FLÁVIA GARCIA BORGES

Análise do promotor quimérico regulado por zinco para
expressão de proteínas recombinantes em *Saccharomyces*
cerevisiae

Dissertação de apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/
Instituto Butantan/ IPT, do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2015

FLÁVIA GARCIA BORGES

Análise do promotor quimérico regulado por zinco para
expressão de proteínas recombinantes em *Saccharomyces*
cerevisiae

Dissertação de apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/
Instituto Butantan/ IPT, do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área da concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo
Alcalde

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Borges, Flavia Garcia.

Análise do promotor quimérico regulado por zinco para a expressão de proteínas recombinantes em *Saccharomyces cerevisiae* / Flavia Garcia Borges. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biotecnologia de microrganismos.

Versão do título para o inglês: Analysis of chimeric promoter regulated by zinc for the expression of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Zinco 2. Leveduras 3. Promotor 4. Sistema de expressão 5. Fungos I. Alcalde, Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0102/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Flavia Garcia Borges.

Título da Dissertação: Análise do promotor quimérico regulado por zinco para a expressão de proteínas recombinantes em *Saccharomyces cerevisiae*.

Orientador(a): Felipe Santiago Chambergo Alcalde.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

EACH

Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

São Paulo, 04 de abril de 2013.

Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde – Orientador

Flávia Garcia Borges – Orientanda

Projeto de Mestrado – “Análise do promotor quimérico induzido por metais para expressão de proteínas recombinantes em *T. reesei*”

De acordo com a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, somente estão sujeitos à análise pelo CEUA os projetos de pesquisa ou atividade de ensino que envolvam animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata.

Dessa forma, declaro que o referido estudo não se enquadra nessas normas e, portanto, está isento de análise ou aprovação por esse CEUA.

Atenciosamente,

Profa. Tânia Araújo Viel

Coordenadora

Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação
EACH/USP

*Dedico este trabalho aos meus pais, Magda e Milton,
que sempre me deram todo o apoio e incentivo para a
continuação de meus estudos.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde pela oportunidade, confiança, compreensão e por todos os ensinamentos passados, que permitiram a realização desse trabalho e contribuíram com a minha formação pessoal.

Ao Prof. Dr. José Ribamar, pela ajuda e colaboração na realização desse trabalho.

Á todos os alunos, funcionários e professores do Laboratório de Engenharia Genética da Escola de Artes Ciências e Humanidades (EACH-USP), em especial ao Gabriel, Rafaela e Patrícia, pela amizade e ajuda indispensável no final deste trabalho.

Aos companheiros “das antigas”: Laura, Filipe e Philipe, pelos momentos de descontração que deixaram essa jornada mais leve e divertida.

Aos meus pais, meu irmão e familiares, que me apoiaram e tiveram muita paciência durante o andamento deste trabalho.

Á CAPES pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar.”

Francisco de Assis França

Resumo

BORGES, F. G. **Análise do promotor quimérico regulado por zinco para expressão de proteínas recombinantes em *Saccharomyces cerevisiae***. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A produção de proteínas de alto valor comercial, para aplicações diversas, como saúde humana, saúde animal, catálise enzimática, entre outras, tem sido conduzida através da inserção e expressão dos respectivos genes codificadores em diversos hospedeiros como *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta diversas vantagens técnicas para utilização com fins industriais. Entre as técnicas disponíveis, o desenvolvimento de sistemas de expressão através da modificação de fortes promotores conhecidos, como o de celobiohidrolase I de *Trichoderma reesei*, vem sendo amplamente utilizada para a produção de proteínas com potencial utilização biotecnológica. O presente trabalho teve por objetivo a construção de um promotor quimérico (*Pcbh1-mre*) através de modificações do promotor *cbh1* e inserção de elementos de resposta à metais provenientes do promotor do gene transportador de alta afinidade ao zinco (*ZRT1*) de *S. cerevisiae*. O plasmídeo construído foi transformado na cepa W303-1A e induzido com diferentes concentrações de zinco. Para analisar a habilidade do promotor em dirigir a expressão da proteína repórter, foi feito o teste com o substrato ONPG, com os mutantes selecionados e a média das triplicatas foi apresentada em Unidades Miller. Foi possível observar que, conforme a concentração de zinco aumenta, as concentrações de β -galactosidase para hidrolisar o ONPG diminuem, indicando que sob altas concentrações de zinco a atividade do *Pcbh1-mre* é menor. Sob baixas concentrações de zinco ocorre o contrário, sendo observadas as maiores atividades do promotor. Esses resultados confirmam que o sistema funciona de forma eficiente na levedura *S. cerevisiae*. Também foi possível observar que os mutantes crescidos em meio com limitação de zinco e, conseqüentemente, com maior atividade do promotor, tiveram sua taxa de crescimento alterada. O que é esperado devido ao fenômeno conhecido como estresse metabólico, comum durante a produção de proteínas recombinantes em leveduras, na qual a cultura apresenta uma diminuição significativa do crescimento.

Palavras-chave: Zinco. Leveduras. Fungos. Promotor. Sistema de expressão.

Abstract

BORGES, F. G. **Analysis of chimeric promoter regulated by zinc for the expression of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae***. 2015. 89 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The development of commercially valuable proteins for various applications, such as human health, animal health, enzymatic catalysis, among others has been accomplished by insertion and expression of their encoding gene in various host such as *Saccharomyces cerevisiae*, which presents several technical advantages in industrial purposes. Among the expression systems in use, those who use the strong promoter of the cellobiohydrolase I gene (*Pcbh1*) of *Trichoderma reesei*, modified has been widely used for the production of proteins. This study aimed to construct an expression system constituted of the chimeric promoter (*Pcbh1-mre*) built with *cbh1* promoter modified by inserting metal responsive elements (MRE) from the promoter of the high-affinity zinc transporter gene (*ZRT1*) of *S. cerevisiae*. The *S. cerevisiae* W303-1A strain was transformed and the system was induced with different concentrations of zinc. The ability of the promoter to direct the expression of the LacZ reporter protein (β -galactosidase) was tested using ONPG as substrate. It was observed that as the zinc concentration increases β -galactosidase production decreases (0.68 UM), indicating that under high zinc concentrations (0.1mM and 1mM) *Pcbh1-mre* activity is low. At low zinc concentrations (0mM and 0.0002mM) the opposite effect is observed, and the promoter reaches its highest activities (12.00 UM). These results confirm that the system functions efficiently in *S. cerevisiae*. It was also observed that the mutant grown in environment with zinc limitation, hence with higher activity of the promoter, showed reduced growth rate. Indeed, this is expected due to the phenomenon known as metabolic burden, characterized by a joint stress during the production of recombinant proteins in yeast, under conditions which the culture has a significant growth reduction.

Keywords: Zinc. Yeasts. Fungi. Promoter. Expression System.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Estrutura e processamento do RNA em um gene eucariótico	20
Figura 2 - Elementos <i>cis</i> atuantes mais comuns em promotores eucarióticos	21
Figura 3 - Exemplos de motivos de ligação ao DNA	25
Figura 4 - Estrutura da proteína TBP	27
Figura 5 - Complexo de iniciação da transcrição.....	27
Figura 6 - Topologia predita para os transportadores da família ZIP	37
Figura 7 - Respostas à deficiência de zinco mediada por Zap1 em <i>S. cerevisiae</i>	39
Figura 8 - Mecanismo de ativação do gene <i>ZRT1</i> em <i>S. cerevisiae</i>	40
Figura 9 - Anatomia do fator de transcrição Zap1	40
Figura 10 - Ligação dos motivos dedo de zinco no Elemento de Resposta a Metais (MRE) em <i>S. cerevisiae</i>	41
Figura 11 - Sequência de nucleotídeos do promotor <i>ZRT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> (706 pb)	52
Figura 12 - Sequência de nucleotídeos do promotor <i>cbh1</i> de <i>T. reesei</i> (1000 pb)....	53
Figura 13 - Sequência de nucleotídeos do promotor <i>Pcbh1-mre</i> (1318 pb).....	54
Figura 14 - Esquema representativo do desenho do promotor <i>Pcbh1-mre</i>	55
Figura 15 - Mapa esquemático do plasmídeo <i>Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ</i> (10331 pb)	57
Figura 16 - Modelo hipotético da ativação do promotor <i>Pcbh1-mre</i> regulada pela concentração de zinco	58
Figura 17 - Seleção dos transformantes em meio YNBD com a marca auxotrófica URA3.....	59
Figura 18 - Análise da inserção do plasmídeo <i>Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ</i> em <i>S. cerevisiae</i>	60

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Expressão do gene <i>lacZ</i> regulado pelo promotor <i>Pcbh1-mre</i>	65
Gráfico 2 - Expressão do gene <i>lacZ</i> regulado pelo promotor <i>Pcbh1-mre</i> no transformante 3.....	64
Gráfico 3 - Curvas de crescimento.....	67
Gráfico 4 - Expressão do gene <i>lacZ</i> e crescimento celular no transformante 3 sob diferentes concentrações de zinco.....	69

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Promotores utilizados em sistemas para expressão de genes homólogos ou heterólogos.....	32
Tabela 2 - Lista dos oligonucleotídeos utilizados no trabalho	46
Tabela 3 - Características dos plasmídeos utilizados no estudo.....	46
Tabela 4 - Sequência e localização dos MREs nos promotores <i>ZRT1</i> e <i>Pcbh1-mre</i>	51
Tabela 5 - Atividade da enzima β -galactosidase em Unidades Miller	63
Tabela 6 - Média da atividade da enzima β -galactosidase no transformante 3 em Unidades Miller.....	65

Lista de Abreviaturas e Siglas

μ M - micromolar
Abs - absorvância
AD - domínio de ativação
bZIP - *basic leucine zipper*
Cre1 - repressor do gene *cbh1*
CreA - repressor de genes regulados por glicose em *Aspergillus*
DBD - *DNA-binding Domain* (Domínio de ligação ao DNA)
DNA - ácido desoxirribonucleico
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
HTH - *helix-turn-helix*
Inr - elemento iniciador
lacZ – gene que codifica a proteína β -galactosidase
LZM - *low zinc medium* (Meio com baixo metal)
M - molar
mg - miligrama
Mig1 – proteína repressora de genes regulados por glicose em *S. cerevisiae*
mL - mililitros
mM - milimolar
MREs - *metal-responsive elements* (Elementos de Resposta a Metais)
ONPG - O-Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeos
pb - pares de bases
Pcbh1 - promotor do gene celobioidrolase 1 de *T. reesei*
PCR - *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PZRT1 - promotor do gene de alta afinidade ao zinco de *S. cerevisiae*
RNA - ácido ribonucleico
RNA pol I - RNA polimerase I
RNA pol II - RNA polimerase II
RNA pol III - RNA polimerase III
RNAm - RNA mensageiro
RNA_t - RNA transportador
Ssn6 - repressor de genes regulados por glicose em *S. cerevisiae*

Tup 1 - repressor de genes regulados por glicose em *S. cerevisiae*

T - tempo

TBP – *TATA binding protein* (proteína que se liga à caixa TATA)

TF - fator de Transcrição

TFIIA - fator de transcrição IIA

TFIIB - fator de transcrição IIB

TFIID - fator de transcrição IID

TFIIE - fator de transcrição IIE

TFIIF - fator de transcrição IIF

TFIIH - fator de transcrição IIH

Tm - temperatura de anelamento

UARcb1 - *upstream activating region*

UAS - *upstream Activation Sequence* (Sequências Ativadoras aa Montante)

UM - unidades Miller

V - volume

Znf - motivos dedos de zinco

ZREs - *zinc-responsive elements* (Elementos de Resposta ao Zinco)

Zrt - *zinc-regulated transporter* (proteína transportadora regulada por zinco)

μL - microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Regulação transcricional em eucariotos.....	17
2.1.1	<i>Região codificadora</i>	18
2.1.2	<i>Região promotora e elementos cis-atuantes</i>	20
2.1.3	<i>Fatores de transcrição</i>	23
2.1.4	<i>Iniciação da transcrição em eucariotos</i>	26
2.2	Aspectos da conservação de mecanismos regulatórios em eucariotos	28
2.3	O Sistema de Expressão	28
2.3.1	<i>O promotor cbh1 de Trichoderma reesei</i>	30
2.3.2	<i>Saccharomyces cerevisiae como hospedeiro para produção de proteínas recombinantes</i>	31
2.4	Metais e expressão gênica	34
2.4.1	<i>Regulação da expressão gênica por zinco em Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3	JUSTIFICATIVA.....	42
4	OBJETIVO GERAL	43
4.1	Objetivos específicos	43
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
5.1	Cepas e condições de cultura.....	44
5.2	Preparação de DNA plasmidial de levedura.....	44
5.3	Extração de DNA genômico de levedura.....	45
5.4	Manipulação de DNA e técnicas gerais de biologia molecular	45
5.5	Plasmídeos.....	46
5.6	Transformação de bactérias	47
5.7	Transformação de leveduras	47
5.8	Teste da atividade da β -galactosidase	47
5.9	Curva de crescimento.....	48
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1	Desenho do promotor quimérico Pcbh1-mre	50
6.2	Sistema de expressão Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ	57
6.2.1	<i>Construção do plasmídeo de expressão</i>	57
6.2.2	<i>Transformação de Saccharomyces cerevisiae</i>	59
6.3	Análise da atividade da β -galactosidase.....	61
6.4	Análises do Crescimento	65
7	CONCLUSÕES	71
8	PERSPECTIVAS.....	73
	REFERÊNCIAS*	74
	ANEXO A - Descrição do plasmídeo Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ	88

1 INTRODUÇÃO

Um dos benefícios surgidos com a tecnologia do DNA recombinante foi a capacidade de levar um organismo (bactéria, levedura, célula de mamífero, planta ou inseto) à produção em massa de uma proteína. Essas proteínas, denominadas proteínas recombinantes, são utilizadas em diversas áreas como ferramenta para diagnósticos, proteínas terapêuticas e enzimas funcionais. A tecnologia do DNA recombinante permite o estudo dessas proteínas, mesmo sem nenhum conhecimento prévio da sua localização ou função (JAYARAJ; SMOOKER, 2009; YOUNG; BRITTON; ROBINSON, 2012).

A produção das proteínas recombinantes é feita através de um sistema de expressão. Existe uma variedade de sistemas de expressão disponível, que utilizam como hospedeiros, bactérias, leveduras, células de mamíferos, de plantas ou de insetos, ou plantas e animais transgênicos. Cada um desses sistemas apresenta vantagens e desvantagens. A qualidade da proteína, a sua funcionalidade, a velocidade e custo de produção e rendimento são os fatores mais importantes que devem ser considerados na escolha do sistema de expressão mais adequado (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; JAYARAJ; SMOOKER, 2009).

A bactéria *Escherichia coli* é o organismo mais amplamente utilizado para a produção de proteínas homólogas ou heterólogas, devido à sua capacidade de crescer rapidamente a uma elevada densidade, utilizando substratos de baixo custo. Possui uma grande quantidade de informações conhecidas, referentes à sua genética, metabolismo, fisiologia e tecnologia de fermentação, o que a torna de fácil manipulação, e, além disso, apresenta um número cada vez maior de vetores de clonagem e cepas hospedeiras mutantes disponíveis. Contudo, sistemas bacterianos são incapazes de fazer as modificações pós-traducionais, como por exemplo, a glicosilação. Se essas modificações forem necessárias para a atividade da proteína recombinante, sistemas de expressão, utilizando hospedeiros eucariotos, são os mais indicados (GOPAL; KUMAR, 2013; TERPE, 2006).

Entre os organismos eucarióticos utilizados em sistemas de expressão, as leveduras são amplamente utilizadas para a produção de proteínas recombinantes de interesse medicinal e industrial. Elas combinam as vantagens dos organismos unicelulares (como fácil manipulação genética e crescimento rápido) com a habilidade típica dos organismos eucariotos em realizar as modificações pós-

traducionais. Ao contrário da maioria dos organismos eucariotos complexos, os sistemas de expressão com leveduras são econômicos e podem chegar rapidamente a altas densidades celulares (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

Dentre as diferentes substâncias produzidas por sistemas de expressão, as enzimas apresentam um elevado interesse econômico. Elas são utilizadas, em grande escala, na indústria de tecidos (celulases, amilases, oxiredutases), detergentes (proteases, lipases, celulases, oxirredutases), alimentos (amilases, pectinases e celulases), papel e celulose (xilanasas, lípases) e couro (proteases e lípases) (NIELSEN; OXENBOLL, 1998).

A produção de enzimas comerciais tem crescido ao longo do tempo em resposta à expansão do mercado e ao aumento na demanda de novos biocatalizadores. A maioria das empresas que produzem enzimas de interesse industrial está localizada na Dinamarca, Suíça, Alemanha, Holanda e Estados Unidos, sendo o Brasil um país essencialmente importador, que apresenta um uso ainda reduzido de enzimas em processos industriais, quando comparado com outros países (LI et al., 2012).

Dessa forma, observa-se que a tecnologia para a produção de proteínas, principalmente enzimas, está em atraso no país, e, à medida que o Brasil se afirma como um país em desenvolvimento, o aprimoramento de tecnologias internas se torna necessário para que possamos competir frente às tecnologias já existentes no mundo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Regulação transcricional em eucariotos

O desenvolvimento e o aprimoramento de tecnologias que visem à produção de proteínas recombinantes em organismos eucariotos requer o conhecimento prévio de toda a maquinaria de transcrição, que é muito mais complexa do que nas bactérias.

A função mais importante do núcleo celular é o processo de transcrição do gene, maneira pela qual a informação codificada no DNA genômico pode ser utilizada na síntese de moléculas complementares de RNA. O processo de transcrição, assim como outras reações bioquímicas, é coordenado de forma harmoniosa dentro da célula (STEIN; SPELSBERG; KLEINSMITH, 1974). Esse

controle é influenciado por vários processos biológicos, nos quais a primeira etapa da regulação consiste na síntese de RNA pela RNA polimerase.

Em organismos eucariotos há três tipos de RNA polimerases, os quais transcrevem diferentes tipos de genes: a RNA polimerase I (RNA pol I) sintetiza o RNA ribossomal, ou seja, os rRNAs 28S, 5,8S e 18S; a RNA polimerase II (RNA pol II) transcreve os RNA mensageiros (RNAm), que codificam para proteínas; e a RNA polimerase III (RNA pol III) transcreve o RNA 5S e o RNA transportador (RNAt) (KORDE; ROSSELOT; DONZE, 2014). Os estudos de regulação transcricional se concentram na determinação do início e do nível de transcrição pela RNA pol II, a qual é responsável pela transcrição de genes que codificam para proteínas.

