



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0615980-0 A2**

(22) Data de Depósito: 11/07/2006
(43) Data da Publicação: 31/05/2011
(RPI 2108)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/10 2006.01
C12Q 1/68 2006.01

(54) Título: **MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO STRESS NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA**

(57) Resumo: MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO STRESS NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA. Revelam-se métodos para identificação de genes que aumentam a tolerância a stress ou perturbação na levedura, lista de identificação dos genes, e o uso destes genes para melhorar a eficiência da levedura.

(30) Prioridade Unionista: 26/07/2005 IN 1977/del/2005

(73) Titular(es): Council OF Scientific & Industrial Research

(72) Inventor(es): Kallannan Ganesan, Rekha Puria, Rohini Chopra

(74) Procurador(es): Toledo Corrêa Marcas e Patentes S/C Ltda.

(86) Pedido Internacional: PCT IB2006001910 de 11/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/012934de 01/02/2007

MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA.

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção trata da melhora do fermento para uma mais forte tolerância ao estresse. Mais especificamente, trata da identificação de genes que aumentam a sobrevivência das leveduras durante a produção de etanol, e o uso de tais genes para melhorar o desempenho das linhagens de fermento.

10 CONTEXTO DA INVENÇÃO

Um fermento capaz de completar a produção de etanol sem grandes perdas em viabilidade é altamente desejado nas destilarias. No entanto, as linhagens comumente usadas em destilarias perdem a viabilidade rapidamente, devido a alta concentração de etanol encontrada durante a
15 fermentação. Além do mais, o fermento também atua em temperaturas mais elevadas (especialmente em países tropicais), o que, juntamente com o etanol, reduz a viabilidade dramaticamente. Várias abordagens foram tomadas para melhorar as linhagens de leveduras com alta tolerância a etanol e à temperatura (termotolerância). Uma abordagem é testar a levedura isolada do
20 ambiente natural para as propriedades desejadas (Banat ET AL, 1 998). Enquanto algumas linhagens possuem alta tolerância à temperatura ou ao etanol, elas podem não ter as propriedades desejadas, tais como maior osmotolerância (por exemplo, a habilidade de suportar altas concentrações de solutos como sal e açúcar), taxa de fermentação mais rápida, e ausência de
25 produtos secundários indesejáveis. Outra abordagem é começar com

linhagens que já possuem algumas das propriedades desejadas, e melhorá-las através da mutagênese e seleção para melhor sobrevivência durante a fermentação (por exemplo, Ganesan et AL, 2003, Patente Indiana # 189737). A maior limitação dessa abordagem é que a melhora é na maior parte devido à

5 mutação em um único gene. Como vários genes controlam tolerância ao estresse, modificando-se mais do que apenas um único gene de tal espécie espera-se obter tolerância muito maior do que com genes isolados. Isso será particularmente válido para a tolerância ao estresse durante a fermentação etanólica, já que as células de fermento encontram mais do que um tipo de

10 estresse sob tais condições, como alta osmolaridade, alta concentração de etanol, e alta temperatura. Portanto, se os genes que causam tolerância a esses efeitos são identificados, então eles podem ser racionalmente manejados para aumentar a tolerância ao estresse. No entanto, não é fácil identificar tais genes utilizando a genética de leveduras e as abordagens de

15 biologia molecular convencionais, por causa das seguintes razões.

A abordagem convencional para identificar genes de fermento envolvidos em qualquer processo trata primeiro de identificar os mutantes deficientes em tal processo, e os catalogar em diferentes grupos de complementação genética através de análise genética, e finalmente identificar

20 os genes utilizando ferramentas da biologia molecular de leveduras e DNA recombinante (Kaiser et al, 1994). Mutantes podem ser obtidos como mutantes espontâneos, ou induzidos por mutagênese química (Kaiser et al, 1994), por mutagênese por inserção de transposição (Ross-Macdonald et al., 1999), ou até pela introdução de reservas de ribozima (Thompson, Patente Norte-

25 Americana # 6,183,959). Uma posterior detecção de mutantes para fenótipos

desejados tipicamente envolve a manutenção de um grande número de potenciais leveduras mutantes como populações clonais (colônias) na superfície de um meio sólido não-seletivo em Placas de Petri, e os rastreando através da transferência deles para um meio sólido seletivo por replicação por placa. As colônias incapazes de crescer no meio seletivo serão identificadas, e as colônias correspondentes serão retiradas do meio não-seletivo e posteriormente caracterizadas. Esse processo de identificação é chamado de rastreamento de placa. No entanto, tal abordagem não é útil para identificar genes envolvidos na tolerância do estresse de fermentação, já que não há rastreamento de placa capaz de simular as condições encontradas pelas leveduras dentro do caldo de fermentação. Para tanto, foi desenvolvido anteriormente em nosso laboratório um método capaz de simultaneamente monitorar a movimentação de mutantes individuais de um micróbio em populações mistas presentes em caldos líquidos (Sharma et al, 2001; Sharma & Ganesan, 2003, Patente Norte-Americana #6,528,257). Por tal método, vários genes com papéis importantes na tolerância ao estresse de fermentação puderam ser identificados. Outros métodos que também facilitam o monitoramento simultâneo da movimentação de mutantes podem ser usados para esse propósito (Brown & Smith, 1997, Patente Norte-Americana #5,612,180; Smith et al, 1996; Winzeler et al, 1999).

No entanto, identificar genes através de fenótipos de mutantes tem certas limitações. Em primeiro lugar, não é fácil obter mutantes geneticamente enfraquecidos que são essenciais para crescimento e sobrevivência normais. Portanto, tais genes, que são também cruciais para alguma outra função como a tolerância ao estresse, serão despercebidos. Em

segundo lugar, muitos genes são repetidos nas leveduras, por exemplo, existe mais de um único gene provendo a mesma função ao organismo. Assim, mutando qualquer um deles não irá resultar em fenótipo discernível, e eles passarão despercebidos nos rastreamentos convencionais de mutantes. Além

5 do mais, se o propósito de identificação de genes envolvidos em um processo tal como tolerância ao estresse é em última análise melhorar o organismo, então identificar genes relevantes através de caça a mutantes não é sempre bem-sucedido. A razão é que, embora um gene possa ser importante para um processo biológico por desempenhar uma etapa essencial no processo, ele

10 pode não estar desempenhando a etapa de taxa limitadora. De tal modo, superexpressando tal gene não resultará em melhora alguma no processo. Portanto, primeiro deve-se identificar todos os genes envolvidos em um processo, e depois superexpressando-os um a um para ver se eles aprimoram o processo isso é laborioso, dispendioso em tempo, e propenso à falha. Aqui

15 nós provemos um método alternativo que supera todas as limitações acima. Além disso, nosso método também supera a limitação da falta de placas de rastreamento.

Uma outra abordagem para atribuir uma função a genes é determinar os perfis de expressão gênica utilizando microarranjos. Através dos

20 perfis de expressão genética, os níveis de expressão de quase todos os genes de um organismo são simultaneamente determinados (por exemplo, Hughes et al., 2000; Wu et al, 2001; Fabrizio et al, 2005; Vrana et al., 2003). Se um conjunto de genes é mais expressado sob uma determinada condição comparada com outra, então é assumido que tais genes possuem algum papel

25 a desempenhar sob a primeira condição. No entanto, essa assumpção não é

apoiada por estudos onde tentativas foram feitas para correlacionar a expressão de genes com os seus papéis sob uma condição ambiental particular (Giaever et al, 2002; Birrel et al., 2002). A correlação encontrada era dificilmente melhor do que o que pode ser visto por sorte e, portanto, atribuir
5 uma função a um gene baseado em níveis de expressão pode ser desorientador. Em contraste, os métodos baseados em mutação (citados acima) que atribuem funções baseados em fenótipos mutantes são muito mais confiáveis em atribuir papéis biológicos a genes. De maneira similar, métodos (discutidos abaixo) que são baseados na superexpressão deliberada de genes
10 também são confiáveis, já que eles podem também atribuir papéis biológicos a genes baseados no fenótipo do organismo.

