**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL POR GLICOSE DO PROMOTOR DO GENE
QUE CODIFICA CELOBIOHIDROLASE I DE *Trichoderma reesei* EM
*Saccharomyces cerevisiae***

Dirce Maria Carraro Pereira

Orientador: Prof. Dr. Hamza El-Dorry

**Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da
Universidade de São Paulo**

**São Paulo
1998**

“Regulação Transcricional por Glicose do Promotor do Gene que Codifica Celobiohidrolase I de *Trichoderma reesei* em *Saccharomyces cerevisiae*”.

DIRCE MARIA CARRARO PEREIRA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. HAMZA FAHMI ALI EL DORRY
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. SÉRGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ - USP

Profa. Dra. LUCIANA CÉSAR DE CERQUEIRA LEITE
IB

Profa. Dra. ANITA DOLLY PANEK
UFRJ

Prof. Dr. JOÃO ATÍLIO JORGE
FFCLRP - USP

SÃO PAULO
11 DE MAIO DE 1998

*Dedico esta tese a vocês, Tomaz e Júlia,
com carinho...*

Agradecimentos

Eu agradeço ao meu orientador e amigo Professor Hamza El-Dorry, por criar todas as condições necessárias para a realização deste trabalho e pelas suas valiosas observações.

Ao Professor Gonçalo Guimarães Pereira, pela sua grande participação e contribuição efetiva neste trabalho.

Ao Professor Cornelius Hollenberg pela realização de parte deste trabalho em seu laboratório.

Aos amigos Wilton e Zilda, pela ajuda e amizade.

A todos os colegas do laboratório, com quem muito aprendi e pelos bons momentos que compartilhamos. Ao Ribamar, Jorge, Euclides, Eric, Augusto, Flavio, Sawsan, Emi, Luciana e em especial a Luana e Ari, que participaram diretamente de parte deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório do Professor Pio Colepicolo, Professora Mari Armelin e do Professor Roberto Santelli.

Aos recém chegados no laboratório, Natalie, Daniela e Felipe.

A todos os professores, secretárias e funcionários do instituto de química.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutoramento.

A toda minha família pelo suporte, sempre que foi necessário.

Agradecimento especial aos financiadores deste trabalho, FAPESP-Temático (97/5267/0) e PADCT-CNPq (62.0622/91.1)

ÍNDICE

Curriculum

Abreviaturas

Summary

i

Resumo

ii

1. Introdução

1

1.1 Regulação transcricional em eucariotos

1

1.1.1 Formação do complexo de iniciação da transcrição

3

1.1.2 Elementos *cis* atuantes

5

1.1.3 Mecanismos de ativação

6

1.1.4 Mecanismos de repressão

11

1.2 Repressão por glicose em *Saccharomyces cerevisiae*

12

1.2.1 Considerações gerais

12

1.2.2 Fatores envolvidos na repressão por glicose

14

1.3 O envolvimento da atividade mitocondrial na expressão de genes nucleares

17

1.4 O sistema celulolítico de *Trichoderma reesei*

19

1.5 Aspectos da conservação de mecanismos de regulação transcricional

21

1.6 Objetivos

23

2. Material e Métodos

24

2.1 Reagentes

24

2.2 *S. cerevisiae*

24

2.2.1 Linhagens

24

2.2.2 Condições de crescimento

25

2.3 *Escherichia coli*

25

2.3.1 Linhagens

25

2.3.2 Condições de crescimento

25

2.4 Técnicas do DNA recombinante

26

2.5 Plasmídeos Básicos

26

2.5.1 Para clonagem e amplificação de fragmentos

26

2.5.2 Para análise do promotor *cbhI*

26

2.5.3 Para isolamento de fragmentos	26
2.6 Construção de Plasmídeos	27
2.6.1 Para análise do promotor <i>cbh1</i>	27
2.6.2 Para análise do promotor <i>CYC1</i>	28
2.6.3 Para análise de deleções do promotor <i>cbh1</i>	29
2.6.4 Para delimitação da região UARcb1	30
2.7 Condições de PCR	32
2.7.1 Para deleções de UARcb1	32
2.8 Seqüenciamento para confirmação da deleção $\Delta 85$	33
2.8.1 Purificação do plasmídio para seqüenciamento	33
2.9 Transformação de <i>E. coli</i>	33
2.10 Transformação de levedura	34
2.11 Determinação da concentração de proteínas	34
2.12 Extratos protéicos e determinação de atividade β -galactosídica	34
2.13 Determinação de glicose em meio de cultura	35
2.14 Análise de interação DNA-proteína	36
2.14.1 Extratos protéicos para gel de retardamento	36
2.14.2 Marcação do fragmento de DNA	36
2.14.3 Condições da reação de interação	37
2.14.4 Condições de eletroforese	37
2.15 Obtenção de mutantes "petite"	37
3. Resultados	38
3.1 Análise da regulação transcricional do gene repórter <i>lacZ</i> pelo promotor do gene <i>cbh1</i> de <i>T. reesei</i> em <i>S. cerevisiae</i> .	38
3.1.1 Regulação de <i>cbh1</i> em levedura	38
3.1.2 Análise de deleções do promotor híbrido <i>cbh1-CYC1</i>	40
3.1.3 Controle por glicose da expressão de <i>lacZ</i> mediada por UARcb1	44
3.1.4 Análise das deleções de UARcb1	46
3.2 Análise de fatores de levedura que interagem com UARcb1	48
3.3 Fatores de levedura envolvidos na regulação de <i>cbh1</i>	52
3.3.1 O envolvimento de <i>SNF1</i> e <i>SSN6</i>	52

3.3.2 O envolvimento de <i>TUP1</i>	54
3.2.3 O envolvimento de <i>MIG1</i>	56
3.4 O envolvimento da atividade mitocondrial na expressão de <i>lacZ</i> mediada pelo promotor híbrido <i>cbh1-CYC1</i>	58
3.4.1 Análise da expressão de <i>lacZ</i> regulada pelo promotor <i>cbh1</i> em mutantes <i>petites</i>	58
3.4.2 O papel de heme na interação DNA-proteína de UARcb1	61
4. Discussão	63
5. Conclusões	76
6. Referências Bibliográficas	77

ABREVIATURAS

<i>ADH2</i>	gene da álcool desidrogenase 2
<i>ADR1</i>	gene que codifica o ativador da transcrição do gene álcool desidrogenase 2
<i>AP1</i>	gene que codifica para ativador de transcrição ("activator protein")
ATP	Adenosina tri-fosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CBH	Celobiohidrolase
<i>cbh1</i>	Gene que codifica para CBH1
<i>cbh2</i>	gene que codifica para celobiohidrolase 2
<i>CIT1</i>	gene que codifica para citrato sintetase 2 (forma mitocondrial)
<i>CIT2</i>	gene que codifica para citrato sintetase 1 (forma peroxissomal)
<i>CRE1</i>	gene que codifica para o repressor do gene <i>cbh1</i>
CTD	Domínio carboxi-terminal de RNA polimerase
<i>CYC1</i>	gene que codifica para iso-1-citocromo c
<i>CYC7</i>	gene que codifica para iso-7-citocromo c
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNP	dinitrofenol
dNTP	Desoxinucleosídeo fosfato (N= A, C, G ou T)
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
<i>egl1</i>	gene que codifica para endoglucanase 1
<i>egl2</i>	gene que codifica para endoglucanase 2
<i>FOS</i>	gene que codifica para fator da transcrição
<i>GAL1</i>	gene que codifica para galactoquinase
<i>GAL4</i>	ativador do gene <i>GAL1</i>
<i>GAL80</i>	regulador da atividade de <i>GAL4</i>
<i>GCN4</i>	gene que codifica para ativador da transcrição
GTF	Fatores gerais de transcrição - "General transcription factors"
<i>HAP1</i>	gene que codifica para ativador de transcrição de <i>CYC1</i> e <i>CYC7</i>
<i>INR</i>	elemento iniciador da transcrição

<i>JUN</i>	gene que codifica para fator de transcrição
<i>MAL</i>	sistema de degradação de maltose
<i>MIG1</i>	gene que codifica para o repressor de transcrição de vários genes reprimidos por glicose
mU	mmoles de ONPG hidrolisados/min/mg de extrato de proteína
<i>MYC</i>	gene que codifica fator da transcrição
OD	Densidade ótica
ONPG	o-Nitrofenil- β -D-galactopiranoside
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase - "Polymerase chain reaction"
RNA pol II	RNA polimerase II
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>SNF1</i>	gene que codifica serina treonina quinase (envolvida na desrepressão de genes reprimidos por glicose)
<i>SP1</i>	gene que codifica para fator de transcrição - "specific protein 1"
<i>SSN6</i>	gene que codifica para repressor de transcrição (envolvido na regulação de genes reprimidos por glicose)
<i>SUC2</i>	gene que codifica para invertase 2
<i>Swi</i>	mediador da transcrição (componente da holoenzima pol II)
TAF	Fatores associados ao TBP - "TBP-associated factors"
TBP	Proteína que se liga ao TATA - "TATA-binding protein"
TF	Fatores de transcrição - "Transcription factors"
<i>TUP1</i>	gene que codifica para repressor de transcrição
UAS	"Upstream activating factors"
URS	"Upstream repressing factors"
<i>VP16</i>	gene que codifica para proteína viral com função ativadora
X-GAL	3-indolyl- β -D-galactopiranoside
<i>Zif268</i>	gene que codifica para ativador

OBS: As abreviaturas relativas a genes que aparecem no texto na forma itálica significam o gene, enquanto aquelas que se apresentam de forma não itálica se relacionam ao produto gênico desses genes

SUMMARY

The cellulotic system of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* is transcriptionally induced 1000 –fold in presence of cellulose and is strongly repressed by glucose. Using the promoter deletion approach, the upstream activating region (UARcb1) responsible for cellulose-stimulated transcription of the major member of the cellulase system, cellobiohydrolase I, was localized between –241 and –72 relative to the TATA box. In this work we show that this region controls transcription and mediates glucose repression of a reporter gene in *Saccharomyces cerevisiae*, a unicellular microorganism that lacks the genes required for the utilization of cellulose.

Glucose-controlled transcription mediated by the UARcb1 requires the product of *SNF1* gene, a protein kinase, and two repressors SSN6 and TUP1, which are well established in controlling glucose-repressible yeast genes. Our results indicate a conserved mechanism of glucose control in eukariotic microorganisms.

RESUMO

O sistema celulolítico do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é induzido transcricionalmente em pelo menos 1000 vezes pelo crescimento do fungo na presença de celulose e fortemente reprimido por glicose. Usando a abordagem de deleção no promotor, determinou-se que a região localizada entre -241 e -72 bp, em relação ao TATA box, denominada UARcb1, é responsável pela transcrição estimulada por celulose da enzima celobiohidrolase I (*cbh1*). Neste trabalho mostramos que essa região controla a transcrição de um gene repórter, sofrendo repressão por glicose, em *Saccharomyces cerevisiae*, um microrganismo que não possui os genes necessários para a utilização de celulose.

A transcrição mediada por UARcb1, que é controlada por glicose, requer o produto do gene *SNF1*, uma proteína quinase, e dois repressores: SSN6 e TUP1, cujos papéis no controle de genes reprimidos por glicose, na levedura, são bem estabelecidos. Nossos resultados indicam um mecanismo conservado de controle por glicose em microrganismos eucarióticos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Regulação Transcricional em Eucariotos

As reações bioquímicas que ocorrem dentro de uma célula são harmoniosamente coordenadas por processos regulatórios. Esse controle é influenciado por vários fenômenos biológicos, nos quais a primeira etapa da regulação consiste na síntese de RNA pela RNA polimerase (Conaway e Conaway, 1993). Em organismos eucariotos há três tipos de RNA polimerases, as quais transcrevem diferentes tipos de genes: a RNA polimerase I (RNA polI) sintetiza RNA ribossomal, a RNA polimerase II (RNA polII) transcreve genes que codificam para proteínas e a RNA polimerase III (RNA polIII) transcreve o RNA 5S e o RNA transportador (tRNA) (Sawadogo e Sentenac, 1990). Devido ao grande interesse em se entender como são controlados fenômenos biológicos, tais como crescimento celular, respostas a alterações ambientais, desenvolvimento de organismos multicelulares e mesmo doenças genéticas, como o câncer, os estudos de regulação transcricional se concentram na determinação do início e do nível de transcrição pela RNA polII, a qual é responsável pela transcrição de genes que codificam para proteínas.

A estrutura de um gene pode ser dividida em duas porções: a região codificadora, a qual é transcrita pela RNA polII em mRNA no núcleo e, posteriormente, traduzida em proteína no citoplasma; e a parte que antecede esta região, denominada região promotora. O promotor de um gene contém seqüências específicas, denominadas elementos *cis*, que são o alvo dos fatores de transcrição, que por sua vez constituem um conjunto de proteínas que determinam a ação da RNAPolII; e portanto a transcrição. Esse fenômeno, chamado regulação transcricional, é extremamente complexo e resulta da interação entre vários fatores protéicos, que obedecem a etapas até o momento não muito bem compreendidas. O processo que vai desde a molécula de DNA até a formação da proteína em níveis fisiologicamente regulados inclui, além da formação da molécula de RNA mensageiro, a estabilidade dessa molécula (Cereghino e Scheffler, 1996), a tradução do mRNA em proteína e as alterações pós traducionais. Esse conjunto de eventos é responsável pelo controle da expressão gênica.

As seqüências que se colocam adjacentes ao ponto de iniciação da transcrição são denominadas elementos promotores e aquelas localizadas mais distantes são denominadas elementos "upstream". Os elementos promotores são representados por TATA box (que possuem o consenso TATAA) e INR (elemento iniciador); e os elementos "upstream" por UAS "upstream activating sequence" (Struhl, 1987).

De forma geral para um gene ser ativado, isto é, ter sua expressão incrementada, é necessário que haja a formação de um complexo de iniciação, responsável pelo início da transcrição; e a ação de uma proteína ativadora que, ligada no elemento "upstream", seja capaz de interagir com a maquinaria geral (ou basal) de transcrição ativando o sistema. A figura 1 apresenta os elementos e fatores que participam de uma transcrição gênica regulada.

Figura 1. Modelo da maquinaria básica de transcrição e do processo de ativação.

Outro elemento que compõe a maquinaria basal de transcrição é o elemento iniciador - INR (Chen e Struhl, 1985). Em levedura, o elemento iniciador tem sua localização determinada em relação ao ponto de iniciação da transcrição e de forma diferente do elemento TATA ele não apresenta seqüência consenso e tem efeito modesto no nível de

transcrição. Esse elemento apresenta outras funções não bem caracterizadas, sendo proposto por Berroteram et al. (1994), que ele contenha sítios de ligação para fatores específicos complementares.

1.1.1 Formação do Complexo de Iniciação da Transcrição

A iniciação da transcrição apresenta uma hierarquia de interações, nas quais fatores se ligam a elementos promotores. A montagem do complexo é um fator limitante para a transcrição de um gene. A maioria dos promotores contém elementos TATA (por apresentar a sequência consenso TATAAA) que são importantes para orientar o ponto exato de início da transcrição. Os elementos TATA de levedura são localizados de -40 a -120 pb a montante do sítio de iniciação do mRNA (Struhl, 1989). Por outro lado, as sequências TATA de outros eucariotos são invariavelmente localizadas de -25 a -30 pb do sítio de iniciação. Os elementos TATA são reconhecidos pela "TATA-binding protein" (TBP), um componente da maquinaria basal de transcrição que inicia a montagem do complexo basal, que tem a função de recrutar a RNAPolIII para o promotor (McKnight, 1996).

TBP é o mais conservado fator de transcrição eucariótico com seu domínio C-terminal apresentando mais de 80% de identidade entre homólogos em uma ampla variedade de espécies. Esta é uma proteína pequena, de 30.000 daltons, que se liga no sulco menor da hélice de DNA. TBP apresenta uma estrutura tridimensional que se parece com uma sela. A superfície interna da "sela" interage com o "TATA box" e as superfícies externas interagem com outras proteínas (Klug, 1993; Buratowski, 1994). Apesar de inicialmente definido como fator básico da polimerase II, TBP é requerido para a transcrição pelas três RNA polimerases (Hernandez, 1993). Esse fator se associa com outros fatores denominados TAFs ("TBP associated factors") formando complexo denominado TFIID (Dymlacht et al., 1991). Depois da ligação de TBP ao elemento TATA, que é um passo indispensável para a formação do complexo (Buratowski, 1994), se ligam os fatores denominados TAFs, formando o fator TFIID (figura 2). É verificado que TFIID é capaz de promover a transcrição de genes cujos promotores não apresentam a sequência "TATAbox", sendo que TBP sozinho é incapaz de fazê-lo (Pugh e Tjian, 1992; Ge e

Roeder, 1994). Isto demonstra que os TAFs não são essenciais para formação do complexo de iniciação em promotores contendo TATA box (Hernandez, 1993; Buratowski, 1994; Tjian e Maniatis, 1994). Ao complexo DNA-TFIID se liga o fator TFIIA. esse fator parece estar envolvido na manutenção do complexo em determinadas condições fisiológicas, podendo estabilizar a interação TBP-DNA em promotores com elementos TATAs enfraquecidos por alteração iônica (Lee, 1992).

Figura 2. Modelo para a montagem do complexo de pré-iniciação em um promotor que contém TATA box. Apesar de não serem essenciais a formação do complexo de iniciação, os TAFs estão representados na figura, em vermelho com linha pontilhada. As barras representam interações proteína-proteína. Os fatores se adicionam no complexo na ordem indicada pelas setas. esse modelo foi baseado em revisão apresentada por Roeder (1996).

O complexo formado DNA-TFIID-TFIIA é alvo para o fator TFIIIB, que se estende entre o elemento TATA e o sítio de iniciação do mRNA. esse fator, além de se ligar

diretamente ao complexo DNA-TBP, é também requerido para o recrutamento da RNA polII para o complexo de transcrição, funcionando como uma ponte entre TFIID e RNAPolII (Buratowski, 1994).

A RNA polII de levedura apresenta 12 subunidades, sendo que todas elas têm seu respectivo gene já clonado (Young, 1991). Suas duas maiores subunidades estão envolvidas com a catálise. Outras subunidades interagem com muitos fatores de transcrição, porém sua função exata é ainda obscura. Quanto à natureza da estrutura da enzima, o domínio carboxi-terminal é o mais estudado (CTD – carboxi terminal domain). Evidências mostram que esse domínio é indispensável para a transcrição de genes cujos promotores não apresentam a sequência TATA (Buermeier et al., 1992), sendo não absolutamente necessário para a atividade de promotores com TATA box (Serizawa et al., 1993). Outras evidências mostram que TFIID interage com CTD (Conaway et al., 1992) sugerindo que CTD pode desempenhar um papel importante na associação da polimerase com o complexo de iniciação.

TFIIF se liga a RNAPol II, mesmo na ausência de DNA ou de outros fatores, sugerindo que a RNA polimerase se liga primeiramente ao TFIIF para depois se ligar ao complexo de iniciação (Flores et al., 1991; Tyree et al., 1993). É verificado que o fator TFIIE se liga ao complexo para a posterior incorporação do fator TFIIH (Flores et al., 1992). Esse fator (TFIIH) apresenta a atividade de quinase, entre outras atividades bioquímicas, e está envolvido na fosforilação do CTD da maior subunidade da RNAPol II (Drapkin et al., 1994).

Esta série de eventos mencionados representa um modelo de montagem do complexo de iniciação, que é sustentado por muitas evidências experimentais, porém esse não é o único modelo proposto. Um segundo modelo propõe a formação da holoenzima antes da ligação a molécula de DNA (Ossipow et al., 1995).

1.1.2 Elementos *cis* Atuantes

O complexo de iniciação composto pelos elementos *cis* e os fatores gerais de transcrição (GTFs), citados anteriormente, compreendem o aparato de transcrição basal, o qual tem a habilidade de garantir o nível basal de transcrição de um dado promotor

(Lewin, 1990). Para se ter um nível regulado de transcrição é necessário que fatores regulatórios interajam com elementos *cis* (upstream) localizados em posições variáveis no promotor e esse complexo, por sua vez, interaja com o complexo de iniciação.

Em *Saccharomyces cerevisiae* UAS é um sítio de ativação que contém tipicamente de 10 a 30 pb de comprimento e está localizado de - 50 a - 1500 pb do sítio de iniciação (Guarente, 1988; Struhl, 1995). Outra classe de elementos *cis* é representada pelos "enhancers", que são seqüências capazes de estimular a transcrição independentemente da orientação ou distância que estejam em relação ao ponto de iniciação da transcrição, ocorrendo de centenas a milhares de pares de bases distantes de TATABox (McKnight e Tjian, 1986). Estes elementos não são encontrados em levedura, sendo entretanto os UAS análogos, e em muitos casos homólogos, a seqüências "enhancer" de mamíferos. Alguns promotores de levedura contêm elementos regulatórios negativos (URS – upstream repressing sequence), denominados operadores, que reprimem a transcrição (Struhl, 1989).

1.1.3 Mecanismos de ativação

Alguns estudos de mecanismos de ativação sugerem que ativadores podem estimular a transcrição pelo melhor recrutamento de TBP ao promotor, facilitando o acesso do fator ao elemento TATA (Klages e Strubin, 1995 ; Klein e Struhl, 1994; Struhl, 1996). Esta hipótese é altamente provável uma vez que a ligação de TBP ao TATA box é muito frágil quando considerado o fato que o DNA está envolvido em cromatina, o que representa uma barreira física aos GTFs (Imbalzano et al., 1994). Proteínas ativadoras podem estimular a formação do complexo TFIID-TFIIA com o elemento TATA, ativando desta forma a transcrição (Chi et al., 1995). Parece que múltiplos contatos entre domínios de ativação e TAFs podem favorecer fortemente a ligação de TFIID ao elemento TATA, aumentando o nível de transcrição do gene (Choy e Green, 1993; Hernandez, 1993; Buratowski, 1994).

Os TAFs são considerados coativadores por não serem necessários para a transcrição basal, porém são indispensáveis para a transcrição ativada de vários promotores (Tjian e Maniatis, 1994; Roeder, 1996). Esse fato sugere fortemente que estes fatores exercem um papel importante na ativação da transcrição, provavelmente pela interação com proteínas ativadoras. Um exemplo de interação de fatores de ativação com TAFs é a proteína p53, um

supressor de tumor que ativa a expressão de proteínas que controlam a proliferação celular. Esta interação se dá pelo domínio de ativação ácido de p53, localizado na região N-terminal que se liga aos TAFII40 e TAFII60 (Thut et al., 1995).

Em células de levedura, uma considerável porção da pol II corresponde a um grande complexo multiprotéico denominado holoenzima pol II (Koleske and Young, 1995). Esta holoenzima contém a maior parte dos fatores básicos de transcrição e também vários outros fatores não reconhecidos, que estão aparentemente ausentes da maquinaria básica de transcrição definida *in vitro*. Proteínas como: Srb2 a Srb11, Gal11, Sin4 e Rgr1 foram originalmente identificadas por mutações que influenciavam a transcrição de genes. As proteínas Srb são associadas ao CTD da polII e têm a capacidade de fosforilar esse domínio. O subcomplexo contendo Srb são denominados mediadores; (Kim et al., 1994) e podem ser separados da maior subunidade de polII. Desta forma, a holoenzima pol II deve ser uma entidade molecular que inicia a transcrição *in vivo* (Koleske e Young, 1995) e, em combinação com TBP, pode responder a proteínas ativadoras, o que não acontece quando a reação contém somente o núcleo pol II. Assim, parece que os mediadores que compõe a holoenzima pol II são alvos de interação com ativadores (Struhl, 1996).

