PATRICIA PEREIRA ADRIANI

Sistema de expressão induzido por estradiol em
Saccharomyces cerevisiae

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

São Paulo
2016

PATRICIA PEREIRA ADRIANI

Sistema de expressão induzido por estradiol em
Saccharomyces cerevisiae

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde.

Versão original

São Paulo
2016

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

© reprodução total

Adriani, Patrícia Pereira.

Sistema de expressão induzido por estradiol em *Saccharomyces cerevisiae* / Patrícia Pereira Adriani. -- São Paulo, 2016.

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: Sistema de expressão.

Versão do título para o inglês: Expression system induced by estradiol in *Saccharomyces cerevisiae*.

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Sistema de expressão 3. Promotor
4. Levedura 5. Estrogênio 6. *Trichoderma reesei* 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/SBIB026/2016

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

Candidato(a): Patrícia Pereira Adriani.

Título da Dissertação: Sistema de expressão induzido por estradiol em
Saccharomyces cerevisiae.

Orientador(a): Prof. Dr. 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, 01 de outubro de 2013.

Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Junior – Orientador
Patrícia Pereira Adriani – Orientanda
Projeto de Mestrado – “Sistema de Expressão Induzido por Estradiol em Trichoderma reesei”
Instituição – Escola de Artes, Ciências e Humanidades – EACH/USP

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 todo o meu trabalho e esforço aos meus pais, Wilson Adriani e Silvana Adriani por sempre estarem ao meu lado. Mesmo que a palavra “obrigado” signifique tanto, não expressará por inteiro o quanto o apoio e incentivo de vocês foram e é importante pra mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade e crescimento pessoal e profissional que esse mestrado me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergó Alcalde pela confiança, humildade, incentivo, aprendizagem e paciência. Você foi essencial para que eu chegasse até aqui. Obrigada por toda ajuda e compreensão!

À todos os professores que eu tive, a oportunidade de conhecer e conviver e que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho. Em especial ao Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Junior pela ajuda e profissionalismo.

À todos os alunos, funcionários e professores do Laboratório de Biotecnologia da Escola de Artes Ciências e Humanidades (EACH-USP) que eu convivi durante esses anos, em especial ao Gabriel Stephani de Oliveira, Flávia Garcia Borges, Rafaela Maria dos Anjos e Jeniffer Farias pelas risadas, ajuda, incentivo e principalmente pela amizade.

Aos meus pais, irmão, amigos, familiares e namorado por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado, me dando força e apoio.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

E aos demais que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Muito Obrigada!

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se
chegar a um objetivo.”*

José de Alencar

RESUMO

ADRIANI, P. P. **Sistema de expressão induzido por estradiol em *Saccharomyces cerevisiae***. 2016. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Devido as suas características funcionais, as proteínas vêm sendo cada vez mais utilizadas em diferentes áreas e atividades da sociedade humana como: alimentícia, indústria, têxtil, papel e celulose, química e médica. A produção industrial de proteínas de valor comercial para diversas aplicações, vem sendo cada vez mais conduzida através do desenvolvimento de sistemas de expressão em diferentes hospedeiros, como *Saccharomyces cerevisiae*. O presente trabalho teve por objetivo desenhar um sistema de expressão metabolicamente independente induzido pelo hormônio estradiol que, em *S. cerevisiae*, seja capaz de produzir e secretar com eficiência proteínas homólogas e/ou heterólogas de interesse industrial. Para tanto, foi desenhado e construído um plasmídeo regulador (que expressa o fator de transcrição quimérico c-myc–Gal4(DBD)–hER α (LBD)–VP16(AD) e um plasmídeo de expressão (que contém o promotor quimérico p5xUAS_{GAL}–UARcb1, o qual será induzido pelo fator de transcrição quimérico, regulando a expressão da proteína repórter celobiohidrolase I – *cbh1* de *Trichoderma reesei*). Ambos plasmídeos foram utilizados para transformar a cepa ScW303-1A/*pdr5* Δ (construída neste trabalho) e induzido com diferentes concentrações de estradiol. Para analisar a habilidade do promotor em dirigir a expressão da proteína repórter *cbh1*, foi feito o teste de DNS, com os transformantes selecionados, utilizando carboximetilcelulose 1% como substrato. A maior atividade enzimática ocorre na indução do sistema com 5 μ M de 17- β -estradiol e DES (dietilestilbestrol). Os resultados mostram que o sistema de expressão induzido por 17- β -estradiol e DES, funciona de forma eficiente em *S. cerevisiae* e que o mesmo pode ser utilizado na produção biotecnológica de outras proteínas de interesse.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Sistema de expressão. Promotor. Levedura. Estrogênio. *Trichoderma reesei*. Proteína.

ABSTRACT

ADRIANI, P. P. **Expression system induced by estradiol in *Saccharomyces cerevisiae***. 2016. 113 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Due to its functional characteristics, the proteins are being increasingly used in different areas and activities of human society: food, industry, textile, pulp and paper, chemical and medical. The industrial production of commercially valuable proteins for various applications is increasingly being conducted through the development of systems of expression in different hosts such as *Saccharomyces cerevisiae*. This study aimed to design a metabolically independent expression system induced by estradiol hormone in *S. cerevisiae* is able to produce and secrete effectively homologous proteins and / or heterologous of industrial interest. Thus, it was designed and built a regulatory plasmid (expressing the chimeric transcription factor c-myc-Gal4 (DBD) -hER α (LBD) - VP16 (AD) and an expression plasmid (which contains the chimeric promoter 5xUAS_{GAL}- UARcb1, which is induced by the chimeric transcription factor, regulating the expression of the reporter protein *cellobiohydrolase I* - cbh1 of *Trichoderma reesei*). Both plasmids were used to transform ScW303-1A / *pdr5* Δ strain (constructed in this work) and induced with different concentrations of estradiol. To analyze the ability of the promoter to direct the expression of the reporter protein cbh1, the DNS testing, with the selected transformants was done using 1% carboxymethylcellulose as a substrate. The highest enzymatic activity occurs in the induction system with 5 μ M of 17- β -estradiol and DES (diethylstilbestrol). The results show that the expression system induced by 17- β -estradiol and DES operates efficiently in *S. cerevisiae* and that it can be used for the biotechnological production of other proteins of interest.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. Expression system. Promoter. Yeast. Estrogen. *Trichoderma reesei*. Protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da hidrólise enzimática da molécula de celulose através da ação das enzimas endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase.....	21
Figura 2. Região promotora de <i>S. cerevisiae</i> com os elementos <i>cis</i> atuantes: UAS, caixa TATA e Inr em destaque.	27
Figura 3. Domínios de ligação ao DNA de fatores de transcrição de levedura.	32
Figura 4. Desenho estrutural da proteína de ligação a TATA (TBP)	34
Figura 5. Complexo de iniciação da transcrição.....	35
Figura 6. Mecanismo de funcionamento do receptor hormonal por estrogênio.	42
Figura 7. Sistema de expressão de proteínas induzido por estradiol.	44
Figura 8. Esquema representativo da transformação integrativa em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1A.....	51
Figura 9. Esquema da técnica de Rompimento Gênico em Passo Único.	54
Figura 10. Mapa esquemático dos plasmídeos	61
Figura 11. Sequência de DNA e aminoácidos da construção presente no plasmídeo regulador.....	63
Figura 12. Sequência de DNA e aminoácidos da construção presente no plasmídeo de expressão.	64
Figura 13. Análise da construção do plasmídeo regulador.....	65
Figura 14. Análise da construção do plasmídeo de expressão.	66
Figura 15. Eletroforeses em gel de agarose 1% da amplificação do gene <i>KanMX</i> com cauda do gene <i>PDR5</i> amplificado a partir do DNA genômico da cepa <i>S. cerevisiae</i> BY4741 <i>pdr5</i> Δ (linha 1, 2, 3 e 4).....	69
Figura 16. Placas de cultura demonstrando o crescimento de transformantes em meio YPD geneticina.	69
Figura 17. Eletroforeses em gel de agarose 1% da extração de DNA genômico.	70
Figura 18. Eletroforeses em gel de agarose 1% para confirmação da integração do gene <i>KanMX</i> no locus de <i>PDR5</i> por PCR.....	70
Figura 19. Teste de crescimento diferencial.....	72
Figura 20. Curva de crescimento em YPD..	74

Figura 21. Curva de crescimento YP Sacarose 2%.....	74
Figura 22. Curva de crescimento em YP Glicerol 2%.....	75
Figura 23. Curva de crescimento em YP Galactose 2%.....	76
Figura 24. Curva de crescimento cepa controle (W303-1A) em meio YP Sacarose 2% suplementado com diferentes concentrações de 17- β -estradiol.....	78
Figura 25. Curva de crescimento do transformate 2 em meio YP Sacarose 2% suplementado com diferentes concentrações de 17- β -estradiol.....	79
Figura 26. Curva de crescimento do transformate 4 em meio YP Sacarose 2% suplementado com diferentes concentrações de 17- β -estradiol.....	79
Figura 27. Curva de crescimento do transformate 5 em meio YP Sacarose 2% suplementado com diferentes concentrações de 17- β -estradiol.....	790
Figura 28. Determinação da atividade enzimática da enzima <i>cbh1</i>	82
Figura 29. Determinação da atividade enzimática da enzima <i>cbh1</i> na presença de E ₂ e DES.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no trabalho.....	48
Tabela 2. Características dos plasmídeos construídos.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - microgramas

µl - microlitros

µM - micromolar

Abs - Absorbância

AD – Domínio de Ativação (*activation domain*)

bHLH – *basic helix – loop – helix*

bZIP – zipper de leucina

cbh1 – celobiohidrolase I

CIAP – *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*)