A presente invenção envolve simultaneamente rastrear genes que através da superexpressão aprimoram nas leveduras a tolerância ao estresse. Isso é em contraste com métodos conhecidos que superexpressam um gene
15 por vez para aprimorar a tolerância ao stress; por exemplo, superexpressão do HAL1, YAK1, SOD1, SOD2 e TPS1 individualmente demonstrou aumento na tolerância a várias condições de estresse (Chen et al, 1995; Davidson et al, 1996; Gaxiola et al, 1992; Hartley et al, 1994; Soto et al, 1999). Em muitos outros casos, linhagens de leveduras foram manejadas utilizando a estratégia
20 de superexpressão de modo que estas fermentassem eficientemente substratos como amido, celobiose, lactose, xilose, etc. (Adam et al, 1995; Muslin et al, 2000; Walfridson et al, 1995). Superexpressão do GPD1 demonstrou o aumento da produção de glicerol por 1.5-2.5 vezes (Remize et al, 1999). Nós desenvolvemos nosso método para superar a limitação da falta de
25 rastreamento por placa para a tolerância ao estresse de fermentação, e

também a falta de muita compreensão sobre os genes envolvidos neste processo. Ao invés de primeiro identificar os genes envolvidos na tolerância ao estresse, e depois superexpressá-los um por um para ver se há aumento na tolerância ao estresse, em nosso método uma abordagem inovadora é tomada para diretamente identificar os genes que aprimoram a tolerância ao estresse através da superexpressão. Rastreamentos de superexpressão na escala de genoma foram suportados por outros, por exemplo, para identificar fenótipos letais ou de crescimento prejudicado (Espinet et al, 1995; Boyer et al, 2004), e para identificar genes de ciclo de célula previamente não caracterizados (Stevenson et al, 2001). Todos esses rastreamentos usufruíram da vantagem de rastreamentos em placas para identificar as propriedades desejadas do organismo. Em contraste, em nosso método, os genes que conferem a tolerância ao estresse aprimorada são identificados a partir de um pool misto de um grande número de transformantes de levedura superexpressando diferentes genes. Isso é particularmente vantajoso para identificar genes conferindo fenótipos para os quais não há rastreamento em placa, como os tolerantes ao estresse fermentativo.

RESUMO DA INVENÇÃO.

A presente invenção envolve o desenvolvimento de um método para identificação simultânea de genes que conferem fenótipos desejados, através do rastreamento de uma população mista de transformantes de leveduras. Uma coleção de plasmídeos carregando diferentes genes com os seus respectivos promotores ou sob o controle de um forte promotor são transformados em leveduras. A coleção deve ser grande o suficiente para carregar quase todos os genes de um organismo com alta probabilidade. O

pool de transformantes de levedura é então sujeitado a seleção, por exemplo, para melhor sobrevivência sob condições de fermentação. As células que sobrevivem a uma rodada de seleção são então sujeitadas a uma outra rodada de seleção. Em uma abordagem, a seleção é repetida por cerca de seis vezes.

5 Ao final, o pool de sobreviventes é esperado para ter quase todos aqueles transformantes que são capazes de sobreviver às condições de seleção bem melhor do que o pool inicial de transformantes, que podem ser confirmados através da comparação da performance entre esses dois pools. Para garantir que a sobrevivência aprimorada é devido aos genes carregados nos

10 plasmídeos, e não por causa de qualquer mutação no genoma do organismo, os plasmídeos são recuperados das leveduras, os quais são retransformados em leveduras do tipo selvagem e o fenótipo confirmado. Os genes carregados nesses plasmídeos são então identificados por métodos como seqüenciamento de DNA. Esses genes então são estudados um por um para confirmar os seus

15 pais na tolerância ao estresse. A expressão desses genes pode então ser modulada em leveduras, uma por vez, ou em combinação, para aprimorar o desempenho da levedura durante a fermentação. Em outra abordagem, o pool de transformantes de levedura é sujeito à seleção por apenas algumas rodadas. Ao final dessa seleção, esse pool estará enriquecido com aqueles

20 capazes de sobreviver melhor do que a população média, mas a sobrevivência da maioria dos transformantes será similar ao do pool inicial de transformantes. Para identificar os genes carregados pelos melhores sobreviventes, as seguintes etapas devem ser seguidas. O DNA total é isolado da população inicial de transformantes e da população selecionada. A inserção de DNA

25 carregado nos plasmídeos, do DNA total, é seletivamente amplificado utilizando

primitivos específicos para plasmídeos. Os fragmentos da inserção de DNA amplificado da população inicial de transformantes é rotulado com uma tinta fluorescente, e aquele da população selecionada, com outra tinta fluorescente. As probas de DNA rotulado são então misturadas e hibridizadas para um

5 microarranjo manchado com DNA correspondente a quase todos os genes do fermento. As manchas de DNA no microarranjo que demonstram sinal de aprimoramento para a proba correspondente à população selecionada comparada com aquela da população inicial são então identificadas. O papel desses genes é posteriormente confirmado através de experimentos adicionais

10 envolvendo superexpressão individual ou exclusão desses genes (deleção).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

De acordo, a presente invenção proporciona um método para identificar genes que, através de superexpressão, aprimoram a tolerância das leveduras ao estresse, o que compreende em,

15 -Transformar leveduras com uma coleção de genes de levedura clonadas em um plasmídeo para prover um grande número de transformantes de levedura.

-Combinação dos transformantes a fim de obter uma população inicial de transformantes

20 -Sujeitar a população de transformantes a condições de seleção de modo que a viabilidade da população celular decresça de 3 a 200 vezes, através disso enriquecendo aquelas células transformadas capazes de sobreviver melhor durante essas condições,

-Recuperar células sobreviventes e as cultivando em um meio mínimo definido que permita o crescimento apenas daquelas células que retêm plasmídeos,

5 -Sujeitar tais células a rodadas adicionais de seleção através da repetição das etapas c e d,

-Recuperar as células que sobreviveram por no mínimo três rodadas de seleção

10 -Comparar as populações de células selecionadas com a população inicial de células sob condições de seleção para confirmar a sobrevivência aprimorada das células selecionadas,

-Colocar em placas o pool selecionado de células a fim de obter colônias isoladas,

15 -Isolar o DNA de colônias individuais de leveduras e transformar em E. coli a fim de recuperar o plasmídeo presente nas colônias individuais de levedura,

-Transformar esses plasmídeos em leveduras e testar os transformantes para checar se os plasmídeos realmente conferem tolerância aprimorada sob as condições de seleção, e,

20 -Identificar os genes carregados pelos plasmídeos, que conferem a tolerância ao estresse aprimorada, por seqüenciamento.

Em uma incorporação da invenção, genes que contribuem a uma aptidão aprimorada durante a seleção são diretamente identificados utilizando hibridização de microarranjo, o que se compreende por,

-transformar leveduras com uma coleção de genes de leveduras clonadas em um plasmídeo para prover um grande número de transformantes de levedura.

5 -Fazer a combinação dos transformantes a fim de prover uma população inicial de transformantes.