Outro complexo Swi/Snf também desempenha um papel na ativação da transcrição. Esse complexo rompe a organização nucleossomal de um maneira dependente de ATP *in vitro*. Esta alteração da estrutura da cromatina pode facilitar a ligação de ativadores ou de TBP na sua seqüência alvo (Imbalzano et al., 1994). Entretanto como Swi/Snf perturba os nucleossomos e se, realmente, o complexo afeta ativadores e TBP *in vivo* permanece obscuro.

Para uma proteína cumprir seu papel de ativador, isto é o de incrementar a transcrição de um gene, ela deve apresentar um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ativação, com o qual deve interagir com fatores da maquinaria basal de transcrição, e de alguma forma, promover a transcrição. Células de levedura contém uma ampla variedade de transativadores que se ligam em UAS pelos domínio típicos de ligação ao DNA, como o "helix-turn-helix", "leucin zipper", "zinc finger" e "bzip". O motivo "helix-turn-helix" é caracterizado por uma sucessão de duas alfa-hélices separadas por uma volta de comprimento variável ("loop") (Pabo e Sauer, 1992). Nesta estrutura cada hélice é uma molécula anfipática com resíduos carregados de um lado e sem carga do outro. Esse

motivo foi encontrado nos reguladores de tipo de acasalamento de levedura (mating type) $\alpha 2$ e $\alpha 1$ (Porter e Smith, 1986). Outro tipo de estrutura denominada "Homeo-domain" (HD) possui uma estrutura composta de 3 α -hélices, das quais uma se liga ao sulco maior do DNA, enquanto as outras duas fazem contato com o lado externo da hélice. Esse motivo é encontrado em uma conservada região de várias proteínas regulatórias de *Drosophila* (Laughon e Scott, 1984).

O segundo motivo de ligação ao DNA, o "leucine zipper", é formado por uma sequência rica em leucinas, sendo que a cada 7 aminoácidos encontra-se uma leucina, resultando em uma α -hélice anfipática, com uma face hidrofóbica na molécula, formada pelos radicais metil das leucinas, que possibilita a união de duas moléculas por um encaixe semelhante a um zíper (Landschulz et al., 1988). Esta estrutura foi descoberta pelo estudo que mostrou grande homologia de sequência entre os produtos de diversos oncogenes (FOS, MYC, JUN e AP1). Nesse tipo de estrutura é possível formar heterodímeros, como JUN e FOS. Esta estrutura se liga ao DNA através das sequências adjacentes à região do zíper, que são altamente básicas. As proteínas que possuem uma região entre o N-terminal e a região do zíper são denominadas "b-Zip", tendo como representante a proteína regulatória de levedura GCN4, que está envolvida com a biossíntese de proteínas e purinas (Vogt et al., 1987).

A terceira estrutura, chamada "Zinc finger", é a mais encontrada em organismos eucariotos. Esta apresenta uma sequência ordenada de resíduos de cisteína e histidina (Cys-N₂-Cys-N₁₂-His-N₃-His) para coordenar de forma tetraédrica um átomo de zinco (Zn). Esta estrutura dobra-se formando um arranjo tridimensional similar a um dedo (Lee et al., 1989). Uma estrutura alternativa foi encontrada no regulador GAL4 de levedura (Laughon e Scott, 1984). Nesse caso, dois átomos de Zn são ligados por 6 resíduos de cisteínas, resultando na formação de uma folha de trevo de três pequenos laços de proteína (Pan e Coleman, 1990). Esse tipo de estrutura é também encontrado em um grande número de reguladores de levedura incluindo HAP1 (Creusot et al., 1988; Pfeifer et al., 1989). As sequências ricas em GC encontradas nos promotores eucarióticos - GC box - são reconhecidas pelo fator de transcrição SP1 ("specific protein 1") que também possui esta estrutura (Mitchell e Tjian, 1989). Outro tipo de "Zinc finger" é Cys2-His2, representada pela proteína Zif268 de *Xenopus* (Pavletich e Pabo, 1991).

Domínios de ligação a DNA de proteínas regulatórias são aptos para se ligar com alta afinidade a seqüências de DNA definidas. Entretanto, seria esperado que genes que são ativados pelos mesmos ativadores apresentassem em seu promotor seqüências similares. Inesperadamente é observado que vários reguladores tem a propriedade de se ligar a diversas seqüências nucleotídicas, as quais apresentam pouca ou nenhuma homologia. HAP1, um ativador de *S. cerevisiae* dos genes *CYC1* e *CYC7* (isocitocromo c oxidase 1 e isocitocromo c oxidase 7, respectivamente), requerido para a expressão dependente de heme desses genes (Guarente et al., 1984; Pfeifer et al., 1987), se liga com afinidade equivalente nas seqüências alvo dos dois promotores, sendo que as mesmas apresentam pouca homologia (Pfeifer et al., 1987). Um único "zinc finger" é responsável por esta ligação nos elementos dos dois promotores e mutações nesse domínio de ligação causa a perda da capacidade de se ligar em um ou outro elemento (Verdiere et al., 1986; Pfeifer et al., 1987). Sítios promíscuos de ligação a DNA têm sido demonstrado em humanos para proteínas receptoras de glucocorticóides (Chandler et al., 1983). Estas observações sugerem que reguladores que reconhecem várias seqüências poderiam exercer sua função pela ligação em sítios na proximidade de outros fatores de transcrição, com os quais eles pudessem interagir e proporcionar o reconhecimento (Guarente e Bermingham-McDonogh, 1992). Esse mecanismo proporciona e pode explicar a considerável flexibilidade para o controle de genes, habilitando o mesmo regulador, de acordo com o contexto do promotor, exercer sua função regulatória.

Em relação aos domínios de ativação, há algumas classes já caracterizadas incluindo domínios ricos em prolina (Proline-rich), domínio ricos em glutamina (Glutamine-rich) e domínio ácidos ou ativadores acídicos. Dentre esses o domínio ácido de ativação parece ser o único que aparentemente funciona universalmente em todos os eucariotos testados, desde levedura até humanos.

O domínio de ativação ácido em levedura é frequentemente definido por pequenas regiões ácidas, geralmente ricas em resíduos de ácido aspártico e de ácido glutâmico (Asp e Glu). Apesar da carga negativa ser importante, o nível de estimulação da transcrição é também influenciado por resíduos hidrofóbicos e outras características que são pouco compreendidas em nível estrutural (Hahn, 1993). Experimentos que comprovam esta teoria foram feitos com o domínio ácido de ativação de GCN4. A remoção dos resíduos negativos

mostrou que a diminuição de cargas negativas não foi precisamente correlacionada com a diminuição da capacidade de ativação (Hope et al., 1988).

Os ativadores ácidos não apresentam conservação na sua seqüência a não ser na carga negativa líquida. A falta de conservação na seqüência foi demonstrada por estudos de mutagênese em GAL4 de levedura (envolvido no metabolismo de galactose). Esse estudo mostrou que poucas mutações tiveram efeito na redução da capacidade de ativação (Gill e Ptashne, 1987). Outros experimentos com o ativador VP16 apresentaram resultados semelhantes, mostrando que a remoção de somente um resíduo de fenilalanina foi crítico para a função de ativação. Porém a remoção de 4 resíduos de uma só vez causou efeito modesto na redução (Gill e Ptashne, 1987). Estas evidências sugerem que a região da proteína responsável pela ativação deve ser redundante e/ou apresentar requerimento de seqüência bem limitado (Hahn, 1993).

Foi observado por Lech et al. (1988) que a fosforilação de resíduos presentes no domínio de ativação também pode levar a um aumento nesta função, o que indica o efeito do aumento da carga negativa líquida para esse fenômeno. Estudos mais recentes contestam a importância da carga negativa e da estrutura de α -hélice para a capacidade de ativação dos domínios ativadores das proteínas. Leuther et al. (1993) demonstrou que a carga negativa não é importante para a ativação por *GAL4*. Eles eliminaram a maioria das, ou em alguns casos todas, cargas negativas e obtiveram uma modesta redução na função ativadora. Além disso, adicionaram resíduos positivamente carregados com predição de estrutura de folha beta pregueada e tiveram pouco efeito na redução da capacidade de ativação de *GAL4*, sugerindo que os ativadores apresentam forma distinta para realizar sua função.

Não somente os domínios ácidos apresentam a capacidade de ativar a transcrição. A proteína SP1 (specific protein 1) contém duas regiões ricas em glutamina, que desempenham um importante papel na ativação de genes, possivelmente pelo contato direto com TAFs durante o processo de iniciação (Hoey et al., 1993), permitindo assim uma estável interação de TFIID a promotores "TATAless" (que não apresentam o elemento TATA). Há também os domínios ricos em prolina que exercem papel na ativação de genes. Esses domínios tem sido encontrados em diversos reguladores de eucariotos superiores, porém ainda não é claro se os mecanismos que estas classes de ativadores utilizam para

ativar a transcrição de genes estão presentes em todos os organismos eucariotos (Mitchell e Tjian, 1989; Guarente e Bermingham-McDonogh, 1992).

Há evidências que mostram que um ativador deve ser regulado e somente ativar a transcrição quando necessário (Woychik, 1994). Receptores de hormônios esteróides, que são ativadores de transcrição, e são mantidos inativos através de ligação com outras proteínas para que funcionem somente na presença do hormônio (Ptashne, 1988). Há evidências que um regulador pode ser controlado por fosforilação. A proteína ADR1, ativadora do gene *ADH2* é parcialmente regulada por fosforilação de uma quinase dependente de cAMP (Denis e Galo, 1986, Hunter e Karin, 1992). Mutações no gene *SNF1*, que codifica uma proteína serina-treonina quinase (Celenza e Carlson, 1986), impede a ativação de *ADH2* de uma forma independente de ADR1 (Denis et al, 1991).

Muitos estudos estão concentrados nesta área a fim de desvendar o verdadeiro mecanismo pelo qual as proteínas ativadoras conseguem modular o nível de expressão de genes. Esses dados mostram que aparentemente tais mecanismos estão envolvidos no intuito de estabilizar ou recrutar TBP ao elemento TATA box, que é o ponto comum dos fenômenos acima descritos.

1.1.4 Mecanismos de repressão

Organismos eucariotos apresentam uma variedade de mecanismos de repressão que regulam a transcrição de genes não relacionados. O mecanismo mais geral envolve os nucleossomos, que revestem o DNA e restringem severamente o acesso dos GTFs (fatores gerais de transcrição) ao promotor (Grunstein, 1990). Recentemente foi demonstrado que a acetilação da cromatina torna o DNA acessível aos fatores basais estimulando a transcrição. Isto é explicado pelo fato de que o grupo acetil, o qual é ligado em resíduos básicos da proteína como a lisina, reduz a atração das histonas pelo DNA devido a neutralização das cargas positivas. Esta alteração proporciona a aproximação dos GTFs com a molécula de DNA, promovendo, desta forma, a expressão do gene e mostrando o envolvimento da cromatina no controle da regulação da expressão gênica (Pennisi, 1997).

Além disso, sítios operadores podem inibir a transcrição de genes e podem ser localizados em várias posições ao longo dos promotores. As proteínas repressoras podem

agir pela competição com proteínas ativadoras em sítios coincidentes ou sobrepostos (Small et al., 1991) ou pela ligação em domínio de endereçamento nuclear de ativadores, evitando dessa forma o transporte desses do citoplasma para o núcleo (Beg et al., 1992). Outra forma de repressão seria pela ligação de repressores entre o elemento TATA e o UAS, inibindo estericamente a comunicação entre o ativador e maquinaria básica de transcrição (Brent e Ptashne, 1984). Os repressores podem também se ligar a domínios de ativação de ativadores impedindo a interação com o complexo basal de transcrição e conseqüentemente impedindo sua função, como é o caso do repressor GAL80 do sistema GAL. Esse repressor se liga na região de GAL4 que vai do aminoácido 856 a 881, na ausência de galactose, cobrindo o domínio de ativação e impedindo que GAL4 exerça sua função. A presença do indutor (galactose) faz com que de alguma forma o repressor GAL80 se desligue de GAL4 permitindo que esse volte a ter a capacidade de ativar (Ma e Ptashne, 1987).

1.2 Repressão por Glicose em *S. cerevisiae*

1.2.1 Considerações Gerais

A glicose desempenha um papel crucial na regulação metabólica da célula e na transcrição de vários genes envolvidos no metabolismo de carboidratos de uma série de organismos. Células que crescem nessa fonte de carbono reprimem a expressão de um grande número de genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas (Ronne, 1995), por ser a glicose mais facilmente metabolizada pelos organismos. Repressão por glicose é extensivamente estudada na levedura *S. cerevisiae*, com o objetivo de se entender como um simples fator ambiental pode controlar mecanismos de transcrição e conseqüentemente a expressão de vários genes. O uso de mutantes e utilização de técnicas moleculares muito bem estabelecidas neste organismo ajudam a decifrar esse fenômeno, o qual se mostra resultante da interação de vários fatores.

A nível transcricional diversos mecanismos têm sido descritos pelos quais a glicose pode reprimir a expressão de genes. Eles incluem basicamente repressão por reguladores negativos (Nehlin et al., 1991; Flick e Johnston, 1992) e repressão da síntese (Vallari et al., 1992) ou função de ativadores (Johnston e Carlson, 1992; Denis et al., 1992).

A expressão de genes reprimidos por glicose pode ocorrer por dois mecanismos distintos, sendo eles, mecanismo de desrepressão ou mecanismo de indução. Desrepressão se dá pela simples ausência de glicose (Denis et al., 1981), enquanto indução necessita da presença de indutores específicos (Johnston e Carlson, 1992; Hong e Mamour, 1987; Goldenthal et al., 1987). Os dois mecanismos são reprimidos por glicose, sendo o segundo (indução) reprimido mesmo na presença do indutor, mostrando que a presença de glicose é a primeira etapa da regulação destes genes.

Em *S. cerevisiae* o sistema *GAL*, do metabolismo de galactose e o sistema *MAL*, do metabolismo de maltose estão sob controle duplo, isto é, repressão por glicose e indução por galactose (Johnston e Carlson, 1992) ou maltose (Vanoni et al., 1989), respectivamente; enquanto o sistema de degradação de sacarose apresenta exclusivamente repressão por glicose (Carlson e Botstein, 1982).

Nesta levedura os genes reprimidos por glicose incluem, além dos requeridos para fontes alternativas de carbono, aqueles que são requeridos para o metabolismo oxidativo. O desenvolvimento da mitocôndria e competência respiratória em *S. cerevisiae* são eventos reprimidos por glicose e induzidos por oxigênio. Devido a regulação dupla destes genes, eles são em parte semelhantes à regulação dos sistemas *GAL*, *MAL* e *SUC*. Os exemplos mais estudados são *CYC1* e *CYC7*, os quais codificam diferentes formas do citocromo c (Forsburg e Guarente, 1989).

Três mecanismos gerais governam a repressão por glicose nos genes do sistema *GAL* (do metabolismo de galactose): 1. inibição da indução por galactose; 2. redução no nível de *GAL4* (o ativador); 3. repressão via os elementos negativos *cis* atuantes. Todos exercem papéis fundamentais na repressão. A indução por galactose é mediada por duas proteínas regulatórias, *GAL4* e *GAL80*. *GAL4* se liga ao UAS do promotor de *GAL1* ativando sua transcrição. Esta proteína tem sido extensivamente caracterizada, apresentando um domínio de ligação a DNA do tipo “zinc finger” (C_2C_2) no amino-terminal e diversos domínios ácidos em outras regiões, os quais são requeridos para ativação da transcrição. A proteína *GAL80* inibe a atividade de *GAL4* pela ligação no carboxi-terminal, provavelmente mascarando o domínio de ativação (Bajwa et al., 1988).

A enzima invertase, que hidrolisa extracelularmente sacarose em glicose e frutose, é codificada por uma família de genes relacionados, denominados *SUC*. O mais estudado é o

gene *SUC2*, que apresenta uma diferença de 100 vezes nos níveis de mRNA entre o estado reprimido e desreprimido (Carlson e Botstein, 1982). A utilização de maltose em levedura é controlada pelos loci MAL, consistindo de genes que codificam para permease, maltase e para um regulador positivo (Vanoni et al., 1989).

Os genes *CYC1* e *CYC7* são expressos de forma favorável sob condições divergentes, porém compartilham de alguns elementos regulatórios (Laz et al., 1984). Eles são influenciados, de forma antagônica, pelo nível de oxigênio e nível de glicose, e também mediados pela concentração intracelular de heme, cuja biossíntese é dependente de oxigênio. A expressão de *CYC1* é extremamente diminuída em mutantes incapazes de sintetizar heme, e pode ser restaurado pela adição extracelular deste efector (Forsburg e Guarente, 1989). A transcrição de *CYC1* é controlada por dois elementos, UAS1 e UAS2, os quais são alvo de fatores de ativação chamados de HAP (Haem-Activated Proteins). A proteína HAP1 se liga no UAS1 de uma maneira dependente de heme *in vitro*.

1.2.2 Fatores envolvidos na Repressão por Glicose

Muitos genes envolvidos no circuito de regulação por glicose foram clonados utilizando o sistema SUC. Os mutantes não desreprimíveis são incapazes de expressar *SUC2* mesmo na ausência de glicose, enquanto os mutantes constitutivos expressam invertase na presença ou ausência de glicose. Muito sobre repressão por glicose foi elucidado utilizando esse sistema, pelo fato de se tratarem de reguladores gerais que estão envolvidos na expressão de genes que sentem flutuação desta fonte de carbono no meio de cultura. O primeiro grupo a ser selecionado foi o dos SNF (sucrose non fermentation gene), que são representados por mutantes que são incapazes de crescer em meio contendo sacarose, em outras palavras, não são desreprimidos na ausência de glicose (Celenza e Carlson, 1984a). Outro grupo de mutantes que suprimem a mutação em SNF foi selecionado. Mutações que permitem que mutantes *snf* passem a utilizar sacarose foram denominados SSN (Supressor SNF gene).

Entre os vários reguladores clonados, *SNF1* (Celenza e Carlson, 1984^a) and *SSN6* estão entre os mais bem compreendidos. SNF1 é uma proteína quinase, que fosforila resíduos de serina e treonina, e está envolvida na desrepressão de uma série de genes

reprimidos por glicose. Mutantes *ssn6* produzem níveis altos de invertase de forma constitutiva, assim como expressam constitutivamente outros genes reprimidos por glicose. Desta forma, verificou-se que SSN6 é um repressor que, na presença de glicose, impede a expressão de genes envolvidos na degradação de fontes de carbono alternativas (Celenza e Carlson, 1986).

Mais tarde, com a clonagem de outros fatores, um pouco foi elucidado a respeito de como se dá o processo de repressão por glicose. Foi verificado que o produto do gene *TUP1* interage com SSN6, formando o complexo repressor TUP1-SSN6. Há evidências que mostram que TUP1 interage com as histonas H3 e H4, que são proteínas nucleossomais, devendo modular a estrutura da cromatina (Edmonson et al., 1996). O complexo TUP1-SSN6 não se liga diretamente ao DNA. Para que isso ocorra esse complexo deve interagir com repressores, por exemplo, o bem caracterizado MIG1 (Treitel e Carlson, 1995). *MIG1* codifica uma proteína que apresenta uma estrutura de ligação a DNA, isto é, "zinc finger" do tipo Cys₂His₂ (Nehlin e Ronne, 1990). Esta proteína está envolvida com a repressão de genes reprimidos por glicose. Elementos envolvidos na repressão por glicose têm sido mapeados no promotor *GALI* (Flick e Johnston, 1990) onde MIG1 se liga. No sistema *GAL* o repressor MIG1 tem um papel duplo. Ele também reprime a transcrição do ativador GAL4. O sítio alvo dessa proteína é motivo rico em GC (Nehlin et al., 1991). Esse repressor se liga a dois sítios na região 5' de *SUC2*, que é um gene componente do sistema de degradação da sacarose que apresenta repressão por glicose (Carlson e Botstein, 1982).

Evidências genéticas sugerem que um papel de SNF1 é aliviar a repressão transcricional causada pelo complexo MIG1-SSN6-TUP1 nos genes *SUC2* e *GALI*. Entretanto SNF1 deve afetar a expressão por outros mecanismos que não estão sujeitos a repressão por esse complexo (Lesage et al., 1996). SNF1 e SSN6 estão envolvidos na expressão de genes que codificam proteínas mitocondriais e que apresentam repressão por glicose, como *COX6* e *CYC1* (Wright e Poyton, 1990).

O complexo repressor SSN6/TUP1 reprime diversos genes em respostas a alterações ambientais, como por exemplo alterações metabólicas. SSN6 é uma grande fosfoproteína que contém 10 cópias em tandem de repetições de tetratricopeptídeo (TPR) (Schultz et al., 1990). Esse domínio parece mediar a interação proteína-proteína e três repetições são

necessárias para a interação com TUP1 (Smith et al., 1995). Diferentes repetições são requeridas para a repressão de diferentes lotes de genes (Tzamarias e Struhl, 1995). A habilidade de interagir com múltiplas proteínas consiste com a proposta de que SSN6 age como um adaptador entre TUP1 e várias proteínas que se ligam a DNA (Edmondson et al., 1996).

Diversos domínios foram identificados em TUP1. A metade do domínio carboxi terminal (CTD) de TUP1 contém 8 repetições de uma sequência de 43 aminoácidos rica em aspartato e triptofano (WD) (Williams e Trumbly, 1990; Mukai et al., 1991). A região amino terminal de 72 aminoácidos de TUP1 é requerida para a interação com SSN6 (Tzamarias e Struhl, 1995). O mecanismo pelo qual o complexo SSN6/TUP1 confere repressão é ainda desconhecido. Os possíveis alvos deste complexo incluem os fatores basais de transcrição e componentes da estrutura da cromatina. Evidências comprovam as duas possibilidades. A repressão pelo complexo SSN6/TUP1 de um gene repórter sob a regulação de promotores de genes específicos para célula de levedura do tipo de acasalamento (a) (mating type a) pode ser reconstituído *in vitro*, na presença de extratos nucleares e proteína recombinante $\alpha 2$ (necessária para repressão dos genes do tipo a) (Herschbach et al., 1994). Entretanto, a modesta repressão observada (2 a 4 vezes) é bem menor que a observada *in vivo* (200 vezes), indicando que alguns fatores devem ser limitantes no extrato nuclear, provavelmente a cromatina (Edmondson et al., 1996). Outros experimentos mostram que o estável posicionamento de nucleossomo e a completa repressão por SSN6/TUP1 requerem não somente $\alpha 2$, SSN6 e TUP1, mas também a cauda do amino terminal da histona H4 (Roth e Simpson, 1992). Mais recentemente, Edmondson et al. (1996) demonstraram que o domínio de repressão de TUP1 interage especificamente com o domínio amino terminal das histonas H3 e H4 e que esta interação é dependente do nível de acetilação da histona. Além disso, demonstraram que mutações na região amino terminal de H3 e H4, abole ou enfraquece a interação com TUP1, comprometendo a repressão mediada por esse fator e sugerindo que o complexo deva diretamente modular a estrutura da cromatina e reprimir a expressão de genes.