CMC - Carboximetilcelulose

DBD – Domínio de Ligação ao DNA (*DNA binding domain*)

DES – Dietilestilbestrol

DNS – ácido dinitrosalicílico

E₂ – 17-β-estradiol

E. coli – *Escherichia coli*

ERE – Elemento de resposta a estrogênio

GTFs – Fatores Gerais de Transcrição (*General transcription factors*)

hERα - Receptor de estrogênio humano alpha

HTH – hélice – alça –hélice

LBD – Domínio de ligação ao ligante (*Ligand binding domain*)

TF – Fator de transcrição

Inr - Iniciador

MDR – Resistência á multidrogas

mg - miligramas

mL - mililitros

mRNA – RNA mensageiro

nM – nanomolar

pb – pares de bases

Pcbh1 – Promotor celobiohidrolase I

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDR – *Pleiotropic drugs resistance*

PEG - Polietilenoglicol

rpm – rotação por minuto

rRNA – RNA ribossomal

RNA pol I – RNA polimerase I

RNA pol II – RNA polimerase II

RNA pol III – RNA polimerase III

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

TBP – Proteína de ligação à TATA (*TATA binding protein*)

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

tRNA – RNA transportador

T. ressei – *Trichoderma ressei*

UAS – Sequência Ativadora à Montante (*Upstream activation sequence*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Biocombustíveis	20
2.2	Hidrólise Enzimática da Celulose e <i>Trichoderma reesei</i>	21
2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.4	Regulação Transcricional em Eucariotos.....	26
2.4.1	<i>Elementos cis atuantes</i>	27
2.4.1.1	<i>Sequências Ativadoras a Montante (UAS)</i>	27
2.4.1.2	<i>Caixa TATA</i>	28
2.4.1.3	<i>Elemento Iniciador (Inr)</i>	28
2.4.2	<i>Fatores de Transcrição (TFs)</i>	29
2.4.3	<i>Proteínas reguladoras da transcrição</i>	32
2.4.4	<i>Iniciação da Transcrição em Eucariotos</i>	33
2.5	O sistema de expressão.....	35
2.5.1	<i>Saccharomyces cerevisiae como hospedeiro de Sistema de Expressão</i>	38
2.5.2	<i>Compostos Estrogênicos</i>	40
2.5.3	<i>Sistema de Expressão Induzido por Hormônio</i>	42
3	JUSTIFICATIVA	45
4	OBJETIVO GERAL	46
4.1	Objetivos específicos	46
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
5.1	Cepas e condições de cultura	47
5.2	Manipulação de DNA e técnicas gerais de biologia molecular.....	47
5.3	Construção dos plasmídeos.....	48
5.4	Transformação de bactérias e leveduras	50
5.5	Extração de DNA de levedura.....	52
5.6	Sequenciamento de DNA	52
5.7	Inativação do gene PDR5	53
5.8	Ensaio de resistência para Triton X-100	54
5.9	Curva de crescimento	54
5.10	Análise da atividade Enzimática da celobiohidrolase I	55

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6.1	Desenho e Construção do Sistema de Expressão	57
6.2	Transformação e Preparação de DNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
6.3	Estabilização e confirmação da inativação do gene <i>PDR5</i>	67
6.4	Teste de resistência a Triton X-100	71
6.5	Análise do Crescimento	72
6.6	Atividade enzimática	80
7	CONCLUSÕES	85
8	PERSPECTIVAS	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE A: Resumo de trabalho apresentado na 45a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).	101
	APÊNDICE B: Resumo de trabalho apresentado na 44a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e 23º Congresso da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.	1012
	APÊNDICE C: Capítulo de livro intitulado “ <i>Biomass and Bioenergy</i> ” em <i>Energy Science and Technology</i> , volume 7: <i>bioenergy</i> , ISBN 1626990689 Studium Press LLC, USA.	103
	APÊNDICE D: Pedido de patente referente ao trabalho “Enzima Recombinante Époxido Hidrolase de <i>Trichoderma reesei</i> , purificação, atividade enantioseletiva e aplicações.	104
	APÊNDICE E: Artigo submetido para publicação intitulado “Epoxide hydrolase from the fungus <i>Trichoderma reesei</i> : biochemical properties and conformational characterization”	105

1 INTRODUÇÃO

As proteínas desempenham diversas funções importantes nos processos biológicos, entre elas: estrutural (participa da estrutura celular, conferindo forma, suporte e resistência à célula), reserva energética (podem ser degradadas em acetil CoA para o ciclo de Krebs), proteção imune (anticorpos), hormonal (responsáveis por regular diversas atividades metabólicas) e enzimática (atuam como catalisadores de reações químicas) (NELSON; COX, 2014; TYERS; MANN, 2003).

Devido as suas características funcionais, as proteínas vêm sendo cada vez mais utilizadas em processos industriais de diferentes áreas: alimentícia, têxtil, papel e celulose, química e médica. Na área médica, por exemplo, as proteínas são utilizadas em diversos produtos clínicos humanos para tratamento de diferentes doenças, como no caso da diabetes.

Pessoas diabéticas apresentam deficiência na produção de insulina (hormônio responsável por metabolizar a glicose no organismo), fazendo com que a glicose se acumule no sangue e na urina. Pessoas com algum tipo de diabetes podem necessitar de tratamento com insulina em algum estágio da doença. A obtenção dessa proteína pode ser feita extrativamente, ou seja, diretamente de algum organismo que a produz, ou a partir de sua produção por organismos geneticamente modificados.

A obtenção de proteínas diretamente dos organismos que as produzem, além de ser limitada, normalmente leva a baixos rendimentos, o que pode tornar o processo de extração economicamente inviável. Dessa forma, a produção dessas moléculas através de organismos geneticamente modificados demonstra-se uma alternativa praticável por utilizar-se de processos que sejam capazes de produzir proteínas em altas concentrações e preferencialmente que permitam as mesmas de serem isoladas (como no sobrenadante do cultivo) (ROCHA, 2010). Entre as diversas técnicas disponíveis atualmente, a tecnologia do DNA recombinante é a mais utilizada, por permitir a manipulação genética de diferentes organismos e consequentemente aumento da produção de determinadas proteínas de interesse comercial (JAYARAJ; SMOOKER, 2009; YOUNG; BRITTON; ROBINSON, 2012).

Através da tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível o desenvolvimento de sistemas de expressão, ou seja, a inserção e expressão dos

respectivos genes codificadores de interesse a fim de otimizar ou potencializar a produção de diversas proteínas (ROCHA, 2010). Porém, para que o desenvolvimento desses sistemas sejam viáveis, é necessário considerar alguns fatores, como a qualidade da proteína, a sua funcionalidade, a velocidade e custo de produção, o rendimento e o hospedeiro que será utilizado (leveduras, bactérias, células animais em cultura, plantas, etc) (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; JAYARAJ; SMOOKER, 2009).

Entre os hospedeiros, a bactéria *Escherichia coli* é o organismo mais utilizado para a produção de proteínas homólogas e ou heterólogas, devido à quantidade de informações conhecidas referente à sua genética, metabolismo, fisiologia e tecnologia de fermentação. Contudo, existem algumas limitações em sistemas de expressão bacterianos, como o fato de muitas proteínas expressas serem concentradas em corpos de inclusão intracelulares e a incapacidade das bactérias fazerem modificações pós-traducionais, como por exemplo, a glicosilação. Esses fatos acabam impedindo a utilização desse organismo como hospedeiro para a produção de determinadas proteínas recombinantes, sendo indicado a utilização de hospedeiros eucariotos (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016; GOPAL; KUMAR, 2013; HAMILTON; GERNGROSS, 2007; TERPE, 2006).

Dentre os organismos eucarióticos utilizados para sistemas de expressão, as leveduras combinam as vantagens de organismos unicelulares (facilidade de manipulação genética), com a capacidade de processamento típico de eucariotos (organização da estrutura tridimensional e edições pós-traducionais), em conjunto com a ausência de endotoxinas (PORRO et al., 2005). Em eucariotos, como leveduras, também é possível adicionar uma sequência sinal adequada a montante da região codificadora do gene, que permite direcionar a proteína de interesse para o meio extracelular (ROCHA, 2010).

Diferentes proteínas podem ser produzidas por sistemas de expressão, entre elas as enzimas são as que apresentam um elevado interesse econômico por possuírem função catalisadora. As enzimas são utilizadas em grande escala, em diversas indústrias como: tecidos (celulases, amilases, oxirredutases), detergentes (proteases, lipases, celulases, oxirredutases), alimentos (amilases, pectinases e celulases), papel e celulose (xilanases, lipases) e couro (proteases e lipases) (NIELSEN; OXENBOLL, 1998). Estudos relacionados a sistemas de expressão são

de grande interesse industrial, pois podem contribuir significativamente para a redução do custo de produção das enzimas de interesse comercial.

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. Em 2007 o mercado mundial de enzimas estava estimado em 4 bilhões de dólares, dos quais, aproximadamente, 60% era atribuído a enzimas industriais produzidas na Europa e os outros 40% restantes eram produzidas nos Estados Unidos e Japão. Na América Latina, a demanda por enzimas estava concentrada principalmente no Brasil, Chile e Argentina (COSTA et al., 2007).

Até o momento a maioria das empresas que produzem enzimas de interesse industrial estão localizadas 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).

Considerando todo esse contexto, 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.