-Sujeitar a população de transformantes a condições de seleção de tal modo que a viabilidade da população de células decresça de 3 a 200 vezes, através disso enriquecendo aquelas células transformadas capazes de sobreviver melhor durante essas condições,

10 --Recuperar células sobreviventes e as cultivando em um meio mínimo definido que permita o crescimento apenas daquelas células que retêm plasmídeos,

-Sujeitar tais células a rodadas adicionais de seleção através da repetição das etapas c e d,

15 -Recuperar as células que sobreviveram por no mínimo uma rodada de seleção,

- Isolar o DNA total da população inicial de transformantes e da população selecionada,

20 -Amplificar especificamente somente a inserção de DNA carregado nos plasmídeos do total de DNA utilizando primers específicas para plasmídeos,

-Rotular a inserção de fragmentos de DNA da população inicial de transformantes com uma tinta fluorescente, e aquele ta população selecionada com outra tinta fluorescente,

-Misturar e hibridizar as probas rotuladas para um microarranjo manchado com DNA correspondente a quase todos os genes da levedura.

-Identificar as manchas de DNA no microarranjo que demonstram sinais aprimorados para a proba correspondente P com a população
5 selecionada comparada com aquela da população inicial e,

-Identificar genes que correspondem a essas manchas de DNA como aqueles que aumentam a tolerância ao estresse da levedura durante a seleção.

Em outra incorporação da invenção; leveduras são transformadas
10 com uma coleção de genes de organismos que já são tolerantes ao estresse particular.

E ainda em outra incorporação da invenção, plasmídeos carregando genes altamente enriquecidos durante a seleção podem ser diretamente isolados a partir de coleção por hibridização de colônia.

15 Em ainda outra incorporação da invenção, a tolerância ao estresse das leveduras é melhorada através da transformação com plasmídeos que superexpressam os genes identificados acima.

Em ainda outra incorporação da invenção, o plasmídeo é um plasmídeo de expressão com um promotor indutível.

20 E em ainda outra incorporação da invenção, a tolerância ao estresse das leveduras é aprimorada através da modulação do nível de expressão dos genes identificados acima, através da substituição do promotor do gene alvo presente no genoma da levedura com um promotor constitutivo ou indutível.

Em ainda outra incorporação da invenção, genes selecionados de um grupo consistindo de RPI1, WSC2, WSC4, YIL055C, SRA1, SSK2, ECM39, MKT1, SOL1, e ADE16 são superexpressados singularmente ou em combinação para aprimorar a tolerância ao estresse.

5 Em ainda outra incorporação da invenção, mais de um gene pode ser simultaneamente superexpressado na mesma linhagem para posteriormente melhorar a resistência ao estresse.

Em ainda outra incorporação da invenção, o estresse é aquele encontrado por leveduras sob condições de produção de álcool, particularmente em altas temperaturas.

Em ainda outra incorporação da invenção, glucose é utilizada como matéria-prima para a produção de álcool.

Em ainda outra incorporação da invenção, sucrose ou melaço o qualquer outra fonte complexa de carbono é utilizada como matéria-prima para a produção de álcool.

Em ainda outra incorporação da invenção, o organismo é uma linhagem de levedura de laboratório.

Em ainda outra incorporação da invenção, o organismo é uma linhagem de levedura industrial.

20 Em ainda outra incorporação da invenção, o organismo é qualquer microorganismo que necessita de aprimoramento na tolerância ao estresse.

Em ainda outra incorporação da invenção, o estresse é qualquer condição adversa encontrada por microorganismos em indústrias.

O processo da presente invenção é ilustrada nos exemplos dados abaixo, que não devem, no entanto, constituir um limite do escopo da presente invenção.

EXEMPLO 1

5 Detecção de coleções de expressão genômica para genes que aprimoram tolerância ao estresse. A coleção genômica do DNA de leveduras feita sobre o controle de um promotor constituinte ADH1 (Dehidrogenase de álcool 1), em um plasmídeo centromérico com URA3 como marcador de seleção foi obtido de uma coleção de Cultura do tipo Americano (CCTA). A
10 linhagem de levedura FY3 (Winston et al., 1995), obtida de Fred Winston (Departamento de Genética, Harvard Medical School, Boston, MA, 02115, EUA) foi utilizada para todas as transformações. Os plasmídeos dessa coleção foram transformados em linhagens FY3 por protocolo de transformação padrão (Kaiser et al, 1994). Transformantes ($\sim 10^5$) foram colocados em pool juntos e
15 submetidos a 6 rodadas de fermentação a 30° C. O tempo de colheita e transferência para as sucessivas rodadas foi feito com alvo em mente de matar 90% das células. Em banho no meio mínimo ao fim de cada rodada revelou que aproximadamente 50% das células perderam seu plasmídeo. Depois de repetidas rodadas de fermentação ambas as populações foram tratadas
20 separadamente.

Resultados de seleção a 38°: Da população selecionada, plasmídeos foram tirados por protocolos padrão e transformados em E. coli JM109. Plasmídeos foram purificados dos transformantes por métodos tradicionais (Sambrook et al, 1989) e digeridos com a enzima de restrição
25 Xho1. Plasmídeos demonstrando padrões de digestão similares foram

posteriormente digeridos com um conjunto de duas ou três enzimas (XhoI, XbaI, e EcoRV). 25 plasmídeos demonstrando padrões de digestão singulares foram então transformados em leveduras, e os estudos de sua fermentação foram feitos a 38° com a linhagem de controle transformada somente com
5 vetor. Dos 25 plasmídeos, 10 mostraram aumento de 20 a 1000 vezes em viabilidade depois de 49-52 horas de fermentação, produzindo um pouco mais ou a mesma quantidade de álcool comparando com o controle. O Sequenciamento feito com um primer específico de promotor de ADH1 e busca BLAST por similaridade de seqüência (Atshul et al, 1997) demonstrou que
10 todos os nove insertos completaram o gene RPI1, incluindo o seu promotor. Além disso, o gene RPI1 esteve presente em ambas orientações com respeito ao promotor ADH1. A partir disso, pode ser inferido que a introdução de uma cópia adicional do RPI1 expressa de seu próprio promotor é o suficiente para prover a tolerância aprimorada ao estresse durante a fermentação.

15 Resultados de seleção a 30° : A população obtida depois de 6 rodadas de repetida seleção foi comparada com população paterna inicial não selecionada em termos de viabilidade e taxa de produção de etanol. Enquanto a taxa de produção de etanol manteve-se comparável, a população selecionada demonstrou aproximadamente 150 vezes maior sobrevivência do
20 que a população paterna depois de 127 horas de fermentação. Para descartar a possibilidade de contribuição de qualquer mutação espontânea enriquecida em viabilidade aprimorada, plasmídeos foram recuperados da população selecionada e transformados em um pool de 100 E. coli JM109. Plasmídeos isolados de um pool aleatório de 1000 colônias de E. coli foram transformados
25 de volta em leveduras de linhagem FY3 através de protocolos padrão.

Aproximadamente 20,000 transformantes de levedura foram colocados juntos em pool e sujeitos a uma rodada adicional de fermentação a 30°. Esses transformantes demonstraram viabilidade muito melhor do que a linhagem paterna, confirmando que os genes carregados nos plasmídeos conferem tolerância aprimorada a estresse. Tais plasmídeos foram novamente transferidos a E. Coli, e plasmídeos de 38 colônias foram isolados e analisados por restrição de digestão para identificar clones singulares. Quinze plasmídeos singulares foram transformados de volta em FY3 e comparados em fermentação a 30° em sobrevivência relativa e produção de etanol tendo em vista a população controle. Entre esses, nove pareceram promissores. Os genes carregados por esses plasmídeos foram identificados por seqüenciamento utilizando primer específico para ADH1 e busca BLAST por similaridade de seqüência. Dentre os nove clones, cinco corresponderam a WSC4, três carregavam o gene não caracterizado YIL055C e um carregava um inserto de aproximadamente 2.9-Kb compreendendo por todo o CAP2, a maior parte do SRA1 e uma pequena porção do CKA1. Estudos posteriores foram feitos para confirmar o papel de tais genes na fermentação.