Em termos moleculares, um gene pode ser definido como uma sequência de nucleotídeos do DNA que é expresso em um produto funcional, ou seja, em uma molécula de RNA ou em uma cadeia polipeptídica. De forma geral, a estrutura de um gene eucariótico, que codifica para uma proteína, pode ser dividida em duas porções: (I) a região codificadora, a qual é transcrita pela RNA pol II em mRNA no núcleo e, posteriormente, traduzida em proteína no citoplasma, localizada a jusante do sítio de início de transcrição; e (II) a região que a antecede (a montante do sítio de início de transcrição), denominada região promotora ou reguladora (Figura 1). Para um gene ser transcrito é necessária a ativação e interação dos componentes da maquinaria de transcrição que agindo sobre a região promotora determinaram o grau de expressão de um determinado gene em resposta às condições fisiológicas ou ambientais da célula.

2.1.1 Região codificadora

A região codificadora de um gene eucariótico apresenta-se fragmentada em regiões codificantes (éxons), separadas por regiões não codificantes (íntrons) (MALONE et al., 2006). A presença de íntrons pode aumentar drasticamente o comprimento de DNA necessário para a codificação de um gene. Um cálculo simples revela que apenas 5% do tamanho médio de um gene humano codifica diretamente a proteína desejada. Os 95% restantes são compostos por íntrons (WATSON et. al., 2006).

Primeiramente, a transcrição produz um RNA inicial, que passa por modificações pós-transcricionais para a formação do RNA maduro. A primeira modificação ocorre na extremidade 5' dessas moléculas, onde é adicionado um *cap*.

O *cap* é adicionado antes mesmo que o transcrito inicial esteja completo e parece ser importante para o processamento subsequente no núcleo. O RNA inicial também sofre a poliadenilação, que é a adição de um segmento de até 250 resíduos de ácido adenílico na extremidade 3', chamada de sequência poli-A. Apesar de a sequência poli-A não ser encontrada em todos os transcritos eucarióticos, naqueles que a possuem ela parece ser essencial. A ausência dessa cauda causa a rápida degradação dos transcritos. Por isso, tanto o *cap* 5' quanto a cauda de poli-A 3' são críticos se o transcrito de RNAm tem de sofrer mais processamentos adicionais e ser transportado para o citoplasma (KLUG et al., 2010).

Após a adição do *cap* 5' e da cauda poli-A 3', o RNA inicial é processado para a remoção dos íntrons, deixando para trás a porção codificadora da molécula de RNAm, os éxons. Esse processo é chamado de *splicing* do RNA. Os íntrons são removidos por um spliceossomo, composto por subunidades chamadas de ribonucleoproteínas nucleares pequenas. Esses complexos de proteínas e RNA se ligam a sítios de *splicing* nas extremidades de um íntron, clivam o DNA, ligam os éxons adjacentes e removem o íntron em formato de laço. Diferentes tipos celulares podem não remover os íntrons exatamente da mesma maneira, causando o *splicing* alternativo, que pode produzir versões ligeiramente modificadas da proteína em diferentes tecidos (MCINNES; NUSSBAUM; ROBERT, 2007).

Na figura 1 é apresentada a estrutura de um gene eucariótico e o processamento do RNA inicial para a produção de um RNAm maduro, pronto para ser traduzido à proteína.

Em concordância com uma densidade gênica maior, os eucariotos mais simples apresentam quantidade de íntrons significativamente menor (WATSON et al., 2006). Por exemplo, o genoma da levedura *S. cerevisiae* é muito mais compacto que de outros eucariotos, sendo que somente 4% dos genes possuem íntrons, que, de forma geral, codificam proteínas ribossomais, apresentando, em sua maioria, somente um íntron, próximo ao códon de iniciação. Em contrapartida, no genoma da levedura *Schizosaccharomyces pombe*, 40% dos genes apresentam íntrons. Isso mostra que *S. cerevisiae* possui um genoma muito mais compacto, quando comparado com outras leveduras e outros fungos (GOFFEAU et al., 1996).

Figura 1 - Estrutura e processamento do RNA em um gene eucariótico. Fonte: adaptado de WATSON et al., 2006.

2.1.2 Região promotora e elementos *cis*-atuantes

A região promotora é composta por sequências de DNA que funcionam como sítios de reconhecimento para a maquinaria da transcrição. Geralmente tem centenas de nucleotídeos e especificam o início e a direção da transcrição ao longo do DNA. Essas sequências específicas são denominadas elementos *cis* atuantes, que são reconhecidos por fatores de transcrição específicos e se colocam adjacentes ao ponto de iniciação da transcrição (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013).

Um promotor é constituído por elementos *cis* atuantes, que são essenciais para uma transcrição precisa e eficiente realizada pela RNA pol II (STEPHEN; TJIAN, 1988). Os elementos *cis* mais conhecidos incluem: a caixa TATA; o Elemento Iniciador (Inr) (CHEN; STRUHL, 1985) e, no caso dos promotores de leveduras, apresentam as Sequências Ativadoras a Montante (*Upstream Activation Sequence*) (UAS) (STRUHL, 1989). Alguns promotores apresentam também as caixas CAAT ou CCAAT, as caixas GC ou GGGCGGG (figura 2).

Figura 2 - Elementos *cis* atuantes mais comuns em promotores eucarióticos. A figura foi desenhada a partir de um esquema proposto por Murray et al., 2013.

A caixa TATA é uma região rica em adeninas e timinas, que contém frequentemente de 7 a 8 pb na sequência consenso TATAAAA (MCINNES; NUSSBAUM; ROBERT, 2007). Localiza-se cerca de 25 a 30 pb antecedente ao local iniciador da transcrição. Em leveduras, os elementos TATA estão localizados tipicamente em regiões de 40 a 120 pb antecedente ao local de início da transcrição. Esta não é a única sequência de DNA que sinaliza o início da transcrição, mas para a maioria dos promotores de polimerase II, ela é a mais importante (STRUHL, 1995; WATSON et al., 2006). Mutações nessas sequências reduzem a transcrição e deleções podem alterar o sítio de início da transcrição (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013).

Os elementos TATA são reconhecidos pela proteína de ligação à caixa TATA, denominada TBP (*TATA binding protein*), um componente básico necessário para formação e ativação do complexo de transcrição (MOGNO et al., 2010; STRUHL, 1995).

Esses elementos são considerados de extrema importância para o início da transcrição e estão presentes na maioria dos promotores de levedura. Apesar da sua importância para os promotores da RNA pol II, não são suficientes para iniciar a transcrição da maioria dos genes de leveduras (STRUHL, 1987; STRUHL, 1995). Por estarem presentes em diversos tipos de promotores, acredita-se que os elementos TATA tenham um papel geral no processo de transcrição (STRUHL, 1987).

O elemento iniciador (Inr) está contido entre posições -3 e +5, próximo ao sítio de início de transcrição do RNAm. É um elemento do promotor distinto, com pouco efeito sobre o nível de expressão, mas é o principal determinante de onde inicia a transcrição. O Inr pode apresentar uma sequência específica de maior afinidade com

a RNA pol II, podendo atuar sozinho ou em conjunto com a caixa TATA (SMALE; KADONAGA, 2003; STRUHL, 1987).

Funcionalmente o Inr é semelhante à caixa TATA, pois é igualmente reconhecido pelo fator de transcrição IID (TFIID) e pode compensar a ausência desse elemento em promotores sem TATA. Porém, quando esses dois elementos estão presentes no mesmo promotor, separados por 25 pb, eles funcionam de forma sinérgica (SMALE; KADONAGA, 2003).

Os elementos UAS são sequências curtas, geralmente apresentam de 10 a 30 pb e estão distantes do elemento iniciador, cerca de 100 a 1500 pb a montante do sítio de início da transcrição. Para os genes cuja taxa de transcrição depende de condições fisiológicas, esses elementos são os principais determinantes da regulação de seus promotores (STRUHL, 1989).

A quantidade e a posição dessas sequências podem influenciar de forma direta o nível da expressão de determinado gene. Isso ocorre porque os elementos UAS são reconhecidos por proteínas de ligação ao DNA, conhecidas como fatores de transcrição. Esses fatores, por sua vez, são capazes de regular a atividade de promotores (STRUHL, 1995). Cerca de 20% de promotores de leveduras apresentam homopolímeros dA:dT, que possuem função semelhante as sequências UAS, no entanto, devida a características intrínsecas, não precisam interagir com uma proteína de ligação ao DNA específica (IYER; STRUHL, 1995).

A caixa CAAT está localizada aproximadamente 70 a 80 pb antecedente ao local de início da transcrição. Essa sequência consenso é menos presente que a caixa TATA, quando presente, contribui para uma transcrição quantitativamente mais eficiente. Já a caixa GC, é uma sequência consenso presente particularmente na região promotora dos genes de manutenção, alguns dos quais não possuem caixas TATA e CAAT, mas são extremamente ricos em GC no promotor (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013; MCINNES; NUSSBAUM; ROBERT, 2007).

Em cada caso, os elementos *cis* são reconhecidos e ligados por uma ou mais proteínas capazes de ativar ou reprimir a iniciação da transcrição, essas proteínas são conhecidas como fatores de transcrição. Acredita-se que a modulação da quantidade, atividade, ou localização celular desses fatores é um importante mecanismo de controle da iniciação da transcrição (STEPHEN; TJIAN, 1988).

2.1.3 Fatores de transcrição

Genes para os produtos gênicos que são requeridos durante todo o tempo são expressos em níveis considerados constantes em praticamente todas as células de uma espécie ou organismo, com a expressão chamada de constitutiva. Já os genes para os produtos gênicos cujos níveis se elevam ou caem em resposta a sinais moleculares são referidos como induzíveis, cuja regulação é feita por proteínas. Sendo assim, a ação de transcrever um gene que codifica uma proteína específica é o principal mecanismo de controle em uma célula. A transcrição é um dos mecanismos que permite a célula regular quais proteínas serão produzidas e em que velocidade (LODISH et al., 2014; WATSON et al., 2006).

A transcrição é mediada e regulada por interações proteína-DNA. Para isso, um componente importante da regulação transcricional é o recrutamento, para regiões específicas do DNA, de proteínas conhecidas como fatores de transcrição (TFs). Os TFs interagem com os elementos *cis* atuantes e agem aumentando ou interferindo na interação entre a RNA pol II e o promotor. Sendo assim, para que haja uma transcrição eficiente, é necessária a ação combinatória e sinérgica dessas proteínas (MOGNO et al., 2010; REMÉNYI; SCHÖLER; STRUHL, 1995; WILMANN, 2004).

Os fatores de transcrição e outras proteínas regulatórias possuem a habilidade em reconhecer os elementos *cis* atuantes, afetando a expressão do gene alvo. Para interagir com o DNA, uma proteína necessita de uma estrutura relativamente pequena, que pode se salientar estavelmente da superfície da proteína, de forma a tornar possível a interação com o DNA. Esses são os domínios de ligação ao DNA, conhecidos como DBD (*DNA-binding Domain*).

De forma geral, os domínios de ligação ao DNA dos TFs nos eucariotos têm vários motivos característicos em sua estrutura tridimensional, sendo os principais: o motivo hélice-volta-hélice (HTH - *helix-turn-helix*), o dedo-de-zinco e o zíper de leucina básico (bZIP - *basic leucine zipper*) (HAHN; YOUNG, 2011).

O motivo dedo de zinco é encontrado em uma ampla variedade de fatores de transcrição que regulam a expressão gênica relacionada com o crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular. Fatores de transcrição com DBDs contendo dedos de zinco são o grupo mais abundante em todos os organismos, podendo ser subdividido em: C₂H₂ *zinc finger*, C₄ ou GATA *fingers* e C₆ *zinc knuckle*

ou Zn_2Cys_6 *binuclear zinc cluster*, sendo o C_2H_2 o mais comum (HAHN; YOUNG, 2011).

Os dedos de zinco contêm cerca de 23 resíduos de aminoácidos, sendo que quatro resíduos (4 cisteínas ou 2 cisteínas e 2 histidinas) coordenam um único íon de zinco. Os resíduos intercalados de cisteína e histidina ligam-se covalentemente aos átomos de zinco, fazendo com que a cadeia de aminoácidos se dobre em alça. Os aminoácidos da alça interagem com sequências específicas do DNA ligando-se a elas (KLUG et al., 2010; MURRAY et al., 2013).

A figura 3A mostra a interação entre o DNA e três dedos de zinco de um polipeptídeo único da proteína reguladora Zif 268 de camundongo. DBDs contendo dedo de zinco são formados por duas ou mais unidades de repetições de dedos de zinco, duas folhas beta, uma alfa hélice e um íon de zinco ligado aos resíduos de cisteína e histidina. Cada dedo de zinco possui uma sequência específica de ligação ao DNA, localizada na parte amino-terminal da alfa hélice (BÖHM; FRISHMAN; MEWES, 1997; HAHN; YOUNG, 2011; MACPHERSON; LAROCHELLE; TURCOTTE, 2006).

A segunda classe mais abundante é conhecida como proteína zíper de leucina básico (bZIP). Esse motivo de ligação ao DNA contém uma região chamada zíper de leucina que permite a dimerização de proteína com proteína. As proteínas bZIP são caracterizadas por apresentar uma região de 30 aminoácidos básicos, seguidos de uma sequência de 30 a 40 resíduos de leucina, denominado de zíper de leucina. O zíper de leucina medeia a dimerização e justaposição de duas regiões básicas para formar o sítio de ligação ao DNA (ALBER, 1992) (figura 3B).

Cada uma das duas moléculas que se juntam para formar um zíper de leucina contém quatro resíduos de leucina flanqueados por aminoácidos básicos. Quando as duas moléculas se dimerizam, os resíduos de leucina se "defrontam". O dímero resultante contém duas regiões de α -hélices básicas adjacentes ao zíper que se ligam aos resíduos de fosfato e especificam as bases do DNA, fazendo o zíper assemelhar-se a uma tesoura (KLUG et al., 2010).

A terceira classe mais abundante entre os fatores de transcrição é conhecida como hélice-volta-hélice (HTH - *Helix-Turn-Helix*), a estrutura fundamental dessa classe de proteínas é conter duas α -hélices conectadas por uma alça do tipo beta (figura 3C). Uma das α -hélices é chamada de hélice do reconhecimento, que

interage com as bases expostas do DNA alvo, e a outra interage com sequências não específicas do DNA (KLUG et al., 2010; STRUHL, 1989).

Os fatores de transcrição, ao interagirem com a maquinaria de transcrição, de forma direta ou indireta, podem recrutar a RNA pol II para transcrever o gene de interesse. Dessa forma, a ação conjunta desses fatores com os elementos *cis* atuantes pode ativar ou reprimir a transcrição de determinado gene (FOULKES; SASSONE-CORSI, 1992).

Figura 3 - Exemplos de motivos de ligação ao DNA. (A) Dedos de zinco: três dedos de zinco (cinza) complexados com o DNA (azul e branco). Cada Zn^{2+} (vinho) coordena dois resíduos de histidina e dois resíduos de cisteína. **(B) Zíper de leucina:** Um zíper de leucina da proteína ativadora GCN4 da levedura. Apenas as α -hélices “ziperadas” (branco e azul claro) estão mostradas. Os resíduos de leucina interactantes estão mostrados em vermelho. **(C) Hélice-volta-hélice:** Domínio de ligação do repressor Lac, com o motivo hélice-volta-hélice mostrado em vermelho e laranja. A hélice de reconhecimento está em vermelho. Fonte: NELSON; COX, 2002.

2.1.4 Iniciação da transcrição em eucariotos

A iniciação da transcrição apresenta uma hierarquia de interações, nas quais fatores de transcrição se ligam aos elementos presentes no promotor. A montagem do complexo é um fator limitante para a transcrição de um gene, pois é essa etapa que determina o quanto o gene de interesse será expresso. A iniciação da transcrição pela RNA pol II requer a atividade de mais de 70 polipeptídeos e é controlada por numerosos complexos transcripcionais, por exemplo, o TFIID (fator transcrricional IID) (WATSON et al., 2006).

O complexo TFIID é composto por vários fatores transcripcionais: proteína de ligação a TATA (TBP - *TATA binding protein*), Fator de Transcrição IIA (TFIIA), Fator de Transcrição IIB (TFIIB), Fator de Transcrição IIE (TFIIE), Fator de transcrição IIF (TFIIF) e o Fator de transcrição IIH (TFIIH). O componente do TFIID que se liga à sequência TATA do DNA é a proteína TBP (BARBERIS et al., 1995).

A proteína TBP é o fator de transcrição mais conservado entre os eucariotos, possuindo identidade de mais de 80% em seu domínio C-terminal entre uma ampla variedade de espécies. Essa proteína é responsável por se ligar ao elemento TATA presente no promotor de vários genes, trazendo consigo todo o complexo TFIID. A proteína de ligação a TATA é pequena, possuindo apenas 30.000 daltons, e se liga ao sulco menor da hélice do DNA. A TBP apresenta uma estrutura tridimensional similar a uma sela. A superfície interna da "sela" interage com a caixa TATA e a superfície externa interage com as outras proteínas (BURATOWSKI, 1994; KLUG, 1993) (figura 4).

Ao ligar-se ao DNA, a TBP distorce amplamente a sequência TATA. O complexo TBP-DNA resultante fornece uma plataforma para o recrutamento de outros fatores gerais de transcrição e da própria polimerase ao promotor. *In vitro*, essas proteínas se ligam no promotor na seguinte ordem: TFIIA, TFIIB, TFIIF juntamente com a polimerase (complexada ainda a outras proteínas) e com TFIIE e TFIIH, que se ligam a montante da RNA pol II (WATSON et al., 2006).

O TFIIA se liga a montante do elemento TATA e ao mesmo tempo ao fator TBP, promovendo uma mudança conformacional e consequentemente a estabilização de TBP ao elemento TATA (HARFORD; MORRIS, 1997).