Entre as enzimas de interesse no Brasil, podemos citar as celulasas. As celulasas contribuem em cerca de 8% da demanda de enzimas industriais em todo o mundo, sendo esse um produto bem conhecido e de alto valor comercial (COSTA et al., 2007). As celulasas estão envolvidas em diversos processos industriais, entre eles a hidrólise enzimática de materiais lignocelulolíticos para a produção de biocombustíveis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biocombustíveis

Durante as últimas décadas, o consumo excessivo de combustíveis fósseis tem contribuído consideravelmente para o aumento do índice de poluição, principalmente em áreas urbanas. Devido a este problema, o bioetanol, um produto renovável e limpo, vem sendo amplamente utilizado como combustível alternativo, por reduzir o efeito estufa e a poluição do ar, beneficiando assim a saúde pública (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). Atualmente, existem duas classes de bioetanol: bioetanol de primeira geração e bioetanol de segunda geração.

O bioetanol de primeira geração é produzido a partir de matérias-primas comestíveis como milho, soja e cana-de-açúcar. Essas matérias-primas são submetidas à fermentação dos açúcares por cepas de leveduras convencionais. Apesar dessa tecnologia estar consolidada com a crescente demanda do uso de biocombustíveis, atualmente existe uma insegurança em sua utilização devido a competição do solo pela produção de alimentos, levando conseqüentemente, a mudanças na utilização da terra e possíveis desmatamentos (DAROCH et al., 2013; LU et al., 2011).

Bioetanol de segunda geração é obtido a partir da biomassa vegetal, ou seja, envolve o processamento biológico de material lignocelulósico, por exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar, que é composto por celulose, hemicelulose e lignina (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; DAROCH et al., 2013). O processo de produção desse tipo de biocombustível pode ser dividido basicamente em quatro etapas: Pré-tratamento da biomassa, hidrólise enzimática, fermentação dos açúcares e recuperação do etanol. Entre as etapas citadas, pode-se destacar a hidrólise enzimática da celulose, considerada o método mais eficiente e menos contaminante para obter glicose a partir de lignocelulose.

2.2 Hidrólise Enzimática da Celulose e *Trichoderma reesei*

A hidrólise enzimática da celulose requer a ação sinérgica de três classes de enzimas celulolíticas (celulases): endoglucanases, celobiohidrolases ou exoglucanases e β -glicosidases. As endoglucanases clivam aleatoriamente as ligações 1,4- β -glicosídicas, resultando em novos oligossacarídeos de comprimentos variáveis. Celobiohidrolase ou exoglucanases produzem celobiose através da clivagem das cadeias extremas da celulose, as β -glicosidases hidrolisam a celobiose para produzir glicose (figura 1) (DUFF; MURRAY, 1996; ILMÉN et al., 1996; RIZK; ANTRANIKIAN; ELLEUCHE, 2012).

Apesar da grande quantidade de trabalhos científicos sobre componentes e mecanismos envolvidos na hidrólise enzimática de material lignocelulolítico e da conversão da biomassa vegetal em etanol ser bem conhecida atualmente, a produção de bioetanol ainda não se tornou uma realidade industrial viável. Pois, o custo das enzimas necessárias ao processo de conversão do material lignocelulolítico chega a ser responsável por cerca de 40% dos custos totais de produção. Isso ocorre devido à falta de sistemas eficientes de produção enzimática de baixo custo (BON; FERRARA, 2007; CARDONA; SANCHEZ, 2007; CANILHA et al., 2012; IMMANUEL et al., 2007; JOHN et al., 2011; SINGHANIA et al., 2007).

Figura 1. Representação da hidrólise enzimática da molécula de celulose através da ação das enzimas endoglucanase, celobiohidrolase e β -glicosidase. Fonte: RIZK; ANTRANIKIAN; ELLEUCHE, 2012

Diferentes organismos (fungos e bactérias) são conhecidos devido a sua capacidade de degradarem celulose. Entre eles, o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é considerado o produtor de enzimas celulolíticas mais eficiente (MONTENECOURT, 1983).

O sistema celulolítico de *T. reesei* envolvendo o promotor celobiohidrolase I (*Pcbh1*) é conhecido devido a sua capacidade de ser induzido por diferentes sacarídeos como celulose, sacarose e lactose em, pelo menos, 1000 vezes (CARLE-URIESTE et al., 1997). No entanto ele é regulado por repressão catabólica, sendo reprimido pelo produto da degradação do próprio sacarídeo, ou seja, a glicose (ABRAHÃO-NETO et al., 1995; ILMÉN et al., 1996; ILMÉN; THRANE; PENTTILA, 1996). Porém, com as técnicas de gene-knockout, engenharia genética, e sistemas de transformação tornou-se possível o desenvolvimento de cepas capazes de produzir e secretar grandes quantidades de proteínas homólogas e/ou heterólogas (BOUWS; WATTENBERG; ZORN, 2008; CHERRY; FIDANTSEF, 2003; MARTINEZ et al., 2008; VINZANT et al., 2001).

Para o desenvolvimento de sistemas de expressão são necessários alguns componentes básicos, são eles: (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).

Sabendo que a escolha do promotor para uma eficiente transcrição é essencial no desenvolvimento de sistemas de expressão e considerando o conhecimento em torno do *Pcbh1* de *T. reesei*, diversos estudos têm sido desenvolvidos utilizando-se desse promotor a fim de otimizar a expressão gênica de diferentes proteínas.

Entre os diversos trabalhos desenvolvidos, Liu e colaboradores (2008), analisou a região promotora de 2.2 kb do gene *cbh1* caracterizando 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; THRANE; PENTTILA, 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).

Outro estudo realizado por Zou et al e colaboradores (2012) 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.

Os estudos citados acima demonstraram a habilidade funcional de promotores artificiais *Pcbh1* sem repressão por glicose e com maior força de expressão. No entanto, quando o promotor *cbh1* 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. Tais indutores podem levar a expressão de outros componentes do sistema, tornando a expressão não seletiva. O excesso de proteínas irrelevantes acaba dificultando a seleção das proteínas de interesse. Além disso, proteases extracelulares podem ser produzidas simultaneamente e interferirem no rendimento (LI et al., 2012; ZOU et al., 2012).

Devido as dificuldades apresentadas, 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 afim de minimizar os efeitos no metabolismo celular.

Embora o uso de sistemas de expressão em *T. reesei* apresentarem vantagens, alguns problemas também são encontrados na sua utilização em estudos, como a forma filamentosa de crescimento, que causa dificuldades na aeração e homogeneização, o tempo de cultivo, é necessário de 7 a 10 dias diferente do que acontece em um crescimento unicelular de leveduras (WIEBE, 2003).

As leveduras têm sido amplamente utilizadas como organismo modelo para o desenvolvimento de sistemas de expressão, por ser um fungo unicelular que se divide por brotamento muito rapidamente (em torno de 90 minutos cada divisão) e ser de fácil manipulação (SHERMAN, 2002; SMITH et al., 1985). Além de apresentar os mecanismos celulares básicos (recombinação, metabolismo, etc) e a regulação transcricional conservados com eucariotos (SHERMAN, 2002).

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Leveduras são fungos unicelulares conhecidos principalmente pela sua habilidade de fermentar açúcares para a produção de etanol. Existem cerca de 600 espécies descritas, agrupadas em 80 gêneros. Elas são caracterizadas devido à grande dispersão nos habitats naturais, pois são comuns em folhas de plantas e flores, solo e água salgada. Também são encontradas na superfície da pele e no trato intestinal de animais de sangue quente, onde podem viver em simbiose ou como parasitas (SHERMAN, 2002; SMITH et al., 1985).

Entre as diferentes leveduras existentes, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* se tornou um sistema-modelo para estudos após experimentos genéticos realizados por Fred Sherman nos anos de 1960 e 1970 sobre a estrutura de genes e os efeitos de mutações em proteínas e desde então tem recebido cada vez mais atenção por diversos pesquisadores de diferentes linhas de pesquisa (SHERMAN, 2002; FELDMANN, 2010).

Dentre as inúmeras vantagens que tornam *S. cerevisiae* apropriada para estudos biológicos, elas destacam-se por apresentar crescimento rápido, sistema genético bem definido, por ser um microrganismo não-patogênico, ou seja, sua manipulação pode ser realizada sem muitas precauções, fácil isolamento de mutantes, rompimento gênico viável com numerosos marcadores e sistema de transformação de DNA versátil (SHERMAN, 2001; SHERMAN, 2002).

Devido a sua crescente importância biológica e facilidade de manipulação a levedura *S. cerevisiae* teve seu genoma totalmente sequenciado em 1996 por Goffeau e colaboradores. Seu genoma é relativamente pequeno, possuindo cerca de 6000 genes, e o DNA cromossômico possui 12.068 kilobases, subdivididos em 16 cromossomos. Com as informações sobre seus aspectos genômicos juntamente com o desenvolvimento das técnicas de transformação de DNA (epissomal e integrativa), a levedura tornou-se particularmente acessível para a clonagem de genes e técnicas de engenharia genética (CLIFTEN et al., 2003; GERSHON; GERSHON, 2000; GOFFEAU et al., 1996; SHERMAN, 2001).

Em virtude das suas características *S. cerevisiae* tem sido amplamente utilizada como modelo de estudo para o entendimento da célula eucariótica há mais de meio século. Por exemplo, através da técnica de 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, 2001; SMITH et al., 1985), possibilitando um maior conhecimento da maquinaria celular e desenvolvimento de diversos estudos relacionados a sistemas de expressão.