Dados atuais mostram, de uma forma muito curiosa, que TUP1 é o repressor da formação de filamentos na levedura *Candida albicans*, não apresentando envolvimento na repressão de genes reprimidos por glicose nessa levedura. Entretanto é verificado que

TUP1 de *C. albicans* complementa mutantes *tup1* de *S. cerevisiae*, indicando um mecanismo de repressão conservado. Isto mostra que TUP1 age como um repressor transcricional em ambas as espécies. Entretanto a regulação da proteína repressora que liga ao DNA e a identidade dos promotores aos quais esse complexo se liga parecem ter se divergido entre as espécies (Braun e Johnson, 1997).

1.3 O envolvimento da atividade mitocondrial na expressão de genes nucleares

Mitocôndria é uma organela essencial da célula onde ocorre o fenômeno da respiração. Nesta organela estão localizadas as enzimas do ciclo do ácido cítrico e enzimas requeridas para a via biossintética de diversos aminoácidos e de heme. Mitocôndria possui seu próprio genoma, que codifica para uma pequena fração das proteínas necessárias para o transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. A outra parte é codificada por genes nucleares, traduzida no citoplasma e importada para a organela (Forsburg e Guarente, 1989).

S. cerevisiae é um anaeróbico facultativo e, de forma diferente de outros organismos eucarióticos, pode sobreviver com a perda parcial ou total de seu DNA da mitocôndria, satisfazendo suas necessidades energéticas através da glicólise. Estes deficientes respiratórios são denominados mutantes *petites* (*pet*) e, a depender do tipo de deleção no genoma mitocondrial, são chamados ρ^- (deleção parcial) ou ρ^0 (deleção total) (Dujon, 1981). Estes mutantes são incapazes de crescer em fonte de carbono não fermentável, como por exemplo, etanol e glicerol.

A função essencial da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria é a fosforilação oxidativa, na qual a passagem de elétrons de um complexo protéico para outro, até o aceptor final de elétrons (O_2), resulta na diferença de potencial na membrana mitocondrial interna, que é usada para a síntese de ATP. Estes complexos protéicos são representados pelos citocromos, e os elétrons são transportados via o grupo prostético heme desses (Forsburg e Guarente, 1989).

O fato de parte destes polipeptídeos ser transcrita no núcleo e parte na mitocôndria exige uma expressão coordenada dos genes nucleares com o estado mitocondrial e com as condições de crescimento da célula. A célula tem que balancear a produção de proteínas

codificadas em genomas distintos para permitir a montagem de todos os componentes na membrana interna da mitocôndria. Além disso alguns componentes destes complexos apresentam isoformas, como por exemplo os genes *CYC1* e *CYC7*, que são duas formas de citocromos c oxidase codificadas no genoma nuclear e que afetam funções catalíticas dos complexos multiméricos composto de subunidades codificadas na mitocôndria. Estas isoformas são diferencialmente reguladas pelos sinais de desenvolvimento e ambientais e provavelmente auxiliam no ajuste da célula quanto a produção de energia para diferentes necessidades (Poyton e McEwen, 1996).

Por outro lado, muitas evidências sugerem que a mitocôndria pode se comunicar com o núcleo interferindo no nível de transcritos de genes nucleares, a depender da função respiratória da organela. Parikh et al. (1987) utilizando mutantes *petites*, mostraram que o estado do genoma mitocondrial pode afetar a expressão de genes nucleares. Os autores classificaram três grupos de mRNA, o grupo de RNA que aumentava o nível nos mutantes em relação à linhagem selvagem (grupos II e III) e o grupo que diminuía o nível nos mutantes em relação a linhagem selvagem (grupo I). O mecanismo molecular deste envolvimento ainda não é totalmente compreendido.

Assim, a função mitocondrial pode afetar o nível de transcrição de vários genes nucleares, como por exemplo os genes *CIT1* e *CIT2*, que codifica a forma mitocondrial e peroximal de citrato sintetase em *S. cerevisiae*, respectivamente. A expressão de *CIT1* foi reduzida em mutantes *petite*, enquanto a de *CIT2* apresentou um comportamento antagônico no nível de transcrição, aumentando a sua expressão em mutantes deficientes respiratórios (Liao et al., 1991).

Recentemente foi demonstrado no fungo filamentoso *T. reesei*, que o estágio fisiológico da mitocôndria influencia a transcrição de genes nucleares. Abrahão Neto et al. (1995) mostraram que os transcritos de *cbhl* e *egl1*, que codificam para celobiohidrolase 1 e endoglucanase 1, respectivamente, e que são membros do sistema celulolítico desse organismo, são reprimidos por glicose nas concentrações que reprimem a atividade mitocondrial. Adicionalmente, os transcritos foram reprimidos quando submetidos a baixas concentrações de oxigênio e por agentes que dissipam o gradiente de prótons da membrana mitocondrial interna, e também com outros que bloqueiam o transporte de elétrons na cadeia respiratória. Estes resultados mostram a correlação da atividade mitocondrial e

repressão por glicose, indicando que possivelmente a repressão está ligada a atividade respiratória.

1.4 O sistema celulolítico de *Trichoderma reesei*

A biomassa celulósica anual resultante do processo fotossintético de algas e plantas é de aproximadamente $7,2 \times 10^{10}$ toneladas (Ljungdahl e Erickson, 1985). Sua utilização como fonte de energia é de extremo interesse, tendo como empecilho o fato da celulose ser um polissacarídeo de alta complexidade, tornando sua hidrólise para glicose em um processo não econômico. Todavia existe uma série de microrganismos que possuem o sistema capaz de degradar celulose. Entre esses o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é o mais estudado, possuindo um sistema completo de enzimas celulolíticas extracelulares (Montenecourt, 1983), podendo crescer em meio contendo celulose como única fonte de carbono.

As enzimas que degradam celulose são tradicionalmente divididas em três grupos, de acordo com sua forma de ação; celobiohidrolases (CBH), que removem resíduos de celobiose das extremidades da cadeia celulolítica (Barr et al., 1996); endoglucanases (EGL), que clivam ligações β -glucosídicas (Stahlberg et al., 1993); e β -glucosidase, que hidrolisa celobiose e oligossacarídeos de pequena massa molecular em glicose. A atividade das três classes é necessária para a hidrólise eficiente de celulose para glicose.

O sistema celulolítico desse microrganismo é induzido pelo menos 1000 vezes na presença de celulose (Carle-Urioste et al., 1997) e fortemente reprimido por glicose (Abrahão Neto et al., 1995). Dados atuais mostram que os componentes do sistema celulolítico são regulados coordenadamente (Abrahão Neto, 1995; Torigoi et al., 1996; Ilmén et al., 1997), devendo existir um mecanismo de regulação comum.

Sendo celulose um polímero insolúvel, constituído de unidades de glicose unidas por ligações β -1,4, foi grande o interesse em se entender como a celulose, a qual é incapaz de atravessar a membrana celular, induziria o sistema de celulasas. Desde estudos iniciais foi suposto que a indução dos genes que codificam para celulasas necessitavam de uma expressão constitutiva basal, a qual seria capaz de gerar produtos solúveis que penetrassem na célula e induzissem a expressão das celulasas (Mandels e Reese, 1960). Estudos

mostraram que soforose, um dímero de glicose unidas por ligação β -1,2, presente em culturas de *T. reesei* crescidas em celulose ou celobiose, é um potente indutor do sistema celulolítico (Mandels e Reese, 1960). Acredita-se que a formação da soforose se dá através da atividade de transglicosilação da enzima β -glicosidase, ligada à membrana celular, sobre a celobiose (ligação β -1,4 - celobiose; em β -1,2 - soforose) (Mach et al., 1995).

Evidências experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram a importância da expressão basal do sistema celulolítico para a indução de seus próprios transcritos pelo polímero insolúvel celulose. El Gogary et al. (1989) demonstraram, através do uso de anticorpos anticelulases, que os mesmos bloqueiam a expressão das celulases quando o agente indutor utilizado era a celulose; na indução por soforose, entretanto, os anticorpos não tiveram qualquer efeito. Esse resultado indica que o indutor solúvel (soforose) ultrapassa o bloqueio causado pelos anticorpos. Outros experimentos, utilizando um anti-senso contra os mRNAs dos genes *cbh2*, *egl1* e *egl2*, mostraram *in vivo* o bloqueio da expressão induzida de *cbh1* quando em presença de celulose. A expressão do anti-senso não reprimiu a indução do transcrito na presença de soforose. Estes resultados indicam a necessidade de uma atividade celulolítica para indução do sistema por celulose, que é conseguida pela expressão basal das celulases (Carle-Urioste et al., 1997). Além disso foram caracterizados mutantes que são defectivos na indução dos transcritos de celulases por celulose ou soforose. No entanto, esses mutantes ainda apresentam expressão basal (Torigói et al., 1996). Dessa forma, os experimentos com esses mutantes indicaram que os promotores que controlam a expressão desses genes devem ter duas atividades distintas, uma responsável pela expressão basal e outra pela expressão induzida.

Resultados obtidos recentemente usando a abordagem de deleção do promotor de celobiohidrolase I (*cbh1*) confirmaram essa suposição. Neste experimento, utilizando β -glucuronidase (GUS), como gene repórter, foram identificados 169 pb localizados de -72 a -241 (relativos ao TATA box) que são responsáveis pela expressão induzida por celulose. Esta região de 169 pb foi denominada UARcb1 ("upstream activating region of *cbh1* gene"). A deleção desta região do promotor aboliu a atividade induzida por celulose, mas no entanto, não teve efeito sobre atividade basal do gene *cbh1*. A região responsável por esta atividade é de 72 pb, a qual foi denominada BERcb1 ("basal expresion region of *cbh1* gene"). Portanto, o estudo deste promotor concluiu que esse é composto de duas regiões

regulatórias – a basal (BERcb1-72pb) e a induzida (UARcb1-169pb) (Henrique-Silva et al., 1996). A figura 3 representa essas regiões no promotor de *cbhl*.

Figura 3. Estrutura e localização das regiões que controlam a expressão basal e induzida por celulose no promotor de *cbhl*. UARcb1: “Upstream activating region of *cbhl*” gene, BERcb1: “Basal expression region of *cbhl* gene”. As posições citadas são relativas ao elemento TATA.

Foi ainda observado no promotor *cbhl* sítios putativos de ligação do repressor CRE1, homólogo de MIG1 de *S. cerevisiae*, o primeiro regulador clonado do sistema celulolítico (Ilmén et al., 1996b; Takashima et al., 1996). Estes sítios se localizam a montante de UARcb1.

Todos esses dados sugerem fortemente que a expressão de *cbhl* é regulada por elementos *cis* que controlam a expressão basal, induzida por celulose e reprimida por glicose.

1.5 Aspectos da conservação de mecanismos regulatórios em eucariotos

Um dos maiores temas que surgiu recentemente de estudos de regulação transcricional em *S. cerevisiae* é a considerável conservação do processo de controle da expressão gênica entre eucariotos, de levedura a mamíferos. Esta conservação não inclui somente os componentes basais da maquinaria de transcrição, mas também fatores

específicos de ativação, suas seqüências alvos de ligação ao DNA e até seus mecanismos de ativação e repressão (Guarente, 1992).

Além disso, embora reguladores apresentem-se altamente conservados entre organismos eucariotos, a homologia entre suas seqüências é frequentemente limitada apenas aos domínios funcionais das proteínas. Esses, em muitos casos, tratam-se de apenas alguns aminoácidos específicos dispersos entre resíduos que podem variar aleatoriamente. Por exemplo, o motivo "zinc finger" responsável pela interação de diversos reguladores, como ADR1 (regulador da álcool desidrogenase) (Guarente et al, 1982), com as suas seqüências alvo.

Esta conservação de reguladores e seqüências regulatórias tem sido repetidamente verificada através da expressão de genes de diversas origens sob o controle dos seus próprios promotores na levedura *S. cerevisiae* (Guarente et al., 1992). *S. cerevisiae* apresenta todas as características desejáveis para o estudo da regulação gênica a nível molecular, como uma grande coleção de mutantes e genes isolados, fácil manipulação genética, grande variedade de vetores integrativos, episomais ou centroméricos, altas taxas de transformação, integração e disrupção, etc. Devido a isso, esse microrganismo tem sido intensivamente utilizado para desvendar os princípios desta área fundamental da ciência.

É ainda interessante citar que, embora os elementos e fatores regulatórios, sejam conservados entre eucariotos, as funções que eles desempenham nos seus hospedeiros podem ter se divergido de acordo com a história evolutiva destes (Guarente et al., 1992). Por exemplo, *GCN4* está envolvido no controle traducional de mRNA codificando para enzimas da biosíntese de aminoácidos em levedura, enquanto seus homólogos em eucariotos superiores, *jun* e *fos*, estão envolvidos na regulação transcricional de diversos genes (Guarente et al., 1992). Outro interessante exemplo é o caso de *TUP1*, já citado anteriormente. Em *S. cerevisiae* TUP1 está envolvido com a repressão de genes por glicose e em *Candida albicans*, TUP1 participa da repressão de formação de pseudo-hifas, não apresentando função nenhuma na repressão por glicose neste organismo (Braun e Johnson, 1997).

O gene que codifica celobiohidrolase I (*cbh1*) de *T. reesei* é induzido por celulose e reprimido por glicose. A repressão por glicose entre os microrganismos eucarióticos é um mecanismo evolutivamente conservado. Neste processo tanto repressores quanto

mecanismos envolvidos estão sendo caracterizados, porém até o momento não se sabe o sinal pelo qual glicose reprime a expressão de genes afetados por esse carboidrato.

1.6 Objetivos

O fungo filamentoso *T. reesei* possui um eficiente sistema celulolítico, no qual a expressão das celulasas é controlada coordenadamente a nível transcricional. O crescimento de *T. reesei* em celulose resulta na indução do sistema, sendo que glicose reprime fortemente a expressão das celulasas. Dentre os componentes deste sistema, celobiohidrolase I (CBH1) é a enzima mais estudada por ser o componente majoritário.

Esforços têm sido acumulados a fim de se entender o mecanismo de regulação do gene *cbh1* e, apesar de muito ter sido elucidado nos últimos anos (El-Dorry et al., 1996; Henrique-Silva et al., 1996; Carle-Urioste et al., 1997; Seitboth et al., 1997), as limitações experimentais deste microrganismo dificultam a compreensão do sistema e a determinação dos fatores envolvidos em sua regulação.

No presente trabalho analisamos a regulação transcricional por glicose do promotor do gene que codifica celobiohidrolase I (*cbh1*) de *T. reesei* em *S. cerevisiae*, um microrganismo unicelular que não possui os genes que codificam para celulasas. Esta levedura tem sido utilizada como uma poderosa ferramenta para examinar a conservação evolutiva entre eucariotos. Assim, nós analisamos o controle por glicose de um gene repórter controlado pela região 5' do gene *cbh1* de *T. reesei*. Também foi analisada a interação com esta região de fatores bem caracterizados de *S. cerevisiae* envolvidos na repressão por glicose.

2. Material e Métodos

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A.), de marca Merck (adquiridos de Quimtra, Comércio e Indústria S.A., São Paulo). Da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA, foram adquiridos acrilamida, bis-acrilamida, ampicilina, bicina, SDS, brometo de etídio, TEMED, BSA, triton X100, X-gal, ONPG, agar, agarose, peptona, triptona, extrato de levedura, etileno glicol, PEG 1000, β -mercaptoetanol, sorbitol, persulfato de amônio, azul de bromofenol, xileno glicol e aminoácidos.

Meio de cultura para levedura "yeast nitrogen base" sem aminoácidos e sulfato de amônio, foram adquiridos da DIFCO, USA. Resinas de gel filtração e purificação de DNA tipo SEPHACRIL (200, 300 e 400) e poli dIdC fita dupla foram obtidas da Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suécia. As enzimas de restrição e modificadoras de DNA foram obtidas da Pharmacia, Boehringer Mannheim, Biolabs e da Gibco-BRL. Isótopos foram adquiridos da Amersham International plc, Inglaterra. "Kits" para sequenciamento de DNA foram do tipo Dye-Terminator – cycle sequence ready reaction. N. Cat. 401628. Os oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados pela BIO SYNTHESIS – Oligo Data Sheet, pela PROMICRO – produtos microbiológicos. Os filmes de raio X foram da marca Kodak X-OMAT XK1. Todas as soluções foram preparadas com água desionizada Milli Q (Millipore Corporation, Bedford, Ma, USA).

2.2 *S. cerevisiae*

2.2.1 Linhagens

HD93-15D *MATa his3 leu2 ura3 trp1*

HD93-15Dm1 *MATa his3 leu2 ura3 trp1 mig1*

MCY1551 *MAT α ura3-52 ade2-101 leu2::His3 snf1A suc2*

YM4554 *MATa ura3-52 his3 ade2-101 leu2 Δ 1 trp Δ 63 ssn6::ura3::Leu2*

YM4513 *MATa ura3-52 his3 ade2-101 leu2Δ1 trpΔ63 tyr tup1::Trp1*

YM4553 *MATa ura3-52 his3 ade2-101 leu2Δ1 trpΔ63 tyr mig1::Leu2*

2.2.2 Condições de crescimento

YEPD - 2% extrato de levedura, 1% peptona, 2% glicose - usado como meio rico.

YNB - Como meio mínimo (0,17% “yeast nitrogen base”, 0,5% sulfato de amônio) foi usado meio sintético suplementado com fontes distintas de carbono de acordo com o objetivo de cada experimento. Para marcas de auxotrofia foram adicionados aminoácidos ou nucleotídeo (uracila) numa concentração final de aproximadamente 40µg/ml. Para meio sólido o valor de pH foi corrigido entre 6,8 a 7,0 sendo posteriormente adicionado 2% agar.

2.3 *Escherichia coli*

2.3.1 Linhagens

XL1-blue *supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac⁻, F'[proAB⁺ lac^a lacZΔM15 Tn10(tet^r)]*

DH5αF⁻ *F' (Z80dlacZ_(lacZ)M15_(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻,m_k⁺) supE44_thi⁻1 gyrA (Nal^r)relA1 (GIBCO BRL)*

2.3.2 Condições de crescimento

LB (1% bacto-triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) foi usado para crescimento de bactérias. Ampicilina (concentração final 150mg/ml) foi aplicada ao meio para seleção de plasmídeo com a marca correspondente.

2.4 Técnicas de DNA recombinante

Manipulação de seqüências de DNA foram executadas conforme protocolo básico - (Ausubel et al., 1990). Reações enzimáticas foram conduzidas conforme as condições estipuladas pelas companhias das quais as enzimas foram produzidas. Fragmentos de DNA foram extraídos de gel de agarose de acordo com a disponibilidade do método. Foram utilizados Gene-Clean II Kit – Bio 101 (BIO-RAD) e JETsorb (GENOMED). Quando o fragmento era menor que 150 pb, foi utilizado gel de acrilamida em concentrações que variaram de 6 a 12%, conforme tamanho do fragmento. Os métodos de extração empregados e das preparações rápidas de plasmídeos realizadas foram os descritos por Ausubel et al. (1990).

2.5 Plasmídeos básicos

2.5.1 Para clonagem e amplificação de fragmentos

BlueScript - M13 KS⁻ (STRATAGENE)

2.5.2 Para análise do promotor *cbh1*

YEp358 (Myers et al., 1986)

YEp357R (Myers et al., 1986)

2.5.3 Para isolamento de fragmentos

Promotor *cbh1* BS2.2 (Cedido por Henrique-Silva)

Região 5' do gene *cbh1* (fragmento *EcoR1-BglII*) com aproximadamente 2,2 Kb, foi ligada com linker *Bam*HI e posteriormente clonada no sítio *Bam*HI do plasmídeo BlueScript-M13-KS⁻

Promotor *CYC1* pLG669-Z (Guarente, 1983)

Região 5' do gene *CYC1* (iso-citocromo c oxidase 1) dirigindo a transcrição do gene repórter *lacZ*.

Região UARcb1 BS-UARcb1 (Cedido por Henrique-Silva)

Região UARcb1 flanqueada pelos sítios enzimáticos *Hind*III e *Bgl*II foi clonada em BlueScript-M13 KS- nos sítios *Hind*III e *Bam*HI que é compatível com *Bgl*II. Para retirada da região de UARcb1 do plasmídeo utilizou-se as enzimas *Hind*III e *Xba*I.

2.6 Construção de plasmídeos

Os procedimentos para obtenção de cada plasmídeo estão descritos a seguir. Eles estão representados em “Resultados” quando forem mencionados. Todas as construções foram testadas por análise do padrão de restrição. PCR e sequenciamento foram empregados para a confirmação das construções, quando necessário.

2.6.1 Para análise o promotor *cbh1*

Plasmídeo YEpCB2.2-Z

A região 5' do gene *cbh1* foi retirada do plasmídeo BS2.2 (2.5.3) com a enzima de restrição *Bam*HI e inserida no mesmo sítio do plasmídeo YEp358. Nesse promotor está incluído parte do gene estrutural codificando os 8 primeiros aminoácidos (25 pb) fundido em fase com o gene repórter *lacZ* do plasmídeo YEp358. A construção que apresentou orientação correta foi isolada e denominada YEpCB2.2-Z.

2.6.2 Para análise do promotor *CYC1*

Plasmídeo YEpCYC-Z

O fragmento de 1.1 Kb referente a região 5' do gene *CYC1* foi retirada do plasmídeo pLG669-Z com as enzimas de restrição *SalI* e *BamHI* e foi então inserida no plasmídeo YEp357R, originando o plasmídeo YEpCYC-Z.

Plasmídeo YEpMCYC-Z

Para remoção das regiões *cis* regulatórias do promotor do gene *CYC1*, o plasmídeo YEpCYC-Z (2.6.2) foi submetido a restrição com as enzimas *SalI* e *XhoI*, perdendo a região de -1100 a -250, que corresponde àquela que contém as seqüências *cis* regulatórias denominadas UAS1 e UAS2 (-700 a -250) e a região a montante desta (-1100 a -700) (Guarente et al., 1981). O fragmento restante foi religado. A região do promotor *CYC1* passou a conter somente a seqüência TATA box responsável pelo recrutamento da maquinaria basal de transcrição.

Plasmídeo YEpMxCYC-Z

Para obtenção do plasmídeo que traz o promotor mínimo *CYC1*, perdendo somente uma região de 450 pb (-700 a -250), onde estão localizado os UAS1 e UAS2 (Guarente et al, 1981). Para isso o plasmídeo YEpCYC-Z foi digerido com a enzima de restrição *XhoI*, que flanqueia essa região, e religado, originando o plasmídeo YEpMxCYC-Z

Os dois plasmídeos contendo o promotor mínimo de *CYC1*, citados acima, foram utilizados para identificação e análise de regiões *cis* regulatórias do promotor do gene *cbhl*.

2.6.3 Para análise de deleções do promotor *cbh1*

Utilizando o plasmídeo YEpMCYC1-Z

Plasmídeo YEpMCYC-CB1.2-Z

Regiões distintas do promotor *cbh1* foram inseridas a montante do promotor mínimo de *CYC1*. No caso de YEpMCYC-CB1.2-Z, um fragmento da região 5' de *cbh1* flanqueado pelos sítios de restrição *HindIII*, que corresponde a região de -1400 a -204, foi inserido no mesmo sítio (*HindIII*) do plasmídeo YEpMCYC-Z (2.6.2). Esse sítio fica a montante do promotor mínimo de *CYC1*. Foi isolada a construção com a orientação correta.

Plasmídeo YEpMCYC-CB1.0-Z

Para retirar uma região de 169 pb, correspondente a UARcb1 do promotor *cbh1*, flanqueada pelos sítios de restrição *BglII-HindIII*, o plasmídeo YEpMCYC-CB1.2-Z foi submetido a corte de restrição com as enzimas *BglII* e *PstI*. Depois do corte foi utilizada a enzima T4 polimerase para obtenção dos finais abruptos e o fragmento obtido foi religado. Desta forma o plasmídeo resultante (YEpMCYC-CB1.0-Z) não contém a região de 169 pb (UARcb1).