EXEMPLO 2

Caracterização do RPI1. Dos estudos preliminares, baseados em seqüenciamento, inferimos que a adição de uma única cópia do RPI1 (inibidor 1 de pathway Ras cAMP) é o suficiente para prover tolerância aprimorada ao estresse durante fermentação. Portanto, subclonamos o inserto 2.6kb inteiro isolado de um dos clones RPI1 no site XhoI de um vetor integrativo Prs306. Esse vetor foi linearizado dentro do gene URA3 do vetor e transformado na linhagem FY3 para integração visada no locus URA3 do genoma.

Transformantes foram selecionados por protrofia de uracila em placas de meio mínimas. Uma cópia adicional do RPI1 então foi integrada no genoma. Anteriormente, estudos demonstraram que os perturbantes do RI1 não são letais (Kim et al, 1991). Perturbantes do RPI1 foram feitos através de mutagênese insercional utilizando primers específicos de Tn3. A linhagens de superexpressão e perturbação foram então utilizadas para estudos de fermentação realizados a 38° e 30°. Estudos de fermentação a 38° foram feitos com 20% de glucose por 38 a 44 horas enquanto estudos de fermentação a 30° foram feitos com 25% de glucose por 108 a 114 horas. A viabilidade foi monitorada ao fim da fermentação. Linhagens com uma cópia adicional do RPI1 demonstraram aprimoramento de sobrevivência muitas vezes maior comparadas com a população de controle em ambos os estudos a 30 e 38°. As linhagens com a cópia perturbada do RPI1 demonstraram sobrevivência consideravelmente reduzida, confirmando o papel do RPI1 na tolerância ao estresse. Mas as linhagens com uma cópia adicional do RPI1 demonstraram uma taxa vagarosa de fermentação no começo, embora não houve diferença na quantidade de etanol finalmente feita comparada com as linhagens do tipo selvagem.

Estudos de cultura mista: pode ser argüido que a melhora na sobrevivência vista na linhagem de superexpressão do RPI1 é devido a taxa vagarosa de fermentação. Para eliminar tal possibilidade, fermentações em cultura mista foram realizadas. Linhagens com uma cópia adicional do RPI1 foram misturadas em igual proporção com uma população de controle do tipo selvagem tendo o marcador de resistência G418. O marcador de resistência G418 não afeta o desempenho ou a viabilidade de células durante a

fermentação, mas serve como marcador para distinguir a linhagem de controle da linhagem de testes após a fermentação mista. A taxa de fermentação da cultura mista foi comparável àquela de linhagem de tipo selvagem. Após a fermentação, a linhagem de teste com cópia adicional do RPI1 demonstrou

5 sobrevivência aproximadamente cem vezes maior do que a de tipo selvagem tanto em 38° (tabela 1 A) como em 30° (tabela 1 B). Em contraste, a viabilidade da linhagem com o RPI1 apagado foi extremamente pobre comparada com a linhagem de controle. Tais resultados demonstram que o RPI1 é crucial para a tolerância da levedura ao estresse durante fermentação etanólica.

10

Tabela 1 ^a	
Efeito do nível de expressão do gene RPI1 na sobrevivência de leveduras depois de 37 horas de fermentação a 38o C	
Nome da linhagem* (número da cópia do gene)	Sobrevivência relativa da linhagem de teste G418S como uma porcentagem do total de população
Controle (1) + Controle G418R (1)	64.0%
RPI1 ^{^(2)} + Controle G418R	99.98%
RPI1A(0) + Controle G418R	1.66%

Tabela 1b	
Efeito do nível de expressão do gene RPI1 na sobrevivência de leveduras depois de 114 horas de fermentação a 30o C	
Nome da linhagem (número da cópia do gene)	Sobrevivência relativa da linhagem de teste G418S como uma porcentagem do total de população
Controle (1) + Controle G418R (1)	43%
RPI1 ^{^(2)} + Controle G418R (1)	100%
RPI1A(0) + Controle G418R (1)	0%

O RPI1 anteriormente fora identificado como um supressor de alta cópia de mutação de Ras2, suprimindo o fenótipo da onda de calor induzido

15 pela mutação de Ras2 (Kim et al, 1991). Estudos posteriores demonstram que o RPI1 é crucial para a tolerância ao estresse durante a fermentação etanólica

também e sua superexpressão pode ser utilizada para aumentar a superexpressão muitas vezes.

EXEMPLO 3

Caracterização do WSC4. Gene WSC4 (Cell Wall integrity and Stress Response; componente da integridade da parede celular e resposta ao estresse) , identificado a partir da fermentação a 30°, é conhecido por ser requerido para a translocação secretória de proteína, para manutenção da integridade da parede celular e por resposta ao estresse no *S. cerevisiae* (Verna et al, 1997). Para estudar o seu comportamento no estresse de fermentação, o gene WSC4 completo, junto com o seu promotor, foi subclonado em vetor integrativo PRS306. Esse gene então foi integrado ao genoma por recombinação homóloga no locus *ura3*, portanto aumentando em um o número de cópias. Perturbadores do WSC4 foram também feitos por mutagênese de transposição e posteriormente confirmados por seqüenciamento. Estudos de fermentação feitos a 30°C com 25% de glucose por 108 horas demonstraram que ele pôde aumentar a sobrevivência de 5 a 10 vezes comparado ao tipo selvagem. Posteriormente, estudos de fermentação em cultura mista foram realizados com linhagens de tipo selvagem e demonstraram que o WSC4 de fato aumenta a tolerância da linhagem de *S. cerevisiae* a estresse (tabela 2). Abundância de linhagens com deleção do WSC4 é consideravelmente reduzida no pool misto. Este estudo demonstra que o WSC4 pode ser explorado a fim de melhorar a tolerância ao estresse durante a fermentação.

Tabela 2	
Efeito do nível de expressão do gene WSC4 na sobrevivência de leveduras depois de 109 horas de fermentação a 30o C	
Nome da linhagem (número da cópia do gene)	Sobrevivência relativa da linhagem de teste G418S como uma porcentagem do total de população
Controle (1) + Controle G418R (1)	44%
WSC4 ⁽²⁾ + Controle G418R (1)	73%
WSC4 ⁽⁰⁾ + Controle G418R (1)	6.1%

EXEMPLO 4

Caracterização do YIL055c. YIL055c, um gene de função desconhecida, foi também isolado do rastreamento de superexpressão a 30°.

- 5 Para confirmar o seu papel na tolerância ao estresse, o ORF desses genes foi subclonado sob o controle do forte promotor de GPD1 no vetor integrativo Pgv8. O construto recombinante foi então integrado ao locus *ura3* da linhagem FY3. Tal gene também foi perturbado por mutagênese de transposição e confirmado por seqüenciamento. Estudos de fermentação realizados a 30°,
- 10 demonstraram que sob a superexpressão do YIL055c, a taxa de fermentação foi consideravelmente reduzida, embora a fermentação possa completar tal como a fermentação de um tipo selvagem. Perturbantes demonstraram taxa de fermentação normal. Em cultura mista feita a 30°, essas linhagens de superexpressão fermentaram em taxa igual a cultura de controle do tipo
- 15 selvagem mista. Essas linhagens ainda confeririam sobrevivência aprimorada comparadas com células do tipo selvagem (Tabela 3). Isso indica que a sobrevivência aprimorada não é devido a taxa de fermentação reduzida. O papel do YIL055c na tolerância ao estresse é bastante similar ao do RPI1, e, portanto tais genes são parte provável do mesmo trajeto de resposta ao
- 20 estresse.