Como no trabalho realizado por Carraro e colaboradores (1998) que demonstraram que o promotor *cbhl* de *T. reesei* é capaz de controlar e ativar a transcrição em *S. cerevisiae*, enquanto que Madhavan e Sukumaran (2014) observaram essa habilidade na levedura *Kluyveromyces lactis*. Confirmando a ideia da conservação dos mecanismos de regulação transcricional entre eucariotos.

Devido a esses e outros fatores e considerando a ideia de conservação dos mecanismos de regulação da transcrição nos eucariotos atualmente *S. cerevisiae* tem sido amplamente utilizada como hospedeiro de expressão de proteínas recombinantes homólogas e/ou heterólogas, visando um melhor desempenho da maquinaria celular e consequentemente maior produção de enzimas com potencial utilização industrial, como as necessárias para a degradação da biomassa. Porém, para que isso seja possível é necessário o conhecimento prévio de toda a maquinaria de transcrição de eucariotos, que é muito mais complexa do que as de procariotos (NEVALAINEN; TE'O; BERQQUIST, 2005).

2.4 Regulação Transcricional em Eucariotos

De forma geral, a estrutura de um gene eucariótico pode ser dividida em duas porções: a região codificadora, a qual é transcrita em mRNA no núcleo e, posteriormente, traduzida em proteína no citoplasma, localizada a jusante do sítio de início de transcrição; e a região promotora localizada a montante do sítio de início da transcrição, responsável pela regulação transcricional.

A regulação transcricional influencia muitos fenômenos biológicos como crescimento celular, desenvolvimento de doenças e resposta a mudanças ambientais. Em organismos eucarióticos a transcrição é complexa, pois, ao contrário da expressão gênica procariótica, que muitas vezes utiliza proteínas individuais para a transcrição, a regulação gênica eucariótica envolve a interação e combinação de múltiplas proteínas (STRUHL, 1994; STRUHL, 1995), entre elas, as RNA polimerases.

As RNA polimerases são enzimas que possuem a função de catalisar a transcrição do DNA, tanto em organismos procarióticos como em organismos eucarióticos. Em eucariotos existem três tipos de RNA polimerases, as quais atuam em promotores estruturalmente distintos e 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 (mRNA), que codificam para proteínas; e a RNA polimerase III (RNA pol III) transcreve o rRNA 5S e o RNA transportador (tRNA), entre outros (KORDE et al., 2014). Em particular, o processo de transcrição mediado pela RNA pol II é altamente conservado em diversos organismos eucariotos e, em alguns casos, os componentes do processo são funcionalmente substituíveis.

A região promotora de qualquer gene é composta por sequências de DNA que funcionam como sítios de reconhecimento para a maquinaria da transcrição. A iniciação transcricional pela RNA pol II depende de múltiplas sequências de DNA, denominadas elementos *cis* atuantes (JACKSON; TJIAN, 1988; STRUHL, 1994; WINSTON et al., 1992).

2.4.1 Elementos *cis* atuantes

Os elementos *cis* atuantes são sequências de DNA que fazem com que cada gene seja capaz de responder à presença ou ausência de vários estímulos. Os estímulos são apresentados para o gene através da concentração e atividade dos fatores de transcrição; esses, por sua vez, ligam-se às sequências *cis* atuantes presentes na região promotora, regulando o processo de iniciação da transcrição (YUH; BOLOURI; DAVIDSON, 2001).

Para os genes transcritos pela RNA polimerase II, a iniciação transcricional precisa e eficiente é dependente de múltiplas sequências de DNA *cis* atuantes (JACKSON; TJIAN, 1988). Como pode ser visto na figura 2, os promotores de leveduras possuem essencialmente três tipos básicos de elementos de sequência de DNA, são elas: Sequências Ativadoras a Montante (*Upstream Activation Sequence*, UAS), caixa TATA e elemento iniciador (Inr) (STRUHL, 1989a).

Figura 2. Região promotora de *S. cerevisiae* com os elementos *cis* atuantes: UAS, caixa TATA e Inr em destaque. Fonte: ADRIANI, P. P., 2016.

2.4.1.1 Sequências Ativadoras a Montante (UAS)

Os elementos UAS são sequências curtas de DNA, possuem cerca de 10 a 30 pb, e geralmente estão localizadas de 50 a 500pb a montante do sítio de iniciação da transcrição. As sequências UAS de levedura são análogas e, em alguns casos, homólogas às sequências *enhancer* de mamíferos. Os elementos UAS funcionam de forma bidirecional e a distâncias variáveis a montante do sítio de iniciação. Geralmente quando localizados a jusante são incapazes de ativar a transcrição (STRUHL, 1995).

De modo geral, a quantidade e posição dessas sequências pode influenciar diretamente o nível da expressão de um determinado gene, pois os elementos UAS

são reconhecidos por proteínas de ligação ao DNA, conhecidas como fatores de transcrição; esses, por sua vez, são capazes de regular a atividade de um dado promotor (HAHN; YOUNG, 2011; STRUHL, 1995; SWAMY et al., 2009). No entanto, aproximadamente 20% de promotores de levedura apresentam homopolímeros dA:dT, que possuem função semelhante às sequências UAS, porém, devido a características intrínsecas, não precisam interagir com uma proteína de ligação ao DNA específica (IYER; STRUHL, 1995).

2.4.1.2 Caixa TATA

A Caixa TATA é uma região rica em adeninas e timinas, ela contém aproximadamente de 6 a 8 pb na sequência consenso TATAAA. Na maioria dos eucariotos, as sequências TATA encontram-se inseridas de 25 a 30 pb de distância a montante do sítio de iniciação da transcrição. Em leveduras, essas sequências podem ser encontradas a uma distância de 40 a 120 pb a montante do mesmo sítio (STRUHL, 1995).

Os elementos TATA são reconhecidos pela proteína de ligação à caixa TATA, denominada TBP (*TATA binding protein* – proteína de ligação à caixa TATA), um componente básico necessário para formação e ativação do complexo de transcrição (MOGNO et al., 2010; STRUHL, 1994).

A maioria dos promotores de levedura contém esses elementos, considerados de extrema importância para início da transcrição. Apesar de serem necessários e considerados os mais importantes para os promotores da RNA pol II, os elementos TATA 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).

2.4.1.3 Elemento Iniciador (*Inr*)

Em levedura, o elemento iniciador localiza-se entre as posições -3 e +5, próximo ao sítio de iniciação do RNAm. O *Inr* tem pouco efeito sobre o nível de expressão, mas é o principal determinante de onde inicia a transcrição. Uma vez que está próximo ao sítio de iniciação, esse elemento pode apresentar uma sequência

específica de maior afinidade com a RNA pol II, podendo atuar sozinho ou em conjunto com o elemento 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 (HERNANDEZ, 1993; SMALE; KADONAGA, 2003).

Em cada caso, os elementos *cis* (UAS, caixa TATA e Inr) 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 (JACKSON; TJIAN, 1988).

2.4.2 Fatores de Transcrição (TFs)

Um componente importante da regulação transcricional é o recrutamento para regiões específicas do DNA, de proteínas conhecidas como fatores de transcrição. O controle da expressão gênica depende principalmente da interação entre os fatores de transcrição (TFs) e dos elementos *cis* atuantes presentes no promotor. Para que haja uma transcrição eficiente, é necessária a ação combinatória e sinérgica dessas proteínas (MOGNO et al., 2010; REMÉNYI et al., 2004; STRUHL, 1995;).

De acordo com o Banco de dados *Yeasttract* (<http://www.yeasttract.com>; TEIXEIRA et al., 2006), existem em média 169 genes designados como TFs, tornando-os uma das classes mais abundantes de proteínas no genoma de leveduras.

Entre os organismos eucariotos, os fatores de transcrição possuem estruturas semelhantes e domínio de ligação ao DNA sítio- específico; também é possível encontrar em uma grande variedade de espécies domínios de ligação ácidos (constituídos de resíduos de aminoácidos ácidos), esses interagem diretamente com a maquinaria transcricional, estimulando a transcrição (STRUHL, 1989).

De forma geral, os TFs podem ser divididos em três classes com base no tipo de domínio de ligação ao DNA (*DNA binding domain*, DBD) que contêm, sendo:

estabilizados por dedo de zinco, hélice-alça-hélice e tipo zíper (HAHN; YOUNG, 2011).

DBDs contendo dedos de zinco é o grupo mais abundante em todos os organismos, podendo ser subdivido em: C2H2 *zinc fingers*, C4 ou GATA *fingers* e C6 *zinc knuckle* ou Zn2Cys6 *binuclear zinc cluster*. Leveduras também possuem pelo menos um TF cujo domínio de ligação ao DNA é estabilizado por Cu^{+2} (HAHN; YOUNG, 2011). O domínio de ligação ao DNA dedos de zinco é um dos domínios de fatores de transcrição mais comuns entre os eucariotos. Essas proteínas são formadas por duas ou mais unidades de repetições de dedos de zinco, duas folhas beta, uma alfa hélice e um íon de zinco ligado a dois resíduos de cisteína e dois de histidina. Cada dedo de zinco possui uma sequência específica de ligação ao DNA, localizada na parte amino-terminal da alfa hélice (BOHM et al., 1997; HAHN; YOUNG, 2011; MACPHERSON; LAROCHELLE; TURCOTTE, 2006).

Em *S. cerevisiae*, a classe dedos de zinco conhecida como C4 ou GATA, consiste de proteínas envolvidas principalmente no metabolismo de nitrogênio. Esses fatores de transcrição se ligam a uma sequência de DNA denominada GATA [(A / T) GATA (A / G)] através de dois domínios dedos de zinco (COOPER, 2002; URNOV, 2002).