Plasmídeo YEpMCYC-UARcb1

Para análise da região do promotor de 169 pb, denominada UARcb1, o plasmídeo YEpMCYC-CB1.2-Z foi cortado com as enzimas de restrição *BglII* e *ClaI*. Desta restrição foi isolado o fragmento de 1281 pb, que contém UARcb1, promotor mínimo de *CYC1* e parte do gene repórter *lacZ*. O plasmídeo YEp357R foi submetido a corte com as enzimas *BamHI* e *ClaI*, isolando-se o fragmento de 7149 pb, o qual contém a parte complementar do gene *lacZ* e o restante do plasmídeo. Estes dois fragmentos foram isolados de gel de agarose e ligados *BglII/BamHI* e *ClaI/ClaI* que apresentam finais coesivos. Desta forma obteve-se o plasmídeo YEpMCYC-UARcb1.

Utilizando o plasmídeo YEpMxCYC-Z

Plasmídeo YEpMxCYC-UARcb1

Este plasmídeo apresenta a região UARcb1 inserida na região onde anteriormente estavam presente os UAS1 e UAS2 do próprio promotor *CYC1*. A diferença entre YEpMxCYC-UARcb1 e YEpMCYC-UARcb1 está na região a montante da região regulatória de *CYC1*. É importante frisar que os dois promotores mínimos não apresentam flutuações de atividade em meios com diferentes fontes de carbono.

Para construção de YEpMxCYC-UARcb1, a região de 169 pb (UARcb1) foi inserida na região correspondente aos UAS1 e UAS2 do próprio *CYC1*, isto é, no sítio *XhoI* do plasmídeo contendo o promotor *CYC1* mínimo YEpMxCYC-Z. Para isto, do plasmídeo YEpMxCYC-Z foi retirado o fragmento de 7513 pb, flanqueado pelas enzimas *XhoI* e *ClaI*, contendo parte do gene *lacZ* e o restante do plasmídeo YEpMxCYC-Z. O plasmídeo YEpMCYC-UARcb1 foi cortado com as enzimas *SaII* e *ClaI*, obtendo o fragmento de 1293 pb, que continha UARcb1, *CYC1* mínimo e parte do gene repórter *lacZ*. Os dois fragmentos foram ligados pelos sítios *ClaI/ClaI* e *SaII/XhoI*, que apresentam finais coesivos.

2.6.4 Para delimitação da região UARcb1

Para delimitar a região de 169 pb (UARcb1), flanqueada pelos sítios de restrição *BglIII* e *HindIII*, que se mostrou responsável pela indução, foi feito um trabalho de deleção dessa região por PCR. Foram retirados fragmentos de 18 e 85 pb em relação ao sítio de *BglIII* de UARcb1.

Plasmídeo YEpMCYC-CB1.2Δ18-Z

O fragmento de PCR - deleção 18 - (2.7.1), foi cortado com *ClaI*, resultando um fragmento de 2397 pb, que apresenta um final coesivo *ClaI* e um abrupto. Esse fragmento continha UARcb1 com uma deleção de 18 pb (representada na figura 7.A), *CYC1* mínimo e

parte do gene *lacZ*. O plasmídeo YEpMCYC-CB1.2-Z foi cortado com a enzima de restrição *Bgl*II, tendo os finais preenchidos com a polimerase Klenow e após a inativação da polimerase, foi submetido a corte com *Cla*I, o que resultou em um fragmento de 8425 pb. Os dois fragmentos foram ligados obtendo assim o plasmídeo que apresentava uma deleção de 18 pb em UARcb1.

Para evitar que parte do gene repórter *lacZ* fosse produto de PCR, foi retirado de YEpMCYC-CB1.2Δ18-Z, (o promotor de *cbh1* com a deleção de 18 pb), utilizando a enzima *Hind*III, que flanqueia essa região e ligou-se um fragmento de 8406 pb obtido da restrição de YEpMCYC-CB1.2-Z com *Hind*III, que corresponde ao *CYC1* mínimo, gene repórter *lacZ* e o restante do plasmídeo. Essa construção, que aparentemente é igual a anterior, apresenta uma maior confiabilidade, pois o produto de PCR se limitou a região UARcb1Δ18 e não engloba o promotor *CYC1* mínimo nem parte do gene repórter. O restante do plasmídeo é exatamente igual ao seu correspondente sem deleção.

Plasmídeo YEpMCYC-CB1.2Δ85-Z

O produto de PCR – Deleção-Δ85 (2.7.1) - que inclui o UARcb1 com a deleção de 85 pb e o promotor mínimo *CYC1*, foi submetido a reação de corte de restrição com as enzimas *Pst*I e *Bgl*II, obtendo-se assim o fragmento de 155 pb. O plasmídeo YEpMCYC-CB1.2-Z foi submetido a reação de corte com as mesmas enzimas citadas anteriormente e o fragmento resultante de 9531 pb foi ligado com o produto da reação de corte do produto de PCR – Deleção-Δ85 (2.7.1). Portanto, esse plasmídeo resultante (YEpMCYC-CB1.2Δ85-Z) apresenta uma deleção de 85 pb em UARcb1. Depois da confirmação do plasmídeo por padrão de restrição, a região do promotor flanqueada pela enzima *Hind*III foi colocada em plasmídeo BlueScript – M13 KS⁺ para sequenciamento e confirmação da deleção.

2.7 Condições de PCR

As condições de reação de PCR foram a uma temperatura de pareamento de 57°C seguindo o seguinte programa:

- (1) 3 min a 94°C
- (2) 1,5 min a 57°C
- (3) 1,5 min a 72°C
- (4) 1,5 min a 94°C
- (5) 30 vezes volta a etapa 2
- (6) 10 min a 72°C

2.7.1 Para deleções de UARcb1

Deleção $\Delta 18$

Molde: YEpmCYC-CB1.2-Z

Primer reverse *lacZrev*, que hibridiza com uma região do gene repórter *lacZ*

5' CCATCGATAATTTACCGCCGAA 3'.

Primer forward $\Delta 18$, o qual hibridiza com a região localizada logo após os 18 pb do sítio de *Bgl*II de UARcb1

5' GCCTTTGGGTGTACATGTTTG 3'

Deleção $\Delta 85$

Molde: YEpmCYC-CB1.2-Z

Primer reverse: UARcb1 $\Delta 85$, que hibridiza com a região a 85 pb depois do sítio de restrição *Bgl*II de UARcb1

5' GAAGATCTCTTTACCAAGCAGCTGAGGG 3'

Primer forward: CYC1BamH1, que hibridiza com a região à 5' do gene repórter

lacZ incluindo o sítio *Bam*HI de fusão do promotor *CYC1* e o gene repórter.

5' CGGGATCCGTTTATTATTAATTTAGTGTGT 3'

2.8 Seqüenciamento para confirmação da deleção $\Delta 85$

Para confirmação da deleção de 85 pb de UARcb1, foi feito seqüenciamento da região promotora de *cbh1*, que inclui a deleção, clonada em BlueScript – M13 KS-, utilizando o seqüenciador ABI-310 Perkin Elmer. “Kit: Dye-Terminator – cycle sequence ready reaction”. N. Cat. 401628.

2.8.1 Purificação do plasmídeo para seqüenciamento

O plasmídeo obtido de extração alcalina normal foi ressuspensionado em 50 μ l de água desionizada. Depois adicionou-se 2 μ l de RNase 10 mg/ml por 30 min a 30°C. Após isso foi adicionado 30 μ l de solução 20 % PEG 8000 em NaCl 2,5 M. Manteve-se 1 hora em gelo. Após esse procedimento centrifugou-se a 13000 rpm em centrífuga eppendorf 15 min, desprezou-se o sobrenadante e lavou-se com 250 μ l etanol 70 %. O sedimento foi ressuspensionado em 18 μ l de água desionizada. Depois disso, adicionou-se 2 μ l 2M NaOH (esperou-se 5 min). Acrescentou-se 8 μ l NH_4Ac 5M e 100 μ l etanol absoluto. A reação foi colocada em etanol mais gelo seco por 20 min e novamente centrifugada por 13000 rpm por mais 15 min. O sedimento foi cuidadosamente lavado com 250 μ l de etanol 70%, seco a vácuo por 1 hora e ressuspensionado em 10 μ l de água desionizada.

2.9 Transformação de *E. coli*

As bactérias foram feitas competentes conforme método de Hanahan (1985) e de acordo com o protocolo apresentado pelo eletroporador BIO-RAD e foram transformadas com 1,5 a 2 μ l de reação de ligação inativada a 65°C - 10 min. A transformação se deu utilizando Gene-Pulser apparatus a 25mF, a 2,5kV e Pulser Controller 200, com cubeta de eletroporação de 0,2 cm - Biorad.

2.10 Transformação de levedura

As transformações foram conduzidas de acordo com Dohmen et al (1991).

2.11 Determinação da concentração de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita segundo o método Bradford (1976).

2.12 Extratos protéicos e determinação de atividade β -galactosídica

O gene repórter *lacZ* clonado a 3' de uma região promotora a ser estudada, possui sua própria sequência de ligação ao ribossomo, que portanto, não é determinada pela região promotora clonada a sua montante. Desta maneira, a atividade de seu produto gênico representa uma medida quantitativa da capacidade de transcrição do promotor a ser estudado. A β -galactosidase é uma enzima que hidrolisa β -D-galactosídeos. Esta atividade enzimática pode ser observada (em placas) e medida (em meio líquido) com a utilização de substratos cromogênicos. Esses substratos são incolores e quando hidrolisados dão origem a produtos coloridos, como por exemplo ONPG (O-Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) e X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo). O primeiro (ONPG), na presença da enzima é convertido a galactose e orto-nitrofenol. O orto-nitrofenol é amarelo e pode ser quantificado por sua absorção a 420 nm. O segundo (X-GAL), que também é incolor e na presença de β -galactosidase, é convertido a galactose e 5-bromo-4-cloro-3-indol. Este último é azul, e pode ser observado em placa.

Meio líquido

As linhagens analisadas foram crescidas em meio YNB (suplementadas com os aminoácidos necessários) e 2% glicose até fase logarítma $OD_{600} = 1$. Para obtenção das condições de repressão e desrepressão a cultura foi dividida, as duas partes centrifugadas a aproximadamente 3000 rpm e ressuspensas em mesmo meio com as mesmas marcas de

auxotrofia, porém com fontes distintas de carbono: 4% glicose (condição de repressão) e 1% glicerol (condição de desrepressão). As amostras foram retiradas depois de 8 a 10 horas. Para preparação dos extratos protéicos, 3 ml de cultura de células são usadas. Essas foram lavadas em tampão *lacZ* (10mM tampão Na-fosfato pH 7.0, 10mM KCl, 1mM MgSO₄), ressuspensas em 50 mM Tampão Na-fosfato pH 7.0 e então rompidas com 200 µl de pérolas de vidro (0.45-0.5 mm de diâmetro) por repetidas sessões de 30 s em vórtex, alternadas em banhos de gelo (de 6 a 10 repetições). As amostras foram centrifugadas a 9000 rpm por 5 min e os sobrenadantes foram coletados e submetidos a ensaios de atividade β-galactosídica, segundo método Miller (1977) e quantificação protéica (Bradford, 1976). Os valores são apresentados em mmoles de ONPG hidrolisados/min/mg de extrato de proteína (mU/mg). Os resultados apresentados são a média de três transformantes independentes.

Meio sólido

Três transformantes independentes são crescidos em placa contendo YNB (2.2.2) mais requerimento de aminoácido necessário e 2% glicose. Depois de crescidos por 16-24 horas estes são repassados para placas contendo o mesmo requerimento de aminoácidos, a mesma composição de nutrientes do meio mínimo descrito anteriormente, porém com 50 mM de tampão fosfato (Na-fosfato). Nesses meios as fontes de carbono foram: 4% glicose e 1% glicerol juntamente com o substrato (1 mg/placa) X-GAL. As células que expressam β-galactosidase quando crescidas na presença desse substrato apresentam coloração azul 12 horas depois. A solução de X-GAL é feita na concentração de 10 mg/ml de dimetilformamida (DMF), utilizando-se em torno de 100 µl/placa.

2.13 Determinação de glicose em meio de cultura

Para monitorar a presença de glicose nas células crescidas em condições de repressão (glicose) e desrepressão (glicerol), os sobrenadantes das culturas de meio líquido foram submetidos a ensaio com o KIT de determinação de glicose - Sigma Diagnostics - Glucose.

2.14 Análise de interação DNA-proteína

2.14.1 Extratos protéicos de levedura para gel de retardamento

A linhagem de levedura HD93-15D foi inoculada em meio YEPD, com fonte diferencial de carbono: 4% glicose ou 1% glicerol, correspondentes a meio repressor e desrepressor, respectivamente. As amostras foram retiradas em fase estacionária $OD_{600} = 3$ (depois de 16 a 20 horas), centrifugada em centrífuga Sorval RC5C á 4°C - 4000 rpm por 5 minutos. O sedimento foi macerado em nitrogênio líquido e 200 µl de pérolas de vidro para facilitar a maceração. Em seguida foi adicionado tampão de interação. O macerado foi centrifugado na mesma centrífuga descrita anteriormente a 4°C, 13000 rpm por 5 min.

Tampão de interação

HEPES (pH 7,8) - 20mM

NaCl - 100mM

EDTA - 2mM

β-Mercaptoetanol - 7mM

Glicerol - 10%

MgCl₂ - 5mM

Inibidores de proteases: 1mM PMSF; 200µg/ml aprotinin; 50µg/ml leupeptin.

2.14.2 Marcação do fragmento de DNA (utilizado como sonda)

A seqüência de UARcb1 clonada em BlueScript - M13 KS⁻, foi retirada com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III, e tratadas com dNTP, [α^{32} P]CTP e enzima Klenow para preenchimento radioativo das extremidades. Depois de 30 min de tratamento com Klenow centrifugou-se por 2 min sobre coluna MicroSpinS300 Hx- columns PHARMACIA – a 3000 rpm em centrífuga Eppendorf, para eliminação dos nucleotídeos livres. Essa coluna deve ser previamente centrifugada por 1 min a 3000 rpm, para empacotamento.

2.14.3 Condições da reação de interação

A reação de interação se deu com aproximadamente 10 ng de DNA marcado radioativamente (UARcb1) e aproximadamente 15 µg de extrato protéico em volume final de 20 µl. A reação procedeu a 25°C por 20 min. Quando necessário 20 ng de heme foi adicionado a reação de interação. A preparação da solução de heme se deu conforme Ausubel et al. (1990).

2.14.4 Condições de eletroforese

A corrida eletroforética se deu com tampão 89 mM Tris/borato contendo 20 mM EDTA (TBE) sob 90V em gel de acrilamida 5%. Depois da eletroforese o gel foi seco em secador Model 583 - Gel dryer - Bio Rad por 1,5 horas a 80°C, e em seguida autoradiografado.

2.15 Obtenção de mutantes deficientes mitocondriais

A linhagem HD93-15D foi feita “petite” segundo Rothermel et al. (1995). A linhagem HD9315D foi inoculada em 5 ml de YEPD por 24 horas. 50 µl desta cultura foram transferidos para 5ml de meio YEPD contendo 20 mg/ml de brometo de etídio. Este procedimento se repetiu por três vezes consecutivas. A cultura tratada foi plaqueada em placa contendo YEPD em uma diluição adequada para aparecimento de colônias isoladas. As colônias menores foram selecionadas e testadas em meio contendo 1% etanol, no qual a levedura petite não é capaz de crescer, uma vez que necessita da atividade respiratória para metabolizar etanol. Como se trata de deficientes respiratórios são incapazes de crescer em meio contendo fonte não fermentável.

3. RESULTADOS

3.1 Análise transcricional do gene repórter *lacZ* regulada pelo promotor do gene *cbh1* de *T. reesei* em *S. cerevisiae*

3.1.1 Regulação do promotor do gene *cbh1* em levedura

Sistemas regulatórios têm mostrado um alto grau de conservação entre diversos organismos. Nós testamos se o promotor *cbh1*, que dirige a expressão da enzima majoritária do sistema celulolítico em *T. reesei*, poderia dirigir expressão regulada de um gene repórter em *S. cerevisiae*, uma espécie que não possui o sistema celulolítico e que tem sido usada como um poderoso hospedeiro para examinar mecanismos básicos de ativação entre eucariotos (Guarente, 1988; Lech et al., 1988; Guarente e Bermingham-McDonogh, 1992). Nossa investigação foi no sentido de verificar se este promotor poderia regular a transcrição e responder a repressão por glicose neste organismo unicelular. Em *T. reesei*, *cbh1* dirige uma expressão fortemente reprimida por glicose e induzida por celulose (Abrahão Neto et al., 1995; Henrique-Silva et al., 1996).

Com esta finalidade, a região 5' de *cbh1* foi inserida em fase a montante do gene repórter *lacZ*, em um plasmídeo YEp358 (Guarente, 1983). Esta região contém 2.2 Kb de comprimento e 25 pb a 3' do códon de iniciação (ATG). Depois da transformação, os transformantes foram selecionados em placas sem uracila (marca de seleção correspondente ao plasmídeo YEp358). Estes foram crescidos até a fase mid-log ($OD_{600} \cong 1$) em meio líquido contendo glicose 4% por 12 horas, do qual se retirou uma alíquota (correspondente ao tempo 0). As células foram então coletadas, centrifugadas e ressuspensas em igual volume de meio contendo glicerol e alíquotas foram retiradas após 12, 24 e 48 horas. A atividade β -galactosídica foi medida nos extratos protéicos destas amostras, conforme protocolo descrito em material e métodos.

A

B

Tempo após transferência de meio de glicose para glicerol

Figura 4. Atividade β-galactosídica do gene repórter *lacZ* mediada pela região 5' do gene *cbh1* de *T. reesei* em *S. cerevisiae*. A. O plasmídeo YEpCB-Z-2.2 contém um fragmento de 2.2 Kb da região 5' de *cbh1* ligada em fase com o gene repórter da β-galactosidase (*lacZ*) de *E. coli*. B. Aliquotas foram retiradas da cultura em tempo 0 (células crescidas em glicose por 12 horas) e depois da transferência para meio contendo glicerol em tempos 12, 24 e 48h, como indicado. Foram obtidos extratos protéicos das amostras e estas foram submetidas a medição da atividade β-galactosídica. Os valores apresentados (em mU) são a média de três transformantes independentes. O desvio padrão apresentado foi de 1 a 13% entre os transformantes.

Os resultados apresentados na figura 4 mostraram que a atividade de *lacZ* foi aumentada no mínimo 10 vezes depois da transferência de meio contendo glicose para meio contendo glicerol. Este resultado demonstra que o promotor *cbh1* de *T. reesei* dirige uma expressão reprimível por glicose em levedura.

Glicerol foi utilizado aqui como fonte de carbono não repressora, porém outras fontes, como manose, lactose e sacarose foram analisadas em placas contendo o indicador X-GAL. Os resultados foram semelhantes ao observado em meio contendo glicerol. Foi analisada a expressão de *lacZ* controlado pelo promotor de *cbh1* em meio contendo celulose, o qual não apresentou expressão. Este resultado era esperado, já que a levedura não adquiriu os genes do sistema celulolítico durante a evolução e não apresenta os fatores necessários para a indução deste promotor por celulose.

3.1.2 Análise de deleções do promotor híbrido *cbh1-CYC1*

Em prévios estudos, neste laboratório, foi identificada uma região *cis* atuante no promotor de *cbh1*, que é responsável pela resposta à expressão estimulada por celulose e reprimida por glicose no fungo filamentoso *T. reesei*, denominada UARcb1 (Upstream activating region) (Henrique-Silva et al., 1996). O UARcb1 é localizada a - 72 e - 241 bp relativa ao TATA box (ou - 204 a - 373 relativa ao códon de iniciação ATG).

Nós investigamos a expressão do gene repórter *lacZ* sob a regulação de diferentes segmentos da região 5' do gene *cbh1* a fim de verificar se a mesma região responsável pelo controle da expressão deste gene no fungo *T. reesei* é também a que media a regulação em *S. cerevisiae*. Estes segmentos foram ligados com o promotor mínimo de *CYC1*, que traz a região do TATA box, na qual é montada o complexo básico de transcrição. Esta transcrição basal não é modulada, uma vez que as regiões regulatórias de *CYC1* (UAS 1 e UAS 2) foram deletadas (Guarente and Ptashne, 1981).

A atividade do promotor foi monitorada através da observação dos transformantes em meio sólido contendo glicerol ou glicose como fonte de carbono, na presença do substrato cromogênico X-GAL (5'-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo). Em placas a formação de coloração azul indica a expressão do gene *lacZ*, que é dada pela ação enzimática de *lacZ* sob o substrato, produzindo o produto cromogênico (5'-bromo-4-cloro-

3-indolil) que apresenta coloração azul. A atividade β -galactosídica também foi medida em cultura crescida em meio líquido, através de extração de proteínas e posterior ensaio de atividade usando o substrato ONPG (O-Nitrofenol- β -galactopiranosídeo).

O gene repórter *lacZ* controlado pelo promotor *CYCI* inteiro com as regiões regulatórias UAS1 e UAS2, , como era esperado (Guarente and Ptashne, 1981), teve a expressão aumentada quando as células transformadas foram transferidas para meio contendo glicerol (Fig. 5A construção 1). Deleção da sequência de DNA entre - 250 a - 700, que contém os elementos responsáveis pela regulação por glicose deste promotor (UAS1 e UAS2), resultando no promotor mínimo de *CYCI*, contendo TATA box, não apresentou alteração significativa na atividade β -galactosídica entre os dois meios testados. Este resultado era esperado por estarem ausentes, nesta construção, os elementos capazes de modular a expressão, UAS1 e UAS2 (Fig. 5A construção 2) (Guarente and Ptashne, 1981).

Figura 5. Atividade β -galactosídica de transformantes que carregam as deleções de *cbhI*, mostradas na figura, regulando a expressão de *lacZ*. 1) Promotor *CYC1*; 2) Promotor mínimo de *CYC1*, sem as regiões regulatórias UAS1 e UAS2; 3) Região 5' do gene *cbhI* (de -204 a -1400) ligado no promotor mínimo; 4) Promotor *cbhI* sem a região UARcb1 inserida no promotor mínimo de *CYC1*. Os sítios de restrição usados para gerar estas construções estão representados pelas letras (B, *Bam*H1; Bg, *Bgl*II; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sal*I e X, *Xho*I). Letras separadas por barras significam sítios depois de preenchimento e ligação. Números arábicos indicam a posição relativa ao ATG dos genes aos quais eles pertencem. A) Atividade β -galactosídica (em mU) dos transformantes foi determinada usando extrato protéico e substrato ONPG. Resultados são dados pela média dos valores obtidos de três transformantes independentes. O desvio padrão entre as repetições não ultrapassou 13%. B) Atividade β -galactosídica de cada transformante observada em placa contendo X-GAL, como indicador, e 1% glicerol ou 4% glicose.