O TFIIB se estende entre o elemento TATA e o sítio de iniciação do RNAm, além de se ligar diretamente ao complexo TBP-DNA, é também requerido para o

recrutamento da RNA pol II para o complexo de transcrição, funcionando como uma ponte entre TFIID e RNA pol II (BURATOWSKI, 1994).

A proteína TFIIF tem a função de recrutar a RNA polimerase II até o promotor (POSS; EBMEIER; TAATJES, 2013). TFIIH fosforila a cauda C-terminal (CTD) da subunidade maior da RNA pol II, fornecendo a energia necessária para o início da transcrição e TFIIE é importante para a liberação do promotor.

Na figura 5 é possível observar um esquema representando o complexo de iniciação da transcrição, com os fatores de transcrição gerais e a RNA pol II.

Figura 4 - Estrutura da proteína TBP. A figura representa a proteína TBP ligada ao DNA pelo elemento TATA e ligada, à esquerda, ao TFIIA e, à direita, ao TFIIB. Fonte: SHI et al., 2007.

Figura 5 - Complexo de iniciação da transcrição. Fatores de transcrição gerais envolvidos na iniciação da transcrição pela RNA polimerase II. Os fatores se adicionam no complexo na ordem indicada pelas setas. Esse esquema foi desenhado baseado no modelo apresentado por Roeder (1996).

Nas leveduras, esse complexo de iniciação da transcrição é bem conhecido, assim como muitos fatores de ativação. Isso tem permitido a manipulação desse organismo, como a otimização da transcrição de genes de interesse através de técnicas de biologia molecular, o que possibilita a construção e o desenvolvimento de sistemas de expressão alternativos.

2.2 Aspectos da conservação de mecanismos regulatórios em eucariotos

Um dos maiores temas que surgiu de estudos de regulação transcricional 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 sequências alvos de ligação ao DNA e até seus mecanismos de ativação e repressão (SHERMAN, 2002).

A evolução dos mecanismos transcricionais é um aspecto importante para entender as cadeias regulatórias. Estudos anteriores sugerem que grupos de genes que são ortólogos em *S. cerevisiae* são regulados por elementos *cis* conservados (CLIFTEN et al., 2003).

Experimentos demonstram que mesmo proteínas de regulação gênica não relacionadas, de espécies eucarióticas amplamente diferentes, podem cooperar quando introduzidas na mesma célula. Essa situação reflete o alto grau de conservação da maquinaria de transcrição (ALBERTS et al., 2010).

2.3 O Sistema de Expressão

Os componentes básicos de um sistema de expressão são: (I) um promotor forte para eficiente transcrição, (II) uma região de início de transcrição eficaz, (III) sequência de DNA de um peptídeo sinal para eficiente secreção, (IV) sequência de DNA do gene de interesse, e (V) sequência de terminação e poliadenilação (BERKA; BARNETT, 1989).

Uma das formas de aumentar a expressão de proteínas recombinantes é através de sistemas induzíveis. Para isso, os genes recombinantes podem ser

colocados sob o controle de uma ampla variedade de promotores, que podem sofrer diferentes estímulos para induzir o sistema (PALOMARES et al., 2004).

Um modelo bastante interessante de indução para expressão de proteínas recombinantes é baseado em um tipo de promotor regulado por metais pesados (HEUCHEL et al., 1994). Os promotores de metalotioneínas têm sido utilizados para a construção de vetores de expressão para diferentes finalidades. Um exemplo é o promotor de lacase do fungo *Pleurotus ostreatus*, chamado *poxa1b*, que quando utilizado em um sistema de expressão induzido por cobre, aumentou a expressão da proteína repórter (AMORE; HONDA; FARACO, 2012). Outro exemplo é o promotor do gene de metalotioneína (CuMT) de *Neurospora crassa*, que também é ativado por cobre (KUMAR; DAYANANDA; SUBRAMANYAM, 2005). Utilizando metais pesados como indutores, é possível aumentar a expressão de proteínas, e, levando em consideração o fato de metais, como cádmio, chumbo, cobre e zinco terem custos bem inferiores às outras substâncias indutoras, isso cria uma vantagem adicional a esse tipo de sistema.

Outra abordagem que tem sido utilizada é o desenvolvimento de ferramentas de engenharia metabólica para o desenho de promotores quiméricos, que têm sido utilizados para o controle da expressão de diferentes genes em uma variedade de sistemas, como a expressão de genes terapêuticos em células humanas (HSIEH et al., 2012; SALINELLES et al., 2012), expressão de genes relacionados ao estresse hídrico na planta *Nicotiana tabacum* (NA; METZGER, 2014) e a expressão de genes exógenos na alga *Chlamydomonas reinhardtii* (JINXIA et al., 2008).

Sabendo que a escolha do promotor para uma eficiente transcrição é essencial no desenvolvimento de sistemas de expressão, uma das barreiras encontradas para a produção de proteínas recombinantes em fungos é o fato do número de promotores utilizados em sistemas com esses organismos ainda ser pequeno. O promotor do gene celobioidrolase I (*cbh1*) de *T. reesei* (*Pcbh1*) é um promotor forte e mais comumente utilizado para dirigir a expressão de diversas proteínas (Tabela 1).

Sendo a transcrição uma etapa importante na expressão de um gene, diversos trabalhos apresentam metodologias para o desenho e análise de promotores, com a finalidade de incrementar a força da transcrição e expressão gênica (GERTZ; SIGGIA; COHEN, 2009; JUVEN-GERSHON; CHENG; KADONAGA, 2006; RATNA; BECSKEI, 2011; SCHLABACH et al., 2010).

2.3.1 O promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei*

O *Pcbh1* é um promotor induzido por diferentes sacarídeos, como celulose, soforose e, lactose (CARLE-URIESTE et al., 1997). No entanto ele é regulado por repressão catabólica, sendo reprimido pelo produto da degradação da própria celulose, ou seja, a glicose (ABRAHÃO-NETO et al., 1995; ILMÉN et al., 1996).

Partindo da necessidade de desenvolvimento de novos promotores, Liu et al., (2008), analisou a região promotora de 2.2 kb do gene *cbh1* e caracterizou as regiões envolvidas na sua regulação, entre elas a região envolvida na repressão da expressão na presença de glicose (CARRARO et al., 1998; HENRIQUE-SILVA et al., 1996; ILMÉN et al., 1996;). Assim, foi feita a modificação do promotor removendo a região envolvida na repressão pela presença de glicose, chamados de sítios CREI/CREA e a substituindo por 2, 4 ou 6 cópias da região que inclui a caixa CAAT e o sítio de ligação do fator de transcrição ACE2, que é um ativador envolvido no ciclo mitótico celular (MULHERN; LOQUE; BUTLER, 2006).

Zou et al., (2012) também deletou a região do *Pcbh1* envolvida na repressão por glicose e a substituiu por várias cópias dos sítios CAAT, nos quais, em leveduras e fungos filamentosos se ligam os fatores de ativação HAP2/3/5 (ZEILINGER et al., 2001), e dos sítios de ligação do fator de ativação ACE2.

A partir dessas modificações, ambos obtiveram promotores artificiais não reprimidos na presença de glicose e com maior força de expressão, que têm sido utilizados para expressão de proteína homóloga (β -glicosidase, ZHANG et al., 2010) e heteróloga (eritropoietina humana, ZHONG et al., 2011), em *T. reesei*. Mesmo com as modificações, os promotores artificiais desenvolvidos foram induzidos com sacarídeos, como lactose e celulose, o que também pode apresentar problemas quando o promotor é utilizado para a expressão de proteínas recombinantes.

Quando o *Pcbh1* é utilizado para a expressão de uma proteína, um indutor ou até mesmo vários indutores, no caso, os sacarídeos, são adicionados à cultura para que ocorra a expressão do gene de interesse. No entanto, tais indutores podem levar a expressão de outros componentes do sistema, tornando a expressão não seletiva. Isso pode levar a uma contaminação das proteínas selecionadas, com um excesso de proteínas irrelevantes, aumentando a dificuldade no momento da purificação. Além disso, proteases extracelulares podem ser produzidas

simultaneamente e prejudicarem o rendimento (LI et al., 2012; ZOU et al., 2012). Sendo assim, torna-se necessário identificar, desenhar e caracterizar novos promotores com potencial utilização industrial (NEVALAINEN; TE'O; BERQQUIST, 2005), que possam ser ativados ou reprimidos por indutores alternativos.

Com a finalidade de confirmar a ideia inicial da conservação dos mecanismos de regulação da transcrição nos eucariotos, alguns trabalhos analisaram a habilidade do promotor *cbh1* de *T. reesei* em dirigir a expressão de proteínas recombinantes em leveduras. Carraro et al., (1998) demonstraram que o promotor *cbh1* é capaz de controlar e ativar a transcrição em *S. cerevisiae*, enquanto que Madhavan e Sukumaran (2014) observaram essa habilidade na levedura *Kluyveromyces lactis*.

2.3.2 *Saccharomyces cerevisiae* como hospedeiro para produção de proteínas recombinantes

Leveduras são fungos unicelulares com aproximadamente 600 espécies descritas, agrupadas em 80 gêneros (SHERMAN, 2002), sendo que a espécie *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro eucarioto a ter o seu genoma totalmente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996), o qual tem sido manipulado para expressar uma ampla variedade de proteínas recombinantes nas últimas três décadas (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

Como sistema modelo para manipulação genética, a levedura *S. cerevisiae* apresenta algumas vantagens em relação a outros microrganismos, o que inclui a facilidade com que os genes podem ser manipulados e caracterizados nesse organismo (KLUG et al., 2010).

Tabela 1 - Promotores utilizados em sistemas para expressão de genes homólogos ou heterólogos.

Promotor	Gene	Organismo	Referência
<i>cbh1</i>	Lignin peroxidase	<i>Phlebia radiata</i>	SALOHEIMO et al., 1989
<i>cbh1</i>	Glucoamylase P	<i>Hormoconis resinae</i>	JOUTSJOKI; TORKKELI, 1992
<i>tef1</i> e <i>cDNA1</i>	Celobiohidrolase I e Endoglucanase I	<i>T. reesei</i>	NAKARI-SETALA; PENTILLÄ, 1995
<i>cbh1</i>	Endopeptidase B	Cevada	SAARELAINEN et al., 1997
<i>cbh1</i>	Cisteína endopeptidase e Celobiohidrolase I	Cevada	NYKANEN et al., 1997
<i>cbh1</i>	endochitinase	<i>T. harzianum</i>	MARGOLLES-CLARK et al., 1996
<i>pki1</i>	Xylanase I e II	<i>T. reesei</i>	KURZATKOWSKI et al., 1996
<i>cbh1</i>	Fosfatase	<i>A. niger</i>	MIETTINEN-OINONEN et al., 1997
<i>pki</i>	Bgn16.2	<i>T. harzianum</i>	DELGADO-JARANA; PINTOR-TORO; BENÍTEZ, 2000
<i>cbh1</i>	Xilanase 2	<i>Humicola grisea</i>	DE FARIA et al., 2002
<i>cbh1</i>	Laccase	<i>Melanocarpus albomyces</i>	KIISKINEN et al., 2004
<i>cbh1</i>	Xilanase	<i>Nonomuraea flexuosa</i>	PALOHEIMO et al., 2003
<i>cbh1</i>	Tirosinase	<i>T. reesei</i>	SELINHEIMO et al., 2006
<i>cbh1</i>	Esteril esterase	<i>Melanocarpus albomyces</i>	KONTKANEN; REINIKAINEN; SALOHEIMO, 2006
<i>cbh1</i>	Celobiohidrolase I	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	BENKO et al., 2007
<i>cbh1</i>	Xilanase 11A, B e C	<i>Chaetomium thermophilum</i>	MANTYLA et al., 2007
<i>cbh1</i> -modificado	β -glucuronidase	<i>E. coli</i>	LIU et al., 2008
<i>cbh1</i> -modificado	β -glicosidase	<i>T. reesei</i>	ZHANG et al., 2010
<i>cbh1</i>	β -glicosidase	<i>Penicillium decumbens</i>	MA et al., 2011
<i>cbh1</i> -modificado	Eritropoietina	Humano	ZHONG et al., 2011
<i>cbh1</i>	β -glicosidase	<i>A. niger</i>	WANG; XIA, 2011
<i>cbh1</i>	β -glicosidase	<i>A. aculeatus</i>	NAKAZAWA et al., 2012

Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Além disso, outras propriedades tornam essa espécie apropriada para estudos biológicos, como o crescimento rápido, isolamento de mutantes, sistema genético bem definido, manipulação com poucas precauções, por ser um microrganismo não patogênico (GRAS organism, generally regarded as safe), além de apresentar um sistema de transformação de DNA versátil. Ao contrário de muitos microrganismos, o rompimento gênico em *S. cerevisiae* produz células viáveis com numerosos marcadores (SHERMAN, 2002).

Além disso, diferentemente da maioria dos outros microrganismos, as cepas de *S. cerevisiae*, possuem ambos os estados haploide e diploide em seu ciclo vital. Em ambas, a divisão celular ocorre por brotamento, um processo mitótico por meio do qual uma célula-filha menor, geneticamente idêntica, brota da superfície da célula-mãe, cresce e, finalmente, separa-se dela. A alternância do ciclo vital entre haploide e o diploide durante a análise genética é uma vantagem, pois algumas mutações são mais facilmente detectáveis em células haploides, enquanto que a fase diploide permite estudos adicionais, de complementação, por exemplo, o estudo de mutações letais recessivas, que podem ser mantidas em uma linhagem diploide (KLUG et al., 2010).

Outras características, como o desenvolvimento de transformação de DNA, tornou a levedura acessível para a clonagem de genes e técnicas de engenharia genética, pois os plasmídeos podem ser introduzidos na forma episomal ou integrativa. Na transformação integrativa o DNA exógeno, com segmentos homólogos, pelo menos parcial, é dirigido para locais específicos no genoma, fazendo com que a transformação seja mais estável e sítio-específica (SHERMAN, 2002). Os plasmídeos episômicos transformam a levedura com alta eficiência (10^4 a 10^5 transformates/ μ g de DNA plasmidial), mantendo-se em, aproximadamente, 30 cópias por célula. No entanto, os transformantes obtidos com estes plasmídeos são menos estáveis que aqueles obtidos com plasmídeos integrativos (ROSE; BROACH, 1991).

S. cerevisiae foi a primeira espécie de levedura manipulada para a expressão de proteínas recombinantes, sendo utilizada para diversas finalidades. A sua popularidade no uso industrial está relacionada com a grande quantidade de informação referentes à sua fisiologia, genética e técnicas de fermentação, que já são bem dominadas. Juntamente com as vantagens já mencionadas, a competitividade dessa levedura é também devido a sua alta capacidade de

produção e consumo de etanol e sua tolerância a estresse ambiental, como baixos níveis de oxigênio (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

No entanto, assim como todos os outros sistemas de expressão, a produção de proteínas recombinantes por *S. cerevisiae* também apresenta suas desvantagens. A principal desvantagem é a presença de um padrão de glicosilação diferente ao de células humanas e mesmo realizando modificações pós-traducionais importantes e possibilitando a secreção de proteínas recombinantes, este sistema é geralmente incapaz de atingir os mesmos níveis de expressão daqueles atingidos pelo uso de *E.coli*. Outros fatores que têm limitado o número de produtos comerciais produzidos por esses sistemas são os vários casos de instabilidade dos plasmídeos e os baixos rendimentos (ÇELIK; ÇALIK, 2012; SUDBERY, 1996).

Mesmo com o surgimento de sistemas alternativos para a expressão de proteínas recombinantes, *S. cerevisiae* ainda é o hospedeiro predominante para a produção de diversas proteínas, incluindo a produção de metabólicos, além de ser o organismo modelo para o estudo de proteínas humanas ligadas a doenças genéticas e degenerativas (PETRANOVIC; NIELSEN, 2008).

2.4 Metais e expressão gênica

Os metais são componentes naturais de nosso planeta, estão presentes em solos e rochas e desde o início da vida os seres vivos têm se desenvolvido na presença de metais. O estudo da composição dos seres vivos tem mostrado a existência de um metaloma (conteúdo de metais na célula), constituído pelos metais requeridos em grandes ou pequenas quantidades para a atividade celular (BARTON et al., 2007).

Portanto, a habilidade dos organismos em acumular íons metálicos a partir da dieta ou do meio ambiente é essencial para a sua sobrevivência (EIDE, 1997). Íons metálicos, como ferro, zinco e cobre, são essenciais para a maioria dos organismos. No entanto, a superacumulação desses metais pode ser tóxica (EIDE, 1997; SIMM et al., 2011; ZHAO; EIDE, 1997; ZHAO et al., 1998; ZHENG et al., 2008). Quando os níveis intracelulares desses metais estão muito elevados, isso pode interferir em processos vitais e causar a morte celular. Por exemplo, excesso de ferro pode gerar

espécies de oxigênio reativo que danificam lipídeos, proteínas e DNA. Sendo assim, todos os organismos necessitam de sistemas que regulem e controlem a captação e redistribuição desses metais (EIDE, 1997).

Ferro e zinco são micronutrientes essenciais para as células bacterianas e eucarióticas, pois tem um papel essencial em processos bioquímicos (EIDE, 1997). O zinco é um elemento essencial que desempenha um papel importante em processos celulares, sendo o primeiro exemplo da utilidade de íons metálicos na biologia. É requerido para a atividade de mais de 300 enzimas, incluindo álcool desidrogenase, superóxido dismutase Cu/Zn, anidrase carbônica e muitas proteases. Além disso, esse metal tem um papel importante no correto dobramento dos domínios específicos de muitas proteínas, principalmente aquelas que necessitam do zinco como cofator estrutural, como os fatores de transcrição que contêm motivos de ligação ao DNA dependentes de zinco, conhecidos como "dedos de zinco". Por exemplo, quase 2% dos genes no genoma de *S. cerevisiae* contêm domínios de ligação ao DNA dependentes de zinco (GITAN et al., 1998; ZHAO et al., 1998; ZHENG et al., 2008).

Estudos mostraram que o zinco é essencial para a proliferação de organismos patogênicos, uma vez que mutantes *knockout* em transportadores de zinco não são capazes de crescer em ambientes com baixa concentração de zinco e apresentam a virulência reduzida. Além disso, muitos organismos são mais susceptíveis à baixa concentração de zinco do que à privação de ferro (SIMM et al., 2011). O efeito preciso da superacumulação de zinco não é conhecido, mas ele pode se ligar a ligantes inapropriados no meio intracelular ou competir com outros íons metálicos por sítios ativos das enzimas, por transportadores de proteínas e assim por diante (GITAN et al., 1998; ZHAO et al., 1998).