Tabela 3	
Efeito do nível de expressão do gene YIL055C na sobrevivência de leveduras depois de 108 horas de fermentação a 30o C	
Nome da linhagem (número da cópia do gene / superexpressão sob promotor GPD)	Sobrevivência relativa da linhagem de teste G418S como uma porcentagem do total de população
Controle (1) + Controle G418R (1)	47%
YIL055C^(GPD) + Controle G418R (1)	94%
YIL055C (0) + Controle G418R (1)	17.5 %

EXEMPLO 5

Caracterização do SRA1. Outro clone rastreado inclui três genes, incluindo um fragmento do SRA1. A parte SRA1 desse clone foi subclonada sob o controle do promotor forte GDP1 em Pgv8 e integrado ao genoma da levedura. Estudos de fermentação foram realizados com o clone de superexpressão do SRA1 a 30 demonstraram sobrevivência aprimorada várias vezes após 108 horas de fermentação com 25% de açúcar. Linhagens com o SRA1 superexpresso mostraram atraso inicial na produção de etanol, mas completaram a fermentação em tempo igual ao tomado pelo tipo selvagem. Estudos superiores de fermentação em cultura mista demonstraram taxa de fermentação normal, mas sobrevivência aprimorada comparada à linhagem de controle (Tabela 4). Perturbantes de SRA1 demonstraram sobrevivência reduzida durante o próprio crescimento normal e portanto estudos de fermentação não foram realizados com tais linhagens.

Tabela 4	
Efeito do nível de expressão do gene YIL055C na sobrevivência de leveduras depois de 108 horas de fermentação a 30o C	
Nome da linhagem (número da cópia do gene / superexpressão sob promotor GPD)	Sobrevivência relativa da linhagem de teste G418S como uma porcentagem do total de população
Controle (1) + Controle G418R (1)	47%
SRA1^(GPD) + Controle G418R (1)	94%

SRA1 possui atividade inibidora de cinese de proteína dependente de cAMP. Superexpressão do SRA1 altera o equilíbrio de associação ou dissociação do PKA (protein kinase inhibitor; inibidor de cinese de proteína) em suas subunidades em direção ao estado indissociado (Portela et al, 2001). Ele também leva à hiperacumulação de glicogênio e resistência aprimorada a choque. Portanto, o SRA1 quando superexpresso leva a menos atividade de PKA e tolerância aprimorada ao estresse. Atividade de PKA reduzida resulta em taxa de crescimento reduzida (Van Dijck et al, 200). Isso poderia explicar a taxa de fermentação reduzida observada quando há superexpressão do SRA1. Mas a viabilidade melhorada em fermentação em cultura mista demonstra que a tolerância aumentada ao estresse não é devido à taxa reduzida de fermentação. Isolamento do SRA1 por estratégia de superexpressão prova a validade da estratégia, já que o papel do trajeto cAMP em tolerância ao estresse já está estabelecido através de estudos com mutantes RAS.

EXEMPLO 6

Perfis de aptidão em escala de Genoma de linhagens de superexpressão. Microarranjos são largamente explorados para monitorar todo o genoma em chip único. Isso dá uma melhor idéia das interações entre milhares de genes simultaneamente. Aqui nós utilizamos DNA baseado em microarranjo, para simultaneamente monitorar os genes presentes em plasmídeos, pelos seus papéis em estresse de fermentação. A linhagem de levedura FY3 foi transformada com o todo genoma de coleção de superexpressão, como descrito no Exemplo 1. Um pool de aproximadamente 20,000 transformantes foi cultivado em um meio mínimo por 24 horas,e

dividido em dois banhos. Um pool foi mantido com população não-selecionada enquanto outro foi submetido a duas rodadas de fermentação a 38oC. Depois de cada rodada células foram colhidas e cultivadas em meio mínimo para enriquecer para células retendo plasmídeos. Ao final de duas rodadas, o DNA

5 total foi isolado do pool de células selecionado e não-selecionado por protocolos padrão(Kaiser et al, 1994). Fragmentos de inserto de DNA de plasmídeos presentes no DNA total foram especificamente amplificados usando um primer (5'-CTCGAAGCTACGTCAGGG-3') complementar a seqüências adaptadoras presentes em ambos os lados do inserto de DNA.

10 Uma reação PCR foi configurada em volume de 25ul. Ela conteve 100 ng do padrão, 1X tampão Taq (NEB), 0.4mM primer, 0.2mM dNTPs e 5U Taq DNA polimerase. Condições de ciclo térmico eram: desnaturação a 95oC por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94oC por 1 minuto, recozidos a 60oC por 1 minuto e extensão a 72oC por 10 minutos. Os produtos PCR

15 foram checados para uniformidade em padrão de tamanho em ambas as populações por eletroforese de gel de agarose e depois purificados utilizando kit de purificação PCR (Qiagen). Um ug de primers aleatórios (nonamer), 2ng de DNA de controle de Arabidopse, 0.5mM dNTPs sem dCTP, 1X buffer de klenow, 2ul de fluorophor (Cy5/Cy3 dCTP) e 50U de fragmento de DNA

20 polimerase Klenow (NEB) foram adicionados. A reação foi incubada a 37C por 12 horas e terminada pela adição de 2.5ul de 0.5M EDA. O produto rotulado foi purificado utilizando um kit de purificação PCR. A rotulação foi quantificada através da comparação de diluição serial de amostra impura com amostra pura em uma lamina de vidro. Esses foram escaneados em microarranjo para

25 descobrir o percentual de incorporação. Para hibridização Cy5 e Cy3,

fragmentos de DNA rotulado foram misturados em partes iguais e o volume foi aumentado a 18ul. Isso foi desnaturado a calor a 95oC por 2 minutos. A reação de hibridização de 80ul foi configurada. Nesses 18ul de proba rotulada, 1X tampão de hibridização, 1.6ul 10% SDS e 40ul de formamida foram

5 misturados. Esse volume inteiro é colocado em uma placa de vidro de microarranjo e cuidadosamente coberto com a tampa rasa. Hibridização foi configurada em uma câmara de hibridização e incubada em banho de água quente a 42oC por 12 horas. A lavagem dos slides foi feita seguindo os protocolos padrão (Bowtell et al, 2002). Esses slides então foram escaneados

10 em um scanner de microarranjo Axon 4000B. O Software Genepix Pro foi utilizado para a análise de dados. Experimentos foram feitos em duas coleções separadas para verificar consistência. Além disso, experimentos de troca de tinta foram também feitos para descartar viés na rotulação. Genes que mostram maior sinal para FNA de população comparada à população inicial

15 são aqueles que ficaram enriquecidos durante a seleção, e, portanto possuem maior aptidão durante as condições de seleção.