A fusão da região 5' do gene *cbh1*, de - 243 a - 1400, com o promotor mínimo resultou a expressão reprimida por glicose (figura 5, construção 3), indicando que nesta região do promotor deve conter elementos regulatórios responsáveis pela expressão controlada do gene repórter *lacZ*. Como controle, nós utilizamos a ligação da região do promotor de *cbh1* na direção invertida resultando na perda da capacidade de desrepressão em meio sem glicose (não apresentado na figura). O efeito foi abolido quando o fragmento de DNA localizado entre - 204 e - 373 foi deletado (figura 5, construção 4), indicando que esta região (UARcb1) do promotor é responsável pela regulação do gene repórter *lacZ*. UARcb1 foi capaz de restaurar a regulação quando inserida no promotor mínimo (figura 5, construção 5). É interessante notar que quando é retirada a região de - 373 a - 1400, a montante de UARcb1 (construção 5) a repressão por glicose é relaxada quando comparada com a regulação mediada pelo promotor em que esta região está presente (figura 5, 18 mU-construção 3 em comparação com 106 mU-construção 5). Este resultado sugere a presença de elementos *cis* atuantes negativos em *cbh1* que devem influenciar a repressão por glicose, quando em presença desta fonte de carbono, sobre os quais discutiremos mais tarde.

Em suma, a análise de deleção nos mostrou, que a mesma região que controla a expressão induzida por celulose no fungo *T. reesei*, é capaz de controlar uma expressão reprimida por glicose em um organismo que não apresenta os genes responsáveis pela hidrólise da celulose, mostrando um mecanismo de regulação por glicose conservado entre estes dois microrganismos. Além disso, esta análise sugere a existência de elementos regulatórios negativos a montante de UARcb1, que parece influenciar a expressão reprimida por glicose.

3.1.3. Controle por glicose da expressão de *lacZ* mediada por UARcb1

Para confirmar a habilidade de UARcb1 (região entre - 204 a - 373) mediar a repressão por glicose, nós analisamos o comportamento do promotor híbrido UARcb1-*CYC1* quanto a flutuação de glicose no meio de cultura. Para isso células transformadas foram crescidas em meio contendo glicose, centrifugadas e transferidas em mesmo volume de meio contendo glicerol por 12 horas e depois novamente centrifugada e transferida em meio contendo glicose por outras 12 horas. Foram retiradas alíquotas destas amostras e estas foram submetidas à medição da atividade β -galactosídica utilizando extrato proteico e substrato ONPG. Como controle utilizamos a construção com o promotor mínimo de *CYC1* (YEpMCYC-Z) (figura 6).

A presença de UARcb1 foi necessária para o promotor híbrido sentir a flutuação de glicose no meio de cultura. A atividade *lacZ* foi estimulada em torno de 5 vezes quando a glicose foi retirada do meio. Entretanto, essa atividade foi reprimida quando glicose foi adicionada novamente ao meio. Desta forma, este resultado indica que UARcb1 é capaz de mediar a expressão que é reprimida por glicose em dois organismos distantes, sugerindo que esta região do promotor é alvo para fatores regulatórios envolvidos em um mecanismo de regulação conservado e controlado por glicose.

Figura 6. Efeito de glicose na expressão do gene repórter *lacZ* controlado pelo promotor híbrido UARcb1-CYC1. A) Representação dos plasmídios com os quais células de *S. cerevisiae* foram transformadas. Eles contêm o gene repórter *lacZ* controlado pelo promotor híbrido UARcb-CYC1 ou pela construção onde foi deletado o UARcb1 (promotor CYC1 mínimo). B.(a) Células transformadas foram crescidas em meio mínimo na presença de 4% glicose por 12 horas. (b) As células foram centrifugadas e o pelete foi ressuspensionado em mesmo volume de meio contendo glicerol (1%) ao invés de glicose e incubadas por mais 12 horas. (c) As células desreprimadas (de b) foram coletadas por centrifugação e ressuspensionadas novamente em meio contendo glicose, por 12 horas adicionais. Atividade de *lacZ* foi determinada nos extratos protéicos das culturas crescidas com diferentes fontes de carbono, como indicado. A atividade relativa é obtida em relação ao valor de atividade β -galactosídica obtido em (a).

3.1.4 Análise das deleções de UARcb1

A fim de melhor caracterizar a região do UARcb1, foram feitas através de técnica de PCR, deleções nessa região. UARcb1 é uma região de 169 pb (figura 8.A), responsável pela indução por celulose no fungo *T. reesei* (Henrique-Silva et al., 1996) e que responde ao controle por glicose na levedura, como mostrado neste trabalho. Dessa forma deleções de 18 pb e 85 pb foram obtidas. Na primeira deleção, $\Delta 18$ (figura 8 A – linha vermelha), foi retirada uma seqüência que apresentava uma pequena homologia com o sítio de ligação do ativador HAP1, para saber se esta estava envolvida no controle do promotor por glicose. HAP1 é um transativador que se liga as seqüências contidas nos promotores de vários genes que apresentam repressão por glicose e indução por oxigênio. Estas seqüências não apresentam, no entanto, grande homologia. A comparação entre as seqüências reconhecidas por HAP1 estão representadas na figura 7.

<i>CYC1</i> (UAS1A)	T T C A C C G A T C T T T C C G G T C T C T
<i>CYC1</i> (UAS1B)	T T G G C C G G G G T T T A C G G A C G A T
<i>CYT1</i>	G C C G C C G G A A A T A C C G G C C G C C
<i>CTT1</i>	C G A A A T G G A G A T A A C G G A G G T T
<i>CYC7</i>	G C C C T C G C T A T T A T C G C T A T T A
<i>cbh1</i> (UARcb1)	A T C T C G G G C C C T C G C G C G T T C G

Figura 7. Comparação entre seqüências reconhecidas pelo ativador HAP1. Na última linha está representada a seqüência presente no promotor de *cbh1* que apresenta pequena semelhança com as demais. As bases em negrito são encontradas em todas as seqüências.

A deleção $\Delta 85$ (figura 8.A- linha preta) corresponde a deleção de 18 pb, mencionado acima, mais 67 pb seguintes. Na figura 8 (B e C) estão apresentados os resultados obtidos com os transformantes que carregam essas deleções (2 e 3) em comparação com o transformante que traz o plasmídeo com o UARcb1 intacto (1).

A) Deleção em UARcb1

TAAGATCTCG GGCCCTCGCG CGTTCGGCCT TTGGGTGTAC ATGTTTGTGC TCCGGGCAAA

TGCAAAGTGT GGTAGGATCG AACACACTGC TGCCTTTACC AAGCAGCTGA GGGTATGTGA

TAGGCAAATG TTCAGGGGCC ACTGCATGGT TTCGAATAGA AAGAGAACCT TAGCCAAGAA

— $\Delta 18$

— $\Delta 85$

		Atividade β -galactosídica			
		B) Glicose	Glicerol	C) Glicose	Glicerol
1-		22	391		
2-		19	368		
3-		18	21		

Figura 8. A) Sequência de UARcb1. As bases sublinhadas em vermelho mostram a deleção de 18 pb e as bases sublinhadas em preto mostram a deleção de 85 pb. Os plasmídeos construídos estão representados de 1 a 3, onde (1) representa a região de UARcb1 completa, (2) representa a deleção de 18 pb ($\Delta 18$) e (3) a deleção de 85 pb ($\Delta 85$). B) Atividade β -galactosídica dos transformantes de cada plasmídeo foi determinada usando ONPG como substrato. Resultados são dados pela média dos valores obtidos de três transformantes independentes. O desvio padrão entre as repetições não ultrapassou 21%. C) Atividade β -galactosídica dos transformantes de cada construção observados em placa contendo indicador X-GAL e 1% glicerol ou 4% glicose, como indicado.

Nossos resultados mostraram que a deleção de 85 pb (Figura 8 construção 3) abole a expressão regulada pelo promotor do gene *cbh1*, enquanto que a deleção de 18 pb nada alterou o comportamento do promotor em relação a construção que traz o UARcb1 sem deleção, nos dois meios analisados. Esta análise indica que o suposto sítio de ligação do ativador HAP1 não alterou o comportamento do promotor mediado por UARcb1. Adicionalmente, sugeriu que a sequência restante de 67 pb (Figura 9) é provavelmente a responsável pela regulação do promotor que sente a flutuação de glicose em *S. cerevisiae* e que supostamente os elementos *cis* reconhecidos pelo fator responsável pela ativação da transcrição estejam localizados nesta região.

<p>5' GCCT TTGGGTGTAC ATGTTTGTGC TCCGGGCAAAT GCAAAGTGTG GTAGGATCGA ACACACTGCT GC 3'</p>
--

Figura 9. Possível sequência responsável pela ativação por celulose em *T. reesei*

3.2 Análise de fatores de levedura que interagem com UARcb1

Para verificar que a transcrição controlada por glicose do gene repórter *lacZ* sob controle de *cbh1* em *S. cerevisiae* é o resultado da interação de fatores regulatórios da levedura com o elemento *cis* atuante localizado um UARcb1, nós conduzimos experimentos de gel de retardamento. Como fragmento de DNA, utilizamos a região de 169 pb (UARcb1) e extrato de proteína de levedura crescida em meio sob condições de desrepressão (com glicerol) e repressão (com glicose). Esta análise mostrou a formação de complexos com extratos protéicos de células crescidas em ambos meios de cultura. A figura 10 apresenta os resultados obtidos.

Figura 10. Análise de gel de retardamento da região UARcb1 com extratos de proteína de *S. cerevisiae* (HD93-15D). UARcb1 marcado radioativamente foi incubado na presença de 250 ng de poli dIdC, extratos protéicos de células crescidas em meio contendo glicose ou glicerol, 20 vezes competidor específico (UARcb1 não marcado) e 100 vezes competidor não específico (fragmento de 249 pb do promotor do gene metanol oxidase (MOX) de *Hansenula polymorpha* - Pereira e Hollenberg, 1996), em diferentes combinações como indicado na figura. As reações de interação foram submetidas a eletroforese e autoradiografadas.

Não foi observado complexo na ausência de extrato protéico de levedura e os complexos formados em presença de extrato protéico de células crescidas em glicerol e glicose foram reduzidos em aproximadamente 80% na presença de 20 vezes excesso molar de competidor específico não marcado radioativamente. Nenhuma redução na formação do complexo foi observada com um excesso de 100 vezes de competidor inespecífico. Esses resultados indicam que reguladores transcricionais de levedura possivelmente estão interagindo com seqüências *cis* presentes em UARcb1.

Nós verificamos também que o complexo formado em extratos de células crescidas em glicose difere do complexo formado com proteína de células crescidas em glicerol. No primeiro caso (glicose) a banda mostra-se ampla e um pouco difusa. Ao contrário, a banda formada com extrato de células desreprimidas (glicerol) apresenta-se estreita e bem nítida. Esta alteração no complexo formado com proteínas de células crescidas em glicose ou glicerol sugere que o fator deva sentir a flutuação de glicose no meio de cultura, sofrendo alguma espécie de modificação pós traducional, a qual poderia ser responsável pelo controle da transcrição.

Outro fato observado através de gel de retardamento que concorda com nossos resultados anteriores, é que a região de 18 pb, a qual não influenciou a regulação mediada por UARcb1 de *lacZ*, também não interferiu na formação do complexo DNA/proteína de células crescidas em glicerol ou glicose (Figura 11). Isto indica que o complexo formado pela ligação de proteínas regulatórias a UARcb1 não ocorre na seqüência de 18 pb mencionada, confirmando os resultados da figura 8 (construção 2).

Figura 11. Análise de gel de retardamento da região UARcb1 com extratos de proteína de *S. cerevisiae* (HD93-15D). UARcb1 marcado radioativamente foi incubado na presença de 250 ng de dIdC, extratos protéicos de células crescidas em meio contendo glicose ou glicerol, 50 vezes excesso molar da sequência de 18 pb dupla fita em diferentes combinações como indicado na figura. As reações de interação foram submetidas a eletroforese e autoradiografadas.

3.3 Fatores de levedura envolvidos na regulação de *cbh1*

3.3.1 O envolvimento de *SNF1* e *SSN6*

Em *S. cerevisiae* *SNF1* codifica uma serina-treonina quinase (Celenza & Carlson, 1986) que representa um papel central no mecanismo pelo qual glicose controla expressão de diversos genes, por exemplo, o gene *SUC2* (Neigeborn e Carlson, 1984), e os genes *CYC1* e *COX6* (Wright e Poyton, 1990), que codificam invertase, iso-1-citocromo c e a subunidade 6 do citocromo c oxidase, respectivamente. Estes genes são reprimidos por glicose e requerem para sua expressão, na ausência de glicose, o produto gênico funcional de *SNF1*.

Outra proteína que está envolvida no controle da expressão de vários genes regulados por glicose é o repressor *SSN6*. Mutação em *SSN6* libera a repressão por glicose de genes como *SUC2*, *CYC1* e *COX6* (Carlson et al., 1981; Carlson et al., 1984; Wright e Poyton, 1990). Evidências sugerem que um papel de *SNF1* é aliviar a repressão transcricional causada por *SSN6* (Neigborn e Carlson, 1984; Trumbly, 1992). Para examinar se a repressão por glicose mediada por UARcb1 é controlada pela maquinaria que regula genes reprimidos por glicose em *S. cerevisiae*, nós testamos a expressão de *lacZ*, controlada pelo promotor híbrido *cbh1-CYC1* em alguns mutantes já caracterizados dessa levedura. Para isso nós utilizamos mutantes que não expressam o gene *SNF1* e *SSN6*, denominados *snf1* e *ssn6*, respectivamente. A figura 12 A e B apresenta a atividade do gene repórter, representado pelas duas construções (onde UARcb1 está presente ou deletado), na linhagem selvagem (HD93-15D) e nas linhagens mutantes. O monitoramento da atividade foi feito em meio sólido em presença de X-GAL e meio líquido, por medida de atividade β -galactosídica dos extratos proteicos usando o substrato ONPG.

Atividade β -galactosídica

Figura 12. Expressão do gene repórter *lacZ* controlado pelo promotor mínimo, mediado por UARcb1 nas linhagens mutantes *snf1* (MCY1551) e *ssn6* (YM4554) em comparação com a selvagem (HD93-15D). Estas linhagens foram transformadas com as construções 1 e 2, sendo que a única diferença entre elas é a presença de UARcb1, a qual foi deletada na construção 2. A- A atividade β -galactosídica foi apresentada em meio sólido contendo X-GAL e 1% glicerol ou 4% glicose. B- Atividade β -galactosídica, determinada nos extratos protéicos usando ONPG como substrato. Os valores apresentados (em mU) foram a média de três transformantes independentes. O desvio padrão entre as transformantes não ultrapassou 15 %.

Os resultados apresentados na figura 12 mostram que o UARcb1 controla a expressão do gene repórter de uma maneira análoga aquela pela qual os genes reprimidos por glicose são controlados na levedura (Carlson et al., 1981; Carlson et al., 1984; Wright e Poyton, 1990). Nos mutantes *snf1* a transcrição é reprimida mesmo na ausência de glicose, enquanto que nos mutantes *ssn6*, a atividade do gene repórter foi expressa mesmo na presença de glicose, tornando-se constitutiva. Estes resultados mostram o envolvimento destes fatores na expressão reprimida por glicose mediada por UARcb1 em *S. cerevisiae*, indicando que o sistema básico do circuito da glicose está conservado nesta regulação heteróloga.

3.3.2 O envolvimento de *TUP1*

TUP1 é um gene que codifica um repressor que forma um complexo juntamente com SSN6 e influencia genes que são reprimidos por glicose, como *SUC2* (Carlson et al., 1984) e outros genes relacionados com tipo de acasalamento em *S. cerevisiae* (Keleher et al., 1992). Nem TUP1 nem SSN6 se liga a DNA. Este complexo interage com MIG1 e também com outros fatores e causa a repressão. Os alvos possíveis deste complexo (MIG1-TUP1-SSN6) incluem fatores basais de transcrição (Herschbach et al., 1994) e componentes da cromatina, como histonas H3 e H4 (Edmondson et al., 1996).

Neste trabalho nós verificamos a influência deste fator na expressão de *lacZ* mediada pela região UARcb1. Para isto, nós analisamos a regulação do promotor híbrido *cbh1-CYC1* em linhagens mutantes *tup1*. O monitoramento da atividade foi feito em meio sólido contendo o substrato cromogênico X-GAL (figura 13).

Figura 13. Expressão do gene repórter *lacZ* controlado pelo promotor híbrido na linhagem mutante *tup1*(YM4513) em comparação com a selvagem (HD93-15D). Estas linhagens foram transformadas com as construções 1 e 2, sendo a única diferença entre elas a presença de UARcb1, a qual foi deletada na construção 2. Células foram crescidas em meio mínimo na presença de 2% glicose até a fase mid-log, centrifugadas, lavadas com meio mínimo sem fonte de carbono. Desta suspensão de células, 10 μ l foram pipetadas em meio sólido contendo o indicador X-GAL e 4% glicose ou 1% glicerol, como indicado, e então incubadas a 30°C por 12 horas.

Em mutantes *tup1*, o gene repórter *lacZ* controlado pelo promotor híbrido *cbh1-CYCI*, contendo o UARcb1 (construção 1 – figura 13), apresentou uma desrepressão parcial em meio contendo glicose, observado em placas, mostrando o envolvimento deste regulador na expressão do promotor em *S. cerevisiae*.

3.2.3 O envolvimento de *MIG1*

O repressor MIG1 de *S. cerevisiae* é uma proteína, cujo domínio de ligação ao DNA é um "zinc finger", que se liga a seqüências GC-box, um motivo presente em genes reprimidos por glicose (Ronne, 1995). Um homólogo de MIG1, o CRE1, foi identificado em *T. reesei* e liga a seqüências similares as de MIG1 (Ilmén et al., 1996b; Strauss et al., 1995; Takashima et al., 1996). A falta de MIG1 causa expressão de vários genes reprimidos por glicose quando as células são crescidas nesta fonte de carbono (Nehlin et al., 1991). Três sítios alvos para ligação de MIG1 foram identificados em *T. reesei*, sendo localizados a 5' de UARcb1. Mutações destes sítios também resultam em desrepressão parcial do gene *cbh1* quando as células crescem em glicose (Ilmén et al., 1996a). É interessante notar que a remoção da região 5' de UARcb1, a qual contém os três sítios de ligação de CRE1, já identificados (localizados entre - 373 e - 1400, figura 5 construção 3), resultou também em uma desrepressão parcial do gene repórter *lacZ* (Figura 5 A, valores 18 contra 106 mU em meio contendo glicose, construção 3 e 5, respectivamente). Para testar se a proteína MIG1 poderia ser responsável por essa repressão, nós analisamos a expressão de *lacZ* controlado pelo promotor híbrido em linhagens *mig* (linhagens que falham na expressão do gene *MIG1*). Nesse caso, entretanto, não se obteve expressão do gene repórter em meio contendo glicose (Figura 14), o que de certa forma nos surpreendeu, pelo fato da deleção da região, onde estão localizados os sítios de ligação da proteína CRE1 de *T. reesei*, homólogo de MIG1, no promotor de *cbh1* levaram ao aumento de atividade, como foi apresentado na figura 5.

Atividade β -galactosídica

Figura 14 . Expressão do gene repórter *lacZ* controlado pelo promotor híbrido na linhagem mutante *mig1* (YM4553) em comparação com a selvagem (HD93-15D). Estas linhagens foram transformadas com as construções 1, 2 e 3. (A)- As células foram crescidas em meio mínimo na presença de 2% glicose até a fase mid-log, centrifugadas, lavadas com meio mínimo sem fonte de carbono. Desta suspensão de células, 10 μ l foram pipetadas em meio sólido contendo o indicador X-GAL e 4% glicose e então incubadas a 30°C por 12 horas. (B) Atividade β -galactosídica (apresentada em mU) foi determinada usando extrato protéico das células crescidas em meio contendo 4% glicose e utilizando ONPG como substrato. Resultados são dados pela média dos valores obtidos de três transformantes independentes. O desvio padrão entre as atividades dos transformantes ficou entre 1 e 18 %.

Esse resultado, apesar de inesperado, nos indica que a repressão por MIG1 apresenta uma ação mais elaborada na levedura *S. cerevisiae*. Uma hipótese seria a existência de um segundo repressor que interage de alguma forma com MIG1, promovendo a repressão, via elementos de repressão identificados a montante de UARcb1, em meio contendo glicose, sendo que na ausência de MIG1 o repressor cumpre o papel de reprimir a expressão do gene repórter. Em outras palavras MIG1 deve interagir sinergicamente com outro fator, para que possa reconhecer seu alvo e causar a repressão, como é observado no gene *GAL1* (Ronne et al., 1995). A transcrição da *GAL1* é influenciada por MIG1, porém o papel de MIG1 nesta repressão só é claro quando é analisado em mutantes duplos *mig1-gal80*, ou mutante *mig1* em meio contendo glicose mais galactose. Nesse caso galactose inativa a função do repressor GAL80, o que fenotipicamente se torna semelhante ao mutante duplo. Esse resultado indica uma interação entre os 2 repressores MIG1 e GAL80 (Ronne et al., 1995). O papel de MIG1 na regulação do gene *cbh1* em *S. cerevisiae* deve ser semelhante ao papel exercido por MIG1 na repressão do gene *GAL1*.

3.4 O envolvimento da atividade mitocondrial na expressão de *lacZ* mediada pelo promotor híbrido *cbh1-CYC1*

3.4.1 Análise da expressão de *lacZ* regulada pelo promotor híbrido *cbh1-CYC1* em mutantes *petites*

Recentemente foi mostrado que a expressão dos genes *cbh1* e *egl1* de *T. reesei* é influenciada pela atividade mitocondrial. A presença de inibidores de respiração impedem a transcrição dos genes citados (Abrahão Neto et al., 1995). Desta forma, nós avaliamos outro aspecto de conservação entre os dois organismos e procuramos saber a influência da atividade desta organela na regulação de *cbh1* em *S. cerevisiae*. Linhagens *petites* de levedura são linhagens que apresentam deleções no genoma mitocondrial ou nos genes nucleares que codificam proteínas envolvidas na respiração, tornando-as incapazes de respirar. Aproveitando a capacidade de *S. cerevisiae* ser um anaeróbico facultativo e poder crescer sem atividade respiratória, nós analisamos a expressão de *lacZ* controlado pelo promotor híbrido *cbh1-CYC1* nesse contexto. Para isto nós transformamos as linhagens

petites com as diferentes construções apresentadas na figura 15 e o correspondente selvagem. Os transformantes foram inoculados em meio contendo glicose 2% até $OD_{600}=1$, divididos em 2 volumes equivalentes, centrifugados e transferidos para mesmo volume de meio contendo 4% glicose ou 1% glicerol. A atividade foi monitorada através da reação enzimática obtida com extrato proteico de células utilizando o substrato ONPG.

Os resultados apresentados na figura 15, mostram que a função mitocondrial é requerida para a desrepressão do gene repórter *lacZ* controlada por *UARcb1* na ausência de glicose (construção 1 e 3). Este fato indica que o mecanismo de regulação de *cbh1* necessita da atividade mitocondrial e é conservado nos dois organismos. Nós analisamos também, a título de controle, a atividade do promotor *CIT2* (citrato sintetase 2). Neste caso, o promotor apresenta ativação na linhagem petite quando esta é colocada em meio sem glicose. A regulação desse promotor foi anteriormente descrita e o fenômeno é denominado de "retrograde communication" (Liao et al., 1991). Nossos resultados mostram mais uma forma de conservação no comportamento do promotor do gene *cbh1* na levedura e no fungo.

