein acid phosfatase from the yeast form of *Yarrowia lipolytica*. *J. Basic Microbiol.* **28**:249-262
- Lopez, M. C., J. M. Nicaud, H. B. Skinner, C. Vergnolle, J. C. Kader, V. A. Bankaitis e C. Gaillardin. (1994) A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form. *J Cell Biol* **124**:113-127.
- López, S., F. Valero e C. Solá. (1996) Strategies in lipase production by immobilized *Candida rugosa* cells. *Appl Biochem Biotech* **59**:15-23.
- Lotti, M., R. Grandori, F. Fusetti, S. Longhi, S. Brocca, A. Tramontano e L. Alberghina. (1993) Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene* **124**:45-55.
- Luehrsen, K. R., S. Taha e V. Walbot. (1995) Nuclear pre-mRNA processing in higher plants. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **47**:12-14.
- Malcas, E. e J. D. Friesen. (1990) A sequence pattern that occurs at the transcription initiation region of yeast RNA polymerase II promoters. *Nucl Acids Res* **18**:3387-3393.
- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G., Jr. e Amundson, C.H. (1990) Immoobilized lipase reactors of fats and oils- A review. *J. Am. Oil. Chem. Soc* **67**:890-910.
- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G., Jr. e Amundson, C.H. (1992) Use of lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butteroil. *Biotech. Bioeng.* **39**: 984-1001.
- Malek, I. (1968) Production of SCP from hidrocarbons, p. 268. *Em: R. I. Metals e S. R. Tannenbaum* (ed.), Single Cell Protein. MIT Press, Cambridge.

- Maniatis, T., Fritsch, E. e Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. *Em: J. Sambrook* (ed.). Cold Spring Harbor, New York.
- Margolin, A. L. (1993) Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme Microb Technol* 15:266-280.
- Martín, J. C., J. F. Bello, F. J. Burguillo e M. G. Roig. (1994) Kinetic behaviour and reaction mechanism of the hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in mixed micelles with Triton X-100 catalyzed by lipase from *Candida rugosa*. *J Mol Catal* 93:37-52.
- Matoba, S., J. Fukayama, R. A. Wing e D. M. Ogrydziak. (1988) Intracellular precursors and secretion of alkaline extracellular protease of *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* 18:4904-4916.
- Mattevi, A., M. A. Vanoni, F. Todone, M. Rizzi, A. Teplyakov, A. Coda, M. Bolognesi e B. Curti. (1996) Crystal structure of d amino acid oxidase: a case of active site mirror image convergent evolution with flavocytochrome b(2). *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7496-7501.
- Mattey, M. e Adoga, G. (1991) low molecular thermostable enzymes. *Enzyme Microb. technol.* 13:525
- Mattey, M. e D. Morgan. (1978) Secretion of extracellular lipases by *Candida lipolytica*, p. 426-428. *Em: (ed.)*, 573rd meeting, Hull. Bioch. Soc. Trans.
- Maverrsborg S., Boehmer A., Schunck W-H., Muller H-G. (1991). Cytochrome P450 of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Abstr. Int. Symp. On cytochrome of microorganisms*, Berlin pag 63.
- Medda, S. y R. L. Proia. (1992) The carboxylesterase family exhibits C-terminal sequence diversity reflecting the presence or absence of endoplasmic-reticulum-retention sequences. *Eur J Biochem* 206:801-6.
- Micanovic, R., L. D. Gerber, J. Berger, K. Kodukula e S. Udenfriend. (1990) Selectivity of the cleavage/attachment site of phosphatidylinositol-glycan-anchored membrane proteins determined by site-specific mutagenesis at Asp-484 of placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci* 87:157-161.
- Miles, R. J., E. L. T. Siu, C. Carrington, A. C. Richardson, B. V. Smith e R. G. Price. (1992) The detection of lipase activity in bacteria using novel chromogenic substrates. *FEMS Microbiol Lett* 90:283-288.
- Mitsubishi Elec. (1990). Blood analysis using enzyme electrode biosenser. Patente Japonesa; J02145968.
- Miyamoto A., Shigeta A., Tanaka Y. (1995). PN:EP;65 8626.
- Montesinos, J. L., N. Obradors, M. A. Gordillo, F. Valero, J. Lafuente e C. Sola. (1996) Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. *Appl Biochem Biotech* 59:25-37.
- Morín, M. R. (2000) Caracterización enzimática y molecular de dos lipasas produzidas por la levedura *Yarrowia lipolytica*. *Tesina*, Dep. de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.
- Morrissey, J.H. (1981) *Anal. Biochem.* 117:307-310.