As proteínas C6 possuem em seu domínio de ligação do DNA dois íons de zinco ligados a seis resíduos de cisteína. Os fatores de transcrição C6 flanqueiam sequências trinucleotídicas CGG; a orientação e espaçamento desses trinucleotídeos são os principais determinantes da especificidade da ligação desses fatores ao DNA (REECE; PTASHNE, 1993).

A segunda classe mais abundante é conhecida como proteína tipo zíper, podendo ser dividida em duas subclasses: *basic helix-loop-helix* (bHLH) e zíper de leucina (bZIP). De acordo com Jones (2004), fatores de transcrição conhecidos como bHLH possuem dois domínios altamente conservados e funcionalmente distintos, juntos formam uma região de aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos. O domínio básico localiza-se na extremidade N-terminal e liga o DNA através de uma sequência hexonucleotídica conhecida como caixa E. A sequência consenso caixa E varia de acordo com as famílias de bHLH. A extremidade C-terminal possui um domínio HLH que facilita a interação com outras subunidades de proteínas.

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).

A terceira classe mais abundante entre os fatores de transcrição é conhecida como hélice-alça-hélice (HTH), a estrutura fundamental dessa classe de proteínas é conter duas α -hélices conectadas por uma alça. Apesar da considerável variabilidade de sequências, o motivo hélice-alça-hélice possui uma geometria altamente conservada. Os aminoácidos presentes em uma das hélices, conhecida como hélice de reconhecimento, interagem com algumas bases expostas do DNA alvo, enquanto a outra α -hélice interage com sequências não específicas do DNA (STRUHL, 1989).

Na figura 3 é possível visualizar a estrutura de alguns fatores de transcrição presentes em levedura.

A ação direta ou indireta dos fatores de transcrição com os componentes gerais da maquinaria transcricional, pode recrutar a RNA pol II para transcrever o gene de interesse. A ação conjunta desses fatores com os elementos *cis* atuantes determinam a ativação ou inibição da transcrição de determinado gene (FOULKES; SASSONE-CORSI, 1992).

Figura 3. Domínios de ligação ao DNA de fatores de transcrição de levedura. **(A)** C2H2 dedo de zinco; **(B)** C6 (zinc knuckle) de Gal4; **(C)** estrutura bZIP de Gcn4; **(D)** bHLH de Pho4; **(E)** hélice-alça-hélice de Mata2. **Fonte:** Hanh; Young, 2011.

2.4.3 Proteínas reguladoras da transcrição

Ativadores de transcrição eucarióticos são fatores de transcrição modulares, normalmente compostos de um domínio específico de ligação ao DNA (DBD) e uma região ou domínio de ativação (AD). O domínio de ativação pode interagir diretamente com componentes da maquinaria transcrricional (BARBERIS et al., 1995). Muitos genes são ativados por um conjunto de fatores de transcrição ativadores que funcionam de forma combinatória, estabelecendo assim uma regulação diferencial. A interação do domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição com o elemento *cis* atuante serve para localizá-lo e posicioná-lo de tal maneira que ele possa ativar a transcrição (PTASHNE; GANN, 2002).

Os repressores transcripcionais são estruturalmente semelhantes aos ativadores, porém tem a função oposta, em alguns casos eles são capazes de ativar a transcrição além de reprimir. Os repressores podem atuar de várias maneiras

como ligando-se ao promotor e consequentemente bloqueando a ligação da RNA polimerase ou ligando-se a um sítio ao lado do promotor e interagindo com a ligação entre a polimerase e o promotor, inibindo a iniciação transcricional (HOCHSCHILD; DOVE, 1998).

Para estudos relacionados ou envolvendo fatores de transcrição deve-se considerar a complexidade do processo de regulação transcricional, já que esse é constituído por uma rede regulatória na qual os fatores de transcrição podem agir, ativando um gene e ao mesmo tempo reprimindo outro. A rede regulatória dos fatores de transcrição faz com que esses hajam de forma sinérgica, respondendo a diversos estímulos recebidos pela célula, determinando dessa forma o início da transcrição gênica.

2.4.4 Iniciação da Transcrição em Eucariotos

A iniciação da transcrição é uma das etapas mais importantes para a síntese de proteínas, pois é essa etapa que determina o quanto o gene de interesse será expresso.

Existem dois tipos de atividade transcricional: constitutiva e induzida. Diversos genes em diferentes organismos, possuem níveis basais e ativados de transcrição. Geralmente, a “transcrição basal” se refere à transcrição constitutiva de determinado gene, que em sua maioria apresentam baixo nível de expressão, podendo ser reforçada até chegar ao nível de “transcrição ativada”. Para que ocorra a iniciação da transcrição ambos os níveis exigem a presença do promotor e de um complexo de proteínas composto por diversos fatores de transcrição (BARBERIS et al., 1995).

De forma global os componentes proteicos para a iniciação da transcrição em leveduras são a RNA pol II e os fatores de transcrição gerais (GTFs ou TFIID - proteína de ligação a TATA (TBP), 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)). Os GTFs contribuem em diferentes atividades, interagindo direta ou indiretamente com a RNA pol II. Por exemplo, posicionando a RNA pol II no gene e ajudando na abertura da dupla fita do DNA, propiciando a iniciação e alongação da transcrição (BARBERIS et al., 1995; STRHUL, 1995).

A TBP é o fator de transcrição mais conservado entre os eucariotos, possuindo identidade de mais de 80% em seu domínio C-terminal (180 resíduos) entre uma ampla variedade de espécies. Essa proteína é responsável por se ligar ao elemento TATA presente no promotor de vários genes, trazendo consigo 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 (figura 4) (BURATOWSKI, 1994; HERNADEZ, 1993; KLUG, 1993;).

Figura 4. Desenho estrutural da proteína de ligação a TATA (TBP).

Fonte: <http://oregonstate.edu>

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. De acordo com alguns estudos realizados, a interação entre o fator de transcrição IIA e a proteína TBP demonstraram ser essenciais para a ativação transcricional *in vivo* (STARGELL; STRUHL, 1995). Em estudos realizados *in vitro*, TFIIA demonstrou ser extremamente necessária para expressão de alto nível, na presença de determinados ativadores de transcrição como, por exemplo, VP16 (TAN et al., 1996).

O fator de transcrição IIB se estende entre o elemento TATA e o sítio de iniciação do mRNA, 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 et al., 2013). TFIIF fosforila a cauda C-terminal (CTD) da subunidade maior

de Pol II, fornecendo a energia necessária para o início da transcrição e TFIIIE 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 5. Complexo de iniciação da transcrição. Fatores de transcrição gerais envolvidos na iniciação da transcrição pela RNA polimerase II. **Fonte:** Desenho adaptado de Roeder, 1996.

Em leveduras, o complexo de iniciação da transcrição e muitos fatores de ativação são bem conhecidos, o que permite a manipulação desse organismo, bem como a otimização da transcrição, possibilitando a construção ou desenvolvimento de sistemas de expressão alternativos.

2.5 O sistema de expressão

Ao longo das últimas décadas, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA para identificar e movimentar genes de uma variedade de organismos diferentes entre si. Uma das utilizações mais importantes para muitos destes organismos recombinantes é o desenvolvimento de sistemas de expressão, que tem por finalidade produzir proteínas de grande valor comercial. Numerosos estudos têm-se centrado em criar sistemas que sejam capazes de produzir proteínas com eficiência e de forma funcional (LIN CEREGHINO et al., 2001).

Como dito anteriormente, entre os componentes básicos para o desenvolvimento de um sistema de expressão, é necessário um promotor forte para

que haja uma transcrição eficiente (BERKA; BARNETT, 1989). E uma das formas de aumentar a expressão de proteínas recombinantes é através de sistemas de expressão induzíveis. Para isso, os genes das proteínas de interesse devem ser colocados sob o controle de uma ampla variedade de promotores, que podem sofrer diferentes estímulos para induzir o sistema (PALOMARES et al., 2004).

Inúmeros modelos de sistemas de expressão já foram propostos utilizando-se de diversos tipos de indutores, como álcoois, carboidratos, compostos nitrogenados, entre outros. Entretanto, essas moléculas podem ser altamente tóxicas dependendo do microrganismo a ser utilizado como hospedeiro do sistema. Sendo assim, é de extrema importância a seleção e estudo de novos indutores (PACHLINGER et al., 2005).

Um modelo bastante interessante de indução para expressão de proteínas recombinantes é baseado em um tipo de promotor regulado pelo hormônio estrogênio (NALLEY; JOHNSTON; KODADEK, 2006; PACHLINGER et al., 2005). A regulação dirigida por esse tipo de indutor envolve a presença de um fator de transcrição quimérico constituído por um domínio de ligação ao DNA, um domínio de ativação e um domínio de ligação hormonal (QUINTERO et al., 2007). Esse sistema permite a indução com estradiol da proteína recombinante de interesse. Considerando que esse hormônio não é produzido em eucariotos inferiores, acredita-se que a utilização do hormônio não deve ter efeito sobre o genoma ou metabolismo do fungo (PACHLINGER et al., 2005).

Diversos sistemas de expressão utilizando-se de promotores induzidos por estradiol têm sido desenvolvidos com diferentes finalidades (BERGAMASCO et al., 2011; SANSEVERINO et al., 2005; XU et al., 2010). Um exemplo é o sistema desenvolvido por Quintero e colaboradores (2007) para testar a habilidade do promotor de GAL1 na presença do indutor 17- β -estradiol na cepa de *Saccharomyce cerevisiae*, no qual foi possível observar um aumento da expressão da proteína repórter β -galactosidase.