A demanda intracelular de zinco é bastante elevada entre as células bacterianas e eucarióticas e isso faz com que a sua concentração seja mantida em níveis micromolares. Nas células eucarióticas, esses níveis são geralmente encontrados em compartimentos, por exemplo, em vacúolos. Apesar dessa concentração elevada de zinco intracelular, íons livres ou fracamente ligados dentro da célula são encontrados em taxas nanomolares (SIMM et al., 2011).

O delicado balanço de zinco intracelular é realizado por uma regulação homeostática precisa, mediada por vários mecanismos. Incluindo a ligação do metal por macromoléculas citoplasmáticas, como as metalotioneínas (COBBETT;

GOLDSBROUGH, 2002; ZHENG et al., 2008) e as fitoquelatinas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002); o armazenamento do zinco em compartimentos intracelulares e o transporte do zinco para fora da célula através de transportadores de zinco (ZHAO; EIDE, 1997; ZHENG et al., 2008). Os transportadores de zinco são proteínas transmembranas que controlam o movimento do zinco através das membranas celulares e intracelulares (ZHENG et al., 2008).

2.4.1 Regulação da expressão gênica por zinco em *Saccharomyces cerevisiae*

Para manter os níveis intracelulares de zinco relativamente constantes, o ponto primário desse controle na levedura *S. cerevisiae* é a regulação da captação do zinco através da membrana plasmática. Tanto em *S. cerevisiae* quanto em outros eucariotos, a principal família de transportadores envolvidas no processo de captação de zinco é a família ZIP, que leva esse nome devido aos primeiros membros identificados 'ZRT, IRT-like Protein'. Essa família é composta por proteínas Zrt (zinc-regulated transporter) presentes inicialmente em *S. cerevisiae* e também por proteínas Irt (iron-regulated transporter) presentes na planta *Arabidopsis thaliana* (GUERINOT, 2000).

A característica principal da família ZIP é que, sem exceções ainda conhecidas, essas proteínas transportam zinco e/ou outros metais do meio extracelular ou compartimentos celulares para dentro do citoplasma. Além disso, já foram encontradas em bactérias, fungos, plantas e mamíferos (EIDE, 2009).

A maioria das proteínas ZIP é descrita como tendo oito domínios transmembranares e uma topologia de membrana similar, na qual cada extremidade amino-terminal e carboxi-terminal estão localizados no lado de fora da membrana plasmática. Na maioria dos casos, essas proteínas apresentam uma região variável rica em histidina localizada entre os domínios transmembranares 3 e 4. A função dessa região ainda é desconhecida, mas acredita-se que tenha uma função no transporte e regulação do zinco (figura 6) (EIDE, 2009; GUERINOT, 2000).

A atividade de captação do zinco em leveduras é mediada por dois sistemas que utilizam proteínas membros da família ZIP: (1) um sistema de alta afinidade ao zinco, cujo transportador é codificado pelo gene *ZRT1* e (2) um sistema de baixa afinidade ao zinco, cujo transportador é codificado pelo gene *ZRT2* (EVANS-GALEA et al., 2002; ZHAO et al., 1998).

Figura 6 - Topologia predita para os transportadores da família ZIP. A topologia predita sugere a presença de oito domínios transmembranares (1-8). A região variável se encontra entre os domínios 3 e 4, a qual possui uma região rica em histidina com função ainda não totalmente elucidada. Fonte: Adaptado de EIDE, 2009.

Em *S. cerevisiae* a proteína Zap1 é o principal atuante nesse sistema de homeostase (EIDE, 2009; FREY; EIDE, 2012; ZHAO et al., 1998). Zap1 é um fator de transcrição, que atua na regulação da expressão de mais de 80 genes em células com limitação de zinco. Além dos genes *ZRT1* e *ZRT2*, Zap1 regula outro gene que codifica proteínas transportadoras de membrana, o *FET4*; além de genes que codificam proteínas transportadoras vacuolares de zinco (*ZRT3* e *ZRC1*), e genes que codificam outras proteínas importantes na regulação dos níveis de zinco (FREY; EIDE, 2012). Os genes *ZRT1* e *ZRT2* codificam transportadores de Zn^{2+} , enquanto que *FET4* codifica transportadores de Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} . *ZRT1* e *ZRT2* têm um papel no transporte de metal em bactérias, fungos, plantas e animais, sendo que *ZRT1* tem a maior afinidade por zinco e é fundamental em condições extremas de limitação de zinco nas células (EIDE, 2009).

O gene *ZRT1* é expresso em um maior nível quando a célula está em uma situação na qual a concentração de zinco é muito baixa. Isso ocorre porque Zrt1 é uma proteína transportadora com papel fundamental no fornecimento de zinco quando a célula encontra-se nessas situações extremas, enquanto que Zrt2 tem um papel de manutenção das condições celulares (ZHAO et al., 1998).

Na maioria desses genes, a Zap1 atua como um ativador transcricional e aumenta a sua expressão quando os níveis de zinco estão baixos (EIDE, 2009).

Para exercer tais funções Zap1 se liga aos elementos de resposta ao zinco (ZREs – *zinc-responsive elements*), também chamados de elementos de resposta a metais (MREs – *metal-responsive elements*), presentes nos promotores dos genes em questão (EIDE, 2009; ZHAO et al., 1998).

Os promotores dos genes regulados pela Zap1 podem conter uma ou mais cópias dos MREs, que apresentam uma sequência consenso de 11pb (5' - ACCnnnAAGGT - 3') (EVANS-GALEA et al., 2002). O gene *ZRT1* apresenta três cópias desses MREs, e o gene *ZRT2* apresenta duas cópias (ZHAO et al., 1998).

Algumas características desses MREs foram identificadas por Zhao et al., (1998), sendo elas: (1) os MREs são necessários e suficientes para a expressão dos genes responsivos ao zinco; (2) MREs podem funcionar em qualquer orientação em relação ao local de início da transcrição; (3) MREs sozinhos também são ativos, ou seja, múltiplas cópias não são necessárias para a sua função; (4) quando esses elementos estão presentes em múltiplas cópias em um promotor, eles são aditivos ao invés de cooperativos em seus efeitos.

O zinco intracelular fica armazenado no vacúolo e quando a célula está sob condições normais de disponibilidade de zinco, a quantidade do metal acumulada é suficiente para suprir as necessidades celulares. A partir do momento que essa disponibilidade de zinco diminui, o gene *ZRT3* é ativado pela Zap1 e desempenha o papel de transportar o zinco do vacúolo para o citoplasma, no qual ele se torna disponível para ser utilizado (Figura 7) (EIDE, 2009).

Quando a concentração de zinco se torna mais limitante, é necessário que ocorra a ativação do gene *ZRT1*. Nessa situação a proteína ativadora Zap1 se liga aos MREs do promotor de *ZRT1* e ativa a sua transcrição, tornando possível a captação extracelular do zinco através da membrana plasmática, aumentando o nível intracelular de zinco. Quando a deficiência de zinco for suprida, o próprio metal irá inativar o sistema de ativação de *ZRT1*, impedindo que a Zap1 se ligue aos MREs do promotor (Figuras 7 e 8) (EIDE, 2009; ZHAO et al., 1998).

Para entender a interação da Zap1 com os MREs, primeiramente é necessário entender a estrutura dessa proteína. Zap1 é um fator de transcrição de 93 kDa (EVANS-GALEA et al., 2002), com uma cadeia composta por 880 aminoácidos, cujo domínio de ligação ao DNA se encontra na porção C-terminal. Esse domínio é composto de cinco motivos dedos-de-zinco (Znf3 a Znf7), essenciais para a função da proteína (EIDE, 2009; EVANS-GALEA et al., 2002; FREY et al.,

2011; ZHAO et al., 1998) (Figura 9). No entanto, acredita-se que esses cinco motivos não apresentem a mesma importância no contato com o promotor, ou seja, somente um subconjunto desses motivos é responsável pelo contato com os MREs (EVANS-GALEA et al., 2002).

De acordo com Evans-Galea et al., (2002) quatro dos cinco motivos dedo-de-zinco presentes no domínio DBD são responsáveis pela ligação da Zap1 aos MREs, sendo que o motivo Znf3 não apresentou papel algum nessa função. Os motivos Znf4 e Znf7 são os principais atuantes nessa função, ligando-se as extremidades da sequência consenso (ACC-GGT). Os estudos revelaram que Znf7 se liga na sequência ACC, Znf4 na sequência GGT e Znf5 e Znf6 se ligam nos 5bp centrais da sequência (nnnAA) (Figura 10).

Figura 7 - Respostas à deficiência de zinco mediada por Zap 1 em *S. cerevisiae*. A figura representa a localização e a resposta dos genes responsáveis pelo transporte de zinco para o citoplasma quando a célula está em condições de limitação de zinco. Fonte: BORGES, F. G. (2015) (adaptado de EIDE, 2009).

Figura 8 - Mecanismo de ativação do gene *ZRT1* pela Zap1 em *S. cerevisiae*. Quando a concentração de zinco intracelular está normal ou alta, os MREs do promotor do gene *ZRT1* permanecem livres. A partir do momento que a concentração de zinco diminui, a proteína ativadora Zap1 se liga aos MREs e ativa a transcrição do gene. Fonte: BORGES, F. G. (2015) (adaptado de EIDE, 2009).

Figura 9 - Anatomia do fator de transcrição Zap1. O domínio de ligação ao DNA (DBD) com os cinco motivos dedo-de-zinco (3 a 7) representados pelas caixas pretas. O domínio AD1 representado pela caixa listrada e o domínio AD2, representado pela caixa listrada, com seus dois motivos dedo-de-zinco (1 e 2) representados pelas caixas pretas. Fonte: BORGES, F. G. (2015) (adaptado de EIDE, 2009).

Figura 10. Ligação dos motivos dedo de zinco no Elemento de Resposta a Metais (MRE) em *S. cerevisiae*. Os motivos Znf4 e Znf7 se ligam as sequência da extremidade e os motivos Znf5 e Znf6 se ligam aos 5 bp centrais. Fonte: EVANS-GALEA et al., 2002.

Além do domínio de ligação ao DNA, Zap1 apresenta outros dois domínios, AD1 e AD2, também responsáveis pela ativação da transcrição em resposta a baixa concentração de zinco. O domínio AD1 encontra-se na porção N-terminal da proteína, entre os resíduos 332 e 402, e incorporado em uma região chamada de ZRD^{AD1} (*Zinc-Responsive Domain of AD1*), necessária para a regulação por zinco. O domínio AD2 está localizado aproximadamente entre os resíduos 611 e 641 e a região chamada ZRD^{AD2} inclui dois motivos dedo-de-zinco (Znf1 e Znf2) (Figura 9) (EIDE, 2009, FREY et al., 2011).

Sendo assim, sob limitação de zinco, a proteína Zap1 se liga aos MREs dos promotores e regula a transcrição, permitindo uma forte resposta às condições limitantes de zinco (CLAUS; CHAVARRÍA-KRAUSER, 2012).

Estudos sugerem que a Zap1 é um sensor direto de zinco e encontra-se no núcleo das células sob todas as condições de zinco disponível. O zinco regula a atividade da Zap1 por diferentes mecanismos. Esses mecanismos envolvem os domínios AD1 e AD2, sendo controlados pelo zinco de forma independente. Quando o nível de zinco aumenta, o metal se liga aos resíduos das regiões de AD1 e AD2. Essa ligação traz modificações conformacionais que torna os domínios inativos, sendo incapazes de recrutar co-ativadores da Zap1, inibindo a sua atividade (EIDE, 2009, FREY et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

Tendo como premissa a conservação do mecanismo de regulação transcricional entre os fungos; a necessidade de desenvolvimento de novos promotores com potencial uso industrial e biotecnológico; e o fato dos metais serem conhecidos como reguladores da expressão gênica em diferentes organismos, nossa proposta foi construir um sistema de expressão, com a utilização de ferramentas de engenharia metabólica, através da modificação, substituição e avaliação em *S. cerevisiae* de um promotor regulado por zinco.

Essa abordagem nos permite a construção de ferramentas de biologia molecular para manipulação genética e engenharia metabólica de fungos.

Portanto, o desenvolvimento deste trabalho se justifica pela necessidade de incrementar o nível da expressão gênica em fungos com potencial biotecnológico, para que os custos para produção de proteínas recombinantes, entre elas enzimas de interesse industrial, possam ser reduzidos, tornando o seu uso economicamente viável.

4 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um sistema de expressão regulado por zinco que, em *Saccharomyces cerevisiae*, seja capaz de produzir com alta eficiência proteínas homólogas e/ou heterólogas com potencial uso industrial e biotecnológico.

4.1 Objetivos específicos

1. Modificar o promotor do gene *cbh1* de *T. reesei*, removendo a região envolvida na repressão por glicose e a substituindo pela região do promotor do gene *ZRT1* de *S. cerevisiae* contendo os MREs, responsáveis pela regulação mediada pelo zinco;
2. Construir um sistema de expressão constituído pelo promotor modificado controlando o gene repórter β -galactosidase no vetor pYES2/CT/*lacZ*;
3. Inserir a construção em *S. cerevisiae*;
4. Analisar a habilidade do promotor em dirigir a expressão da β -galactosidase em *S. cerevisiae*, sob diferentes concentrações de zinco.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cepas e condições de cultura

Foi utilizada a linhagem W303-1A (*MATa; leu2-3,112; his3-11,15; ura3-1 ade2-1; can1-100; trip1-1*) (THOMAS; ROTHSTEIN, 1989) de *S. cerevisiae*, a qual foi cultivada nos meios de cultura YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose) ou meio mínimo YNBD (base nitrogenada de levedura 0,67%; glicose 2%), adicionando-se os suplementos nutricionais adequados para as marcas auxotróficas (concentrações finais: leucina, triptofano e histidina a 30 mg/L; metionina, uracila e adenina a 20 mg/L). No cultivo em placas foram adicionados 2% de ágar ao meio. As placas foram mantidas em estufa a 30 °C e o tempo de incubação foi de 1 dia para YPD e de 1 a 3 dias para o meio YNBD.

Os testes de atividade enzimática foram realizados em meio LZM (0,17% YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amônia, 0,5% sulfato de amônia, 10 mM Na₃ citrato pH 4.2, 2% glicose, 1 mM Na₂ EDTA, 0,01% dos aminoácidos) suplementado com 25 µM de MnCl₂ e 10 µM de FeCl₂, contendo as diferentes concentrações de zinco: 0 µM, 0,2 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 0,75 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM (SIMM et al., 2011).

Para a propagação dos plasmídeos foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* BL21 (GE Life Science, USA) a qual foi cultivada no meio de cultura LB (Luria-Bertani, 1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl).

5.2 Preparação de DNA plasmidial de levedura

Para a preparação do DNA plasmidial de levedura, as células foram inoculadas em 10 mL de YPD, mantidas a 30 °C sob agitação de 200 rpm, durante a noite. Foram centrifugados 1,5 mL da cultura a 13.000 rpm por 5 segundos, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 1 mL de água estéril.

Após uma nova centrifugação e remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de lise (2% de Triton X-100, 1% de SDS, 100 mM NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0), foram adicionados 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e 300 mg de microesferas de vidro. A mistura foi vortexada por 5 minutos e depois centrifugada a 12.000 rpm por 1 minuto; 100 µL da fase aquosa foram transferidos para um novo tubo e o mesmo

volume de isopropanol foi adicionado, misturados por inversão. A seguir, foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 75% gelado. Após secagem do precipitado, o DNA foi suspenso em 50 µL de água estéril.

5.3 Extração de DNA genômico de levedura

A extração de DNA genômico foi realizada seguindo uma adaptação do protocolo descrito por (HOFMANN; WINSTON, 1987). As células de *S. cerevisiae* W303-1A foram crescidas em 5 mL de meio YPD durante a noite até a fase estacionária. Uma alíquota de 1.5 mL da cultura foi transferida para um microtubo de 1.5 mL e centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular suspenso em 200 µL de tampão de lise (2% triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-Cl pH 8.0; 1 mM EDTA). Foram adicionados à suspensão 100 µL de microesferas de vidro (SIGMA G8772) e 200 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 pH 8.0), o tubo foi vortexado por 5 minutos e centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um microtubo novo e adicionado 1 mL de etanol absoluto, o tubo foi vortexado e centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular suspenso em 400 µL de TE (10 mM tris pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0) com RNase (3 µL de 10 mg/mL), incubado por 30 minutos a 37 °C. Após o tempo de incubação foram adicionados 5,4 µL de 7.5 M de acetato de amônia e 1 mL de etanol absoluto. A suspensão foi vortexada e centrifugada por 2 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o sedimento celular lavado em etanol 70%, centrifugado nas mesmas condições anteriores, secado ao ar e suspenso em 70 µL de água destilada. A extração de DNA foi confirmada em gel de agarose 1%.

5.4 Manipulação de DNA e técnicas gerais de biologia molecular

A eletroforese de DNA, isolamento de DNA, preparação de DNA plasmidial, preparação de géis e outras técnicas empregadas em biologia molecular foram feitas segundo descrito por Sambrook et al., (1989), ou de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes dos produtos utilizados.

Para amplificações de DNA foi utilizado o kit Taq DNA Polimerase (*Life Technologies*, USA), seguindo as instruções do fornecedor, adaptando temperaturas e ciclos de acordo com a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores.

A sequência e a temperatura de anelamento (T_m) dos oligonucleotídeos nesse estudo são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 - Lista dos oligonucleotídeos utilizados no trabalho

Nome	Sequência (5' - 3')	T_m °C
Pcbh1-SpeI-F	GATCC <u>ACTAGT</u> CTGTTCTGAAGCCCGAATGTAG	54
Pcbh1-XhoI-R	CCGCTCGAGGATGCGCAGTCCGCGGTTGACT	60

Fonte: BORGES, F. G. (2015).