- Muderhwa, J. M. e R. Ratomahenina. (1985) Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron And Guerra. *JAOCS* **62**:1031-1036.
- Muller S., Sandal T., Kamp-hasen P., Dalboge M.(1998) Comparison of expression systems in yeast: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorfa*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizoscharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**: 1268-1283.
- Mullins, C., H. A. Meyer, E. Hartmann, N. Green e H. Fang. (1996) Structurally related spc1p and spc2p of yeast signal peptidase complex are functionally distinct. *J Biol Chem* **271**:29094-29099.
- Murzin, A. G., S. E. Brenner, T. Hubbard e C. Chothia. (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* **247**:536-540.
- Nakamura, Y.(1997)CodonUsageDatabase:<http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html>
. Kazusa DNA research institute. Nakamura, Y.
- Nakamura, Y., T. Gojobori e T. Ikemura. (1997) Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases. *Nucleic Ac Res* **25**:244-245.
- Nakano H.; Okugama Y., Iwasa K., Hongo H. (1994). A facile lipase catalyzed resolution of 2-azabicyclo(2.2.1)hept-5- en-3-ones. *Tetrahedron assymetry* **5**:1155-1156.
- Nascimento, A. E. e T. G. Campos. (1994) Effect of sodium dodecyl sulfato on lipase of *Candida lipolytica*. *Appl Biochem Biotechnol* **49**:93-99.
- Nashif, S. A., e F. E. Nelson. 1953. *J. Dairy Sci.* **36**:459
- Ng, D., J. D. Brown e P. Walter. (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**:269-278.
- Nga, B. H., B. F. D. Abu, G. H. Loh, L. L. Chiu, S. Harashima, Y. Oshima e H. Heslot. (1992) Intergeneric hybrids between *Saccharomycopsis fibuligera* and *Yarrowia lipolytica*. *J Gen Microbiol* **138**:223-227.
- Nga, B. H., C. M. Gaillardin, P. Fournier e H. Heslot. (1989) Genetic analysis of lipase low-producing mutants of *Yarrowia lipolytica*. *J Gen Microbiol* **135**:2439-2443.
- Nga, B. H., H. Heslot, C. M. Gaillardin, P. Fournier, K. Chan, Y. N. Chan, E. W. Lim e P. C. Nai. (1988) Use of nystatin for selection of tributyrin non-utilising mutants in *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* **7**:83-86.
- Nicaud J.M., Fabre E. e Gaillardin C. (1989). Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr. Genet.* **16**:253-260.
- Nicaud, J. M., E. Fabre, J. M. Beckerich, P. Fournier e C. Gaillardin. (1989) Cloning, sequencing and amplification of the alkaline extracellular protease (XPR2) gene of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* **39**:285-297.
- Nicaud, J. M., E. Fabre e C. Gaillardin. (1989) Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr Genet* **16**:253-260.