Figura 15. Efeito de atividade mitocondrial na expressão do gene repórter *lacZ* controlado pelo promotor híbrido *cbh1-CYC1*, observada em células *petites*. Células de *S. cerevisiae* selvagem (S) e *petites* (ρ) foram utilizadas. Transformantes de *S. cerevisiae* que contém as construções representadas de 1 a 5 são crescidos em meio mínimo líquido contendo 2% glicose até a fase mid log. As células foram coletadas e ressuspensas em igual volume de meio mínimo contendo 1% glicerol ou 4% glicose e incubados de 8 a 12 horas a 30°C. Extratos protéicos são obtidos das amostras e a atividade β -galactosídica foi determinada usando ONPG como substrato. A construção 5 representa o promotor de citrato sintetase II controlando *lacZ*, que está sendo apresentada como controle. Resultados são dados pela média dos valores obtidos de três transformantes independentes. O desvio padrão entre as atividade ficou entre 1 e 25 %.

3.4.2. Papel do efetor heme na interação DNA-proteína de UARcb1

Heme é cofator em inúmeras proteínas e enzimas (citocromo C e hemoglobina), atuando normalmente como um intermediário na transferência de elétrons. Recentemente foi mostrado que heme pode funcionar como um efetor na regulação de vários processos biológicos, incluindo transcrição, tradução e translocação de proteínas. Zhang e Guarente (1994) mostraram que a interação entre o fator de ativação HAP1 e o seu sítio de ligação no promotor *CYC1* sofre alteração na presença de heme, o que é verificado em experimentos de gel de retardamento pelo padrão de mobilidade do complexo na presença e ausência desse efetor. A proteína HAP1 é necessária para desrepressão de genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais em levedura, como *CYC1* (Pfeifer et al. 1987), e sua ligação ao DNA é dependente da concentração de heme na célula (Zhang & Guarente, 1994). Baseado na necessidade da atividade mitocondrial para ativação do promotor *cbh1* em levedura e em *T. reesei* (Abrahão Neto et al., 1995), nós testamos a influência de heme na interação DNA-proteína de UARcb1.

Para se verificar se heme interfere no complexo UARcb1-proteína, foi efetuada uma reação de interação na presença deste efetor. Muito próximo ao que acontece com HAP1, o complexo formado sofreu uma maior mobilidade, apresentando menor peso molecular, como mostrado na figura 16. Os resultados mostraram que heme influencia o complexo na região UARcb1, sugerindo que este efetor pode estar envolvido na regulação de *cbh1*. Esta influência não é dependente de HAP1, uma vez que extratos protéicos de linhagens que falham na expressão de *HAP1* (*hap1*), mostraram comportamento semelhante na presença de heme. Esta observação indica que se realmente heme influencia a regulação de *cbh1* em levedura, não é pela via do ativador HAP1.

Figura 16. Análise de gel de retardamento da região UARcb1 com extratos de proteína de *S. cerevisiae* (HD93-15D). UARcb1 marcado radioativamente foi incubado na presença de 250 ng de dIdC, extratos protéicos de células crescidas em meio contendo glicose ou glicerol, e presença e ausência de 20 ng de heme em diferentes combinações como indicado na figura. (A) complexo formado na ausência de heme. (B) complexo formado na presença de heme. As reações de interação são submetidas a eletroforese e autoradiografadas.

4. DISCUSSÃO

Apesar da regulação dos genes que codificam para celulasas ter sido investigada com êxito ao longo dos últimos anos (El-Dorry et al., 1996; Henrique-Silva et al., 1996; Carle-Urioste et al., 1997; Seiboth et al., 1997), pouco se conhece da identidade dos fatores de transcrição envolvidos nesses processos. A estratégia básica para a clonagem de genes reguladores em microrganismos consiste no isolamento de mutantes deficientes na regulação do gene em questão e a complementação desses com um banco genômico da espécie. Efetivamente, mutantes para a regulação de celulasas têm sido descritos e caracterizados (Torigoi et al., 1996), porém a complementação desses para a identificação dos genes mutados não tem sido obtida. A principal razão para tal reside na falta de vetores apropriados para *T. reesei* e na instabilidade dos transformantes. Como alternativa para esse problema, o presente trabalho propôs inicialmente a fusão entre o promotor do gene *cbh1*, o qual codifica uma das principais celulasas do sistema, e o gene repórter *lacZ*. Essa fusão deveria ser então introduzida na levedura *S. cerevisiae*, um excepcional organismo experimental que tem sido largamente empregado para investigar transcrição em eucariotos (Guarente e Bermingham-McDonogh, 1992). Inicialmente esperava-se que, pelo fato da levedura não possuir celulasas, o gene *lacZ* não fosse expresso. Com isso, seria possível transformar as leveduras com genes de *T. reesei* e isolar aqueles capazes de disparar a expressão da fusão gênica. Esses seriam então os prováveis ativadores do sistema.

Curiosamente, nossos resultados mostraram que a fusão da região 5' de *cbh1* a *lacZ* pôde levar a expressão deste gene. Esse fato poderia ser explicado pela presença do TATA box nessa região do promotor, o qual poderia estar permitindo, mesmo que de forma precária, a montagem do complexo basal de transcrição nesse ponto e portanto uma expressão basal de β -galactosidase. É conhecido que os componentes que controlam a expressão basal estão entre as proteínas mais conservadas em eucariotos, podendo, em grande número de casos, ser intercambiadas entre espécies evolutivamente distanciadas (Buratowski, 1994; Moqtaderi et al., 1996; Hahn et al., 1989; Guarente e Bermingham-McDonogh, 1992). Entretanto, o nosso resultado apontou para um fenômeno adicional, que foi o fato da expressão mediada pelo promotor *cbh1* ser reprimida por glicose, o que é

uma característica essencial da regulação de *cbhl* no próprio *T. reesei*. Em vista disso, nossos dados indicaram que elementos *cis* basais e regulatórios estavam sendo reconhecidos pela maquinaria de transcrição na levedura.

O sentido evolutivo da conservação desse tipo de mecanismo parece claro, sendo que a causa da repressão por glicose seria a economia da célula na produção de enzimas necessárias para metabolizar fontes de carbono alternativas, enzimas essas dispensáveis na presença de glicose. Sendo assim, é lógico supor que, uma vez desenvolvido esse mecanismo em uma determinada célula, ele tenda a se conservar, apesar da especiação, nos diversos organismos. Uma prova dessa tendência foi recentemente apresentada ao se verificar que a região promotora do gene da α -amilase de *Drosophila melanogaster*, um raro exemplo de genes diretamente reprimidos por glicose em animais multicelulares, está sujeito a repressão por glicose na levedura (Hickey et al., 1994). Assim, mesmo entre essas duas espécies tão afastadas deve haver significativa homologia estrutural e funcional entre os componentes envolvidos neste tipo de regulação.

O próximo passo foi a identificação das regiões do promotor *cbhl* efetivamente comprometidas em mediar a regulação do gene repórter *lacZ* em levedura. Para fazer essa avaliação, fragmentos do promotor *cbhl* foram introduzidos dentro do promotor do gene *CYC1*, o qual foi deletado nas suas regiões regulatórias e ligado a *lacZ* (Guarente et al., 1981). Tem sido demonstrado que esse promotor mínimo é capaz de permitir a montagem do complexo basal de transcrição no seu TATA box, porém esse evento não é suficiente para uma transcrição regulada (Klein e Struhl, 1994; Chen et al., 1994). Para que essa ocorra é necessário que ativadores se liguem nas seqüências UASs dos promotores e interajam com esse complexo basal (Klages e Strubin, 1995; Chatterjee e Struhl, 1995). Assim sendo, se as regiões do promotor *cbhl* introduzidas no promotor *CYC1* mínimo forem sítios de reconhecimento de ativadores, ou seja, os elementos *cis* atuantes, esses fatores induzirão a expressão de *lacZ*.

A fusão da região de *cbhl* de -1400 a -250 levou a uma expressão de *lacZ* no mínimo 10 vezes maior em células crescidas em glicerol comparado com glicose. A remoção da região UARcb1 (-373 a -204 em relação ao ATG), identificada em *T. reesei* como responsável pela indução por celulose (Henrique-Silva et al., 1996), resultou na perda da

capacidade de ativação. A região de UARcb1 fundida com o promotor *CYC1* mínimo foi capaz de restaurar a expressão do promotor *cbh1*, ficando esta entretanto ainda reprimida por glicose. Assim sendo, os resultados indicam que UARcb1 traz elementos *cis* capazes de recrutar um fator que interage com a maquinaria basal de transcrição montada na sequência TATA box do promotor mínimo *CYC1* regulando a expressão de *lacZ*. Além disso, os dados mostram que essa ativação é reprimida por glicose.

Esses resultados, em conjunto, levam a inferir sobre dois pontos essenciais; primeiro, que o ativador de *T. reesei* que se liga ao fragmento UARcb1 deve ter um homólogo em *S. cerevisiae* que se liga na mesma região. Assim sendo, embora a levedura não possua os genes das celulases, ela deve possuir um sistema de regulação homólogo àquele que em *T. reesei* regula essa classe de genes. Esse sistema de regulação, por sua vez, deve estar envolvido no controle de genes relacionados com metabolismos específicos, que são reprimidos por glicose, os quais foram desenvolvidos durante o curso da evolução desse organismo de acordo com as pressões seletivas a que estavam submetidos. A nível funcional, a condição para um regulador controlar um gene é que este gene apresente em sua região promotora, o sítio de ligação para o ativador, para que este possa interagir, direta ou indiretamente, com a maquinaria basal de transcrição. Assim sendo, é razoável supor que um mesmo regulador, já presente em um ancestral comum de leveduras e fungos filamentosos, possa ter sido endereçado para o controle de genes diferentes em cada espécie. Em outras palavras, é provável que em diferentes espécies, classes de genes diversos tenham mantido ou criado os sítios para um dado regulador de acordo com a necessidade do organismo. Existem alguns dados para suportar essa hipótese. Por exemplo, o ativador *GCN4* está envolvido no controle da transcrição de genes que codificam para enzimas da biossíntese de aminoácidos em levedura, enquanto seus homólogos em eucariotos superiores, *jun* e *fos*, estão envolvidos na regulação transcricional de vários genes em respostas ao soro (Guarente e Bermingham-McDonogh, 1992). Até o momento não foi descrito nenhum gene envolvido com biossíntese de aminoácidos em eucarioto superior que fosse regulado por fatores dessa família.

Um segundo ponto essencial sobre o qual os nossos dados permitem inferências é quanto ao mecanismo de ativação de *cbh1*. Como descrito, a ativação mediada pelo

UARcb1 é inibida na presença de glicose. Existem duas explicações iniciais para esse fato. A primeira seria que a expressão do fator responsável por essa ativação seria reprimida por glicose. Existem diversos exemplos para esse mecanismo, como os dos ativadores ADR1 (Vallari et al., 1992; Cook e Denis, 1993), GAL4 (Johnston et al., 1994) e LAC9 (Zenke et al., 1993), cujas transcrições são especificamente reprimidas quando as células crescem em meio com glicose. Para verificar esse ponto foram realizados experimentos de gel-shift com o fragmento de DNA correspondente ao UARcb1 e extrato protéico de células de leveduras crescidas na ausência ou presença de glicose. O resultado mostrou a existência de uma ou mais proteínas que se ligam a essa região, e que porém estão presentes, em quantidades equivalentes, nos extratos de células crescidas sob as duas condições. Assim, se essa proteína for o fator que buscamos identificar, ele deve ser expresso sob as duas condições estudadas. A segunda possibilidade seria a do fator estar presente, porém em uma forma inativa. Existem também diversos exemplos para esse mecanismo, inclusive incluindo os reguladores ADR1 (Vallari et al., 1992; Cook e Denis, 1993), GAL4 (Johnston et al., 1994) e LAC9 (Zenke et al., 1993), acima citados. As formas básicas de inativação ou ativação de reguladores consiste na modificação pós-traducional desses em processos como o da fosforilação (Zeng et al., 1997; Randez-Gil et al., 1997; Vallari et al., 1992; Dombek e Young, 1997; Denis e Audino, 1991; Sadowski et al., 1996), ou na interação com proteínas repressoras (Sakurai et al., 1994; Lohr et al., 1995; Zenke et al., 1993), as quais podem mascarar os seus domínios de ativação.

Há na literatura caso de fatores que sofrem alteração quanto a localização a depender das modificações pós-traducionais, como o caso do repressor MIG1. Esse fator em presença de glicose, sofre uma fosforilação e é endereçado para o núcleo, onde exerce sua atividade de repressor; na ausência de glicose não é fosforilado e permanece no citoplasma, onde é inativo (DeVit et al., 1997). Se com o ativador que se liga a UARcb1 ocorre um fenômeno parecido, essa barreira quanto a localização estaria sendo ultrapassada pelo fato de utilizarmos extrato protéico bruto.

Observando-se o resultado do experimento de gel de retardamento, efetivamente verifica-se que existe um rastro no complexo formado com extrato protéico de células

crescidas em glicose, o que poderia indicar modificação pós-traducional das proteínas envolvidas. Essa modificação, por sua vez, poderia estar inativando o fator.

Entretanto, a expressão de *cbhl* em *T. reesei* é absolutamente dependente da presença de celulose no meio, sendo o gene reprimido quando as células crescem em glicose ou glicerol (Abrahão Neto et al., 1995). Assim, como *cbhl* é capaz de mediar a expressão em *S. cerevisiae*, um organismo não responsivo à celulose? Uma provável explicação para este fenômeno é baseada na organização modular de sistemas regulatórios. Em outras palavras, os reguladores são compostos de diversos domínios, os quais sentem sinais distintos, incluindo flutuações metabólicas. Um exemplo ilustrativo é dado pela organização funcional do regulador GAL4 de levedura, responsável pela ativação de genes envolvidos no metabolismo de galactose, como *GALI* (Flick e Johnston, 1990). GAL4 apresenta um domínio que responde a galactose presente no meio de cultura. Neste domínio se liga o repressor GAL80, o qual mascara seu domínio de ativação em células crescidas em glicerol (Lohr et al., 1995). A deleção do domínio de ligação de GAL80 torna GAL4 insensível a galactose e *GALI* tem capacidade total de expressão em meio contendo glicerol, como o selvagem expressaria na presença de galactose. Entretanto, a repressão por glicose não é afetada por esta modificação, demonstrando que a região central de GAL4 contém outro domínio que reprime a ativação em células que crescem em glicose (Stone e Sadowski, 1993). Assim, em analogia ao sistema GAL, uma plausível interpretação para a regulação de *cbhl* em *S. cerevisiae* é que a levedura tenha um regulador homólogo, que reconhece o(s) elemento(s) *cis* presente(s) em UARcb1 e apresente um domínio responsivo à glicose, que está conservado nos dois organismos. Parece ainda razoável sugerir que o fator responsável pela ativação em *S. cerevisiae* e o transativador de *T. reesei* foram originados de um ancestral comum, o qual durante a evolução divergiu entre os dois organismos, sendo conectado ao fator de *T. reesei* um domínio “que sente” celulose. Esse carboidrato, mais especificamente o indutor soforose, poderia ser assim responsável por ativar de alguma forma o regulador de *cbhl*.

Portanto, o fato de *S. cerevisiae* não possuir genes para celulasas não implica que este organismo não possua homólogos para os reguladores que em *T. reesei* controlam estes genes. Assim sendo, uma estratégia alternativa para a clonagem de reguladores de *T. reesei*

seria a identificação de reguladores de levedura envolvidos no controle do promotor *cbh1* neste organismo. Estes fatores provavelmente devem possuir homólogos no fungo filamentoso, os quais devem desempenhar uma função semelhante, e que poderiam ser isolados através de técnicas de hibridização heteróloga, ou pela hibridização com sondas a serem construídas a partir de “primers” degenerados, ou ainda por complementação na levedura.

Para proceder a identificação desses fatores em *S. cerevisiae* foi feita inicialmente uma comparação da sequência do UARcb1 com sequências *cis*-reguladoras de promotores de organismos eucarióticos. Entretanto, essa análise não apontou homologia significativa com nenhum sítio de ligação de reguladores conhecidos (Quandt et al., 1995; Dhawale e Lane, 1993). Sobre esse ponto, entretanto, observa-se que embora os genes das celulasas sejam regulados coordenadamente (Torigoi et al., 1996; Knowles et al., 1987; El-Dorri et al., 1996; Carle-Urioste et al., 1997), a comparação entre a sequência de UARcb1 e sequências 5' flanqueadoras de outros genes celulolíticos não indica homologia clara (Henrique-Silva et al., 1996). Assim, é possível que esta região seja alvo de reguladores com capacidade de reconhecimento de sequências múltiplas, e que os sítios aos quais eles se ligam nos promotores das diversas celulasas não se deixam identificar por uma simples análise de sequência. Esta propriedade incomum é encontrada no fator HAP1 (Pfeifer et al., 1989), que ativa a transcrição de certos genes de levedura controlados por glicose e envolvidos no transporte de elétrons, tais como *CYC1* e *CYC7* (isocitocromo c oxidase 1 e 7, respectivamente) (Prezant et al., 1987; Kim et al., 1990; Pfeifer et al., 1989), o regulador *ROX1* (Deckert et al., 1995a), e genes que codificam proteínas que têm heme como grupo prostético, como *CTT1* (catalase T de levedura) (Winkler et al., 1988) e *CYT1* (citocromo c1) (Schneider e Guarente, 1991). Entre todos os sítios de ligação de HAP1 nesses promotores a homologia é mínima, limitando-se ao posicionamento de alguns nucleotídeos (ver figura 7). Uma pequena homologia a esse sítio de ligação de HAP1 foi encontrada em UARcb1 entre os nucleotídeos localizados de -367 a -349. Entretanto, através de análise de deleção dessa sequência em UARcb1 nós verificamos que a expressão de *lacZ* mediada pelo promotor deletado para essa sequência apresenta o mesmo padrão obtido por aquele contendo o UARcb1 intacto. Além disso, considerando-se que o complexo observado nos

experimentos de gel shift estão envolvidos com a regulação de *cbhl*, é de se esperar que, se essas proteínas se ligassem ao sítio acima descrito, um oligo contendo esse sítio seria capaz de seqüestrar essas proteínas do complexo quando adicionado à reação de ligação. Esse fato não foi observado, não tendo a seqüência a capacidade de competir especificamente com o fragmento UARcb1. Assim, o complexo não interage com nucleotídeos dessa região.

Além das razões descritas acima, um outro fato nos levou a analisar HAP1 como um possível regulador de *cbhl*. Tem sido demonstrado que esse regulador é ativado por heme (Haldi e Guarente, 1995), uma molécula que desempenha um papel essencial como um cofator intermediário da transferência de elétrons de numerosas proteínas e enzimas, tais como hemoglobina e citocromos. Na ausência de heme, observa-se que HAP1 encontra-se complexado sob a forma de vários monômeros no citoplasma (complexo multimérico), devendo o alto peso molecular desse complexo dificultar a migração do fator para o núcleo (Zhang e Guarente, 1994). Observa-se que a adição de heme dissocia esse complexo de proteínas, sendo possível então detectar um aumento na formação de dímeros de HAP1, com alta afinidade pelo DNA (Zhang e Guarente, 1994). Em termos experimentais, observa-se que em ensaios de gel de retardamento a adição de heme à reação de ligação entre HAP1 e o seu sítio de reconhecimento leva a um aumento da migração do complexo formado. Esse mesmo fenômeno foi detectado com o complexo formado no fragmento UARcb1 quando heme foi adicionado à reação de ligação. A nossa interpretação foi a de que o suposto fator que se liga a essa região, a exemplo de HAP1, poderia ter a sua atividade modulada por heme. Entretanto, esse complexo sensível a heme também foi formado quando extrato protéico de células *hap1* foi empregado na reação de ligação, mostrando que HAP1 não deve se ligar a região UARcb1. Essa hipótese foi também reforçada pelo fato desse promotor ser ativo em uma linhagem deletada para *hap1* (dado não mostrado). Os resultados apontam porém para a possibilidade da existência de um segundo fator também modulado por heme que pode estar envolvido na regulação de *cbhl*.

É interessante notar que heme é produzido pela mitocôndria quando as células crescem em meio com oxigênio (Haldi e Guarente, 1995; Oechsner et al., 1992). Assim, HAP1 pode ser visto como um sinalizador celular do estado fisiológico dessas organelas, que faz com que diversos genes sejam expressos quando as mitocôndrias estão ativas.

Portanto, o fato de um regulador desse tipo existir é altamente atraente para explicar um fenômeno observado em *T. reesei*, que é o fato do promotor *cbh1* não ser ativado na ausência da atividade mitocondrial (Abrahão Neto et al., 1995). Essa condição foi obtida no fungo através da adição de desacopladores de cadeia respiratória ao meio de cultura, como DNP. Esse mesmo comportamento foi observado em relação a regulação de *cbh1* em *S. cerevisiae*. Nesse organismo, nós observamos que a falta da função mitocondrial leva a inatividade do promotor, que se torna incapaz de mediar a expressão de *lacZ*. Nesse caso, *S. cerevisiae* se mostrou um organismo altamente adequado, pois é possível, através da adição de brometo de etídio ao meio de cultura, induzir a produção de mutantes “petite”; ou seja, mutantes que apresentam deleção no DNA mitocondrial. É importante lembrar que esse organismo pode prescindir da função respiratória para viver, obtendo energia pela glicólise. Assim, esse parâmetro pôde ser testado sem a interferência de inibidores de respiração, os quais também poderiam gerar efeitos secundários. Um outro controle importante para demonstrar que a atividade mitocondrial afeta a expressão de *cbh1* de forma definida é o fato de existirem genes de *S. cerevisiae*, como *CIT2*, que são ativados pela ausência de atividade mitocondrial, um fenômeno denominado “retrograde communication” (Liao et al., 1991; Liao e Butow, 1993; Chelstowska e Butow, 1995). Com isso, podemos afirmar que a não ativação de *cbh1* não é consequência da falência das funções da célula.

Assim sendo, a essencialidade da função respiratória para a ativação de *cbh1* é uma outra importante característica para a qual detectamos uma flagrante conservação. A questão agora é entender como ocorre a comunicação entre a mitocôndria e o núcleo. No caso do gene *CIT2*, mencionado acima, foram encontrados dois fatores diretamente envolvidos na ativação desse gene e que são influenciados pelo estado da mitocôndria (Liao e Butow, 1993). Para a situação contrária, entretanto, em que o gene é desativado em função da falta de atividade respiratória, não existe nenhuma evidência para explicar o fenômeno. Uma possibilidade seria a de que esses promotores necessitariam de remodelamento de cromatina para serem ativados, e os fatores que realizam esse tipo de operação, como os do complexo SWI2/SNF2, parecem ser dependente de ATP (Tsukiyama e Wu, 1997; Laurent et al., 1993; Tsukiyama et al., 1994). Assim, na ausência de função

respiratória o nível dessa molécula poderia ser reduzido a um patamar insuficiente para a atividade desse tipo de regulador.

Além da sequência descrita acima, para a qual existia a possibilidade da ligação de HAP1, foi testado o efeito da deleção de outra sequência na região UARcb1 controlando a expressão de *lacZ*. Esse estudo identificou uma sequência de 67 pb como responsável pela ativação mediada pelo promotor. Este parece ser um dado altamente significativo, pois considerando-se todos os pontos de conservação apresentados neste trabalho, é provável que esta região, localizada de -349 a -282 do ATG, responda pela ativação de *cbh1* também em *T. reesei*. Se isso se confirmar, os dados obtidos em *S. cerevisiae* nos permitirão prever prováveis resultados sobre a regulação de *cbh1* in *T. reesei*, facilitando sobremaneira a experimentação neste fungo.