Além do possível aumento da expressão da proteína de interesse, outra vantagem da utilização de estrogênio como indutor é o baixo custo dessas substâncias e a baixa ou nula interferência no metabolismo celular do organismo em estudo (PACHLINGER et al., 2005), criando 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; MEYNIER DE SALINELLES et al., 2002), 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).

Considerando a importância da transcrição na expressão gênica, diversos trabalhos têm por finalidade apresentar metodologias para o desenho e análise de promotores, afim de potencializar a expressão de um gene, já que existe uma relação direta entre o promotor e uma transcrição eficiente (GERTZ; SIGGIA; COHEN, 2009; JUVEN-GERSHON; CHENG; KADONAGA, 2006; RATNA; BECSKEI, 2011; SCHLABACH et al., 2010). Porém, uma das barreiras encontradas para a produção de proteínas recombinantes em fungos é o fato do número de promotores utilizados em sistemas de expressão com esses organismos ainda serem pequenos, sendo o promotor do gene *cbh1* de *T. reesei* o mais comumente utilizado para dirigir a expressão de diversas proteínas por ser um promotor forte.

Com o objetivo de manipular a rede regulatória de um gene e consequentemente reduzir o custo da produção de proteínas homólogas e/ou heterólogas como celulasas, o presente trabalho tem por finalidade o desenvolvimento de um sistema de expressão que seja capaz de incrementar a produção de proteínas de interesse comercial em *Saccharomyces cerevisiae*.

2.5.1 *Saccharomyces cerevisiae* como hospedeiro de Sistema de Expressão

Leveduras e bactérias compartilham muitas das vantagens técnicas para utilização em biologia molecular. E embora a bactéria *E. coli* ainda seja a primeira escolha de organismo para a produção de proteínas heterólogas, a levedura *S. cerevisiae* tem diversos recursos atraentes, como produção de proteínas ausentes de endotoxinas e, em alguns casos, ter atividade mais elevada nos produtos produzidos. A levedura *S. cerevisiae* atualmente é reconhecida como sistema modelo simples para estudos em eucariotos, pois seu genoma pode ser facilmente manipulado, além de apresentar diversos aspectos positivos para estudos biológicos (SHERMAN, 2001).

Entre as diversas propriedades conhecidas, as leveduras *S. cerevisiae* destacam-se por serem não-patogênicas, possuírem crescimento rápido, isolamento de mutantes, sistema genético bem definido, sistema de transformação de DNA altamente versátil, além de apresentarem processo de controle de expressão gênica altamente conservados quando comparados aos mamíferos (SHERMAN, 2002).

A conservação do processo de controle da expressão gênica entre leveduras e mamíferos, não inclui somente os componentes basais da maquinaria da transcrição, mas também fatores específicos de ativação, sequências alvos de ligação ao DNA e até os mecanismos de ativação e repressão, tornando levedura um organismo extensamente utilizado para o desenvolvimento de sistemas de expressão (SHERMAN, 2001; SHERMAN, 2002) e produção de proteínas recombinantes como tripsina pancreática bovina (KOWALSKI et al., 1998), proteína de Capsídeo VP1 de vírus (PEREIRA et al., 2012) e celobiohidrolases de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* (HONG et al., 2014).

Alguns estudos realizados demonstraram que mesmo proteínas de regulação gênica não relacionadas, de espécies eucarióticas amplamente distintas, podem cooperar quando introduzidas na mesma célula, refletindo o alto grau de conservação da maquinaria de transcrição (ALBERTS et al., 2010). Por exemplo, Carraro e colaboradores (1998) demonstraram que o promotor de *cbh1* de *T. reesei* é capaz de controlar e ativar a transcrição em *S. cerevisiae* deixando nítido a existência de um mecanismo comum de regulação da expressão gênica conservada entre fungos.

Outros estudos demonstraram que a maquinaria de transcrição é notavelmente conservada entre mamíferos e leveduras. Por exemplo, a sequência da subunidade maior da RNA pol II entre as duas espécies citadas demonstram uma homologia considerável, incluindo a sequência repetida na cauda C-terminal. Pode-se citar também a homologia estrutural da proteína TBP presente em leveduras e humanos. Além da conservação dos fatores de transcrição gerais, alguns mecanismos de ativação da transcrição demonstram ter suas funções conservadas, como o domínio AD do ativador GAL4 de levedura funcionar em células humanas. Essas observações tornam possível, através da engenharia genética, a utilização dos componentes da maquinaria celular de espécies distintas e aprimoramento da regulação transcricional (GILL; SADOWSKI; PTASHNE, 1990; STRUHL, 1989a).

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).

Um elemento importante para regulação transcricional e que muitas vezes estão relacionados ao baixo rendimento na produção proteica, é a presença da molécula sinal ou indutora do sistema de expressão. Pois suas propriedades (composição química, peso molecular, solubilidade, metabolismo, pH, entre outros) podem influenciar no metabolismo do microrganismo, sendo um aspecto importante a ser considerado (PACHLINGER et al., 2005). Portanto, é necessário identificar, desenhar e caracterizar novos sistemas de expressão, com potencial utilização industrial e mínimo ou nulo efeito no metabolismo do microrganismo.

Levando-se em consideração as informações disponíveis e que a transcrição é uma etapa importante na regulação gênica, diversos trabalhos apresentam metodologias para o desenho e análise de promotores. Um exemplo é o sistema desenvolvido por Nalley e colaboradores (2006), que utiliza-se de um sistema de expressão capaz de reconhecer o composto estrogênico 17- β -estradiol como

indutor, por apresentar baixo ou nenhum efeito no metabolismo tampouco no desenvolvimento de organismos eucariotos inferiores.

2.5.2 Compostos Estrogênicos

Hormônios esteroides (por exemplo, estrogênio, progesterona e cortisol), são compostos naturalmente presentes nos vertebrados. Esses compostos são bem conhecidos e importantes, pois são responsáveis pelo desenvolvimento e pela regulação de diversas funções no organismo. Os hormônios sexuais femininos, conhecidos como estrogênios, se enquadram no grupo dos esteroides, eles são um grupo de compostos biologicamente ativos produzidos a partir do colesterol e possuem características hidrofóbicas (GONSCHOROWSKI, 2013).

Uma célula reconhece o hormônio através de receptores e proteínas que interagem com o hormônio em uma estrutura específica. Esta interação entre hormônios e receptores desencadeia reações bioquímicas, conhecidas como sinalização intracelular, levando a uma resposta biológica característica devido ao seu mecanismo de ação (LINTELMANN et al., 2003).

Existem dois tipos de mecanismos de ação hormonal: Os hormônios que possuem seus receptores na superfície externa da membrana plasmática das células-alvo e os hormônios que possuem seus receptores localizados no interior celular (GONSCHOROWSKI, 2013). Devido as suas características hidrofóbicas, os esteroides são capazes de serem transportados por proteínas carregadoras até o tecido alvo, sem sofrer alterações, e ingressar ao citoplasma da célula por difusão simples (sem gasto de energia), ou seja, não precisam se ligar a receptores de membrana plasmática para ingressar na célula (NELSON; COX, 2014).

Os esteroides interagem com receptores nucleares, presentes no citoplasma. Apesar desses compostos não agirem diretamente no DNA, eles podem ser classificados como os próprios ativadores da transcrição, pois somente na presença deles que o complexo transcricional se torna capaz de migrar para o núcleo celular, se ligar a sequências específicas do DNA e ativar a expressão do gene alvo (NALLEY; JOHNSTON; KODADEK, 2006; NELSON; COX, 2014).

Os compostos estrogênicos, como o 17- β -estradiol e DES, ligam-se ao receptor nuclear de estrogênio humano alfa (*human estrogen receptor alpha*, hER α), também conhecidos como domínio de ligação ao ligante (*ligand binding domain*,

LBD). Após, a ligação do hER α ao 17- β -estradiol, denominado interação hormônio-receptor, esse complexo sofre uma dimerização através da sua ligação com outro semelhante também presente no citoplasma. O dímero migra para o núcleo celular e liga-se a sequências de DNA altamente específicas, denominadas elementos de resposta a estrogênio (ERE), resultando na expressão do mRNA correspondente (NALLEY; JOHNSTON; KODADEK, 2006; NELSON; COX, 2014).

A interação hormônio-receptor é regulada alostericamente, ou seja, leva a alterações estruturais irreversíveis, viabilizando uma expressão gênica mais rápida. Na ausência de compostos estrogênicos, o receptor hER α permanece sequestrado no citoplasma, em complexo com proteínas chaperonas (por exemplo, Hsp70), inativando a sua função (NALLEY; JOHNSTON; KODADEK, 2006; PACHLINGER et al., 2005).

Na figura 6 é possível observar um esquema para a regulação hormonal por estrogênio.

Considerando que compostos estrogênicos têm mínimo ou nulo efeito no metabolismo e desenvolvimento de eucariotos inferiores e que eucariotos superiores e inferiores possuem a maquinaria transcricional conservada, sistemas de expressão de proteínas recombinantes utilizando como indutor compostos estrogênicos têm sido desenvolvidos em levedura.

Figura 6. Mecanismo de funcionamento do receptor hormonal por estrogênio. Os receptores são encontrados no citoplasma, em um complexo com uma proteína de choque térmico (Hsp70). Quando o hormônio estrogênio se liga, Hsp70 se dissocia e o receptor dimeriza, expondo um sinal de localização nuclear. O receptor dimérico com o hormônio ligado, migra para o núcleo, onde se liga ao elemento de resposta a estrogênio (ERE) e atua como ativador da transcrição. **Fonte:** adaptado de Nelson; Cox, 2014.