5.5 Plasmídeos

As sequências de DNA das regiões promotoras do gene celobiohidrolase 1 de *T. reesei* (*cbh1*, GenBank, D86235) e do gene transportador de alta afinidade de zinco de *S. cerevisiae* (*ZRT1*, SGD YGL255W) foram obtidas e analisadas. Após análise, foi feito o planejamento de remoção e inserção de regiões de DNA (provenientes do promotor do gene *ZRT1*) no promotor do gene *cbh1* e a sequência de DNA do promotor artificial, chamado *Pcbh1-mre*, foi encaminhada para síntese pela empresa Life Technologies (USA), a qual clonou as mesmas no plasmídeo pYES2/CT/*lacZ* (Life Technologies, USA). Na tabela 3 encontram-se descritas as características dos plasmídeos utilizados no trabalho.

Tabela 3 - Características dos plasmídeos utilizados no estudo.

Plasmídeo	Tamanho	Característica
pYES2/CT/ <i>lacZ</i>	8959 pb	Vetor pYES2/CT/LacZ - Amp ^R e URA3
<i>Pcbh1-mre</i> / pYES2/CT/ <i>lacZ</i>	10331 pb	Vetor pYES2/CT/LacZ (8959 pb) - Amp ^R e URA3 - com o promotor <i>Pcbh1-mre</i> (1372 pb) clonado a montante do gene <i>lacZ</i>

Fonte: BORGES, F. G. (2015).

5.6 Transformação de bactérias

A transformação bacteriana foi realizada por eletroporação conforme procedimento descrito pelo fabricante do Electroporador 2510 (Eppendorf, Alemanha). Uma alíquota de 1 µg do plasmídeo foi utilizada para transformar a bactéria eletrocompetente *E. coli* BL21. As células foram plaqueadas em meio LB ampicilina e incubadas em estufa a 37 °C por 18 horas. Os clones resistentes a Ampicilina foram utilizados na preparação de DNA plasmidial, de acordo com o protocolo do fabricante do *plasmid DNA mini Kit* (Qiagen, Alemanha).

5.7 Transformação de leveduras

A transformação de leveduras foi realizada de forma epissomal de acordo com o protocolo de Chen et al., (1992). As células foram crescidas durante a noite em 3 mL de meio YPD, a 30 °C e 200 rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em água estéril, vortexadas e centrifugadas para a precipitação. A água foi removida e as células foram ressuspensas em *One-Step Buffer* (ingredientes por tubo: 80 µL de 50% PEG, 10 µL de 2 N LiAc, 10 µL de 1 M DTT, 5 µL de SS-DNA (10mg/mL) e 0,5-1 µL do DNA plasmidial). As células foram aquecidas a 45 °C por 30 minutos. Após o aquecimento foram centrifugadas e ressuspensas em 100 µL de água, que foram plaqueados no meio de seleção. As placas foram incubadas a 30 °C e as colônias apareceram após 4 dias de incubação.

5.8 Teste da atividade da β-galactosidase

A β-galactosidase é uma enzima que hidrolisa β-D-galactosídeos. Esta atividade enzimática pode ser medida em meio líquido com a utilização de substratos cromogênicos. Esses substratos são incolores e quando hidrolizados dão origem a produtos coloridos, por exemplo, o ONPG (O-Nitrofenil-β-D-galactopiranosídeos). Na presença da enzima, o ONPG, é convertido em galactose e orto-nitrofenol, substância de cor amarela, a qual pode ser quantificada por sua absorção à 420 nm (CARRARO et al., 1998). O teste para análise da atividade de β-galactosidase foi descrito primeiramente por Miller (1972).

Para a realização dos testes, as alíquotas de 1 mL das culturas de células induzidas foram lavadas em tampão Z gelado de pH 7.0 (0.06 M de fosfato de sódio dibásico, 0.04 M de fosfato de sódio monobásico, 0.01 M de cloreto de potássio, 0.001 M de sulfato de magnésio heptahidratado) e a Abs₆₀₀ foi determinada. Desse 1 mL de solução de células, 0,2 mL foram diluídos em 0,8 mL de Tampão Z com 0,27% de β-mercaptoetanol. Foram adicionados 0,1 mL de clorofórmio e 0,05 mL de 0,1% de SDS e a mistura foi vortexada por 1 minuto. Após essa etapa, uma solução branca foi observada, significando que as células foram lisadas e o conteúdo interior das células contendo a β-galactosidase foi liberado no sobrenadante.

Para iniciar a reação foram adicionados 0,2 mL de ONPG nesta solução de células lisadas, a temperatura foi mantida a 30 °C durante toda a reação, e tempo cronometrado até a reação apresentar a coloração amarela. A reação foi finalizada com a adição de 0,5 mL de Carbonato de sódio 1 M e a Abs₄₂₀ da solução foi determinada.

O cálculo da atividade de β-galactosidase foi determinado em Unidades Miller, calculado da seguinte forma:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 \times \text{Abs}_{420} / (T \times V \times \text{Abs}_{600})$$

Onde T é o tempo de reação cronometrado e V é o volume utilizado em mL de cultura suspendida em tampão Z, da qual foi determinada a Abs₆₀₀.

5.9 Curva de crescimento

Para a determinação da curva de crescimento das cepas de levedura, a quantificação celular foi estimada através da avaliação da densidade óptica, com comprimento de onda de 600 nm.

A partir de culturas recentes em placas de YPD, as células foram inoculadas em 10 mL de meio YPD, mantidas a 30 °C sob agitação de 200 rpm, durante a noite. Partindo dos pré-inóculos, as células foram inoculadas em 200 µL de meio YPD e meio LZM suplementado com diferentes concentrações de zinco (0 µM, 0,2 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 0,75 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM), de forma que a absorção (Abs) inicial fosse 0,1. As células foram incubadas em placas de 96 poços no leitor de microplacas (*Infinite220 PRO series – TECAN*), a 30 °C, sob agitação e, leituras

da Abs₆₀₀ foram feitas a cada hora, durante 24 horas. Os resultados foram analisados no Microsoft Office Excel.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenho do promotor quimérico *Pcbh1-mre*

Para o desenvolvimento do presente trabalho, após análise da literatura (SIMM et al., 2011; WOODACRE et al., 2008; YONKOVICH et al., 2002; ZHAO et al., 1998), foram selecionados o promotor do gene transportador de alta afinidade ao zinco (*ZRT1*) de *S. cerevisiae* (SIMM et al., 2011) e o promotor do gene celobioidrolase 1 (*cbh1*) de *T. reesei* (NEVALAINEN; TE'O; BERQUQUIST, 2005; CARRARO et al., 1998), para a construção de um promotor quimérico.

Como descrito anteriormente, por ser um promotor forte, o promotor *cbh1* de *T. reesei* é o mais utilizado para induzir a expressão de proteínas recombinantes em fungos. A variedade de trabalhos utilizando esse promotor em sistemas de expressão (tabela 1, revisão bibliográfica), assim como a sua modificação apresentando resultados positivos (LIU et al., 2008; ZOU et al., 2012), objetivaram na escolha do desenvolvimento deste trabalho. Além disso, ele mostrou-se capaz de controlar a expressão de proteínas em *S. cerevisiae*, como foi demonstrado por Carraro et al., (1998), atestando a premissa da conservação dos mecanismos transcricionais em eucariotos.

No promotor *cbh1*, a região que controla a expressão induzida por celulose no gene *cbh1*, chamada de UARcb1 (*upstream activating region*), está localizada entre -72 pb a -241 pb, em relação a caixa TATA. Com o intuito de avaliar se essa região poderia controlar a transcrição de um gene em *S. cerevisiae*, Carraro et al., (1998) fizeram diferentes deleções na região UARcb1, e a colocou controlando o gene repórter *lacZ*. As análises revelaram que o promotor *cbh1* foi capaz de promover a transcrição de *lacZ* e de apresentar repressão por glicose em *S. cerevisiae*. Uma análise de deleção indicou ainda que uma sequência de 67 pb, localizada entre -349 a -282 dentro de UARcb1 é responsável por mediar a ativação na levedura, sendo essa região de grande importância para a regulação transcricional em *S. cerevisiae*.

A levedura *S. cerevisiae* apresenta um sistema de homeostase de zinco bem conhecido e descrito, e o gene *ZRT1*, que codifica a proteína transportadora de alta afinidade ao zinco, é expresso em maior nível quando a célula está em uma condição com baixa concentração de zinco. Além disso, possui em seu promotor três sítios MREs (EIDE, 2009; ZHAO et al., 1998) responsáveis pela regulação

transcricional de acordo com a disponibilidade de zinco. Sendo assim, o promotor *ZRT1* foi selecionado para o desenvolvimento do trabalho.

A figura 11 mostra a sequência de nucleotídeos do promotor *ZRT1* (*PZRT1*, 706 pb), na qual está destacada a região de 360 pb (-520 a -160) contendo os três sítios MREs e as caixas CAAT. A localização dos MREs no promotor *ZRT1* está indicada na tabela 4.

A figura 12 apresenta a sequência do promotor *cbh1* (*Pcbh1*, 1000 pb). A região de 48 pb (-725 a -676) contendo os sítios de ligação do fator de transcrição Cre1, responsável pela repressão na presença de glicose está destacada. Em amarelo está apontada a região UARcb1.

No desenho do promotor quimérico, a região de 48 pb do *Pcbh1*, responsável pela repressão do promotor na presença de glicose, devido a ligação do fator de transcrição Cre1, foi retirada e substituída pela região de 360 pb do *PZRT1*, responsável pela ativação de acordo com a concentração de zinco. Os 360 pb ficaram inseridos entre -1036 pb a -676 pb no novo promotor, que foi denominado *Pcbh1-mre* (1318 pb) (figura 13 e 14).

A figura 13 mostra a sequência de nucleotídeos do promotor *Pcbh1-mre*, que teve os outros elementos (caixas CAAT e TATA e os sítios para ligação do fator ACE2) do promotor *cbh1* mantidos. A região UARcb1 (amarelo), contendo os 67 pb responsáveis pela ativação do promotor *cbh1* em *S. cerevisiae* também foi mantida. Em cinza, está a região proveniente do promotor *ZRT1* de *S. cerevisiae* com os três motivos MREs (em rosa), de 11 pb cada, cuja posição é apresentada na tabela 4.

Tabela 4 - Sequência e localização dos MREs no promotor *ZRT1* e *Pcbh1-mre*.

Nome	Orientação	Sequência (11 pb)	Localização no <i>PZRT1</i>	Localização no <i>Pcbh1-mre</i>
MRE 1	3' → 5'	TGGAAACCCCA	-456 a -446	-971 a -961
MRE 2	5' → 3'	ACCCTCAAGGT	-319 a -309	-835 a -825
MRE 3	5' → 3'	ACCTTGAAGGT	-204 a -194	-720 a -710

Fonte: BORGES, F. G. (2015).

```

-706 GGCAAGAGTA TTTTCAGACTT TCCTAATATG AAAGGACAAA TTGACACTAA TGTCTGATTA
      CCGTTCTCAT AAAGTCTGAA AGGATTATAC TTTCTCTGTTT AACTGTGATT ACAGACTAAT

-646 TGGCCAATTC CTGCGGTAAA TTACACGGCG ATTACGGCGA CATGAGCTCA CATTTCATCAC
      ACCGGTTAAG GACGCCATTT AATGTGCCGC TAATGCCGCT GTACTCGAGT GTAAGTAGTG

-586 TCTATGGGAC AAATGTTTCC AAAGTGGGCG CAACAAACAC CTGATGTGAC TCCTACCCTT
      AGATACCCTG TTTACAAAGG TTTGACCCGC GTTGTTTGTG GACTACACTG AGGATGGGAA

-526 TGGACAATGC AGATCCACGC TACGGCAAAT TAGTCAAATG CACTAGAACA TGGCGCAAGT
      ACCTGTTACG TCTAGGTGCG ATGCCGTTTA ATCAGTTTAC GTGATCTTGT ACCGCGTTCA

      MRE1

-466 ACTTATTGTG ACCTTTGGGG TACCGTTACC GTCAGTTTTT TTCAGCTAAG GCGCGCGCGC
      TGAATAACAC TGGAAACCCC ATGGCAATGG CAGTCAAAAG AAGTCGATTG CCGCGCGCGC

      Caixa CAAT

-406 CAGATAACTA AAAAAAAAAATA TAGTTGCTGC TTAAAAACA ATACACCCGT ACTCTCTTGC
      GTCTATTGAT TTTTTTTTAT ATCAACGACG AATTTTTTGT TATGTGGGCA TGAGAGAACG

      MRE2

-346 CTGTAAAAAC CTCGAAGGAC CAAAGATACC CTCAAGGTTC TCATCTGTGC GGTATTCTTC
      GACATTTTTG GAGCTTCCTG GTTCTATGG GAGTTCCAAG AGTAGACACG CCATAAGAAG

      Caixa CAAT                                Caixa CAAT

-286 AAATTACAAT GACATTCCC AAAATTATCA GATGTGCTCA GGTATCTTCT CTCAATGAG
      TTTAATGTTA CTGTAAAGGG TTTTAATAGT CTACACGAGT CCATAGAAGA GAGGTTACTC

      MRE3

-226 ATGAGACAGA TGAACATATT TGACCTTGAA GGTCATGGAA AGTAGGTTGA GAGCAAATGT
      TACTCTGTCT ACTTGTATAA ACTGGAACCT CCAGTACCTT TCATCCAACCT CTCGTTTACA

-166 GTAGAACGAA ATTAAGAAAA AAAGAAATTA CGCACGGCAT TAGCTCGATG ACTTAGTTAT
      CATCTTGCTT TAATTCTTTT TTTCTTTAAT GCGTGCCGTA ATCGAGCTAC TGAATCAATA

-106 AAATAGAGGC CTGGTATCGG CTGTCATGAT CTCATCTCTT CCCTATTTAC AAAAAAACTG
      TTTATCTCCG GACCATAGCC GACAGTACTA GAGTAGAGAA GGGATAAATG TTTTTTTGAC

-46  CAAGTATAGA CAATAAAACA ACAGCACAAA TATCAAAAAA GGAATT
      GTTCATATCT GTTATTTTGT TGTCGTGTTT ATAGTTTTTT CCTTAA

```

Figura 11 – Sequência de nucleotídeos do promotor *ZRT1* de *S. cerevisiae* (706 pb). Em cinza, a região de 360 pb contendo os três elementos MREs (em rosa). Os elementos do promotor estão sublinhados. Fonte: BORGES, F. G. (2015).

```

-1000 CTGTTCTGAAG CCCGAATGTA GGATTGTTAT CCGAACTCTG CTCGTAGAGG CATGTTGTGA
      GACAAGCTTC GGGCTTACAT CCTAACAAATA GGCTTGAGAC GAGCATCTCC GTACAACACT

-940 ATCTGTGTGCG GGCAGGACAC GCCTCGAAGG TTCACGGCAA GGGAAACCAC CGATAGCAGT
      TAGACACAGC CCGTCCTGTG CGGAGCTTCC AAGTGCCGTT CCCTTTGGTG GCTATCGTCA
      Caixa CAAT

-880 GTCTAGTAGC AACCTGTAAA GCGCCAATGC AGCATCACTG GAAAATACAA ACCAATGGCT
      CAGATCATCG TTGGACATTT CGGCGTTACG TCGTAGTGAC CTTTATATGTT TGGTTACCGA
      ACE2 Caixa CAAT

-820 AAAAGTACAT AAGTTAATGC CTAAAGAAGT CATATACCAG CGGCTAATAA TTGTCAATC
      TTTTCATGTA TTCAATTACG GATTTCTTCA GTATATGGTC GCGGATTATT AACATGTTAG
      Sítios Cre1

-760 AAGTGGCTAA ACGTACCGTA ATTTGCCAAC GGCTTGTGGG GTTGCAGAAG CAACGGCAAA
      TTCACCGATT TGCATGGCAT TAAACGGTTG CCGAACACCC CAACGCTTTC GTTGCCGTTT
      Caixa CAAT Caixa CAAT

-700 GCCCCACTTC CCCACGTTTG TTTCTTCACT CAGTCCAATC TCAGCTGGTG ATCCCCCAAT
      CGGGGTGAAG GGGTGCAAAC AAAGAAGTGA GTCAGGTTAG AGTCGACCAC TAGGGGGTTA

-640 TGGGTCGCTT GTTTGTTCGG GTGAAGTGAA AGAAGACAGA GGTAAGAATG TCTGACTCGG
      ACCCAGCGAA CAAACAAGGC CACTTCACTT TCTTCTGTCT CCATTCTTAC AGACTGAGCC

-580 AGCGTTTTGC ATACAACCAA GGGCAGTGAT GGAAGACAGT GAAATGTTGA CATTCAAGGA
      TCGCAAAACG TATGTTGGTT CCCGTCACCTA CCTTCTGTCA CTTTACAACCT GTAAGTTCCT

-520 GTATTTAGCC AGGGATGCTT GAGTGTATCG TGTAAGGAGG TTTGTCTGCC GATACGACGA
      CATAAATCGG TCCCTACGAA CTCACATAGC ACATTCTCTC AAACAGACGG CTATGCTGCT

-460 ATACTGTATA GTCACCTCTG ATGAAGTGGT CCATATTGAA ATGTAAGTCG GCACTGAACA
      TATGACATAT CAGTGAAGAC TACTTCACCA GGTATAAATT TACATTCAGC CGTGACTTGT
      UARcb1

-400 GGCAAAAGAT TGAGTTGAAA CTGCCTAAGA TCTCGGGCCC TCGGGCCTTC GGCCTTTGGG
      CCGTTTTCTA ACTCAACTTT GACGGATTCT AGAGCCCGGG AGCCCGGAAG CCGGAAACCC

-340 TGTACATGTT TGTGCTCCGG GCAAATGCAA AGTGTGGTAG GATCGAACAC ACTGCTGCCT
      ACATGTACAA ACACGAGGCC CGTTTACGTT TCACACCATC CTAGCTTGTG TGACGACGGA

-280 TTACCAAGCA GCTGAGGGTA TGTGATAGGC AAATGTTTCA GGGCCACTGC ATGGTTTTCGA
      AATGGTTCGT CGACTCCCAT AACTATCCG TTTACAAGTC CCCGGTGACG TACCAAAGCT
      Caixa CAAT

-220 ATAGAAAGAG AAGCTTAGCC AAGAACAATA GCCGATAAAG ATAGCCTCAT TAAACGGAAT
      TATCTTTCTC TTCGAATCGG TTCTTGTTAT CGGCTATTTT TATCGGAGTA ATTTGCCTTA
      Caixa TATA

-160 GAGCTAGTAG GCAAAGTCAG CGAATGTGTA TATATAAAGG TTCGAGGTCC GTGCCTCCCT
      CTCGATCATC CGTTTCAGTC GCTTACACAT ATATATTTCC AAGCTCCAGG CACGGAGGGA
      Inr

-100 CATGCTCTCC CCATCTACTC ATCAACTCAG ATCCTCCAGG AGACTTGTA ACCATCTTTT
      GTACGAGAGG GGTAGATGAG TAGTTGAGTC TAGGAGGTCC TCTGAACATG TGGTAGAAAA

-40 GAGGCACAGA AACCCAATAG TCAACGCGG ACTGCGCATC
      CTCCGTGTCT TTGGGTATAT AGTTGGCGCC TGACGCGTAG

```

Figura 12 – Sequência de nucleotídeos do promotor *cbh1* de *T. reesei* (1000 pb). Em cinza, a região de 48 pb contendo os sítios de ligação do fator Cre1 (sublinhados) e em amarelo a região UARcb1 com os 67 pb (sublinhados) responsáveis pela ativação do promotor em *S. cerevisiae*. Os outros elementos do promotor estão sublinhados. Fonte: BORGES, F. G. (2015).