- Nicaud, J. M., P. Fournier, B. C. La, M. Chasles e C. Gaillardin. (1991) Use of *ars18* based vectors to increase protein production in *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* **19**:259-270.
- Norin, M., F. Haeffner, A. Achour, T. Norin e K. Hult. (1994) Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, and *Candida rugosa*. *Protein Sci* **3**:1493-503.
- Novotny, C. (1994) Solubilization of extracellular lipase of *Yarrowia lipolytica*. 7th international congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division Praga.
- Novotny, C., L. Dolezalova e J. Lieblová. (1994) Dimorphic growth and lipase production in lipolytic yeasts. *Folia Microbiol Praha* **39**:71-73.
- Ogrydziak, D. M., J. Bassel, R. Contopoulou e R. Mortimer. (1978) Development of genetic techniques and the genetic map of the yeast *Saccharomyces lipolytica*. *Molec Gen Genet* **163**:229-239.
- Ogrydziak, D. M. e S. J. Scharff. (1982) Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomyces lipolytica* CX161-B. *J Gen Microbiol* **128**:1225-1234.
- Okkels, J. S. (1995) Protein engineering of microbial lipases with industrial interest. *Em: F.X. Malcata*(ed.), Engineering of (with) lipases. Escola Superior de Biotecnologia. Universidade Catolica Portuguesa. Porto. Portugal, NATO Advanced Study Institute. Porto (Portugal).
- Oliver, S. G. e J. R. Warmington. (1989) Transcription, p. 117-152. *En: A. H. Rose y J. R. Harrison* (ed.), In the yeast. Academic Press, London.
- Osaka Fugii Jin. (1995). Pack base agent utilizing extration residue of plant ash and its preparation. Patente Japonesa;07082136.
- Osborne, B. I. e L. Guarente. (1989) Mutational analysis of a yeast transcriptional terminator. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:4097-4101.
- Osumi, T., T. Tsukamoto e S. Hata. (1992) Signal peptide for peroxisomal targeting: replacement of an essential histidine residue by certain amino acids converts the amino-terminal presequence of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase to a mitochondrial signal peptide. *Biochem Biophys Res Commun* **186**:811-818.
- Ota, Y., K. Gomi, S. Kato, T. Sugiura e Y. Minoda. (1982) Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomyces lipolytica*. *Agric Biol Chem* **46**:2885-2893.
- Ota, Y., Y. Morimoto, T. Sugiura e Y. Minoda. (1978) Soybean fraction increasing the extracellular lipase production by *Saccharomyces lipolytica* (*Candida paralipolytica*). *Agric Biol Chem* **42**:1937-1938.
- Otero, C., A. Ballesteros e J. M. Guisan. (1988) Immobilization/stabilization of lipase from *Candida rugosa*. *Appl Biochem Biotechnol* **19**:163-75.
- Otero, C., E. Pastor, V. M. Fernandez e A. Ballesteros. (1990) Influence of the support on the reaction course of tributyrin hydrolysis catalyzed by soluble and immobilized lipases. *Appl Biochem Biotechnol* **23**:237-247.
- Ozegowski, R., Kunath, A. e Schick, H. (1993) *Tetrahedron-Asymmetry* **4**:695-698.

- Palomer, A., Cabré, M., Ginesta, J., Mwuleón e Carganico, G. (1993). Resolution of rac-Ketoprofen esters by enzymatic reactions in organic media. *Chirality*. **5**:320-328
- Parida, S e Dordick, J. S. (1991) Substrate structure and solvent hydrophobicity control lipase catalysis and enantioselectivity in organic media. *J. Am. Chem. Soc.* **113**:2253-2259
- Pearson, B. M., L. J. Fuller, e R. A. McKee. 1990. Biosynthesis of biotin vitamers by *Yarrowia lipolytica*. Lett Appl Microbiol. Oxford : Blackwell Scientific Publications. Feb 89-91.
- Pearson, B. M., D. A. MacKenzie, e M. H. J. Keenan. 1986. Production of biotin by yeasts. Lett. Appl. Microbiol. **2**:25-28.
- Pearson, W. e L., D. 1988. Improved tools for biological sequence analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **85**:2444-2448.
- Percival-Smith, A. e J. Segall. (1984) Isolation of DNA sequences preferentially expressed during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **4**:142-150.
- Perez Campo, F. M., J. M. Nicaud, C. Gaillardin e A. Dominguez. (1996) Cloning and sequencing of the *LYS1* gene encoding homocitrate synthase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **12**:1459-1469.
- Perotti, M. E., L. Pollegioni e M. S. Pilone. (1991) Expression of D-aminoacid oxidase in *Rhodotorula gracilis* under induction conditions: a biochemical and cytochemical study. *Eur J Cell Biol* **55**:104-113.
- Peters, I.I., e F.E. Nelson (1948) Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula lipolytica*. *J Bacteriol.* **55**: 593-600
- Pignède, G., Wang, H., Fudalej, F. e Gaillardin, C. (2000) Characterization of an Extracellular Lipase Ecoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology* **182**: 2802-2810
- Pilone, M., M. A. Vanoni, and P. Casalín. 1993. Purification and properties of D-aminoacid oxidase, an inducible flavoenzyme from *Rhodotorula gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **914**:136-142
- Plou, F. J., M. Barandiaran, M. V. Calvo, A. Ballesteros e E. Pastor. (1996) High yield production of mono and di oleylglycerol by lipase catalyzed hydrolysis of triolein. *Enz Microb Tech* **18**:66-71.
- Pobjecky, N., Rosenberg, G. H., Dinter-Gottlieb, G. e Kaufer, N. F. (1990) Expression of the b-glucuronidase gene under the control of the CaMV 35S promoter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molec Gen Genet* **220**:314-316.
- Polgar, L. (1992) Structural relationship between lipases and peptidases of the prolyl oligopeptidase family. *FEBS Lett* **311**:281-284.
- Prado González, M. (1994) Análisis de la sensibilidad al Cobre de *Yarrowia lipolytica*. Clonación y caracterización estructural de los genes *CRF1*, *MTP1* y *MTP2*. Departamento de Microbiología y Genética, Tesis doctoral, Universidad de Salamanca. Salamanca
- Price, V. L., W. E. Taylor, A. Clevenger, M. Worthington e E. T. Young. (1990) Expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* using *ADH2* promoter. *Meth Enzymol* **185**:308-318.