2.5.3 Sistema de Expressão Induzido por Hormônio

Sistemas de expressão induzido por hormônio têm sido desenvolvidos na levedura *S. cerevisiae* (BERGAMASCO et al. 2011; METZGER et al., 1988; SANSEVERINO et al., 2005; XU et al., 2010) a fim de potencializar a produção de enzimas, principalmente as de interesse comercial. Esses sistemas possuem como principal vantagem a utilização de um indutor independente, ou seja, um indutor externo a célula que seja capaz de produzir pouco ou nulo efeito no metabolismo celular.

Alguns trabalhos já demonstraram a habilidade funcional de promotores quiméricos serem ativados através de indução por estrogênio utilizando-se da proteína híbrida Gal4-ER-V16 para reconhecimento. Entre os trabalhos desenvolvidos, podemos citar o estudo realizado por Quintero et al. (2007), que criou um sistema de expressão contendo duas construções. Uma delas contendo o fator

de transcrição quimérico Gal4-ER-VP16 servindo como ativador da segunda construção, contendo o promotor GAL 1 controlando o gene repórter β -galactosidase. Através desse estudo foi possível observar um aumento da produção da enzima β -galactosidase após a indução do sistema com pequenas quantidades do hormônio 17- β -estradiol (50 nM e 1 μ M).

Outro trabalho, realizado por Nalley e colaboradores (2006), testou a habilidade de interação do fator quimérico (c-myc-Gal4p-hER α -VP16) com o promotor quimérico GAL 1/10, bem como sua habilidade funcional na ausência da proteína Gal 4 e presença de galactose como fonte de carbono. Demonstrando que para que haja um aumento da expressão da proteína repórter é necessário a presença da proteína Gal4 (NALLEY; JOHNSTON; KODADEK, 2006).

No presente trabalho, foi desenhado um Sistema de Expressão regulado por Hormônios Estrogênicos similar ao proposto por Nalley e colaboradores (2006), constituído por um plasmídeo regulador que codifica o fator de transcrição quimérico c-myc-Gal4p(DBD)-hER α (LBD)-VP16(AD) e o plasmídeo de expressão induzido para expressão da proteína de interesse. Cada componente da proteína quimérica possui funções específicas, as quais serão descritos a seguir:

O epítipo c-myc é derivado do gene c-myc, ele possui 10 aminoácidos e geralmente é utilizado como marcador de proteína (CRAVCHIK; MATUS, 1993). No presente trabalho ele foi inserido na extremidade C-terminal com objetivo de reconhecimento por anticorpo específico contra myc, para confirmação da expressão do fator de transcrição quimérico.

O domínio de ligação ao DNA de Gal4(DBD) é constituído pelos resíduos de aminoácidos de 1 a 93 da proteína Gal4p de *S. cerevisiae*, ele está sendo utilizado para o reconhecimento dos motivos UAS_{GAL} presentes no promotor quimérico, que será descrito mais adiante.

O domínio de ligação ao ligante do receptor de estrógeno humano alfa hER α (LBD) é constituído pelos resíduos de aminoácidos 282 a 595 da proteína hER α , sendo responsável pelo reconhecimento do indutor 17- β -estradiol e pela migração do fator de transcrição quimérico do citoplasma para o núcleo (PACHLINGER et al., 2005).

O domínio de ativação ácido da proteína viral 16 (VP16(AD)), é composto pelos resíduos de aminoácidos 424 a 490 da proteína VP16 do vírus herpes simples 1. O domínio de ativação VP16 possui a função de recrutar o complexo de

transcrição, ligar a proteína de ligação a TATA (TBP), presente no fator de transcrição IID (TFIID), à caixa TATA presente no promotor quimérico (HE et al., 1993).

Quando expresso na levedura *S. cerevisiae*, o fator de transcrição quimérico é mantido sequestrado no citoplasma, em complexo com a chaperona Hsp90 que apresenta homologia com a chaperona Hsp70 de humanos (NALLEY; JOHNSTON; KODADEK, 2006). Após adição de 17- β -estradiol, a proteína quimérica liberta-se de Hsp90 e migra do citoplasma para o núcleo da célula, onde ativa a transcrição do promotor quimérico contendo motivos UAS_{GAL} (PACHLINGER et al., 2005).

O promotor artificial foi construído a partir do promotor do gene *cbh1* de *T. reesei*, o qual foi modificado através da inserção da região de DNA contendo motivos UAS_{GAL} de levedura. O promotor que está sendo regulado pelo fator de transcrição quimérico foi inserido a montante da região codificadora do gene *cbh1* de *T. reesei*, utilizado como gene repórter. Na figura 7 é possível visualizar um esquema representativo do funcionamento do sistema proposto.

Figura 7. Sistema de expressão de proteínas induzido por estradiol. Na ausência do indutor, o fator de transcrição quimérico c-myc-Gal4(DBD)-hERα(LBD)-VP16(AD) permanece sequestrado no citoplasma associado à chaperona Hsp90. Após adição de estradiol, o fator de transcrição é liberado de Hsp90, migra para o núcleo e ativa a transcrição do promotor alvo pela ligação aos sítios UAS_{GAL}. **Fonte:** Adaptado de NALLEY; JOHNSTON; KODADEK, 2006.

3 JUSTIFICATIVA

Na era pós-genômica, a expressão de proteínas é uma etapa importante para entender sua função e avaliar seu potencial biotecnológico. Assim sendo, o desenho e construção de sistemas de expressão de proteínas induzido por estrogênio em *S. cerevisiae* é uma proposta que se justifica pela necessidade de incrementar o nível de expressão gênica em fungos com potencial biotecnológico.

O desenvolvimento deste trabalho nos permitirá a construção de ferramentas de biologia molecular para manipulação genética e engenharia metabólica de leveduras, objetivando a utilização destes microrganismos para alta e eficiente produção de enzimas homólogas e/ou heterólogas que permita a redução do custo de produção destas enzimas.

4 OBJETIVO GERAL

Desenhar um sistema de expressão induzido pelo hormônio estradiol que, em *Saccharomices cerevisiae*, seja capaz de produzir e secretar com alta eficiência proteínas homólogas e/ou heterólogas com potencial utilização industrial.

4.1 Objetivos específicos

1. Construir o plasmídeo de expressão que contém o promotor *cbh1* de *T. reesei* modificado por inserção de motivos UAS_{GAL} (p5xUAS_{GAL}–UAR_{cb1}) de levedura para controlar o gene repórter celobiohidrolase I de *T. reesei* (*Trcbh1*).
2. Construir o plasmídeo regulador que expressa a proteína quimérica c-myc–Gal4(DBD)–hER α (LBD)–VP16(AD) sob controle do promotor constitutivo TEF2 e terminador CYC1.
3. Inserir o plasmídeo de expressão e regulador por transformação na cepa W303-1A de *S. cerevisiae*.
4. Inativar, na cepa ScW303-1A, o gene *PDR5*, que confere resistência a xenobióticos.
5. Testar a habilidade do sistema de expressão para a produção da proteína repórter celobiohidrolase I em *S. cerevisiae*, em diferentes concentrações do indutor estradiol.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cepas e condições de cultura

Foram utilizadas as linhagens W303-1A (*MATa*; *leu2-3,112*; *his3-11,15*; *ura3-1 ade2-1*; *can1-100*; *trp1-1*) (Thomas; Rothstein, 1989) e BY4741 (*MATa*; *his3Δ 1*; *leu2Δ 0*; *met15Δ 0*; *ura3Δ 0* *pdr5Δ::KanMX*) (BRACHMANN et al., 1988) de *S. cerevisiae*, as quais foram cultivadas 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 foi adicionado 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.

A indução dos transformantes foram realizadas em meio YP Sacarose 2% (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% sacarose, contendo diferentes concentrações de 17-β-estradiol e DES (Dietilestilbestrol): 0 μM, 5 μM e 10 μM (NALLEY; JOHNSTON; KODADEK, 2006).

Para a propagação dos plasmídeos foi utilizada a bactéria *E. coli* BL21 (GE Life Science, USA) a qual foi cultivada no meio de cultura LB (Luria – Bertani, 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) contendo ampicilina na concentração de 150 μg/ mL.

5.2 Manipulação de DNA e técnicas gerais de biologia molecular

A manipulação de DNA com enzimas de restrição, modificação de extremidades, ligação do DNA, clonagem, 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 e colaboradores (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 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Nome	Sequência (5' - 3')	T_m °C
Synth2-852F	TACTGTCTTCTATCGAACAAG	50
Synth3-1538R	GGAGCAAACAGTAGCTTCCCTG	55
Synth3-2128R	CGTCCTCGCCGTCTAAGTGG	52
cbh1 – F	ATGTATCGGAAGTTGGCCGTC	54
cbh1 – R	TTACAGGCACTGAGAGTAGT	50
KanB	CTGCAG CGAGGA GCCGTAAT	56
KanC	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT	49
PDR5-450-up-F	GATTTACTAAGACTCCGGTGAG	53
PDR5-4905-down-R	CCCACAAAATAAGGCCGTATATGAG	56
pdr5-KanMX-F	AAATTGGCAACTAGGAACCTTTCG	51
pdr5-KanMX-R	ACGCACCTATATGTAGTGATTATGT	51

5.3 Construção dos plasmídeos

a. Regulador

A proteína quimera, fator de transcrição a ser ativado pelo indutor de estrogênio, foi desenhada utilizando a sequência de DNA que codifica: (i) promotor TEF2 (GenBank: YPR080W) (bases nucleotídicas de -1 a -402), (ii) um epítipo da proteína c-myc (GenBank: V00568.1) (30 bases nucleotídicas), (iii) um domínio de ligação ao DNA de Gal4p de *Saccharomyces cerevisiae* (DBD, aminoácidos 1 a 93 resíduos) (GenBank: NM_001184062.1), (iv) o domínio de ligação ao estradiol do receptor de estrógeno α humano (GenBank: gb|JF810888) (hER α -LBD, aminoácidos 282 a 595), (v) o domínio de ativação transcricional VP16 do Vírus Herpes Simples 1 (GenBank: JQ673480.1) (AD, aminoácidos 424 a 490) e (vi) terminador CYC1 (GenBank: YJR048W) (200 bases nucleotídicas). A sequência de DNA quimérica de 2308 pb (pTEF2-c-myc-Gal4(DBD)-hER α (LBD)-VP16(AD)-CYC1 TT) foi sintetizada pela empresa *Life Technologies* (USA) e clonada no vetor pMA (2456 pb) da empresa *Life Technologies* (USA). Após a síntese, a molécula de DNA quimérica foi isolada por digestão no sítio de restrição *PvuII*, que deixa extremidades cegas.