O fenômeno de repressão por glicose tem sido intensivamente estudado na levedura *S. cerevisiae*. Entre os genes envolvidos no circuito de controle de glicose, *SNF1*, *SSN6*, *TUP1* e *MIG1* estão entre os mais investigados. *SNF1* é uma proteína quinase envolvida na desrepressão de uma série de genes reprimidos por glicose (Celenza e Carlson, 1989; Celenza e Carlson, 1984b), sendo portanto um regulador geral. É codificado por um gene altamente conservado em eucariotos, sendo encontrado desde leveduras até plantas e mamíferos (Mitchell et al., 1994; Le Guen et al., 1992; Alderson et al., 1991). *SSN6* e *TUP1*, ao contrário, são repressores, envolvido no controle de genes envolvidos na degradação de fontes alternativas de carbono (Varanasi et al., 1996; Redd et al., 1997; Carrico e Zitomer, 1998; Neugeborn e Carlson, 1987), de genes que só devem ser expressos quando as células crescem sob alta tensão de oxigênio (Deckert et al., 1995b) e de genes específicos para o “mating type a” (Szeto e Broach, 1997). As proteínas *SSN6* e *TUP1* agem em conjunto, formando um complexo repressor contendo uma molécula de *SSN6* para quatro de *TUP1* (Varanasi et al., 1996), o qual por sua vez interage com um fator com habilidade de se ligar ao DNA, como *MIG1* (Treitel e Carlson, 1995), *ROX1* (Balasubramanian et al., 1993) ou $\alpha 2$ (Szeto e Broach, 1997). Esse fator vai ser então o responsável por endereçar a repressão para genes como *SUC2* (Lutfiyya e Johnston, 1996), *GAL1* (Nehlin et al., 1991), os “hypoxia genes” (Deckert et al., 1995b) ou genes a-específicos (Szeto e Broach, 1997). Genes que são controlados por estes fatores, como

SUC2, não são expressos em mutantes que não apresentam SNF1 (*snf1*) mesmo em meio sem glicose (Wright e Poyton, 1990; Neigeborn e Carlson, 1984; Carlson et al., 1981). Em linhagens mutantes para *ssn6* ou *tup1*, ao contrário, esses genes apresentam expressão constitutiva mesmo na presença de glicose (Neigeborn e Carlson, 1987; Carlson et al., 1984).

Para examinar se a repressão mediada por UARcb1 é controlada pela maquinaria que regula genes reprimidos por glicose em *S. cerevisiae*, nós investigamos o papel dos produtos gênicos de *SNF1*, *SSN6*, *TUP1* e *MIG1* na regulação de *lacZ* mediada por essa região em *S. cerevisiae*. Nós observamos que em mutantes *snf1* a transcrição do gene repórter se mantém reprimida mesmo depois que as células são transferidas para meio desrepressor (sem glicose). Nos mutantes *ssn6*, ao contrário, a expressão de *lacZ* se torna constitutiva, apresentando um nível alto mesmo em meio contendo glicose. Assim, esses resultados mostraram de forma clara o envolvimento destes produtos gênicos na regulação do promotor em estudo, a semelhança do que é observado para genes como *SUC2* (Trumbly, 1992), *COX6* e *CYC1* (Wright e Poyton, 1990). No caso de mutantes para *tup1*, entretanto, a expressão de *lacZ* mediada por UARcb1 se mostrou apenas parcialmente desreprimida, indicando que esse fator não exerce o mesmo efeito repressor observado para *SSN6*. Esse resultado foi de certa forma inesperado, uma vez que assume-se que esses dois fatores formam conjuntamente o complexo de repressão (Varanasi et al., 1996; Redd et al., 1997). Dados mais recentes, entretanto, apontam para a possibilidade desses dois fatores poderem atuar independentemente na regulação de diferentes conjuntos de genes. Por exemplo, foi mostrado que uma proteína mutante TUP1, que é incapaz de interagir com *SSN6*, continua capaz de reprimir genes relacionados ao “mating type a” (Carrico e Zitomer, 1998). Nossos resultados apontam para essa direção, mostrando claramente que *SSN6* tem uma capacidade repressora muito maior que TUP1 para regular a expressão mediada por *cbh1*. O mecanismo molecular pelo qual esse efeito é obtido não foi investigado, mas é um ponto relevante para o qual o promotor *cbh1* poderia ser empregado. Ou seja, o nosso trabalho indica que a investigação da regulação do promotor heterólogo pode nos levar a conclusões sobre os mecanismos de ação dos fatores da própria levedura.

Existe um segundo fato relevante em relação ao fator TUP1. Foi recentemente publicado que esse repressor, em *Candida albicans*, não está envolvido com repressão catabólica, mas com a repressão de genes envolvidos com a formação de hifas, um efeito que não é observado em *S. cerevisiae* (Braun e Johnson, 1997). Apesar disso, o mutante *tup1* de *S. cerevisiae* é complementado em todos os seus defeitos pelo gene *TUP1* de *C. albicans*, mostrando que essa proteína conserva todas as características estruturais do seu homólogo de *S. cerevisiae*. Assim sendo, esse é um típico caso de regulador que mudou a função na célula sem alterar a sua forma de ação. Em vista disso, considerando-se que *T. reesei* é um fungo filamentoso, é extremamente relevante saber qual o papel de TUP1 na formação de hifas deste organismo para se entender a evolução desse importante regulador. Nossos dados indicam, pelo fato da regulação de *cbh1* em *S. cerevisiae* se mostrar sensível a TUP1, que esse fator ainda possa estar envolvido na regulação de genes por glicose em *T. reesei*, tendo portanto uma função ainda intermediária entre aquelas observadas em *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Assim, a clonagem e caracterização de *TUP1* de *T. reesei* é um objetivo de grande relevância, essencial para o esclarecimento deste ponto.

Outro ponto importante é que seqüências do promotor *cbh1* localizadas a montante de UARcb1 exercem um papel claramente repressor sob a expressão de *lacZ*. Células de levedura que trazem somente a região de UARcb1, sem a região a montante, mediando a expressão de *lacZ*, apresentam uma desrepressão parcial em meio com glicose (figura 5, construção 5 em comparação com a 3). Isso sugere que existem mecanismos de regulação que atuam através dessa região, uma suposição que está de acordo com observações feitas em *T. reesei*. Neste organismo observou-se que a repressão por glicose é significativamente aliviada quando seqüências acima de -500 são deletadas (Ilmen et al., 1996a). Para explicar este resultado, é sugerido que o repressor CRE1, um fator homólogo a MIG1 de *S. cerevisiae*, se ligue a seqüências desta região, sendo portanto este fator responsável pelo efeito (Ilmén et al., 1996a; Ilmén et al., 1996b). Foi efetivamente reportado que linhagens, nas quais *CRE1* foi deletado, apresentam desrepressão do gene *cbh1* em meio contendo glicose a partir do terceiro nesta condição, o que não ocorre com a linhagem selvagem (Ilmén et al., 1996a). Entretanto, embora a região em questão desempenhe um papel

repressor, nossos dados mostraram que a expressão mediada por UARcb1 é idêntica nas linhagens de *S. cerevisiae* selvagem e mutante para *MIG1*. Esse resultado é inesperado em vista de ser MIG1 o fator que normalmente medeia a repressão controlada pelo complexo TUP1-SSN6 para genes regulados por glicose, e esses fatores, como já vimos, afetam claramente a expressão mediada por *cbh1*. Assim, nossos dados indicam que algum outro fator deve desempenhar essa função de endereçamento para fazer o promotor da celulase ser sensível a TUP1 e principalmente a SSN6. Esse é um dado curioso o qual entretanto está de acordo com algumas observações recentes sobre a regulação do promotor *SUC2*. Para este gene foi demonstrado que a sua expressão é 20 vezes maior na linhagem *ssn6* em comparação com a linhagem *mig1* (Vallier e Carlson, 1994). Com isso, conclui-se que devam existir outras proteínas responsáveis por mediar a repressão de SSN6 sob o promotor *SUC2*. Esse mesmo fenômeno deve estar ocorrendo com a regulação do promotor *cbh1*, e a investigação desse ponto deve trazer importantes conclusões sobre o funcionamento do sistema TUP1-SSN6-MIG1.

Outra possibilidade seria a de que MIG1, a exemplo CRE1, ser efetivamente capaz de reprimir *cbh1*, porém essa repressão não é detectável nas condições testadas. Esse fenômeno ocorre na regulação do gene *GAL1*, cuja repressão não é causada apenas por MIG1 mas também pelo repressor GAL80, o qual por sua vez tem a função de neutralizar o ativador GAL4 (Johnston et al., 1994). Isto significa que *GAL1* é reprimido em meio com glicose nos mutantes *mig1*, pois o ativador do sistema está neutralizado sob esta condição. A transcrição de *GAL1* em meio contendo glicose só é observada em linhagens mutantes para os genes *MIG1* e *GAL80* (*mig1 gal80*), ou em linhagens *mig1* (mutada no gene *MIG1*) meio contendo glicose mais galactose. Nesse caso a galactose inibe a ação de GAL80, o que a torna fenotipicamente similar ao mutante duplo (*mig1 gal80*) (Nehlin et al., 1991). Assim, MIG1 age sinergicamente com GAL80 na repressão de *GAL1* (Lohr et al., 1995; Nehlin et al., 1991; Johnston et al., 1994). Se no caso de *cbh1* o transativador que reconhece UARcb1 tiver comportamento similar a GAL4 e interagir com algum repressor na presença de glicose, o gene que ele está ativando pode ter comportamento análogo ao *GAL1*, e portanto apresentar uma repressão não exclusivamente dependente de MIG1. Este

detalhe só será totalmente esclarecido quando identificarmos qual é a natureza do ativador que controla a expressão de *cbhl* em *S. cerevisiae*.

Em suma, no presente trabalho nós desenvolvemos um sistema para investigar a regulação do promotor de uma celulase de *T. reesei* em *S. cerevisiae*, um organismo experimental bem estabelecido. Foi demonstrado que, embora a levedura seja não celulolítica, o promotor *cbhl* é regulado neste organismo e essa regulação apresenta-se altamente similar à regulação nativa. Por exemplo, nos dois organismos regiões idênticas do promotor desempenham funções paralelas, e a ativação é dependente das funções mitocondriais. Além disso, nós identificamos que a repressão de *cbhl* por glicose em *S. cerevisiae* é exercida através da rede regulatória que envolve os fatores SNF1-SSN6-TUP1, os quais devem portanto existir em *T. reesei* e desempenhar papéis semelhantes. É ainda provável que *S. cerevisiae* possua um regulador homólogo ao que em *T. reesei* ativa os genes para as celulases, devendo porém nesse organismo ter se desenvolvido um mecanismo para sentir a celulose. Assim, foi demonstrado uma importante conservação dos mecanismos de regulação das celulases e desenvolvida uma poderosa ferramenta para auxiliar na identificação e clonagem dos reguladores de transcrição envolvidos nesse sistema.

5. CONCLUSÕES

1. O promotor de *cbh1* foi capaz de promover a transcrição de *lacZ* e de apresentar repressão por glicose na levedura *S. cerevisiae*. Esse comportamento indicou que a levedura possui um mecanismo de regulação que reconhece o promotor, o qual é provavelmente homólogo ao que regula esse gene em *T. reesei*.

2. A análise detalhada da inserção de fragmentos do promotor *cbh1* dentro do promotor mínimo *CYC1* fundido com *lacZ* mostrou que a região de -373 a -1400 (relativa ao ATG) tem função repressora, e que a ativação do promotor é mediada pela região entre -204 a -373 (denominada UARcb1), sendo recentemente demonstrado que essa sequência (UARcb1) media a indução de *cbh1* por celulose em *T. reesei*.

3. Uma análise de deleção indicou ainda que uma sequência de 67 pb, localizada entre -349 a -282 dentro de UARcb1 é a responsável por mediar a ativação na levedura.

4. Existem fatores que se ligam especificamente na região UARcb1, sendo verificada a formação de complexos de mesmo peso molecular, mas com características distintas para células crescidas em meio com glicerol ou glicose.

5. Evidências mostraram que SNF1 é essencial para desrepressão desse promotor, quando as células crescem em meio sem glicose, e que a repressão por glicose é resultado da ação dos fatores SSN6 e TUP1.

6. Respiração mitocondrial é requerida para a ativação de *cbh1* em levedura, e o efector heme é provavelmente o sinal emitido por essa organela para a regulação das celulasas.

7. Os resultados apresentados aqui mostram fortes evidências de que a regulação das celulasas provavelmente é feita por um sistema conservado em diversos organismos, o qual deve ter evoluído em *T. reesei* para sentir celulose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahao-Neto, J., Rossini, C.H., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Crivellaro, O., e El-Dorry, H. (1995). Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* 34, 10456-10462.
- Alderson, A., Sabelli, P.A., Dickinson, J.R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P.R., e Halford, N.G. (1991). Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 8602-8605.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (1990) *Short protocols in Molecular Biology* Harvard Medical School, 2nd Edition
- Bajwa, W., T.E. Torchia, e J.E. Hopper (1988) Yeast Regulatory Gene *GAL3*: Carbon Regulation; UAS_{Gai} elements in common with *GAL1*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL80*, regulation; encoded Protein strikingly similar to yeast and *Escherichia coli* galaktokinase, *Mol. Cell. Biol.* 8,3439-3447
- Balasubramanian, B., Lowry, C.V., e Zitomer, R.S. (1993). The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. *Mol. Cell Biol.* 13, 6071-6078.
- Barr, B.K., Hsieh, Y.L., Ganem, B e Wilson, D. B. (1996) Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochemistry* 35,586-592
- Beg, A.A., S.M. Ruben, R.I. Sheinman, S. Haskill, C.A. Rosen, e A.S. Baldwin (1992) IκB Interacts With the Nuclear Localization Sequences of the Subunit of NFκB: A Mechanism for Cytoplasmic Retention. *Genes Dev.* 6,1899-1913
- Béguin, P. (1990) Molecular Biology of Cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, 219-248
- Berger, S.L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G.A., Agapite, J., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., e Guarente, L. (1992) Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* 70, 251-265.
- Berroteram, R.W., D.E. Ware, e M. Hampsey (1994) The *sua8* Supressors of *Saccharomyces cerevisiae* Encode Replacemntes of Conserved Residues Within the Largest Subunit of RNA Polymerase II and Affect Transcription Start Site Selection Similarly to *sua7* (TFIIB) Mutations. *Mol. Cell. Biol.* 14,226-237
- Bradford, M. M. (1976) A rapid sensitive method for the quantification of micrgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annu. Rev. Biochem.*, 72, 248-254
- Braun, B.R. e Johnson, A.D. (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1 [see comments]. *Science* 277, 105-109.
- Brent, R. & M. Ptashne (1984) A Bacterial repressor Protein or a Yeast Transcriptional Terminator can block Upstream Activation of a Yeast Gene, *Nature* 312,612-15
- Buermeyer, A.B., N.E. Thompson, L.A. Strasheim, R.R. Burgess e P.J. Farnaham (1992) The HIP1 Initiator Element Plays a Role in Determining the *In Vitro* Requirement of the Dihydrofolate Reductase Gene Promoter for the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 12,2250-2259

- Buratowski, S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77, 1-3.
- Carle-Urioste, J.C., Escobar-Vera, J., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Torigoi, E., Crivellaro, O., Herrera-Estrella, A., e El-Dorry, H. (1997). Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J. Biol. Chem.* 272, 10169-10174.
- Carlson, M. e Botstein, D. (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28, 145-154.
- Carlson, M., Osmond, B.C., e Botstein, D. (1981). Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* 98, 25-40.
- Carlson, M., Osmond, B.C., Neigeborn, L., e Botstein, D. (1984). A suppressor of SNF1 mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast. *Genetics* 107, 19-32.
- Carrico, P.M. e Zitomer, R.S. (1998). Mutational Analysis of the Tup1 General Repressor of Yeast. *Genetics* 148, 637-644.
- Celenza, J.L. e Carlson, M. (1984). Cloning and genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 4, 49-53.
- Celenza, J.L. e Carlson, M. (1984). Structure and expression of the SNF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 4, 54-60.
- Celenza, J.L. e Carlson, M. (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* 233, 1175-1180.
- Celenza, J.L. e Carlson, M. (1989). Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell Biol.* 9, 5034-5044.
- celluloseBiochem. Biophys. *Acta* 1157,107-113
- Cereghino, G.P. e I. E. Scheffler (1996) Genetic Analysis of Glucose Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Control of Transcription versus mRNA Turnover. *EMBO J.* 15(2),363-374
- Chandler, V.L., B.A. Maler, e K.R. Yamamoto (1983) DNA Sequences Bound Specifically by Glucocorticoid Receptor *in vitro* Render a Heterologous Promote Hormone Responsiviness *in vivo*. *Cell* 33,489-499
- Chatterjee, S. e Struhl, K. (1995). Connecting a promoter-bound protein to TBP bypasses the need for a transcriptional activation domain. *Nature* 374, 820-822.
- Chelstowska, A. e Butow, R.A. (1995). RTG genes in yeast that function in communication between mitochondria and the nucleus are also required for expression of genes encoding peroxisomal proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 18141-18146.
- Chen W, Struhl K (1985) Yeast mRNA initiation sites are determined primarily by specific sequences, not by the distance from the TATA element. *EMBO J.* Dec 1; 4(12): 3273-3280.
- Chen, J., Ding, M., e Pederson, D.S. (1994). Binding of TFIID to the CYC1 TATA boxes in yeast occurs independently of upstream activating sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11909-11913.
- Chi, T., P. Lieberman, K. Elewood, e Carey M. (1995) A General Mechanism for Transcriptional Synergy by Eukaryotic Activators, *Nature* 377,254-257

- Choy, B. e M.R. Green (1993) Eukariotic Activators Function During Multiple Steps of Preinitiation complex Assembly, *Nature* 366,531-536
- Conaway, R.C. e J.W. Conaway (1993) General Initiation Factors for RNA polymerase II *Annu. Rev. Biochem.* 62,161-190
- Conaway, R.C., J.N. Bradsher e J.W. Conaway (1992) Mechanism of Assembly of RNA Polymerase II Pre Initiation Complex. Evidence for a Function Interaction Between the Carboxil-Terminaldomain of the largest subunit of RNA polymerase II and a High Molecular Mass Form of the TATA Factor. *J. Biol. Chem.*, 267,8464-8467
- Cook, W.J. e Denis, C.L. (1993). Identification of three genes required for the glucose-dependent transcription of the yeast transcriptional activator ADR1. *Curr. Genet.* 23, 192-200.
- Creusot, F., J. Verdière, M. Gaisne, e P.P. Slonimski (1988) CYCP1 (HAP1) Regulator of Oxygen-Dependent Gene Expression in Yeast. I. Overall Organization of the Protein Sequence Displays Several Novel Structural Domains *J. Mol. Biol.* 204,263-276
- Deckert, J., Perini, R., Balasubramanian, B., e Zitomer, R.S. (1995a). Multiple elements and auto-repression regulate Rox1, a repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139, 1149-1158.
- Deckert, J., Rodriguez Torres, A.M., Simon, J.T., e Zitomer, R.S. (1995b). Mutational analysis of Rox1, a DNA-bending repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 15, 6109-6117.
- Denis C.L. e C. Gallo (1986) Constitutive RNA Synthesis for the Yeast Activator ADR1 and Identification of the ADR1-5 Mutation: Implication in Post Translational Control of ADR1. *Mol. Cell. Biol.*, 6,4026-4030
- Denis, C. L., M. Ciriacy, e E.T. Young (1981) A positive Regulatory Gene is required for Accumulation of the Functional mRNA for the Gucoose-repressible Alcohol Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 148,355-368
- Denis, C. L., S. C. Fontaine, D. Chase, B. E. Kemp, e L.T. Bemis (1992) *ADR1c* Mutations Enhance the ability of ADR1 to Active Transcription by a Mechanism that is Independent of Effects on Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Phosphorilation of Ser-230. *Mol. Cell. Biol.* 12,1507-1514
- Denis, C.L. e Audino, D.C. (1991). The CCR1 (SNF1) and SCH9 protein kinases act independently of cAMP- dependent protein kinase and the transcriptional activator ADR1 in controlling yeast ADH2 expression. *Mol. Gen. Genet.* 229, 395-399.
- DeVit, M.J., J.A. Waddle, e M. Johnston (1997) Regulated Nuclear translocation of Mig1 Glucose Repressor. *Molec. Biolog. Cell*, 8,1603,1618
- Dhawale, S.S. e Lane, A.C. (1993). Compilation of sequence-specific DNA-binding proteins implicated in transcriptional control in fungi. *Nucleic. Acids. Res.* 21, 5537-5546.
- Dohmen, R. J., A.W.M. Strasser, C.B. Honer, e C.P. Hollenberg (1991)An Efficient Transformation Procedure Enabling long-term Storage of Competen Cells of Various Yeast Genera. *Yeast* 7,691-692
- Dombek, K.M. e Young, E.T. (1997). Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits ADH2 expression in part by decreasing expression of the transcription factor gene ADR1. *Mol. Cell Biol.* 17, 1450-1458.

- Drapkin, R., A. Sancar e D. Reinberg (1994) Where Transcription meets Repair, *Cell*, 77,9-12
- Dujon, B. (1981) Mitochondrial genetics and functions. In *Molecular Biology of the yeast Saccharomyces* eds: J.S. Strathern, E.W. Jones, J.R. Broach, pp 505-651, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab.
- Dynlacht, B.D., T. Hoey, e R. Tjian (1991) Isolation of Coactivators Associated with the TATA-Binding Protein that Mediate Transcriptional Activation. *Cell* 66,563-576
- Edmondson, D.G., Smith, M.M., e Roth, S.Y. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev.* 10, 1247-1259.
- El-Dorry, H., Crivellaro, O., Leite, A., Abrahao-Neto, J., Henrique-Silva, F., Escobar-Vera, J., Matheucci Junior, E., Carle-Urioste, J.C., Pereira, G.G., Carraro-Pereira, D.M., e El-Gogary, S. (1996). Transcriptional control of the cellulase genes in *Trichoderma reesei*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 905-909.
- El-Gogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, D.E., e El-Dorry, H. (1989). Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6138-6141.
- Flick, J.S. e Johnston, M. (1990). Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 10, 4757-4769.
- Flores, O., H. Lu e D. Reinberg (1992) Factors Involved in Specific Transcription by Mammalian RNA polymerase II. Identification and Characterization of TFIIH. *J. Biol. Chem.*, 267,2786-2793
- Flores, O., H. Lu, M. Kileen, J. Greenblatt, Z.F. Burton e D. Reinberg (1991) The Small Subunit of Transcription Factor IIF Recruits RNA Polymerase II into the Preinitiation Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88,9999-10003
- Forsburg, S.L. e Guarente, L. (1989). Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:153-80, 153-180.
- Ge, H. e R. G. Roeder, Purification (1994) Cloning and Characterization of Human Coactivator PC4 that mediates Transcriptional Activation of Class II Genes. *Cell* 78,513-523
- Gill, G. e M. Ptashne (1987) Mutations of GAL4 protein Altered in an Activation Function. *Cell* 51,121-126
- Goldenthal, M.J., M. Vanoni, B. Buchferer, e J. Marmur (1987) Regulation of MAL gene Expression in Yeast : Gene Dosage effect. *Mol. Gen. Genet.* 209,508-517
- Goldenthal, M.J., Vanoni, M., Buchferer, B. e Marmur, J (1987) Regulation of MAL gene expression in yeast: gene dosage effects. *Mol Gen Genet.* 209, 508-517.
- Grunstein, M. (1990) Histone, Function in Transcription *Annu.Rev. Cell Biol.* 6,643-78
- Guarente, L. (1983). Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* 101:181-91, 181-191.
- Guarente, L. (1988). UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell* 52, 303-305.
- Guarente, L. e Bermingham-McDonogh, O. (1992). Conservation and evolution of transcriptional mechanisms in eukaryotes. *Trends. Genet.* 8, 27-32.
- Guarente, L. e Ptashne, M. (1981). Fusion of *Escherichia coli* lacZ to the cytochrome c gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 2199-2203.