- Purvis, I. J., D. Chotai, C. W. Dykes, D. B. Lubahn, F. S. French, E. M. Wilson e A. N. Hobden. (1991) An androgen-inducible expression system for *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 106:35-42.
- Pustell, T. e F. Kafatos. (1982) A high speed, high capacity similarity matrix: zooming through SV40 and polyoma. *Nucl Acid Res* 10:4765-4782.
- Rademacher, T. W., R. B. Parekh e R. A. Dwek. (1988) Glycobiology. *Ann Rev Biochem* 57:785-838.
- Ramakrishnan, C. V. e B. N. Banerjee. (1952) *Arch Biochem Biophys* 37:131.
- Rawlyer, A. e P. A. Siegenthaler. (1989) A single and continuous spectrophotometric assay for various lipolytic enzymes, using natural, non-labeled lipid substrates. *Biochim Biophys Acta* 1004:337-344.
- Redondo, O., A. Herrero, J. F. Bello, M. G. Roig, M. V. Calvo, F. J. Plou e F. J. Burguillo. (1994) Comparative kinetic study of lipases A and B from *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid p-nitrophenyl esters in mixed micelles with Triton X-100. *Biochim Biophys Acta* 1243:15-24.
- Roberts, S. M., N. J. Turner, A. J. Willets e M. K. Turner. (1995) Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms. *Em: S. M. Roberts e N. J. Turner (ed.)*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Roca, H., B. Garcia, E. Rodriguez, D. Mateu, L. Coroas, J. Cremata, R. Garcia, T. Pons e J. Delgado. (1996) Cloning of the *Penicillium minioluteum* gene encoding dextranase and its expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* 12:1187-1200.
- Romanos, M. A., C. A. Sorer e J. J. Clare. (1992) Foreign gene expression in yeast: A review. *Yeast* 8:423-488.
- Rosenberg, S., D. Coit e P. Tekamp-Olson. (1990) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-derived expression cassettes for constitutive synthesis of heterologous proteins. *Meth Enzymol* 185:341-351.
- Rossolini, F. M., M. L. Riccio, E. Gallo e C. L. Galeotti. (1992) *Kluyveromyces lactis* rDNA as a target for multiple integration by homologous recombination. *Gene* 119:75-81.
- Rost, B. e C. Sander. (1993) Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc Natl Acad Sci Usa* 90:7558-7562.
- Rost, B. e C. Sander. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* 232:584-599.
- Rost, B. e C. Sander. (1994) Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins* 19:55-72.
- Rottensteiner, H., A. J. Kal, M. Filipits, M. Binder, B. Hamilton, H. F. Tabak, and H. Ruis. 1996. Pip2p: a transcriptional regulator of peroxisome proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 15:2924-34.