EXEMPLO 7

Hibridização de colônia para recuperar genes enriquecidos conferindo maior aptidão. Genes conferindo papel na tolerância ao estresse

20 podem ser diretamente isolados da coleção genômica utilizando hibridização de colônia. Probas de genes inteiras, foram preparadas para os genes consistentemente enriquecidos em todos os microarranjos. Plasmídeos recuperados da população selecionada ao final de quatro rodadas de fermentação foram transformados e E. coli através do protocolo padrão. 1000

25 transformantes de E. Coli foram patched em placas LB-amp. Para a

hibridização de colônia padrão utilizando membrana Hybond (N) nylon foi seguida (Sambrook et al, 1989). Para cada gene, muitos clones podem ser isolados. Plasmídeos (de clones pegos aleatoriamente) foram isolados pelo método de lise alcalina, e restrição digerida com enzima XhoI para identificar
5 insertos de tamanho singular. Aqueles parecendo singulares foram seqüenciados utilizando primer específico de ADH1. Esses foram posteriormente caracterizados e transformados em leveduras para confirmar o seu papel em tolerância ao estresse de fermentação. Alguns dos insertos carregavam mais de um gene ou genes parciais adicionais. Além disso, o
10 sequenciamento ajudou a identificar a orientação dos genes em relação ao promotor de ADH1. Insertos correspondendo a RPI1, MKT1, ECM39, SOL1 e ADE16 foram identificados e caracterizados utilizando tal abordagem.

EXEMPLO 8

Confirmação do papel do WSC2. Rastreamento baseado em
15 microarranjo demonstrou que o WSC2 esteve altamente enriquecido em todos os arranjos de experimentos. Assim, clones de superexpressão e perturbação foram realizados para confirmar o seu papel. Clones de superexpressão foram obtidos trocando o seu promotor endógeno por um promotor de GPD1 (Petracek et al, 2002), enquanto perturbantes foram feitos substituindo a região
20 de codificação de WSC2 por marcador URA3. Esses foram transformados em linhagens de deleção do URA3. Estudos de fermentação feitos a 38C com 20% de açúcar demonstraram que aos clones de superexpressão do WSC2 sobrevivem de 50 a 100 vezes melhor que os tipos selvagens ao final da fermentação. Não é demonstrada qualquer mudança na taxa de fermentação
25 comparada com o tipo selvagem. Mesmo em estudos realizados em cultura

mista a 38oC, essa linhagem continuou predominante ao final da fermentação comparada com a linhagem de controle G418^R (tabela 5). O WSC2 pertence a mesma família do WSC4 e é envolvido no trajeto de integridade da parede celular. Genes WSC são funcionalmente redundantes. Alguém não pode

5 identificar seus papéis até que todos sejam deletados ou deletados em combinação. No entanto, esta estratégia de superexpressão não pode identificar o papel de membros individuais dos genes redundantes. A família WSC é uma de moléculas sinalizadoras, que ativam DOWNSTREAM Rho1 e trajeto de cinesa MAP em resposta a estresse ambiental. Além do mais, não há

10 efeito óbvio na taxa de crescimento ou fermentação, sugerindo que esses agem em maneira PKA independente. Assim, posterior exploração do trajeto de genes WSC pode ajudar a melhorar linhagens para maior tolerância ao estresse de fermentação.

Tabela 5	
Efeito do nível de expressão do gene YIL055C na sobrevivência de leveduras depois de 38 horas de fermentação a 38o C	
Nome da linhagem (número da cópia do gene / superexpressão sob promotor GPD)	Sobrevivência relativa da linhagem de teste G418S como uma porcentagem do total de população
Controle (1) + Controle G418R (1)	45.7%
WSC2^(GPD) + Controle G418R (1)	97%

15 EXEMPLO 9

Outros genes identificados por perfis de aptidão. Muitos outros genes que apareceram consistentemente em todo o microarranjo confirmaram os seus papéis na tolerância ao estresse de fermentação através de estudos em cultura mista. Muitos plasmídeos isolados de uma população selecionada

20 na segunda rodada, e identificados por hibridização de colônia por genes específicos, onde foram transformados em leveduras da linhagem FY3. Esses

transformantes foram então sujeitos a estudos de fermentação em cultura mista. Aí, linhagens de teste de superexpressão foram misturadas com uma linhagem de controle de tipo selvagem G418^R em igual proporção. Estudos de fermentação foram feitos a 38°C com 20% de açúcar. Células sensíveis a

5 G418 sobreviventes ao final da fermentação foram comparadas com células G418^R ao final da fermentação. No caso de ECM39 (tabela 6) e MKT1 (tabela 7), clones de superexpressão em mais de 90% da população foram dominados por linhagens de teste sensíveis a G418, enquanto no caso do ADE16 mais de

10 85% da população correspondeu à linhagem de superexpressão de ADE16 (tabela 8). Transformantes de SOL1 dominaram a população da cultura mista em 80% (tabela 9). Genes ECM39, MKT1 e AD16 estiveram presentes em orientação oposta em relação ao promotor de ADH1 nos plasmídeos. Parece que para tais genes a adição de uma única cópia é suficiente para conferir

15 tolerância aprimorada ao estresse durante a fermentação. Embora todos esses genes são conhecidos na literatura, somente nossa abordagem demonstrou os seus papéis em tolerância ao estresse fermentativo.

Tabela 6	
Efeito do nível de expressão do gene ECM39 na sobrevivência de leveduras depois de 39 horas de fermentação a 38°C	
Nome da linhagem (número da cópia do gene / superexpressão sob promotor GPD)	Sobrevivência relativa da linhagem de teste G418S como uma porcentagem do total de população
Controle (1) + Controle G418R (1)	50%
ECM39 ^(?) + Controle G418R (1)	93%

Tabela 7	
Efeito do nível de expressão do gene MKT1 na sobrevivência de leveduras depois de 38 horas de fermentação a 38o C	
Nome da linhagem (número da cópia do gene / superexpressão sob promotor GPD)	Sobrevivência relativa da linhagem de teste G418S como uma porcentagem do total de população
Controle + Controle G418R (1)	48.27%
MKT1 [^] + Controle G418R (1)	92.5%

Tabela 8	
Efeito do nível de expressão do gene ADE16 na sobrevivência de leveduras depois de 38 horas de fermentação a 38o C	
Nome da linhagem (número da cópia do gene / superexpressão sob promotor GPD)	Sobrevivência relativa da linhagem de teste G418S como uma porcentagem do total de população
Controle (1) + Controle G418R (1)	48.27%
ADE16 ^{^(?)} + Controle G418R (1)	84.2%

Tabela 9	
Efeito do nível de expressão do gene SOL1 na sobrevivência de leveduras depois de 38 horas de fermentação a 38o C	
Nome da linhagem (número da cópia do gene / superexpressão sob promotor GPD)	Sobrevivência relativa da linhagem de teste G418S como uma porcentagem do total de população
Controle + Controle G418R (1)	44.44%
SOL1 ^{^(?)} + Controle G418R (1)	86.4%

Em resumo, a presente invenção possui diversas vantagens:

- 5 -Na presente invenção, quase todos os genes de um organismo que possivelmente podem aprimorar a tolerância ao estresse através da superexpressão são simultaneamente identificados. Isso contrasta com os métodos conhecidos, onde genes envolvidos em tolerância ao estresse são primeiro identificados, e depois superexpressos um por um para verificar se
- 10 eles podem melhorar a tolerância ao estresse. A limitação dos métodos atuais é que apenas alguns dos genes superexpressados resultarão em melhora. A razão é porque apenas alguns dos genes envolvidos no processo serão classes limitantes, e somente se esses genes são superexpressados ocorrerá

alguma melhora. Por outro lado, em nossa abordagem somente aqueles genes que realmente aumentam a tolerância ao estresse são diretamente identificados. Portanto, nossa invenção é menos laboriosa e mais eficiente.

-A presente invenção também identifica genes que são essenciais para o crescimento assim como para tolerância ao estresse. Em contraste, as abordagens baseadas em mutação irão na maior parte desperceber tais genes, já que mutantes enfraquecidos nos genes essenciais não conseguirão crescer no primeiro lugar para eles para serem estudados posteriormente.