-1318 AAGCTTCTGT TCGAAGCCCG AATGTAGGAT TGTTATCCGA ACTCTGCTCG TAGAGGCATG
TTCGAAGACA AGCTTCGGGC TTACATCCTA ACAATAGGCT TGAGACGAGC ATCTCCGTAC

-1258 TTGTGAATCT GTGTCGGGCA GGACACGCCT CGAAGGTTCA CGGCAAGGGA AACCACCGAT
AACACTTAGA CACAGCCCGT CCTGTGCGGA GCTTCCAAGT GCCGTTCCTT TTGGTGGCTA

Caixa CAAT

-1198 AGCAGTGTCT AGTAGCAACC TGTAAGCCG CAATGCAGCA TCACTGGAAA ATACAAACCA
TCGTCACAGA TCATCGTTGG ACATTTTCGGC GTTACGTCGT AGTGACCTTT TATGTTTGGT

ACE2

-1138 ATGGCTAAAA GTACATAAGT TAATGCCTAA AGAAGTCATA TACCAGCGGC TAATAATTGT
TACCGATTTT CATGTATTCA ATTACGGATT TCTTCAGTAT ATGGTCGCCG ATTATTAACA

Caixa CAAT

-1078 ACAATCAAGT GGCTAAACGT ACCGTAATTT GCCAACGGCT TGATGCAGAT CCACGCTACG
TGTTAGTTCA CCGATTTGCA TGGCATTAAA CGGTTGCCGA ACTACGTCTA GGTGCGATGC

MRE1

-1018 GCAAATTAGT CAAATGCACT AGAACATGGC GCAAGTACTT ATTGTGACCT TTGGGGTACC
CGTTTAATCA GTTTACGTGA TCTTGTACCG CGTTCATGAA TAACACTGGA AACCCCATGG

-958 GTTACCGTCA GTTTTCTTCA GCTAAGGCGC GCGCGCCAGA TAACTAAAAA AAAATATAGT
CAATGGCAGT CAAAAGAAGT CGATTCCGCG CGCGCGGTCT ATTGATTTTT TTTTATATCA

Caixa CAAT

-898 TGCTGCTTAA AAAACAATAC ACCCGTACTC TCTTGCTGTG AAAACCTCG AAGGACCAAA
ACGACGAATT TTTTGTATG TGGGCATGAG AGAACGGACA TTTTGGGAGC TTCTGGTGT

MRE2 **Caixa CAAT**

-838 GATACCCCTCA AGGTTCTCAT CTGTGCGGTA TTCTTCAAAT TACAATGACA TTTCCCAAAA
CTATGGGAGT TCCAAGAGTA GACACGCCAT AAGAAGTTTA ATGTTACTGT AAAGGGTTTT

Caixa CAAT

-778 TTATCAGATG TGCTCAGGTA TCTTCTCTCC AATGAGATGA GACAGATGAA CATATTTGAC
AATAGTCTAC ACGAGTCCAT AGAAGAGAGG TTACTCTACT CTGTCTACTT GTATAAACTG

MRE3 **Caixa CAAT**

-718 CTTGAAGTCT ATGGAAAGTA GGTGAGAGC AAATGTGTAG AATTCACCTCA GTCCAATCTC
GAACCTCCAG TACCTTTTCA CCAACTCTCG TTTACACATC TTAAGTGAGT CAGGTTAGAG

Caixa CAAT

-658 AGCTGGTGAT CCCCCAATTG GGTGCTTGT TTGTTCCGGT GAAGTGAAAG AAGACAGAGG
TCGACCACTA GGGGGTTAAC CCAGCGAACA AACAAGGCCA CTTCACTTTC TTCTGTCTCC

-598 TAAGAATGTC TGAATCGGAG CGTTTTGTCAT ACAACCAAGG GCAGTGATGG AAGACAGTGA
ATTCTTACAG ACTGAGCTC GCAAAACGTA TGTTGGTTCC CGTCACTACC TTCTGTCACT

-538 AATGTTGACA TTCAAGGAGT ATTTAGCCAG GGATGCTTGA GTGTATCGTG TAAGGAGGTT
TTACAACGTG AAGTTCTCTA TAAATCGGTC CCTACGAAC CACATAGCAC ATTCCTCCAA

-478 TGCTGCGCA TACGACGAAT ACTGTATAGT CACTTCTGAT GAAGTGGTCC ATATTGAAAT
ACAGACGGCT ATGCTGCTTA TGACATATCA GTGAAGACTA CTTCAACAGG TATAACTTTA

UARcb1

-418 GTAAGTCGGC ACTGAACAGG CAAAAGATTG AGTTGAAACT GCCTAAGATC TCGGGCCCTC
CATTCAGCCG TGAATTTGTC GTTTTCTAAC TCAACTTTGA CGGATTCTAG AGCCCGGGAG

-358 GGGCTTCGG CTTTGGGTG TACATGTTG TGCTCCGGG AAATGCAAAG TGTGGTAGGA
CCCGGAAGCC GGAAACCCAC ATGTACAAAC ACGAGGCCG TTTACGTTTC ACACCATCCT

-298 TCGAACACAC TGCTGCCTTT ACCAAGCAGC TGAGGGTATG TGATAGGCAA ATGTTCAGGG
AGCTTGTTG ACAGACGAAA TGGTTCGTCG ACTCCATAC ACTATCCGTT TACAAGTCCC

Caixa CAAT

-238 GCCACTGCAT GGTTCGAAT AGAAAGAGGA GCTTAGCCAA GAACAATAGC CGATAAAGAT
CGGTGACGTA CCAAAGCTTA TCTTTCTCCT CGAATCGGTT CTTGTTATCG GCTATTTCTA

Caixa TATA

-178 AGCCTCATTA AACGGAATGA GCTAGTAGGC AAAGTCAGCG AATGTGTATA TATAAAGGTT
TCGGAGTAAT TTGCCTTACT CGATCATCCG TTTCAGTCGC TTACACATAT ATATTTCCAA

Inr

-118 CGAGGTCCGT GCCTCCCTCA TGCTCTCCCC ATCTACTCAT CAACTCAGAT CCTCCAGGAG
GCTCCAGGCA CGGAGGGAGT ACGAGAGGGG TAGATGAGTA GTTGAGTCTA GGAGGTCTC

-58 ACTTGACAC CATCTTTTGA GGCACAGAAA CCAATAGTC AACCGCGGAC TCGGCATC
TGAACATGTG GTAGAAAAC CCGTGTCTTT GGGTTATCAG TTGGCGCCTG ACGCGTAG

Figura 13 – Sequência de nucleotídeos do promotor quimérico *Pcbh1-mre* (1318 pb). Em cinza, a região de 360 pb proveniente do *PZRT1* contendo os sítios MREs (em rosa) e em amarelo a região UARcb1, com os 67 pb (sublinhados) responsáveis pela ativação do promotor em *S. cerevisiae*. Os outros elementos do promotor foram mantidos. Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Figura 14 - Esquema representativo do desenho do promotor *Pcbh1-mre*. Para o desenho do promotor *Pcbh1-mre* a região de 48 pb do *Pcbh1* (caixa listrada) foi substituída pela região de 360 pb do *PZRT1* (caixa listrada) contendo os três MREs (representados pelos números 1, 2 e 3). Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Conforme citado anteriormente, a expressão de *cbh1* é induzida por celulose e reprimida pelo seu produto de degradação, ou seja, a glicose (ABRAHÃO-NETO et al., 1995; ILMÉN et al., 1996). Esse fenômeno é conhecido como repressão catabólica. A repressão por glicose é um fenômeno no qual as células, quando crescidas em meio com glicose, reprimem a expressão de vários genes (TRUMBLY, 1992).

Dentre os diversos componentes das vias regulatórias já identificados, Mig1 é um dos reguladores da repressão por glicose em *S. cerevisiae*. Mig1 é uma proteína que apresenta o domínio de ligação ao DNA do tipo dedo de zinco (Cys₂His₂) que se liga aos promotores dos genes reprimidos por glicose e recruta os repressores Ssn6 e Tup1 (RONNE, 1995).

Aspergillus nidulans e *A. niger* apresentam o gene *creA*, que codifica a proteína relacionada a repressão por glicose nesses fungos filamentosos. O fator CreA apresenta 84% de similaridade com Mig1 de *S. cerevisiae* e também contém o

domínio de ligação ao DNA do tipo dedo de zinco (Cys₂Hys₂) (VAUTARD; COTTON; FÈVRE, 1999). Em *T. reesei*, o fator Cre1 foi definido como o homólogo funcional do fator CreA de *Aspergillus* (STRAUSS et al., 1995).

A similaridade entre esses fatores leva à premissa de um sistema de repressão por glicose semelhante entre leveduras e outros fungos, que foi demonstrado por Carraro et al., (1998), quando verificaram que a transcrição em *S. cerevesiae* mediada pela região UARcb1 do *Pcbh1* requer os repressores Ssn6 e Tup1.

Dessa forma, o excesso de glicose formado pela degradação da celulose faz com que o repressor Cre1 se ligue ao promotor e reprima a expressão do gene *cbh1*. Sendo assim, a deleção dos sítios de ligação do fator Cre1 resultaria em um aumento na eficiência do promotor *cbh1* e permitiria a realização da cultura na presença de glicose. Isso foi observado por Liu et al., (2008), com o aumento dos níveis de expressão de proteínas heterólogas em *T. reesei* quando utilizado o promotor modificado, com a deleção dos sítios de ligação de Cre1 e com a inserção de sítios de ligação de proteínas ativadoras.

Zou et al., (2012) também confirmaram que a deleção dos sítios Cre1 no promotor *cbh1* aumenta a eficiência do promotor. Análises do promotor *cbh1* selvagem e de promotores modificados pela deleção dessa região e inserção dos sítios de ligação de proteínas ativadoras, revelaram um aumento significativo nas taxas de transcrição do gene repórter.

Desse modo, a deleção dos sítios de ligação de Cre1 no promotor *Pcbh1-mre*, deve, assim como foi constatado por Liu et al., (2008) e Zou et al., (2012), aumentar a eficiência do promotor. Esse aumento deve ser evidenciado com a adição dos sítios MREs, uma vez que genes repórteres colocados sob o controle do promotor *ZRT1* contendo os três MREs apresentaram uma elevação significativa da expressão das proteínas sob baixas concentrações de zinco (SIMM et al., 2011; ZHAO et al., 1998).

Com as modificações realizadas, a utilização do promotor quimérico *Pcbh1-mre* em sistemas de expressão, permite a presença de glicose como fonte de carbono no meio de cultura para crescimento e indução, assim como a aplicação de zinco como regulador alternativo, evitando a ativação de outras vias metabólicas quando são utilizados outros sacarídeos na indução do promotor *cbh1*.

6.2 Sistema de expressão *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ*

6.2.1 Construção do plasmídeo de expressão

A sequência de DNA do promotor *Pcbh1-mre* (desenhada no item 6.1, Figura 13), foi sintetizada e inserida no plasmídeo pYES2/CT/*lacZ* (catálogo V8251-20, *Life Technologies*, USA) a montante do gene repórter β -galactosidase (*lacZ*) pela empresa *Life Technologies* (USA) (Anexo 1). Dessa forma, foi construído o plasmídeo de expressão *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ*, cujo esquema é apresentado na figura 15. A sequência do plasmídeo construído foi confirmada por sequenciamento, feito no laboratório.

Figura 15 - Mapa esquemático do plasmídeo *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ* (10331 pb).
 Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Para propagação do plasmídeo, uma alíquota da construção sintetizada foi utilizada para transformar bactéria eletrocompetente *E. coli* e clones resistentes a ampicilina foram utilizados na preparação de DNA plasmidial.

A partir da construção do plasmídeo de expressão, foi proposta a seguinte hipótese para o funcionamento do sistema: da mesma forma como ocorre com o gene *ZRT1* de *S. cerevisiae* (ZHAO et al., 1998; EIDE, 2009), sob altas concentrações de zinco, a expressão do gene repórter β -galactosidase é inibida, pois a proteína ativadora Zap1 está dissociada dos MREs presentes no promotor quimérico. Ao passo que a concentração de zinco se torna mais limitante, é necessário que ocorra a ativação do gene. Para isso, a proteína Zap1 se liga aos MREs e permite a expressão de forma eficiente, ativando a transcrição do gene repórter. Quando a deficiência de zinco for suprida, o próprio metal irá inativar o sistema, impedindo que a Zap1 se ligue aos MREs (figura 16).

Figura 16 - Modelo hipotético da ativação do promotor *Pcbh1-mre* regulada pela concentração de zinco. Sob altas concentrações de zinco os MREs permanecem livres. Com a diminuição do zinco intracelular, a proteína Zap1 se liga aos MREs e ativa a transcrição do gene repórter. As caixas pretas representam os MREs e os círculos em cinza representam a proteína ativadora Zap1. **Fonte:** BORGES, F. G. (2015) (adaptado de EIDE, 2009).

6.2.2 Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

O plasmídeo *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ* (Figura 15) foi inserido na cepa W303-1A de *S. cerevisiae* de acordo com o protocolo de transformação descrito na metodologia. O protocolo de transformação utilizado foi escolhido pela vantagem de apresentar uma preparação de células competentes rápida e fácil, além de mostrar uma maior flexibilidade na cultura das células, sendo necessário uma quantidade pequena de meio de cultura para o realização do procedimento (CHEN et al., 1992). Por outro lado, a cepa *S. cerevisiae* W303-1A tem sido amplamente utilizada em pesquisas fisiológicas e genéticas (KOKINA; KIBILDS; LIEPINS, 2014); pesquisas de tolerância ao etanol (AVRAHAMI-MOYAL et al., 2012) e produção de proteínas recombinantes (SAMPAIO et al., 2008). Após a transformação, quatro cepas foram selecionadas de forma aleatória e estabilizadas após três replicações em meio YNBD ágar, utilizando a marca auxotrófica *URA3*. A figura 17 apresenta a placa de petri com o meio de cultura de seleção, com os transformantes selecionados *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ* de 1 a 4, um controle positivo (cepa W303-1A transformada com o plasmídeo fechado *pYES2/CT/lacZ*) e um controle negativo (cepa W303-1A não transformada).

Figura 17 – Seleção dos transformantes em meio YNBD com a marca auxotrófica *URA3*. A placa foi incubada a 30°C por 72 horas. 1) Cepa W303-1A não transformada – controle negativo; 2, 3, 4 e 5) Transformantes *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ* 1, 2, 3 e 4, respectivamente; 6) Cepa transformada com o plasmídeo *pYES2/CT/lacZ* – controle positivo. Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Além da confirmação através da cultura em meio seletivo utilizando a marca auxotrófica *URA3*, os transformantes estáveis foram submetidos à extração de DNA plasmidial para confirmar a inserção do plasmídeo. O DNA plasmidial de cada transformante foi amplificado com os oligonucleotídeos específicos (*Pcbh1-SpeI-F* e *Pcbh1-XhoI-R*) (figura 18B, canaletas 1 a 4). Como controle positivo, o plasmídeo sintetizado *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ* foi amplificado com os mesmos oligonucleotídeos (figura 18B, canaleta 5).

Análises das figuras 17 e 18 nos permite concluir que o plasmídeo construído foi inserido na cepa W303-1A nos quatro transformantes analisados.

Figura 18 - Análise da inserção do plasmídeo *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ* em *S. cerevisiae*. A: Esquema do promotor quimérico *Pcbh1-mre* controlando o gene reporter *lacZ*. As setas indicam a posição dos oligonucleotídeos utilizados na análise por PCR, resultando em um fragmento de aproximadamente 1318 pb. B: Eletroforese em Gel de Agarose 1% - amplificação do DNA plasmidial dos transformantes. (1), (2), (3) e (4) transformantes *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ* nº 1, 2, 3 e 4, respectivamente, amplificados com os oligonucleotídeos específicos, de aproximadamente 1318 pb; (5) Plasmídeo sintetizado *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ* amplificado com os oligonucleotídeos específicos, de aproximadamente 1318 pb (controle positivo); (6) DNA genômico da cepa W303-1A amplificado com os oligonucleotídeos específicos (controle negativo); (PM): Peso Molecular 1Kb ladder (Life Technologies, USA). Fonte: BORGES, F. G. (2015).

6.3 Análise da atividade da β -galactosidase

Tendo em vista o fato do alto grau de conservação dos sistemas regulatórios entre os organismos eucariotos, a análise da habilidade do promotor *Pcbh1-mre* em dirigir a expressão regulada do gene repórter *lacZ* em *S. cerevisiae*, foi um dos objetivos do presente trabalho.

Para avaliar a expressão do gene repórter *lacZ* e, conseqüentemente, a atividade do promotor *Pcbh1-mre* em *S. cerevisiae*, os transformantes *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ* 1 a 4 e a cepa controle (cepa W303-1A transformada com o plasmídeo fechado *pYES2/CT/lacZ*) foram analisados pela atividade da enzima β -galactosidase utilizando o teste de ONPG, cuja atividade foi determinada em Unidades Miller (UM).

Os pré-inóculos crescidos em meio YPD foram inoculados em 10 mL de meio LZM, de forma que a Abs₆₀₀ inicial fosse 0,05. Para as análises iniciais, o meio LZM foi suplementado com as seguintes concentrações de zinco: 0 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1000 μ M.