- Rua, L., M. Diaz, V. Fernandez, C. Otero e A. Ballesteros. (1993) Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim Biophys Acta* 1156:181-9.
- Ruschen, S. e U. K. Winkler. (1982) Stimulation of extracellular lipase activity of *Saccharomycopsis lipolytica* by hyaluronate. *FEMS Microbiol Lett* 14:177-121.
- Safarik, I. (1991) A spectrophotometric assay for lipase activity utilizing immobilized triacylglycerols. *J Biochem Biophys Methods* 23:249-253.
- Samad, M. Y. A., C. N. A. Razak, A. B. Salleh, W. M. Zin Wan Yunus, K. Ampon e M. Basri. (1989) A plate assay for primary screening of lipase activity. *J Microbiol Methods* 9:51-56.
- Sambrook, J., E. Fritsch e T. Maniatis. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *En: J. Sambrook* (ed.). Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez, E. M., J. F. Bello, M. Roig, F. J. Burguillo, J. M. Moreno e J. V. Sinisterra. (1996) Kinetic and enantioselective behaviour of the lipase from *Candida cylindracea*: a comparative study between the soluble enzyme and the enzyme immobilized on agarose and silica gels. *Enzm Microb Technol* 18:468-476.
- Sánchez, M. (1996) Estudio de la ruta de secreción en *Yarrowia lipolytica*: Aislamiento y caracterización del gen *SEC65*, un componente de la partícula de reconocimiento de la señal. *Tesis doctoral*, Universidad de Salamanca.
- Sánchez, M., M. Prado, F. J. Iglesias e A. Domínguez. (1995) Cloning and sequencing of the *URA5* gene from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 11:425-433.
- Sanger, F., S. Nicklen e A. Coulson. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 74:5463-5467.
- Sarda, L. e Desnuelle, P. (1958) *Biochim Biophys Acta* 30:513-521
- Screekrishna R., Kropp K. (1996). In Wolf K (ed) Non.conventional yeast in biotechnology. Berlin Springer-Verlag pp203-252.
- Schein, C. H. e M. H. M. Noteborn. (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Tech* 6:291-294.
- Schena, M., D. Picard e K. Yamamoto. (1991) Vectors for constitutive and inducible gene expression in yeast. *Meth Enzymol* 194:389-398.
- Schrader, T. e J. R. Andreesen. (1996) Properties and chemical modification of d amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Arch Microbiol* 165:41-47.
- Schrag, J. D. y M. Cygler. (1993) 1.8 Å refined structure of the lipase from *Geotrichum candidum*. *J Mol Biol* 230:575-591.
- Schrag, J. D., Y. Li, S. Wu e M. Cygler. (1991) Multiple crystal forms of lipases from *Geotrichum candidum*. *J Mol Biol* 220:541-543.
- Schrag, J. D., Y. Li, S. Wu e M. Cygler. (1991) Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* 351:761-764.

- Schultz, L. D., J. Tanner, K. J. Hofmann, E. A. Emini, J. H. Condra, R. E. Jones, E. Kieff e R. W. Ellis. (1987) Expression and secretion in yeast of a 400-KDa envelope glycoprotein derived from *Epstein-Barr* virus. *Gene* **54**:113-123.
- Shimada, Y., A. Sugihara, T. Iizumi e Y. Tominaga. (1990) cDNA cloning and characterization of *Geotrichum candidum* lipase II. *J Biochem Tokyo* **107**:703-707.
- Shimada, Y., A. Sugihara, Y. Tominaga, T. Iizumi e S. Tsunasawa. (1989) cDNA molecular cloning of *Geotrichum candidum* lipase. *J Biochem, Tokyo* **106**:383-388.
- Shimada, Y., A. Sugihara e Y. Tominaga. (1990) Comparative study on primary structures of two lipases from *Geotrichum candidum*, p. 237-241. *Em: L. Alberghina, R. D. Schmid e R. Verger* (ed.), *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, vol. **16**. VCH, New York.
- Sierra, G. (1956) A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* **5**:15-22.
- Sledziewski, A. Z., A. Bell, K. Kelsay e V. L. MacKay. (1988) Construction of temperature-regulated yeast promoters using the *MATa2* repression system. *Bio/Tech* **6**:411-416.
- Smith, T. J. (1995) MolView: a program for analyzing and displaying atomic structures on the Macintosh personal computer. *J Mol Graphics* **13**:122-125.
- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Biol Chem* **98**:503-517.
- Strasser, A. W., R. Selk, R. J. Dohmen, T. Nierman, M. Bielefeld, P. Seeboth, G. Tu e C. P. Hollenberg. (1989) Analysis of the α -amylase gene of *Schwanniomyces occidentalis* and the secretion of its gene product in transformants of different yeast genera. *Eur J Biochem* **184**:699-706.
- Stuer, W., K. E. Jaeger e U. K. Winkler. (1986) Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **168**:1070-1074.
- Sugihara, A., Y. Shimada, M. Nakamura, T. Nagao e Y. Tominaga. (1994) Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum candidum* lipases. *Protein Eng* **7**:585-588.
- Sugihara, A., Y. Shimada e Y. Tominaga. (1990) Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. *J Biochem, Tokyo* **107**:426-430.
- Svendsen, A. (1994) Sequence comparison within the lipase family, p. 1-21. *En: P. Wooley y S. B. Petersen* (ed.), *Lipases: their structure, biochemistry and application*, vol. **1**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Taipa M.A., Aires-Barros, M.R. e Cabral, J.M.S. (1992). Purification of lipases. *Biotechnol.* **26**:11-142.
- Tan, K. H. e C. O. Gill. (1985) Batch growth of *Saccharomycopsis lipolytica* on animal fats. *Appl Microbiol Biotech* **4**:292-298.
- Takahata H., Uchida Y., Ohkawa Y. e Momose T. (1993). Enzymatic resolution of N,N-dialkyl-3-hydroxy-4-pentanamides, unsuccessfull in resolution by the Katsuky-Sharpless asymmetric epoxidation. *Tetrahedron Asymmetry* **4**:1041-1042.