- Guarente, L., B. Lalonde., P. Gifford, e E. Alani (1984) Distinctly Regulated tandem upstream Activation sites Mediate Caabolute repression of the *CYC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Cell 36,503-511
- Guarente, L., Yocum, R.R., e Gifford, P. (1982). A GAL10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79, 7410-7414.
- Hahn, S. (1993) Structure (?) and Function of Acidic Transcription Activators Cell 72,481-83
- Hahn, S., Buratowski, S., Sharp, P.A., e Guarente, L. (1989). Identification of a yeast protein homologous in function to the mammalian general transcription factor, TFIIA. EMBO J. 8, 3379-3382.
- Haldi, M.L. e Guarente, L. (1995). Multiple domains mediate heme control of the yeast activator HAP1. Mol. Gen. Genet. 248, 229-235.
- Henrique-Silva, F., El-Gogary, S., Carle-Urioste, J.C., Matheucci, E., Jr., Crivellaro, O., e El-Dorry, H. (1996). Two regulatory regions controlling basal and cellulose-induced expression of the gene encoding cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* are adjacent to its TATA box. Biochem. Biophys. Res. Commun. 228, 229-237.
- Hernandez, N. (1993) TBP, a Universal Eukariotic Transcriptional Factor? Genes Dev. 7,1291-308
- Hersbach, B.M., Arnaud, M.B., e Johnson, A.D. (1994). Transcriptional repression directed by the yeast alpha 2 protein in vitro. Nature 370, 309-311.
- Hickey, D.A., Benkel, K.I., Fong, Y., e Benkel, B.F. (1994). A *Drosophila* gene promoter is subject to glucose repression in yeast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 11109-11112.
- Himmelfarb, H.J., J. Pearlberg, D.H. Last, e M. Ptashne (1990) Gal1p: A Yeast Mutation that Potentiates the Effect of Weak GAL4-derived Activators, Cell, 63,1299-1309
- Hoey, T., R.O. Weinzierl, G. Gill, J.L. Chen, B.D. Dynlacht, e R. Tjian (1993) Molecular cloning and Functional Analysis of *Drosophila* TAF110 reveal Properties Expected of Activators, Cell 29,247-260
- Hong, S.H. e J. Mamur (1987) Upstream Regulatory Regions Controlling the Expression of the yeast Maltase Gene, Mol. Cell. Biol. 7,2477-2484
- Hope, J. A., S. Mahadevan, e K. Struhl (1988) Structural and Functional Characterization of the Short Acidic Transcriptional Activation Region of Yeast GCN4 protein, Nature 333,635-639
- Hunter, T. e M. Karin (1992) The Regulation of Transcription by Phosphorylation. Cell 70,375-387
- Ilmén, M., A. Saloheimo, M. Onnela e M. Penttilä (1997) Regulation of Cellulase Gene Expression in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. Appl. and Environ. Microb 63,1298-1306
- Ilmen, M., Onnela, M.L., Klemsdal, S., Keranen, S., e Penttilä, M. (1996a). Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Mol. Gen. Genet. 253, 303-314.
- Ilmen, M., Thrane, C., e Penttilä, M. (1996b). The glucose repressor gene cre1 of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. Mol. Gen. Genet. 251, 451-460.
- Imbalzano, A.N., H. Kwon, M.R. Green e R.E. Kingston (1994) Facilitated binding of TATA-binding Protein to Nucleosomal DNA, Nature 370,481-485

- Johnston, M. e M. Carlson (1992) Regulation of carbon and phosphate utilization. In The molecular and Cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene expression p. 193-281, Cold Spring Harbor laboratory press, New York
- Johnston, M., Flick, J.S., e Pexton, T. (1994). Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of GAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 14, 3834-3841.
- Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M., e Johnson, A.D. (1992). Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 68, 709-719.
- Kim, K.S., Pfeifer, K., Powell, L., e Guarente, L. (1990). Internal deletions in the yeast transcriptional activator HAP1 have opposite effects at two sequence elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4524-4528.
- Kim, Y.J., S. Bjorklund, Y. Li, M.H. Sayre e R.D. Kornberg (1994) A Multiple Mediator of Transcriptional Activation and its Interaction with the C-terminal Repeat Domain of RNA Polymerase II. *Cell*, 77,599-608
- Klages, N. e Strubin, M. (1995). Stimulation of RNA polymerase II transcription initiation by recruitment of TBP in vivo. *Nature* 374, 822-823.
- Klein, C. e Struhl, K. (1994). Increased recruitment of TATA-binding protein to the promoter by transcriptional activation domains in vivo. *Science* 266, 280-282.
- Klug, A. Transcription. Opening the Gateway. (1993) *Nature*, 365,486-487
- Knowles, J., Lehtovaara, P., Penttilä, M., Teeri, T., Harkki, A., e Salovuori, I. (1987). The cellulase genes of *Trichoderma*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53, 335-341.
- Koleske, A. e R. A. Young (1995) The RNA Polymerase II Holoenzyme and its Implications for Gene regulation, *Trends Biochem Sci*, 20,113-116
- Koleske, A.J. e R. A. Young (1994) An RNA Polymerase II Holoenzyme Responsive to Activators. *Nature* 368, 466-469
- Landschulz, W. H., Johnson, P.F. e McKnight (1988) The Leucine Zipper: a Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Protein. *Science*, 240,1759-1764
- Laughon, A. e M.P. Scott (1984) Sequence of a *Drosophila* segmentation Gene: Protein Structure Homology with DNA binding protein. *Nature* 310,25-31
- Laurent, B.C., Treich, I., e Carlson, M. (1993). The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev.* 7, 583-591.
- Laz, T.M., D.F. Pietras, e F. Sherman (1984) Differential Regulation of the Duplicated Isocytochrome c Genes in Yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81,4475-4479
- Le Guen, L., Thomas, M., Bianchi, M., Halford, N.G., e Kreis, M. (1992). Structure and expression of a gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a protein related to SNF1 protein kinase. *Gene* 120, 249-254.
- Lech, K., K. Anderson, K. e R. Brent (1988) DNA-Bound Fos Proteins Activate Transcription in Yeast. *Cell*, 52,179-184
- Lee, D.K. (1992) TFIIA induces conformational changes inTFIID via Interactions with the Basic Repeat, *Mol. Cell. Biol.* 12,5189-5196
- Lee, H. Y. e Archer, T.K. (1989) Nucleosome-Mediated Disruption of transcription factor-chromatin initiation Complex at the mouse mammary tumor virus long terminal repeat *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* , 14, 32-41

- Lee, M. S., G.P. Gippert, K.V. Soman, D.A. Kase, e P.E. Right (1989) Three dimensional solution structure of a single DNA-Binding domain. *Science* 245,635-637
- Lesage, P., Yang, X., e Carlson, M. (1996). Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Mol. Cell Biol.* 16, 1921-1928.
- Leuther, K.K., J.M. Salmeron, e S.A. Johnston (1993) Genetic Evidence that an Activation Domain of GAL4 does not Require Acidity and may form a β -sheet. *Cell*, 26,575-585
- Lewin, B. (1990) Commitment and Activation at Pol II Promoters: a Tail of Protein-Protein interaction. *Cell* 61,1161- 1164
- Liao, X. e Butow, R.A. (1993). RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72, 61-71.
- Liao, X.S., Small, W.C., Srere, P.A., e Butow, R.A. (1991). Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11, 38-46.
- Ljungdahl, L. J. e K.E. Erickson (1985) Ecology of Microbial cellulose degradation. In: *Advances in Microbial Ecology*, 8,237-299
- Lohr, D., Venkov, P., e Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J.* 9, 777-787.
- Lutfiyya, L.L. e Johnston, M. (1996). Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of SUC2 expression. *Mol. Cell Biol.* 16, 4790-4797.
- Ma, J. e M. Ptashne (1987) Deletion Analysis of GAL 4 Defines two Transcriptional Activating Segments. *Cell*, 48,847-853
- Mach, R.L., Seiboth, B., Myasnikov, A., Gonzalez, R., Strauss, J., Harkki, A.M., e Kubicek, C.P. (1995). The *bgl1* gene of *Trichoderma reesei* QM 9414 encodes an extracellular, cellulose-inducible beta-glucosidase involved in cellulase induction by sophorose. *Mol. Microbiol.* 16, 687-697.
- Mach, R.L., Seiboth, B., Myasnikov, A., Gonzalez, R., Strauss, J., Harkki, A.M., e Kubicek, C.P. (1995). The *bgl1* gene of *Trichoderma reesei* QM 9414 encodes an extracellular, cellulose-inducible beta-glucosidase involved in cellulase induction by sophorose. *Mol. Microbiol.* 16, 687-697.
- Mandels, M. e E.T. Reese (1960) Induction of Cellulase in Fungi by Cellobiose. *J. Bacteriol.* 79,816-826
- McKnight, S. e R. Tjian (1986) Transcriptional Selectivity of Viral Genes in Mammalian Cells. *Cell*, 46,795-805
- McKnight, S.L. (1996) Transcription Revised: A Commentary on the 1995 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, "Mechanisms of Eukaryotic Transcription", *Genes & Dev.* 10,367-381
- Mitchellhill, K.I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., Witters, L.A., e Kemp, B.E. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 2361-2364.
- Mitchell, P.J. e R. Tjian (1989) Transcriptional Regulation in Mammalian Cells by Sequence-Specific DNA Binding Proteins. *Science*, 254, 371-378
- Montenecourt, B.S. *Trichoderma reesei* cellulases (1983) *Trends biotechnol.* 1,15-161

- Moqtaderi, Z., Yale, J.D., Struhl, K., e Buratowski, S. (1996). Yeast homologues of higher eukaryotic TFIID subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14654-14658.
- Mukai, Y., Harashima, S., e Oshima, Y. (1991). AAR1/TUP1 protein, with a structure similar to that of the beta subunit of G proteins, is required for $\alpha 1$ - $\alpha 2$ and $\alpha 2$ repression in cell type control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11, 3773-3779.
- Myers, A. M., A. Tzagoloff, D.M. Kinney, e C.J. Lusty (1986) Yeast Shuttle and Integrative Vectors with multiple Cloning Sites Suitable for Construction of *lac-Z* fusions *Gene* 45,299-310
- Nehlin, J.O. e Ronne Yeast MIG1 (1990) Repressor is Related to the Mammalian Early Growth response and Wilim's tumor Finger Protein. *EMBO J.* 9,2891-2898
- Nehlin, J.O., Carlberg, M., e Ronne, H. (1991). Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.* 10, 3373-3377.
- Neigeborn, L. e Carlson, M. (1984). Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108, 845-858.
- Neigeborn, L. e Carlson, M. (1987). Mutations causing constitutive invertase synthesis in yeast: genetic interactions with *snf* mutations. *Genetics* 115, 247-253.
- Oechsner, U., Hermann, H., Zollner, A., Haid, A., e Bandlow, W. (1992). Expression of yeast cytochrome c1 is controlled at the transcriptional level by glucose, oxygen and haem. *Mol. Gen. Genet.* 232, 447-459.
- Ossipow, V., J.P. Tassan, E.A. Nigg e U. Schibler A (1995) Mammalian RNA Polymerase II Holoenzyme Containing all Components Required for Promoter-Specific Transcription Initiation. *Cell* 83,137-146
- Pabo, C. O. e R.T. Sauer (1992) Transcription factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61,1053-1095
- Pan, T. e J.E. Coleman (1990) The DNA Binding Domain of GAL4 forms a Binuclear Metal ion Complex. *Biochem.* 29,2023-2029
- Parikh, V.S., M.M. Morgan, R. Scott, L.S (1987). Clements, e R.A. Butow, The Mitochondrial Genotype can Influence Nuclear Gene Expression in Yeast. *Science* 235,576-582
- Pavletich, N.P. e C.O. Pabo (1991) Zinc Finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 21 Å. *Science*, 252,809-817
- Pennisi, E. (1997) Opening the Way to Gene Activity, *Science* 275,155-157
- Pereira, G.G.and C.P. Hollenberg, (1996) Conserved Regulation of the *Hansenula polymorpha* MOX promoter in *Saccharomyces cerevisiae* reveals insights in the transcriptional Activation by Adr1p, *Eur. J. Biochem.* 238,181-191
- Perlman, D. e J.E. Hopper (1979) Constitutive Synthesis of the GAL4 Protein, a Galactose Pathway Regulator in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell* 16,89-93
- Pfeifer, K. B. Arcangioli, e L. Guarente (1987) Yeast HAP1 Activator Binds to two Upstream Activation Sites of Different Sequence. *Cell* 49,9-18
- Pfeifer, K., Kim, K.S., Kogan, S., e Guarente, L. (1989). Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. *Cell* 56, 291-301.
- Pfeifer, K., T. Prezant e L. Guarente (1987) Yeast HAP1 activator binds to two Upstream Activation Sites of Different Sequences. *Cell*, 49,19-27

- Pinto, I., D.E. Ware, e M. Hampsey (1992) The Yeast SUA7 Gene Encodes a Homolog of Human transcription Factor TFIIB and is Required for Normal Start Site Selection *in vivo*. *Cell* 68,977-988
- Porter, S. D. e M. Smith (1986) Homeo-domain Homology in yeast MAT α 2 is essential for repressor Activity. *Nature* 320:766
- Poyton, R.O. e J.E. McEwen (1996) Crosstalk Between Nuclear and Mitochondrial Genomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65,563-607
- Prezant, T., Pfeifer, K., e Guarente, L. (1987). Organization of the regulatory region of the yeast CYC7 gene: multiple factors are involved in regulation. *Mol. Cell Biol.* 7, 3252-3259.
- Ptashne, M. (1988) How Eukariotic Transcriptional Activators Work? *Nature* 335,683-689
- Pugh, B.F. e R. Tjian (1992) Diverse Transcriptional Functions of the Multisubunit Eukariotic TFIID Complex. *J. Biol. Chem.*, (267)2,679-682
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., e Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic. Acids. Res.* 23, 4878-4884.
- Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M., e Entian, K.D. (1997). Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol. Cell Biol.* 17, 2502-2510.
- Redd, M.J., Arnaud, M.B., e Johnson, A.D. (1997). A complex composed of tup1 and ssn6 represses transcription *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 272, 11193-11197.
- Roeder, R.G. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II *TIBS*, 21,327-335
- Ronne, H. (1995) Glucose Repression in Fungi, *Trends in Genetics* 11,12-17
- Roth, S. Y. e R.T. Simpson. (1992) Yeast minichromosomes, *Methods Cell. Biol.* 35,289-314
- Rothermel B.A., A. W Shyjan, J.L. Etheredge, e R.A. Butow (1995) Transactivation by Rtg1p, a basic Helix-loop-Helix Protein that Functions in Communication Between Mitochondria and the Nucleus in yeast, *The Jour. Biol. Chem.* 270(49),29476-29482
- Sadowski, I., Costa, C., e Dhanawansa, R. (1996). Phosphorylation of Gal4p at a single C-terminal residue is necessary for galactose-inducible transcription. *Mol. Cell Biol.* 16, 4879-4887.
- Sakurai, H., Ohishi, T., e Fukasawa, T. (1994). Two alternative pathways of transcription initiation in the yeast negative regulatory gene GAL80. *Mol. Cell Biol.* 14, 6819-6828.
- Sawadogo, M. e A. Sentenac (1990) RNA Polymerase B (II) and General Transcription Factors, 59,711-754
- Schneider, J.C. e Guarente, L. (1991). Regulation of the yeast CYT1 gene encoding cytochrome c1 by HAP1 and HAP2/3/4. *Mol. Cell Biol.* 11, 4934-4942.
- Schultz, J., Marshall-Carlson, L., e Carlson, M. (1990). The N-terminal TPR region is the functional domain of SSN6, a nuclear phosphoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1992 Jun;12(6):2909]. *Mol. Cell Biol.* 10, 4744-4756.
- Seiboth, B., Hakola, S., Mach, R.L., Suominen, P.L., e Kubicek, C.P. (1997). Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. *J. Bacteriol.* 179, 5318-5320.

- Serizawa, H., J., W. Conaway, e R.C. Conaway (1993) Phosphorylation of C-Terminal Domain of RNA polymerase II is not Required in Basal Transcription, *Nature*, 363,371-374
- Sinclair, D.A., G.D. Kornfeld, e I.W. Dawes (1994) Yeast Intragenic transcriptional Control: Activation and Repression sites Within the Coding region of the *Saccharomyces cerevisiae* *LPD1* gene
- Small, S., R Kraut, T. Hoey, R Warrior, e M. Fields (1991) Transcriptional Regulation of a pair-rule Stripe in *Drosophila*. *Genes Dev.* 5,741-755
- Smith, R.L., Redd, M.J., e Johnson, A.D. (1995). The tetratricopeptide repeats of Ssn6 interact with the homeo domain of alpha 2. *Genes Dev.* 9, 2903-2910.
- Stahlberg, J., Johansson, G. e Petterson, G. (1993) *Trichoderma reesei* has no true exo-cellulase: all intact and truncated cellulases produce new reducing end groups on
- Stargell, L.A. e Struhl, K. (1995). The TBP-TFIIA interaction in the response to acidic activators in vivo. *Science* 269, 75-78.
- Stone, G. e Sadowski, I. (1993). GAL4 is regulated by a glucose-responsive functional domain. *EMBO J.* 12, 1375-1385.
- Strauss, J., R. Mach, S. Zeilinger, G. Stoffler, M. Wolschek e C. P. Kubicek (1995) *FEBS Lett.* 376,103-107
- Struhl, K. (1987) Promoter, Activator Proteins, e the Mechanism of Transcriptional Initiation in Yeast. *Cell*, 49,295-297
- Struhl, K. (1989) Molecular Mechanism of Transcriptional Regulation in Yeast. *Annu. Rev. Biochem.*, 58,1051-1077
- Struhl, K. (1995) Yeast Transcriptional Regulatory Mechanism, *Annu. Rev. Genet.*, 29,651-674
- Struhl, K. (1996) Chromatin Structure and RNA Polymerase II Connection: Implications for Transcription, *Cell* 84,179-182
- Szeto, L. e Broach, J.R. (1997). Role of alpha2 protein in donor locus selection during mating type interconversion. *Mol. Cell Biol.* 17, 751-759.
- Takashima, S., H. Likura, A. Nakamura, H. Masaki e T. Uozumi (1996) Analysis of CRE1 Binding Sites in the *Trichoderma reesei* *cbh1* Upstream Region, *FEMS Microbiol. Letters* 145:361-366
- Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., e Uozumi, T. (1996). Cloning, sequencing, and expression of the cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *J. Biotechnol.* 50, 137-147.
- Thut, C.J., J-L. Chen, Klemm, R. e Tjian (1995) p53 Transcriptional Activation Mediated by Coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267, 100-104
- Tjian, R. e T. Maniatis (1994) Transcriptional Activation: A Complex Puzzle With Few Easy Pieces. *Cell* 77,5-8
- Torigoi, E., Henrique-Silva, F., Escobar-Vera, J., Carle-Urioste, J.C., Crivellaro, O., El-Dorry, H., e El-Gogary, S. (1996). Mutants of *Trichoderma reesei* are defective in cellulose induction, but not basal expression of cellulase-encoding genes. *Gene* 173, 199-203.
- Treitel, M.A. e Carlson, M. (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3132-3136.
- Trumbly, R.J. (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6, 15-21.

- Tsukiyama, T. e Wu, C. (1997). Chromatin remodeling and transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 182-191.
- Tsukiyama, T., Becker, P.B., e Wu, C. (1994). ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor [see comments]. *Nature* 367, 525-532.
- Tyree, C.M., C.P. George, L.M. Lira-Devito, S.L. Wampler, M.E. Dahmus, L. Zawel e J.T. Kadonaga (1993) Identification of a Minimal Set of Proteins that is Sufficient for Accurate Initiation by RNA Polymerase II. *Gene Dev.* 7, 1254-1265
- Tzamarias, D. e K. Struhl (1995) Functional dissection of the Yeast CYC8-TUP1 corepressor complex, *Nature* 369, 758-761
- Vallari, R.C., Cook, W.J., Audino, D.C., Morgan, M.J., Jensen, D.E., Laudano, A.P., e Denis, C.L. (1992). Glucose repression of the yeast ADH2 gene occurs through multiple mechanisms, including control of the protein synthesis of its transcriptional activator, ADR1. *Mol. Cell Biol.* 12, 1663-1673.
- Vallier, L.G. e Carlson, M. (1994). Synergistic release from glucose repression by *mig1* and *ssn* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137, 49-54.
- Vanoni, M. Sollitti, P. Goldenthal, M. e Marmur, L. (1989) Structure and regulation of the multiple family controlling maltose fermentation in budding yeast *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 37, 281-322.
- Varanasi, U.S., Klis, M., Mikesell, P.B., e Trumbly, R.J. (1996). The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Mol. Cell Biol.* 16, 6707-6714.
- Verdiere, J., Creusot, F., Guarente, L., e Slonimski, P.P. (1986). The overproducing CYP1 and the underproducing *hap1* mutations are alleles of the same gene which regulates in trans the expression of the structural genes encoding iso-cytochromes c. *Curr. Genet.* 10, 339-342.
- Vogt, P.K., T.J. Bos, e R.F. Doolittle (1987) Homology Between the DNA-Binding domain of the GCN4 regulatory Protein of yeast and the Carboxil-terminal Region of a protein Coded for by the Oncogen *jun*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3316-3319
- Williams, F. E. e R.J. Trumbly (1990) Characterization of TUP1, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 10, 6500-6511
- Winkler, H., Adam, G., Mattes, E., Schanz, M., Hartig, A., e Ruis, H. (1988). Coordinate control of synthesis of mitochondrial and non-mitochondrial hemoproteins: a binding site for the HAP1 (CYP1) protein in the UAS region of the yeast catalase T gene (CTT1). *EMBO J.* 7, 1799-1804.
- Woychik, N.A. (1994) Regulating Regulators, *TIBS* 19, 103-105
- Wright, R.M. e Poyton, R.O. (1990). Release of two *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome genes, COX6 and CYC1, from glucose repression requires the SNF1 and SSN6 gene products. *Mol. Cell Biol.* 10, 1297-1300.
- Young, R.A. (1991) RNA Polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.*, 60, 689-715
- Zeng, X., Deminoff, S.J., e Santangelo, G.M. (1997). Specialized Rap1p/Gcr1p transcriptional activation through Gcr1p DNA contacts requires Gcr2p, as does hyperphosphorylation of Gcr1p. *Genetics* 147, 493-505.
- Zenke, F.T., Zachariae, W., Lunkes, A., e Breunig, K.D. (1993). Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Mol. Cell Biol.* 13, 7566-7576.

- Zhang, L. e Guarente, L. (1994). HAP1 is nuclear but is bound to a cellular factor in the absence of heme. *J. Biol. Chem.* 269, 14643-14647.
- Zhang, L. e Guarente, L. (1995). Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* 14, 313-320.
- Zitomer, R.S. e Lowry, C.V. (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 56, 1-11.