

PERMEASE DE MONOCARBOXILATOS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (*JEN1*): EXPRESSÃO CONSTITUTIVA EM *S. CEREVISIAE* E SOBRE-EXPRESSÃO EM *PICHIA PASTORIS*

Dorit Schuller*, Raquel P. Andrade*, Isabel Soares-Silva, Margarida Casal

Centro de Ciências do Ambiente, Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Braga, Portugal (*) Estes autores contribuíram igualmente para o trabalho

Células da estirpe W303-1A *jen1*Δ foram transformadas com os plasmídeos pD1 e pD2, onde a ORF que codifica para o *JEN1* foi clonada sob o controlo do promotor constitutivo *GPD*. O transporte de ácido láctico foi estimado em células transformadas com estes plasmídeos, colhidas a meio da fase exponencial de crescimento em meio YNB, pH 4,0, suplementado com glucose, ácido acético, ou glucose e ácido acético. Nas células contendo o plasmídeo centromérico pD1 foi possível recuperar a actividade do sistema transportador e confirmar a presença de mRNA-*JEN1* por RT-PCR. Apesar de em condições nativas o sistema estar sujeito a repressão catabólica pela glucose, foi conseguida a expressão constitutiva da permease de lactato. Nas condições testadas não foi observada a sobre-expressão do sistema de transporte pois os valores máximos estimados para os parâmetros cinéticos foram idênticos aos obtidos para a estirpe selvagem W303-1 previamente publicados (parâmetros cinéticos a pH 5,0: Km, 0,69 mM ácido láctico; Vmax, 0,40 nmoles s⁻¹ mg⁻¹ p.s. *in* Casal *et al.*, 1999, J. Bacteriol. 181:2620-2623). Os estudos estruturais com proteínas membranares encontram-se limitados pelas dificuldades técnicas na obtenção de proteína purificada em quantidades apreciáveis. No presente trabalho o gene *JEN1* foi clonado em *Pichia pastoris* com o objectivo de promover a sua sobre-expressão. Recorreu-se à utilização de diferentes estirpes e vectores de expressão. Confirmou-se a construção dos vectores, a correcta inserção no genoma e o número de cópias integradas. Nos vários transformantes seleccionados avaliou-se a actividade do sistema em cultura induzidas 24, 48 e 72 horas na presença de metanol. O máximo de actividade foi sempre obtida nas culturas de 24 horas. Num dos transformante, derivado da estirpe Mut^s, construído por inserção do vector pPICZB-*JEN1*, registou-se um valor 20x superior para a actividade do sistema de transporte de ácido láctico a pH 5,0 (V_{MAX}, 8,6 nmoles s⁻¹ mg⁻¹ peso seco). Estudos de Northern e de Western blotting confirmaram a correspondente expressão do sistema.