- Tharaud C., Ribet A-M., Costes C. e Gaillardin C. (1992). Secretion of human blood coagulation factor Xlla by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Gene* **121**:11-119.
- Theil, F., Schick H. e Winter, G. (1991). Transesterification of meso-cyclopentane diols. *Tetrahedron* **47**: 7569-7582
- TESS. (1997) TESS: Transcription Element Search Software (<http://agave.humgen.upenn.edu/tess/index.html>). CBIL. TESS. Servidor de Internet.
- Titorenko V. I. e Rachuvinski R.A. (1998). The endoplasmatic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *TIBS* **23**:230-233.
- Torres Guzmán, J.C. (1994) Aislamiento y caracterización del gene HOY1 involucrado em la transición lavedura-micélio de *Y. lipolytica*. Tesis doutoral.D¹⁰ de Microbiología y genética . Universidad de Salamanca
- Trelease, R. N., M. S. Lee, A. Banjoko e J. Bunkelmann. (1996) C terminal polypeptides are necessary and sufficient for in vivo targeting of transiently expressed proteins to peroxisomes in suspension cultured plant cells. *Protoplasma* **195**:156-167.
- Treton, B. Y., M. T. Le Dall e C. M. Gaillardin. (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* acid phosphatase mutation by a genomic sequence from the yeast *Yarrowia lipolytica* identifies a new phosphatase. *Curr Genet* **22**:345-355.
- Tronin, A., T. Dubrovsky, S. Dubrovskaya, G. Radicchi e C. Nicolini. (1996) Role of protein unfolding in monolayer formation on air water interface. *Langmuir* **12**:3272-3275.
- Tsujijsaka, Y., M. Iwai e Y. Tominaga. (1973) *Agr Biol Chem* **37**:1457.
- Tuite, M. F., Dobson, M. J., Roberts, N. A., King, R. M., Burke, D. C., Kingsman, S. M. e Kingsman, A. J. (1982) Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **1**:603-608.
- Tzuzuki, W., Kilamura, Y., Suzuki, T. e Mase T. (1999) Effects of glucose lipase activity. *Biosci Biotechnol Biochem. Agu*: **68 (8)** :1467-70.
- Upton, C. e J. T. Buckley. (1995) A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem Sci* **20**:178-179.
- Vadhera, D. V. (1974) *Lipids* **9**:158.
- van Autryve, P., R. Ratomahenina, A. Riaublanc, C. Mitrani, M. Pina, J. Graille e P. Galzy. (1991) Spectrophotometry assay of lipase activity using Rhodamine 6G. *Oleagineux* **46**:29-31.
- van den Berg, J. A., K. J. van der Laken, A. J. van Oyen, T. C. H. M. Renniers, K. Rietveld, A. Schaap, A. J. Brakes, R. J. Bishop, K. Shults, D. Moyer, M. Richman e J. R. Shuster. (1990) *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Bio/Tech* **8**:135-139.
- van der Walt, J. P. e J. A. von Arx. (1980) The yeast genus *Yarrowia* gen.nov. *Antonie van Leeuwenhoek* **46**:517-521.