-A presente invenção também supera a limitação da falta de placas de rastreamento e rastreamentos de placa para o estudo de certos fenótipos tal como tolerância ao estresse durante a fermentação etanólica em caldos líquidos. Isso é possível já que ela permite a abundância de todos os transformantes presentes em um único pool para ser quantitativamente seguida, através do real monitoramento da abundância dos genes carregados em plasmídeos presentes nesses transformantes. Isto é, os genes carregados nos próprios plasmídeos servem como etiquetas de DNA para diferenciar diferentes transformantes presentes no pool.

-A presente invenção também permite com que as pequenas contribuições à aptidão causadas por diferentes genes possam ser quantitativamente estudadas. Isso é possível já que todos os transformantes são estudados em um único pool e portanto experimentam condições idênticas de competição seletiva.

REFERENCIAS

Documentos de patentes U.S.

1. Brown P & Smith V (1997) "Genetic footprinting: insertional mutagenesis and genetic selection" Unites States # 5,612,180

5 2. Sharma VM & Ganesan K (2003) "Method for the simultaneous monitoring of individual mutants in mixed populations" United States Patent # 6,528,257.

3. Thompson JD (2001) "Method for target site selection and discovery" United States Patent # 6,183,959.

10 Outras Publicações

1. Adam et al, "Induced expression of bacterial betaglucosidase activity in *Saccharomyces*" *Yeast*, vol 11, pp.395-406 (1995).

2. Altshul et al, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res*, vol. 25, p.p. 3389-3402 (1997).

15

3. Banat et al, "Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I: Yeasts in general", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* vol.14, pp. 809-821 (1998).

4. Birrell et al., "Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents" *Proc Natl Acad Sci USA* vol 99 pp. 8778-83 (2002).

20

5. Bowtell et al, DNA Microarrays. A molecular cloning manual. Cold spring harbor laboratory press. Cold spring harbor, New York (2002).

6. Boyer et al, "Large-scale exploration of growth inhibition caused by overexpression of
7. genomic fragments in *Saccharomyces cerevisiae*", *Genome Biol.* Vol. 5(9): R72,. Epub (2004).
- 5 8. Chen et al, "Consequences of the overexpression of ubiquitin in yeast: elevated tolerances to osmotic stress, ethanol and canavanine, yet reduced tolerances of cadmium, arsenite and paromomycin", *Biochim Biophys Acta*, vol 1268, pp. 59-64 (1995).
- 10 9. Davidson et al, "Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *saccharomyces cerevisiae*", *Proc Natl Acad USA*, vol 93, pp. 5116-5121 (1996).
- 10 10. Espinet et al, "An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest", *Yeast*, vol. 11, pp. 25-32 (1995).
- 15 11. Fabrizio et al, "Analysis of gene expression profile in yeast aging chronologically", *Mech Ageing Dev.* Vol,26, pp. 11-6 (2005).
- 15 12. Ganesan et al, "An improved process for the production of alcohol using improved thermotolerant flocculent strains of yeast *Saccharomyces*" Indian Patent # 189737 (2003).
- 20 13. Gaxiola et al, "A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast", *EMBO J*, vol 11, pp. 3157-3164 (1992).
- 20 14. Giaever et al, "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome" *Nature*, Vol 418, pp. 387-91 (2002).

15. Hartley et al, "The YAK1 protein kinase os *Saccharomyces cerevisiae* moderates thermotolerance and inhibits growth by an Sch9 protein kinase independent mechanism", *Genetics*, vol.136, pp. 465-474 (1994).
- 5 16. Hughes et al, "Functional discovery via a compendium of expression profiles", *Cell*, vol. 102, pp. 109-26 (2000).
17. Kaiser et al, *Methods in yeast genetics*. A cold Spring Harbor Laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory press, New York (1994).
- 10 18. Kim et al, "Overexpression of RPI1, a novel inhibitor of the yeast Ras-Cyclic AMP pathway down-regulates normal but not mutationally activated ras function", *Mol Cell Biol*, vol. 11, p.p. 3894-904 (1991).
19. Liu "Constructing yeast libraries", *Methods Enzymol*, vol. 350, pp. 72-86 (2002).
- 15 20. Muslin et al, "Overexpression, purification, and characterization of a berley alphaglucosidase secreted by *Pichia pastoris*", *Prot expr purify*. Vol. 18, pp. 20-26 (2000).
21. Petracek et al, "PCR-based engineering of yeast genome", *Methods Enzymol*, vol. 350, pp, 445-468 (2002).
- 20 22. Portela et al, "Evaluation of in vivo activation of protein kinase A under non-dissociable conditions through the overexpression of wild-type and mutant regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiology*, vol. 147, pp. 1149-1159 (2001).
23. Remize et al, "Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains lead to substancial changes in

By-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase". *Appl Environ Microbiol*, vol. 65, pp. 143-149 (1999).

24. Ross-Macdonald et al, "Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption ", *Nature*, vol. 402, pp. 413-5 8 (1999).

25. Sambrock et al, *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press. New York (1989).

26. Sambrock et al, "Quantitative target Display:a method to screen yeast mutants conferring quantitative phenotypes by 'mutant DNA 10 fingerprints', *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, pp. E86 (2001).

27. Smith et al, "Functional analysis of the genes of yeast chromosome V by genetic footprinting", *Science*, vol 274, pp. 2069-2074 (1996).

28. Sobering et al, "Yeast Rpi1 is a putative transcriptional 15 regulator that contributes to preparation for stationary phase", *Eukaryot Cell*, vol. 1 pp. 56-65 (2002).

29. Soto et al, "Accumulation of trehalose by overexpression of tps1, coding for trehalose-6-phosphate synthase, causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeast *schizosaccharomyces pombe*". *Appl 20 Environ Microbiol*, vol. 65, pp. 2020-2024 (1999).

30. Stevenson et al, "A large-scale overexpression screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies previously uncharacterized cell cycle genes". *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 98, pp. 3946-51 (2001).

31. Van Dijck et al, " A baker's yeast mutant (fill) with a specific, 25 partially inactivating mutation in adenylate cyclase maintains a high stress

resistance during active fermentation and growth, *J Mol Microbiol Biotechnol*, vol. 02, pp. 521-530 (2000).

32. Verna et al, "A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*", *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 94, pp. 13804-9 (1997).

33. Vrana et al, "Use of microarray technologies in toxicology research", *Neurotoxicology*, vol. 24, pp. 321-32 (2003).

34. Walfridsson et al, "Xylose metabolizing *Saccharomyces* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase". *Appl Environ Microbiol*, vol. 61, pp. 4184-4190 (1995).

35. Winston et al, "Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C", *Yeast*, vol 11, pp. 53-55 (1995).

36. Winzeler et al, "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis", *Science*, vol. 285, pp. 901-906 (1999).

37. Wu et al, "Plant gene expression profiling with DNA microarrays", *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 39, pp. 917-926 (2001).

REIVINDICAÇÕES

1 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, **caracterizado por** ser um método para
5 identificar genes para aumentar a tolerância de leveduras ao estresse, onde o referido método esta compreende por:

a. Transformar leveduras através de uma livraria de genes de levedura clonados em um plasmídeo a fim de provir um grande número de transformantes de levedura.

10 b. Fazer os banhos dos transformantes obtidos na etapa (a) a fim de provir uma população inicial de transformantes.

c. Sujeitar a população de transformantes obtidos na etapa (b) à condições de seleção onde a viabilidade da população de células decresce de 3 a 200 vezes, assim enriquecendo aquelas células transformadas que podem sobreviver melhor sob tais condições,

15 d. Recuperar as células sobreviventes obtidas na etapa (c) e cultivando-as em um meio que permita o crescimento somente daquelas células que retêm plasmídeos.