Inicialmente, propomos a avaliação da atividade da proteína repórter com as células coletadas entre 15 e 20 horas de indução, ou seja, na fase exponencial de crescimento, conforme descrito nos protocolos realizados por Zhao et al., (1998), MacDiarmid; Gaither e Eide (2000) e Bird et al.; (2004). No entanto, as células não demonstraram um crescimento adequado com esse tempo de indução. Sendo assim, decidimos coletar as células após 24 horas.

Dessa maneira, passadas às 24 horas, foram retiradas alíquotas de 1 mL da cultura para realização dos testes com o substrato ONPG. O volume de células utilizado no teste (V) foi 0,2 mL e o tempo de reação (T) foi de 10 minutos. Portanto, a equação utilizada para calcular a expressão do gene *lacZ* foi a seguinte:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 \times \text{DO}_{420} / (2 \times \text{DO}_{600})$$

Os testes foram feitos em triplicata e as médias dos resultados são apresentadas no gráfico 1 e na tabela 5, em Unidades Miller.

Gráfico 1 - Expressão do gene *lacZ* regulado pelo promotor *Pcbh1-mre*. Os números 1 a 4 representam os 4 transformantes *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ*. Os transformantes foram submetidos à indução no meio LZM sob diferentes concentrações de zinco (0 μM; 1 μM; 10 μM; 100 μM; 1000 μM). A análise da atividade da β-galactosidase foi feita pelo teste de ONPG, cujo resultado é apresentado no gráfico em Unidades Miller (UM). Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Analisando o gráfico 1 e os valores mostrados na tabela 5, foi possível observar, nos 4 transformantes avaliados, que, conforme a concentração de zinco aumenta, as concentrações de β-galactosidase para hidrolisar o ONPG diminuem, indicando que, ao passo que o zinco é adicionado ao meio de cultura, a atividade do promotor é diminuída ou reprimida. As concentrações acima de 10 μM foram consideradas como inibidores do sistema. De acordo com a tabela 5, o promotor tem a sua atividade reduzida de forma significativa, quando são adicionados 100 μM e 1000 μM de zinco ao meio de indução.

Esses resultados iniciais demonstram que a atividade de *Pcbh1-mre* foi maior no meio sem a suplementação de zinco (0 μM) e menor no meio com a máxima suplementação (1000 μM). Conforme o esperado, o controle não apresentou atividade da β-galactosidase.

Tabela 5 - Atividade da enzima β -galactosidase em Unidades Miller.

Cepa	Concentração de Zinco (μ M)				
	0	1	10	100	1000
Pcbh1-mre/pYES2-CT- <i>lacZ</i> – 1	633,709 +- 16,457	608,786 +- 20,354	419,212 +- 16,877	75,110 +- 2,116	50,927 +- 2,952
Pcbh1-mre/pYES2-CT- <i>lacZ</i> – 2	792,769 +- 25,204	630,662 +- 20,814	439,206 +- 21,560	89,372 +- 4,105	63,282 +- 10,923
Pcbh1-mre/pYES2-CT- <i>lacZ</i> – 3	1690,333 +- 20,891	704,862 +- 22,951	610,457 +- 15,189	75,559 +- 12,079	16,282 +- 1,669
Pcbh1-mre/pYES2-CT- <i>lacZ</i> – 4	1395,609 +- 28,648	872,038 +- 16,617	386,361 +- 12,226	160,112 +- 7,776	80,923 +- 4,570
Controle	2,684 +- 0,791	7,177 +- 1,503	5,482 +- 2,649	4,424 +- 1,052	6,632 +- 1,952

Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Zhao et al., (1998), MacDiarmid; Gaither e Eide (2000) e Bird et al., (2004) avaliaram a atividade do promotor *ZRT1* sob diferentes concentrações de zinco através da expressão do gene *lacZ*. Todos eles obtiveram resultados semelhantes em seus experimentos, ou seja, à medida que a concentração de zinco aumenta, as concentrações de β -galactosidase diminuem, demonstrando que a atividade do promotor de levedura é dependente da concentração de zinco disponível no meio.

Comparando as atividades apresentadas pelos quatro transformantes, a cepa transformante de número três se destacou pelo fato de apresentar uma atividade no meio sem zinco cerca de 100 vezes maior do que no meio com 1000 μ M de zinco (1690,333 UM e 16,282 UM, respectivamente – tabela 5). Essa resposta positiva motivou a sua seleção para a realização de outros testes.

Com a finalidade de avaliar se concentrações menores de zinco (entre 0 μ M e 1 μ M) poderiam aumentar a atividade do promotor, o transformante selecionado foi analisado novamente pela atividade β -galactosidase. Nessa segunda etapa, os pré-inóculos crescidos em meio YPD foram inoculados em meio LZM com as seguintes concentrações de zinco: 0 μ M; 0,2 μ M; 0,25 μ M; 0,5 μ M; 0,75 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100

μM ; 1000 μM . Após 24 horas de indução foram retiradas alíquotas de 1 mL da cultura para realização dos testes com o substrato ONPG.

Com o propósito de aumentar a velocidade e a reprodutibilidade dos resultados, os testes foram realizados em placas de 96 poços e lidos no leitor de microplacas. Portanto, o volume (V) de células utilizado precisou ser reduzido, passando para 0,02 mL, com o tempo de reação (T) de 20 minutos. A equação utilizada para calcular a expressão do gene *lacZ* passou a ser a seguinte:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 \times \text{Abs}_{420} / (0.4 \times \text{Abs}_{600})$$

As análises foram feitas em triplicata e as médias são apresentadas no gráfico 2 e na tabela 6, em Unidades Miller.

Gráfico 2 - Expressão do gene *lacZ* regulado pelo promotor *Pcbh1-mre* no transformante 3. As amostras foram submetidas à indução no meio LZM sob diferentes concentrações de zinco (0 μM ; 0,2 μM ; 0,25 μM ; 0,5 μM ; 0,75 μM ; 1 μM ; 10 μM ; 100 μM ; 1000 μM). A análise da atividade da β -galactosidase foi feita pelo teste de ONPG, cujo resultado é apresentado no gráfico em Unidades Miller (UM). Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Iguais aos resultados anteriores, análises do gráfico 2 e os valores mostrados na tabela 6, confirmam que concentrações de zinco acima de 10 μM inibem o sistema. Em contrapartida, a ausência do metal permite a sua melhor ativação. As

concentrações mais baixas (0,2 μM ; 0,25 μM ; 0,5 μM e 0,75 μM) foram capazes de ativar o sistema, porém, a ausência do metal continuou sendo a melhor condição para a expressão da proteína repórter.

Tabela 6 - Média da atividade da enzima β -galactosidase no transformante 3 em Unidades Miller

Concentração de Zinco (μM)								
0	0,2	0,25	0,5	0,75	1	10	100	1000
1683,6	1340,67	927,44	734,04	707,12	671,52	610,45	117,55	5,28
+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
12,00	15,61	18,27	18,23	7,94	9,00	15,18	12,52	0,68

Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Dessa forma, a hipótese inicial de que o sistema de expressão *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ* seria regulado de forma semelhante aos genes responsáveis pela homeostase de zinco em *S. cerevisiae* (Figura 16, item 6.2.1) se torna verdadeira. Sob baixas concentrações de zinco, a proteína ativadora Zap1 se ligou aos MREs do promotor *Pcbh1-mre* e ativou a transcrição do gene repórter, com o objetivo de tornar possível a captação extracelular do zinco através da membrana plasmática. Sob altas concentrações de zinco, a captação extracelular do metal não foi necessária, por isso, o zinco atuou sobre a proteína Zap1, impedindo a sua ligação ao promotor, inativando o sistema.

6.4 Análises do Crescimento

De acordo com os resultados apresentados, o promotor *Pcbh1-mre* apresentou a maior atividade quando a indução foi feita em meio sem a adição de zinco. No entanto, estudos anteriores também sugerem que a falta do zinco no meio intracelular pode afetar a célula de forma negativa, pois sua captação é essencial para a sobrevivência, porém, seu acúmulo pode ser tóxico (EIDE, 1997; SIMM et al., 2011; ZHAO; EIDE, 1997; ZHAO et al., 1998; ZHENG et al., 2008).

Por essa razão, decidimos avaliar o efeito das concentrações de zinco sobre o crescimento das cepas. Dessa forma, foram realizadas as curvas de crescimento do transformante 3 e do controle (cepa W303-1A transformada com o plasmídeo fechado *pYES2/CT/lacZ*) em diferentes meios de cultura e concentrações de zinco.

Os pré-inóculos crescidos em YPD, foram inoculados em 200 μ L de meio LZM com diferentes concentrações de zinco, em placas de 96 poços. Para uma melhor apresentação dos gráficos, somente algumas das concentrações de zinco utilizadas anteriormente foram selecionadas nessa etapa: 0 μ M; 0,25 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1000 μ M. Como controle, as curvas foram feitas no meio YPD (figura 21).

Observando as curvas apresentadas no gráfico 3A percebemos alterações no crescimento quando comparadas as células crescidas em meio YPD e em meio LZM. As células crescidas em YPD, não apresentaram a fase *lag*, provavelmente pelo fato do meio utilizado na preparação dos pré-inóculos ser o mesmo. Por outro lado, as células crescidas no meio LZM necessitaram de adaptações fisiológicas ao passo que o meio foi alterado, apresentando assim uma fase de adaptação mais duradoura, que permitiu o crescimento e a divisão das células (HOHMANN; MAGER, 2003).

A fase de adaptação também foi diferente entre as células crescidas no meio LZM com diferentes concentrações de zinco. Sob a ausência do metal, as células apresentaram uma fase *lag* mais duradoura e conseqüentemente, o início da fase exponencial foi mais demorado, ou seja, mostraram um crescimento mais lento. À medida que o zinco foi sendo adicionado ao meio, as células começaram a ter um crescimento mais acentuado, com a diminuição da fase de adaptação e, conseqüentemente, o adiantamento do início da fase exponencial.

Sendo assim, a primeira proposição de que a falta/limitação ou excesso de zinco poderia alterar o crescimento das células foi descartada. Isso porque, apesar das diferenças observadas no crescimento das cepas do transformante 3, não foram observadas alterações no controle, pois as curvas feitas sob as diferentes condições apresentaram o mesmo perfil de crescimento (gráfico 3B).

Outro fato que nos leva a concluir que o zinco não é o responsável pela alteração do crescimento das células é a presença desse metal no meio YPD. Segundo Frey et al., (2011), mesmo sob altas concentrações de zinco, o meio LZM continua com uma menor concentração desse metal que o meio YPD, devido a presença do quelante EDTA.

Isso nos remete a uma segunda proposição, ou seja, a ideia de que as alterações no crescimento estejam relacionadas com a presença do promotor e a sua conseqüente ativação ou repressão e não com a concentração de zinco, como foi presumido anteriormente.

Gráfico 3 - Curvas de crescimento. Curvas de crescimento nos meios YPD e LZM (suplementado com diferentes concentrações de zinco). **A:** transformante 3 (*Pcbh1-mre/ pYES2/CT/lacZ-3*). **B:** controle (cepa W303-1A transformada com o plasmídeo pYES2/CT/lacZ). Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Interpretando as curvas de crescimento apresentadas no gráfico 3A, de acordo com a segunda proposição levantada, foi possível constatar que a alta expressão da proteína repórter, com a consequente alta atividade do promotor, altera o crescimento das células.

No gráfico 4 é apresentado a relação entre a atividade da β -galactosidase com o crescimento, sob meio LZM com as diferentes concentrações de zinco. O meio sem a presença do metal apresentou uma concentração de células menor, porém o promotor se mostrou mais ativo (aproximadamente 1700 UM). Ao passo que as concentrações de zinco aumentaram o crescimento celular também aumentou, enquanto que a atividade do promotor foi diminuída. A partir de 10 μ M de zinco, foi possível observar um crescimento celular constante e um grande declínio da atividade da β -galactosidase, confirmando que essas concentrações são inibidoras do sistema.

Analizando essa relação, constatamos que quanto maior é a expressão da β -galactosidase, ou seja, quanto maior é atividade do promotor, o tempo para as células entrarem na fase exponencial de crescimento é mais lento.

Essa relação pode ser explicada pelo fenômeno conhecido como estresse metabólico. Em geral, é esperado que após a indução, o cultivo apresente uma diminuição significativa do crescimento, devido a uma baixa taxa de crescimento celular e desregulação de algumas vias metabólicas durante a expressão de proteínas recombinantes em grandes quantidades (ZHU et al., 2009).

Dessa forma, foi possível concluir que a concentração de zinco alterou a habilidade do promotor em dirigir a expressão do gene repórter, no entanto não se mostrou como o responsável pela alteração do crescimento.

Apesar do meio LZM sem a adição de zinco (0 μ M) ser considerado o melhor para a atividade do promotor *Pcbh1-mre*, não podemos afirmar que o metal esteja realmente ausente nesse meio, considerando que o reagente YNB utilizado na preparação do meio LZM (Y1251 – *Sigma-Aldrich*) apresenta em sua composição certa quantidade de zinco (400 μ g/L de ZnSO_4 , aproximadamente 2,5 μ M). O que torna o meio LZM zinco limitante é a presença do EDTA, que é um quelante de alta afinidade ao zinco (MACDIARMID; GAITHER; EIDE, 2000). A adição do EDTA no meio, provavelmente tornou o zinco indisponível na célula, no entanto isso não pôde ser comprovado.

No entanto, sabemos que o zinco, assim como outros metais, é essencial para diversas atividades celulares, além de desempenhar um papel importante no correto dobramento dos domínios de ligação ao DNA do tipo dedo de zinco (BARTON et al., 2007; GITAN et al., 1998; ZHAO et al., 1998; ZHENG et al., 2008). Portanto, uma quantidade mínima de zinco disponível é essencial para que o crescimento das células seja possível.

Gráfico 4 - Expressão do gene *lacZ* e crescimento celular no transformante 3 sob diferentes concentrações de zinco. Fonte: BORGES, F. G. (2015).

Em *S. cerevisiae* a proteína Zap1, é o fator de transcrição responsável não só pela ativação do gene *ZRT1*, mas também de outros genes que atuam na homeostase do zinco, como os genes *ZRT2* e *ZRT3* (FREY; EIDE, 2012). Dessa forma, a introdução do sistema de expressão *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ*, não impediu que a Zap1 exercesse a sua função ativadora sobre esses genes, possibilitando a captação do zinco presente no meio, para que as células pudessem ter um crescimento adequado.

A importância da captação do zinco extracelular pelas proteínas transmembranas, mediada pela atividade da Zap1, foi reforçada quando o sistema

foi analisado em um mutante nulo $\Delta zap1$. A cepa BY4741 $\Delta zap1$ (*MATa*, *his3 Δ 1*, *leu2 Δ 0*, *met15 Δ 0*, *ura3 Δ 0*, *zap1::KanMX4*) foi fornecida pelo Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).

Os resultados das análises não foram mostrados, pois a cepa não foi capaz de crescer no meio de indução LZM com concentrações abaixo de 1000 μ M de zinco. Provavelmente, a ausência do fator responsável pela ativação dos genes que codificam as proteínas atuantes na captação do zinco extracelular, foi um dos responsáveis pelo não crescimento das células, que não foram capazes de captar o zinco mínimo que proporcionasse a manutenção do metabolismo para crescimento. As células que cresceram no meio suplementado com 1000 μ M de zinco, conforme o esperado, não apresentaram nenhuma atividade da proteína repórter.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, descrevemos:

- I) O desenho do promotor quimérico, denominado *Pcbh1-mre*, a partir do aproveitamento de regiões *cis* provenientes dos promotores *cbh1* de *T. reesei* e *ZRT1* de *S. cerevisiae*;
- II) Avaliação da atividade do promotor *Pcbh1-mre* na regulação da expressão do gene repórter *lacZ*;
- III) Avaliação da eficiência do sistema de expressão em *S. cerevisiae*.

A remoção de 48 pb e adição de 360 pb no promotor *cbh1* para o desenvolvimento do promotor *Pcbh1-mre*, não alteraram sua atividade, mostrando que um promotor apresentando elementos de *T. reesei* e *S. cerevisiae* foi funcional. Isso se torna mais uma prova da conservação da maquinaria de regulação transcricional entre os dois organismos.

A decisão de inserir os 360 pb do promotor *ZRT1* contendo os três MREs e não somente os elementos isolados, permitiu a adequada ligação do fator de transcrição Zap1, regulando a expressão do gene repórter.

Os resultados da avaliação da atividade da β -galactosidase mostram a funcionalidade do promotor desenvolvido. A presença dos sítios MREs permitiu a indução do sistema no meio com baixa concentração de zinco e a sua repressão com concentrações altas (acima de 10 μ M).

A remoção dos sítios de ligação do repressor Cre1 permitiu a utilização de glicose no meio de cultura. De igual forma a utilização do zinco como regulador do sistema não alterou ou prejudicou o crescimento celular, independente de sua concentração.

Um aspecto interessante é o fato da presença do sistema de expressão na célula hospedeiro ter aumentado o tempo para o início da fase exponencial de crescimento celular, que apesar de ter sido considerado um fenômeno conhecido, precisa ser melhor elucidado.

O funcionamento do sistema sem a necessidade da presença do zinco e a possibilidade do uso de glicose como fonte de carbono, são as principais vantagens apresentadas pelo sistema de expressão construído. Dessa forma, o promotor

Pcbh1-mre pode ser potencialmente utilizado para produção de proteínas recombinantes de interesse biotecnológico.

Finalmente, este trabalho, que atingiu os objetivos propostos, irá contribuir para o estudo da regulação homeostática de zinco em *S. cerevisiae* e o sistema de expressão desenhado poderá ser testado utilizando outro gene repórter e/ou hospedeiro, por exemplo, o fungo filamentoso *T. reesei*.

8 PERSPECTIVAS

Na continuação deste trabalho, pretendemos testar o sistema controlando a expressão de proteínas de interesse, por exemplo, enzimas envolvidas na degradação de biomassa (exoglucanases e endoglucanases), em *S. cerevisiae* e/ou *T. reesei*.

O desenho e avaliação do sistema de expressão descrito nesta Dissertação de Mestrado nos permitirá desenhar outros sistemas, apresentando motivos reguladores para outros metais ou outras substâncias, como os hormônios, o que oferece uma contribuição relevante para a produção de proteínas recombinantes de interesse biotecnológico.