- Verger, R. (1984) Pancreatic lipases, p. 83-150. *En: B. Borgström y H. L. Brockman (ed.), Lipases, vol. 1. Elsevier, Amsterdam.*
- Verger, R., M. Aoubala, F. Carriere, S. Ransac, L. Dupuis, J. Decaro, F. Ferrato, I. Douchet, R. Laugier e A. Decaro. (1996) Regulation of lumen fat digestion: enzymic aspects. *Proc Nut Soc* 55:5-18.
- Vrati, S., D. A. Mann e K. C. Reed. (1987) Alkaline Northern blots: transfer of RNA from agarose gels to Zeta-Probe membrane in dilute NaOH. *Molecular Biology Reports. Bio-Rad Laboratories* 1:1-4.
- Walton, E. F. e G. T. Yarranton. (1989) Negative regulation of gene expression by mating type., p. 43-69. *En: E. F. Walton y G. T. Yarranton (ed.), Molecular and cell biology of yeasts. Blackie and Van Nostrand Reinhold.*
- Wei, C.-J., J.-C. Huang e Y.-P. Tsai. (1989) Study on the synthesis of D-aminoacid oxidase in *Trigonopsis variabilis* in continuous culture. *Biotechnol Bioeng* 34:570-574.
- Wickerham, L. J. (1951) Taxonomy of the yeast. *Tech Bull U S Dept Agric Washington* 1029:1-56.
- Wickerham, L. J., C. P. Kurtzman e A. I. Herman. (1970) Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science* 167:1141-1144.
- Wilhelm, J. E. e R. D. Vale. (1996) A one-hybrid system for detecting RNA-protein interactions. *Genes Cells* 1:317-323.
- Wilton, D. C. (1991) A continuous fluorescence-displacement assay for triacylglycerol lipase and phospholipase C that allows the measurement of acylglycerols. *Biochem J* 276:129-133.
- Wingender, E., P. Dietze, H. Karas e R. Knueppel. (1996) TRANSFAC: A database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Res* 24:238-241.
- Wingender, E., A. E. Kel, O. V. Kel, H. Karas, T. Heinemeyer, P. Dietze, R. Knueppel, A. G. Romaschenko e N. A. Kolchanov. (1997) Transfac, trrd and compel: towards a federated database system on transcriptional regulation. *Nucleic Ac Res* 25:265-268.
- Watenham HR., Digan ME., Koutz PJ. e Cregg JM. (1997). Isolation of *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186:37-44.
- Wesolowski-louvel M. Breuning K.D. e Fukuhara M. (1996). *Kluyveromyces lactis* in : Worf k (ed) Non-conventional yeast in biotechnology. Berlin: springer-verlag pp139-201.
- Wille M.J. (1996). Hydrolysis of polyunsaturated acid triglycerides. EP:EP 714983.
- Wolnak, B. e M. Scher. (1990) Industrial use of enzymes: Technical and Economic Barriers. Bernard Wolnak & Associates, Chicago.
- Xuan, J. W., P. Fournier e C. Gaillardin. (1988) Cloning of the *LYS5* gene encoding saccharopine dehydrogenase from the yeast *Yarrowia lipolytica* by target integration. *Curr Genet* 14:15-21.
- YaDeau, J. T., C. Klein e G. Blobel. (1991) Yeast signal peptidase contains a glycoprotein and the *Sec11* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:517-521.

Yissum Res. Dev. Hebrew Univ (1991). Doped sol-gel glass. PN;EP 439318.

Zaman, Z., A. J. P. Brown e I. W. Dawes. (1992) A 3' transcriptional enhancer within the coding sequence of a yeast gene encoding the common subunit of two multienzyme complexes. *Mol Microbiol* **6**:189-195.

Zarevaika M., Rejzek M., Wimmer Z., Streinz L. e Demnerova K.(1993). Enzyme mediated hydrolysis of acetates. *Biotechnol. Lett.* **15**:1139-1144.

Zaret, K. S. e F. Sherman. (1982) DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* **28**:563-573.

Zheng, N. e L. M. Gierasch. (1996) Signal sequences: the same yet different. *Cell* **86**:849-852.

Zvyagintseva, I. S., V. V. Dimitriev, E. L. Ruben e B. A. Fikhte.(1980) *Microbiology* (USSR) (in Russian), **49**:417