20 e. Sujeitar as células obtidas na etapa (d) a rodadas adicionais de seleção através da repetição das etapas (c) e (d).

f. Recuperar as células obtidas na etapa (e) que sobreviveram por ao menos três rodadas de seleção.

25 g. Comparar a população de células obtidas na etapa (f) com a população inicial de células sob condições de seleção a fim de confirmar a sobrevivência aprimorada das células selecionadas,

h. Colocar em placas o pool de células selecionadas obtidas na etapa (f) a fim de obter colônias isoladas,

i. Isolar DNA de colônias individuais de levedura obtidas na etapa (g) e transformar em E. Coli a fim de recuperar o plasmídeo presente em colônias individuais de levedura,

j. Transformar os plasmídeos obtidos na etapa (i) em levedura e testar os transformantes a fim de checar se os plasmídeos realmente conferem tolerância aprimorada sob as condições selecionadas,

k. Identificar os genes carregados nos plasmídeos obtidos na etapa (j), que conferem tolerância aprimorada ao estresse, através de seqüenciamento.

2 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, um método para identificar genes que aumentam tolerância de leveduras ao estresse como reivindicado na primeira reivindicação, **caracterizado por** que durante as condições de fermentação o método esta compreendido pelo seguinte processo:

a. Transformar leveduras através de uma livraria de genes de levedura clonados em um plasmídeo a fim de provir um grande número de transformantes de levedura.

b. Fazer o banho dos transformantes obtidos na etapa (a) a fim de provir uma população inicial de transformantes.

c. Sujeitar a população de transformantes obtidos na etapa (b) à condições de seleção onde a viabilidade da população de células

decrece de 3 a 200 vezes, assim enriquecendo aquelas células transformadas que podem sobreviver melhor sob tais condições,

d. Recuperar as células sobreviventes obtidas na etapa (c) e cultivando-as em um meio que permita o crescimento somente daquelas células que retêm plasmídeos.

e. Sujeitar as células obtidas na etapa (d) a rodadas adicionais de seleção através da repetição das etapas (c) e (d).

f. Recuperar as células obtidas na etapa (e) que sobreviveram por uma rodada de seleção

g. Isolar o DNA total da população inicial de transformantes e a população selecionada obtida na etapa (f)

h. Amplificar especificamente somente o inserto de DNA carregado em plasmídeos do DNA total obtido na etapa (g) através do uso de primers específicos para plasmídeos.

i. Rotular os fragmentos de inserto de DNA, obtidos na etapa (h), da população inicial com uma tintura fluorescente, e aqueles da população selecionada, com outra tintura fluorescente.

j. Misturar e hibridizar as probas rotuladas obtidas na etapa (i) para um microarranjo manchado com DNA correspondente a quase todos os genes da levedura.

k. Identificar as manchas de DNA no microarranjo obtidas na etapa (j) que demonstram sinal aprimorada para a proba correspondente a população selecionada compara com a população inicial, e

l. Isolar clones de plasmídeo recombinante que carregam os genes que correspondem às manchas de DNA obtidas na etapa (k) como

aqueles que aumentam nas leveduras a tolerância ao estresse durante a seleção.

3 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método, como descrito nas reivindicações 1 e 2, **caracterizado pelas** leveduras serem transformadas com uma coleção de genes de organismos que já são tolerantes a um estresse em particular.

4 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método, como descrito nas reivindicações 1 a 4, **caracterizado pela** linhagem de levedura utilizada ser *S. cerevisiae*.

5 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método, como descrito nas reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** plasmídeo ser um plasmídeo de expressão com promotor constitutivo.

6 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método, como descrito nas reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** plasmídeo ser um plasmídeo de expressão com promotor indutível.

7 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, **caracterizado por** ser um método para melhorar a tolerância ao estresse em leveduras obtidas através da transformação com

plasmídeos recombinantes carregando os genes identificados nas reivindicações de 1 a 6.

8 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, **caracterizado por** ser um método para melhorar a tolerância ao estresse em leveduras através da transformação com plasmídeos recombinantes que superexpressam os genes identificados nas reivindicações de 1 a 6, compreendendo por:

- a. Sub-clonagem da seqüência codificadora de um gene sob o controle de um promotor constitutivo a fim de obter um plasmídeo recombinante superexpressando o gene, e,
- b. Transformação da levedura com o dito plasmídeo recombinante obtido na etapa (a) a fim de aumentar tolerância ao estresse.

9 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o descrito na reivindicação 8, **caracterizado pelo** o plasmídeo ser um plasmídeo de expressão com um promotor indutível.

10 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o descrito nas reivindicações de 1 a 9, **caracterizado pelo** plasmídeo ser um plasmídeo integrante.

11 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA

MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método para melhorar a tolerância a estresse em leveduras através da modulação do nível de expressão dos genes-alvo identificados nas reivindicações de 1 a 6, **caracterizado por** ser feito através da substituição do promotor do gene-alvo
5 presente no genoma da levedura com um forte promotor constitutivo.

12 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o descrito na reivindicação 11, **caracterizado pelo** promotor ser um promotor indutível.

10 13 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método para aprimorar a tolerância ao estresse em leveduras como nas reivindicações de 1 a 12, **caracterizado pelos** genes serem selecionados a partir de um grupo
15 constituído por RPI1, WSC2, WSC4, YIL05CC, SRA1, ECM39, SSK2, MKT1, SOL1, e ADE16.

14 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o reivindicado nas
20 reivindicações de 1 a 13, **caracterizado pelo** estresse ser estresse fermentativo sob condições de produção de álcool.

15 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o reivindicado nas
25 reivindicações de 1 a 13, **caracterizado pelo** estresse ser estresse

fermentativo sob condições de produção de álcool em alta temperatura na faixa de 37oC a 40oC.

16 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA
5 MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o reivindicado nas reivindicações de 1 a 15, **caracterizado pela** glucose ou sucrose ser a matéria prima para a produção de álcool.

17 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA
10 MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o reivindicado nas reivindicações de 1 a 15, **caracterizado pelo** melaço ou outras fontes complexas de carbono servirem como a matéria prima para a produção de álcool.

18 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE
15 AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o reivindicado nas reivindicações de 1 a 17, **caracterizado pelo** organismo ser de uma linhagem de levedura de laboratório.

19 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE
20 AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o reivindicado nas reivindicações de 1 a 17, **caracterizado pelo** organismo ser de uma linhagem de levedura industrial.

20 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE
25 AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA

MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o reivindicado nas reivindicações de 1 a 17, **caracterizado pelo** organismo ser qualquer microorganismo que necessita de aprimoramento em tolerância a estresse.

21 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE
5 AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o reivindicado nas reivindicações de 1 a 20, **caracterizado pelo** estresse ser qualquer condição adversa encontrada por microorganismos em indústrias.

22 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE
10 AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o reivindicado nas reivindicações de 1 a 22, **caracterizado pelo** uso de genes identificados para melhora de linhagem de levedura.

23 - MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE
15 AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA, método como o reivindicado nas reivindicações de 1 a 22, **caracterizado pelo** uso dos genes selecionados a partir de um grupo constituído por RPI1, WSC2, WSC4, YIL05CC, SRA1, ECM39, SSK2, MKT1, SOL1, e ADE16, para aprimoramento de linhagens de
20 levedura.

RESUMO

MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE AUMENTAM A TOLERÂNCIA AO STRESS NA LEVEDURA PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DA LEVEDURA. Revelam-se métodos para identificação de genes que aumentam a tolerância a stress ou perturbação na levedura, lista de 5 identificação dos genes, e o uso destes genes para melhorar a eficiência da levedura.