REFERÊNCIAS*

- ABRAHÃO-NETO J., et al. Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Biochemistry**, v. 43, p. 10456-10462, 1995.
- ALBER, T. Structure of the leucine zipper. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.2, p. 205-210, 1992.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.
- AMORE, A.; HONDA, Y.; FARACO, V. Copper induction of enhanced green fluorescent protein expression in *Pleurotus ostreatus* driven by laccase *poxa1b* promoter. **FEMS Microbiology Letters**, v.337, p. 155-163, 2012.
- AVRAHAM-MOYAL, L. et al. Turbidostat culture of *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A under selective pressure elicited by ethanol selects for mutations in *SSD1* and *UTH1*. **FEMS Yeast Research**, v.12, p. 521-533, 2012.
- BARBERIS, A. et al. Contact with a component of the polymerase II holoenzyme suffices for gene activation. **Cell**, v.81, p. 359–368, 1995.
- BARTON, L. L. et al. The bacterial metallome: composition and stability with specific reference to the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. **Biomaterials**, v. 20, p. 291-230, 2007.
- BENKO, Z. et al. *Thermoascus aurantiacus* CBHI/Cel7A production in *Trichoderma reesei* on alternative carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-149, p. 195-204, 2007.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERKA, R. M.; BARNETT, C. C. The development of gene expression systems for filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v.7, p. 127-154, 1989.

BIRD, A. J.; STILLMAN, D. J.; EIDE, D. J.; WINGE, D. R. The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in ZRT2. **The EMBO Journal**, v. 23, p. 1123-1132, 2004.

BÖHM, S.; FRISHMAN, D.; MEWES, H. W. Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 2464-2469, 1997.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética Humana** [recurso eletrônico]. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

BURATOWSKI, S. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. **Cell**, v.77, p. 1-3, 1994.

CARLE-URIESTE, J. C., et al. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 10169-10174, 1997.

CARRARO, D. M., et al. A region of the cellobiohydrolase I promoter from the filamentous fungus *Trichoderma reesei* mediates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, dependent on mitochondrial activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, p.407-414, 1998.

ÇELİK, E.; ÇALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v.30, p. 1108–1118, 2012.

CHEN, D. et al. One-step transformation of yeast in stationary phase. **Current Genetics**, v. 21, p. 83-84, 1992.

CHEN, W.; STRUHL, K. Yeast mRNA initiation sites are determined primarily by specific sequences, not by the distance from TATA element. **EMBO Journal**, v.12, p. 3273-328, 1985.

CLAUS, J.; CHAVARRÍA-KRAUSER, A. Modeling Regulation of Zinc Uptake via ZIP Transporters in Yeast and Plant Roots. **PLOS ONE**, v.7, p. 1-11, 2012.

CLIFTEN, P. et al. Finding Functional Features in *Saccharomyces* Genomes by Phylogenetic Footprinting. *Science*, v. 301, p. 71-76, 2003.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 159-182, 2002.

DE FARIA, F. P. et al. Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p. 119-123, 2002.

DELGADO-JARANA, J.; PINTOR-TORO, J. A.; BENÍTEZ, T. Overproduction of beta-1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1481, p. 289-296, 2000.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.

EIDE, D. Homeostatic and Adaptive Responses to Zinc Deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 18565–18569, 2009.

EIDE, D. Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 573-577, 1997.

EVANS-GALEA, M. V. et al. Two of the Five Zinc Fingers in the Zap1 Transcription Factor DNA Binding Domain Dominate Site-Specific DNA Binding. **Biochemistry**, v. 42, p. 1053-1061, 2003.

FOULKES, N. S; SASSONE-CORSI, P. More Is Better: Activators and Repressors from the Same Gene. **Cell**, v. 66, p. 411-414, 1992.

FREY, A. G. F. et al. Zinc-Regulated DNA Binding of the Yeast Zap1 Zinc-Responsive Activator. **PLOS ONE**, v. 7, p. 1-10, 2011.

FREY, A. G. F; EIDE, D. Zinc-responsive coactivator recruitment by the yeast Zap1transcription factor. **Microbiology Open**, v. 1, p. 105-114, 2012.

GERTZ, J.; SIGGIA, E. D.; COHEN, B. A. Analysis of combinatorial cis-regulation in synthetic and genomic promoters. **Nature**, v. 457, p. 215-218, 2009.

GITAN, R. S. et al. Zinc-induced Inactivation of the Yeast ZRT1 Zinc Transporter Occurs through Endocytosis and Vacuolar Degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 28617-28624, 1998.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v.274, p. 546-567, 1996.

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **Protein Journal**, v.32, p. 419-425, 2013.

GUERINOT, M. L. The ZIP family of metal transporters. Review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p. 190-198, 2000.

HAHN, S.; YOUNG, E. T. Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription Factor Regulation and Function, Mechanisms of Initiation, and Roles of Activators and Coactivators. **Genetics**, v. 189, p. 705–736, 2011.

HARFORD, J. B.; MORRIS, D. R. mRNA metabolism and post-transcriptional gene regulation. **Modern cell biology**; v.17, 1997.

HENRIQUE-SILVA, F., et al. Two regulatory regions controlling basal and cellulose-induced expression of the gene encoding cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei*

are adjacent to its TATA box. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 228, p. 229-237, 1996.

HEUCHEL, R. et al. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. **EMBO Journal**, v.13, p. 2870–2875, 1994.

HOFFMAN, C. S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. **Gene**, v. 51, p. 212-267, 1987.

HOHMANN, S.; MAGER W. H. In: **Introduction In Yeast Stress Responses**. Berlin: Springer-Verlag, 2003. p. 1-9.

HSIEH, Y. et al. The EIIAPA chimeric promoter for tumor specific gene therapy of hepatoma. **Molecular Imaging and Biology**, v. 14, p. 452-461, 2012.

ILMÉN, M., et al. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Molecular and General Genetics**, v. 253, p. 303-314, 1996.

IYER, V.; STRUHL, K. Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. **The EMBO Journal**, v.14, p. 2570-2579, 1995.

JAYARAJ, R.; SMOOKER, P. M. So you Need a Protein - A Guide to the Production of Recombinant Proteins. **The Open Veterinary Science Journal**, v.3, p.28-34, 2009.

JINXIA, W. U. Efficient expression of green fluorescent protein (GFP) mediated by chimeric promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.26, p.242-247, 2008.

JOUTSJOKI, V. V.; TORKKELI, T. K. Glucoamylase P gene of *Hormoconis resinae*: molecular cloning, sequencing and introduction into *Trichoderma reesei*. **FEMS Microbiology Letters**, v.78, p. 237-43, 1992.

JUVEN-GERSHON, T.; CHENG, S.; KADONAGA, J. Rational design of a super core promoter that enhances gene expression. **Nature Methods**, v.3, p. 917-922, 2006.

KIISKINEN, L. L., et al. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. **Microbiology**, v. 150, p. 3065-3074, 2004.

KLUG, A. Transcription opening the gateway. **Nature**, v.6447. p. 486-487, 1993.

KLUG, W. S. et al. **Conceitos de Genética**. 9th. Porto Alegre: Artmed, 2010. 896 p.

KOKINA, A.; KIBILDS, J.; LIEPINS, J. Adenine auxotrophy – be aware: some effects of adenine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae* strain W303-1A. **FEMS Yeast Research**, v.14, p. 697-707, 2014.

KONTKANEN, H.; REINIKAINEN, T.; SALOHEIMO, M. Cloning and expression of a *Melanocarpus albomyces* steryl esterase gene in *Pichia pastoris* and *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, p. 407-415, 2006.

KORDE, A.; ROSSELOT; J. M.; DONZE, D. Intergenic Transcriptional Interference is blocked by RNA polymerase III transcription factor TFIIIB in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v.196, p. 427–438, 2014.

KUMAR, K. S.; DAYANANDA, S.; SUBRAMANYAM, C. Copper alone, but not oxidative stress, induces copper-metallothionein gene in *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiology Letters**, v.242, p. 45-50, 2005.

KURZATKOWSKI. W., et al. Glucose-induced secretion of *Trichoderma reesei* xylanases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2859-2865, 1996.

LI, J. et al. Achieving efficient protein expression in *Trichoderma reesei* by using strong constitutive promoters. **Microbial Cell Factories**, v.11, p. 1-10, 2012.

LI, S. et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.2, 2012.

LIU, T., et al. Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by *cellobiohydrolase I* gene (*cbh1*) promoter optimization. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.40, p. 158-164, 2008.

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**, 7th. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1241p.

MA, L., et al. Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium decumbens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 366-371, 2011.

MACDIARMID, C. W.; GAITHER, L. A.; EIDE, D. Zinc transporters the regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 2845-2855, 2000.

MACPHERSON, S.; LAROCHELLE, M.; TURCOTTE, B. A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v.3, p. 583–604, 2006.

MADHAVAN, A.; SUKUMARAN, R.K. Promotor and signal sequence from filamentous fungus can drive recombinant protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Bioresource Technology**, v.165, p. 302-308, 2014.

MALONE, G. et al. Gene prospection in cDNA libraries. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, p. 07-13, 2006.

MANTYLA, A., et al. Production in *Trichoderma reesei* of three xylanases from *Chaetomium thermophilum*: a recombinant thermoxylanase for biobleaching of kraft pulp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 377-386, 2007.

MARGOLLES-CLARK, E., et al. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2145-2151, 1996.

MCINNES; R. R.; NUSSBAUM, R. L.; ROBERT, L. **Genética Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 640 p.

MIETTINEN-OINONEN, A., et al. Overexpression of the *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase gene in a heterologous host *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 58, p. 13-20, 1997.

MILLER, J. H. **Experiments in Molecular Genetics**, Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 1972. 466 p.

MOGNO, I. et al. TATA is a modular component of synthetic promoters. **Genome Research**, v.20, p. 1391-1397, 2010.

MULHERN, S. B.; LOQUE, M. E.; BUTLER, G. *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. **Eukaryotic cell**, v. 5, p. 2001-2013, 2006.

MURRAY, R. K. et al. **Harpes Illustrated Biochemistry (Lange Basic Science)**. 29th. McGraw-Hill. 2013. 832 p.

NA, J.; METZGER, J. D. Chimeric promoter mediates guard cells-specific gene expression in tobacco under water deficit. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 1893-1899, 2014.

NAKARI-SETALA, T.; PENTTILÄ, M. Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 3650-3655, 1995.

NAKAZAWA, H. et al. Construction of a recombinant *Trichoderma reesei* strain expressing *Aspergillus aculeatus* beta-glucosidase 1 for efficient biomass conversion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 92-99, 2012.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3th. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

NEVALAINEN, K. M.; TE'O, V. S.; BERQQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v.23, p. 468-474, 2005.

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v.12, p. 69-71, 1998.

NYKANEN, M. et al. Expression and Secretion of Barley Cysteine Endopeptidase B and Cellobiohydrolase I in *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4929-4937, 1997.

PALOHEIMO, M. et al. High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7073-7082, 2003.

PALOMARES, L. A. et al. **Recombinant Gene Expression: reviews and protocols**. 2. ed. New York, N.Y.: Springer Science & Business Media, 2004. V.267, 506 p.

PETRANOVIC D.; NIELSEN, J. Can yeast systems biology contribute to the understanding of human disease? **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 584-590, 2008.

POSS, C. Z.; EBMEIER, C. C.; TAATJES, D. J. The Mediator complex and transcription regulation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.6, p. 575-608, 2013.

RATNA, P. AND BECSKEI, A. Construction of cis-regulatory input functions of yeast promoters. **Methods in Molecular Biology**, v.734, p. 45-61, 2011.

REMÉNYI, A.; SCHÖLER, H. R.; WILMANN, M. Combinatorial control of gene expression. **Nature Structural and Molecular Biology**, v.11, p. 812-815, 2004.

ROEDER, G. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. **TIBS**, v.21, p. 327-335, 1996.

RONNE, H. Glucose repression in fungi. Review. **Trends in Genetics**, v.11, p. 12-17, 1995.

ROSE, M. D.; BROACH, J. R. Cloning genes by complementation in yeast. **Methods Enzymology**, v. 194, p. 195-230, 1991.

SAARELAINEN, R. et al. Expression of Barley Endopeptidase B in *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p. 4938-40, 1997.

SALINELLES, V. M. et al. Design of a chimeric promoter induced by pro-inflammatory mediators in articular chondrocytes. **FEBS Letters**, v. 518, p. 67-71, 2002.

SALOHEIMO, M., et al. A lignin peroxidase-encoding cDNA from the white-rot fungus *Phlebia radiata*: characterization and expression in *Trichoderma reesei*. **Gene**, v.85, p. 343-351, 1989.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbour; 1989.

SAMPAIO, P. N. et al. Production and characterization of recombinant cyprosin B in *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1A) strain. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.105, p. 305-312, 2008.

SCHLABACH, M. R., et al. Synthetic design of strong promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 107, p. 2538-2543, 2010.

SELINHEIMO, E., et al. Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **FEBS Journal**, v. 273, p. 4322-4335, 2006.

SHERMAN, F. Getting started with yeast. **Methods in Enzymology**, v.350, p. 3-41, 2002.

SHI, H. et al. RNA aptamers directed to discrete functional sites on a single protein structural domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.104, p. 3742–3746, 2007.

SIMM, C. et al. High-Throughput Screen for Identifying Small Molecules That Target Fungal Zinc Homeostasis. **PLOS ONE**, v. 6, p. 1-9, 2011.

SMALE, S. T.; KADONAGA, J. T. The RNA Polymerase II Core promoter. **Annual Review of Biochemistry**, v. 1351, p. 73-88, 2003.

STEIN, G. S.; SPELSBERG, T. C.; KLEINSMITH, L. J. Nonhistone Chromosomal Proteins and Gene Regulation. **Science**, v.183, p. 817-824, 1974.

STEPHEN, P. J.; TJIAN, R. O-Glycosylation of Eukaryotic Transcription Factors: Implications for Mechanisms of Transcriptional Regulation. **Cell**, v. 55, p. 125-133, 1988.

STRAUSS, J. et al. Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. **FEBS Letters**, v. 376, p. 103-107, 1995.

STRUHL, K. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v.14, p. 137-140, 1989.

STRUHL, K. Promoters, Activator Proteins, and the Mechanism of Transcriptional Initiation in Yeast. **Cell**, v.49, p. 296-297, 1987.

STRUHL, K. Yeast transcriptional regulatory mechanisms. **Annual Reviews of Genetics**, v.29, p.651-74, 1995.

SUDBERY, P. E. The expression of recombinant proteins in yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 517-524, 1996.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.72, p. 211-222, 2006.

THOMAS, B. J.; ROTHSTEIN, R. Elevated Recombination Rates in Transcriptionally Active DNA. **Cell**, v. 56, p. 619-630, 1989.

TRUMBLY, R. J. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microreview. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 15-21, 1992.

VAUTARD, G.; COTTON, P.; FÈVRE, M. The glucose repressor CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 453, p. 54-58, 1999.

WANG, B.; XIA, L. High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4568-4572, 2011.

WATSON, J. D. et al. **Biologia Molecular do Gene**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2006. 912 p.

WOODACRE, A. et al. Copper-dependent transcriptional regulation by *Candida albicans* Mac1p. **Microbiology**, v. 154, p. 1502-1512, 2008.

YONKOVICH, J. et al. Copper Ion-sensing Transcription Factor Mac1p Post-translationally Controls the Degradation of Its Target Gene Product Ctr1p. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 23981-23984, 2002.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Review Biotechnology Journal**. v.7, p. 620-634, 2012.

ZEILINGER, S. et al. The Hypocrea jecorina HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the cbh2 (cellobiohydrolase II-gene) activating element. **Molecular Genetics Genomics**, v.266, p. 56-63, 2001.

ZHANG, J. et al. Development of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* strain with enhanced β -glucosidase and filter paper activity using strong artificial cellobiohydrolase 1 promoter. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9815–9818, 2010.

ZHAO, H. et al. Regulation of Zinc Homeostasis in Yeast by Binding of the ZAP1 Transcriptional Activator to Zinc-responsive Promoter Elements. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 28713-28720, 1998.

ZHAO, H.; EIDE, D. Zap1p, a Metalloregulatory Protein Involved in Zinc-Responsive Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, p. 5044-5052, 1997.

ZHENG, D. et al. Regulation of ZIP and ZnT zinc transporters in zebrafish gill: zinc repression of ZIP10 transcription by an intronic MRE cluster. **Physiological Genomics**, v.34, p. 205-214, 2008.

ZHONG, Y., et al. Expression and secretion of the human erythropoietin using an optimized cbh1 promoter and the native CBH I signal sequence in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.165, p. 1169-1177, 2011.

ZHU, T. et al. A systematical investigation on the genetic stability of multi-copy *Pichia pastoris* strains. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 679-684, 2009.

ZOU, G. et al. Construction of a cellulose hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p.1-12, 2012.

ANEXO A – Descrição do plasmídeo *Pcbh1-mre/pYES2/CT/lacZ*

Plasmid DNA Description:

The synthetic gene pCBH1-MRE was assembled from synthetic oligonucleotides and/or PCR products. The fragment was cloned into pYES2_CT_lacZ_A355 using HindIII and BamHI cloning sites. The plasmid DNA was purified from transformed bacteria and concentration determined by UV spectroscopy. The final construct was verified by sequencing. The sequence congruence within the used restriction sites was 100%. See the accompanying data sheets for sequences and find the original ABI trace files as well as the assembled sequences electronically on disk. 5 µg of the plasmid preparation were lyophilized for shipping.

Plasmid Map:

Quality Assurance Documentation: 12AAFLC

Ref. No.: 1205046

Designation: E.coli K12 (dam+ dcm+ tonA rec-)

Gene name: pCBH1-MRE

Gene size: 1372 bp

Vector backbone: pYES2_CT_lacZ_A355

Cloning sites: HindIII / BamHI

Quantity: ~5 µg Plasmid DNA

Note: Please dissolve lyophilized DNA in 50 µl distilled water or 10 mM Tris-HCl (pH 8.0). We recommend sequence verification after each transformation step.

Date: 11 June 2012

Meike Brodt

Quality control

GeneArt AG www.lifetechnologies.com GeneArtSupport@lifetech.com