O vetor selecionado para clonagem da sequência de DNA quimérica foi o YIplac128 (4293 pb) (GenBank: X75463), contendo a marca auxotrófica *LEU2* e a marca de resistência a ampicilina, o vetor foi aberto no sítio de restrição *Sma*I, apresentando extremidades cegas. O plasmídeo YIplac128 linearizado foi desfosforilado com a enzima CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, *Life Technologies* -USA) e purificado em gel de agarose 0,8%. O fragmento pTEF2-c-myc-Gal4(DBD)-hER α (LBD)-VP16(AD)-CYC1 TT e o plasmídeo YIplac128, foram ligados com a enzima T4 DNA ligase (*Life Technologies*, USA). O plasmídeo obtido foi denominado plasmídeo regulador, o qual foi linearizado no sítio de *Cla*I localizado no gene *LEU2*, para transformação.

b. De expressão:

O promotor a ser regulado pelo fator de transcrição quimérico possui cinco motivos UAS_{GAL} de *Saccharomyces cerevisiae* (17 bases nucleotídicas cada seguidos de um separador de 35 bases nucleotídicas) (GenBank: gp|CP004601.1) que foi clonado adjacente à região promotora mínima de *cbh1* de *Trichoderma reesei* (-1 a -208 bases nucleotídicas) (GenBank: dbj|D86235.1), denominada UARcb1 (HENRIQUE-SILVA et al., 1996), controlando a expressão do gene celobiohidrolase I (1545 bases nucleotídicas) (GenBank: gbAY368686.1) de *Trichoderma reesei* (*Trcbh1*) e terminador CYC1 de *Saccharomyces cerevisiae* (200 bases nucleotídicas) (GenBank: YJR048W). A construção de 2194 pb foi sintetizada pela empresa *Life Technologies* (USA) e clonada no plasmídeo pYES2 (5856 pb) contendo as marcas ampicilina e *URA3*. O plasmídeo obtido (p5xUAS_{GAL}-UARcb1-*Trcbh1*-CYC1 TT) foi denominado plasmídeo de expressão e linearizado no sítio de restrição *Stu*I presente no gene *URA3* para transformação.

Na tabela 2 encontram-se descritas as características dos plasmídeos utilizados no trabalho.

Tabela 2. Características dos plasmídeos construídos.

Plasmídeo	Tamanho (pb)	Característica	Descrição
Plasmídeo Regulador	6601	Vetor YIplac128 (4293 pb) - Amp ^R e <i>LEU2</i> - terminador CYC1 (200 pb); Promotor TEF2 (402 pb) e região codificadora c-myc-Gal4(DBD)-hERα(LBD)-VP16(AD) (1506 pb).	Plasmídeo integrativo contendo o fator de transcrição quimérico .
Plasmídeo de Expressão	8050	Vetor pYES2 (5856 pb) - Amp ^R e <i>URA3</i> - promotor quimérico com os 5 motivos UAS _{GAL} (241 pb) e a região mínima UARcb1 (208 pb), gene repórter <i>Trcbh1</i> (1545 pb) e terminador CYC1 (200pb).	Plasmídeo integrativo contendo o promotor quimérico controlando a expressão do gene repórter <i>Trcbh1</i> .
pTEF2-c-myc-Gal4(DBD)-ERα(LBD)-VP16(AD)-CYC1 TT/pMA	4564	Vetor pMA (2456 pb) - Amp ^R ; terminador CYC1 (200 pb); Promotor TEF2 (402 pb) e região codificadora c-myc-Gal4(DBD)-ERα(LBD)-VP16(AD) (1506 pb).	Plasmídeo de clonagem sintetizado pela empresa <i>Life Technologies</i> contendo a sequência do fator de transcrição quimérico.

5.4 Transformação de bactérias e leveduras

A transformação bacteriana foi realizada por eletroporação conforme procedimento descrito pelo fabricante do Electroporador 2510 (Eppendorf, Alemanha). Uma alíquota de 1 µg de DNA de cada plasmídeo foi utilizada para transformar a bactéria eletrocompetente *E. coli* BL21. As células foram plaqueadas em meio LB ampicilina (150 ug/mL) 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).

Os plasmídeos construídos são integrativos em levedura permitindo assim eventos de recombinação que levam a substituição de uma determinada sequência de DNA cromossomal pela correspondente sequência homóloga presente no plasmídeo inserido (HOU et al., 2009; ORR-WEAVER; SZOSTAK; ROTHSTEIN, 1983).

No presente trabalho, os plasmídeos foram previamente linearizados dentro da região que apresenta homologia ao *locus* cromossômico (*LEU2* e *URA3*) da levedura *S. cerevisiae* W303-1A (figura 8) com as enzimas descritas no item 5.3. De acordo com Orr-weaver e colaboradores (1983), as extremidades geradas pelo corte da dupla fita do plasmídeo são altamente recombinantes, aumentando a eficiência da transformação.

Figura 8. Esquema representativo da transformação integrativa em *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A. (A) Plasmídeo regulador linearizado no sítio de *ClaI* para integração no gene *leu2*, localizado no cromossomo 3; **(B)** Plasmídeo de expressão linearizado no sítio de *StuI* para integração no gene *ura3*, localizado no cromossomo 5. **Fonte:** Adriani, P.P., 2016.

Para a transformação utilizou-se o método de acetato de lítio descrito por Gietz e Woods (2002). Uma alíquota de células de *S. cerevisiae* W303-1A foi previamente crescida em meio YPD ágar e mantidas na estufa a 30 °C. Após 48 horas, as células foram inoculadas em 5 mL de YPD líquido e incubadas a 30 °C durante a noite no *shaker* a 200 rpm. Em seguida, uma densidade de célula de 5×10^6 /mL foi utilizada para inocular 50 mL de YPD e incubada a 30 °C no *shaker* a 200 rpm durante 5 horas. A cultura foi transferida para tubo falcon de 50 mL, cetrifugada por 5 minutos a 2.500 rpm para coleta das células. O sedimento celular foi lavado uma vez com 25 mL de H₂O estéril e cetrifugado nas mesmas condições anteriores. As células foram suspensas em 1 mL de acetato de lítio 100 mM, transferidas para um microtubo de 1.5 mL e cetrifugadas por 5 segundos a 12.000 rpm. O acetato de lítio foi removido com a micropipeta, o sedimento foi suspenso em 400 µL de acetato de lítio 100 mM, atingindo o volume final de 500 µL, e separado em 10 alíquotas de 50 µL cada, em microtubos estéreis de 1.5 mL. Os tubos foram cetrifugados por 5 segundos a 12.000 rpm e o acetato de lítio foi removido com micropipeta. Foi adicionado ao tubo os reagentes da mistura de transformação, cuidadosamente, na seguinte ordem: 240 µL de polietilenoglicol 3350 (PEG) 50%, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 25 µL de DNA carregador fita simples (2 mg/ mL), 1 µg de DNA plasmidial em 50 µL de H₂O estéril. Cada microtubo foi agitado vigorosamente até se obter uma mistura homogênea, que foi incubada em estufa a 30 °C. Após 30 minutos, os tubos foram submetidos a choque térmico em banho Maria a 42 °C; passados 25 minutos os mesmos foram cetrifugados por 15 segundos a 8.000 rpm. A mistura de transformação foi removida por micropipeta. Os sedimentos celulares

foram suspensos em 200 µL de H₂O estéril e então plaqueados em meio YNB ágar contendo os suplementos necessários (histidina, metionina, triptofano e adenina), como indicado no item 5.1.

Para o controle negativo as células foram transformadas sem os plasmídeos de interesse e plaqueadas em meio YNB contendo: histidina, metionina, triptofano e adenina.

5.5 Extração de DNA 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 transformadas 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). Foi adicionado 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%.

5.6 Sequenciamento de DNA

As construções foram verificadas por reação de sequenciamento empregando-se o kit de ddNTPs covalentemente ligados a agentes fluorescentes específicos para cada ddNTP (ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing

Ready Reaction kit, Applied Biosystems Inc). As reações de extensão foram feitas em termociclador GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystem Inc. O sequenciamento automático de DNA foi feito no Serviço de sequenciamento de DNA do Instituto de Química/USP, utilizando o sequenciador modelo 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Inc. As sequências foram analisadas no software BioEdit 7.2.5 (HALL et al., 2007).

5.7 Inativação do gene *PDR5*

O gene *PDR5* foi inativado através do rompimento gênico em passo único (ROTHSTEIN, 1983). Esse procedimento baseia-se na utilização de um fragmento linear de DNA contendo um marcador de seleção flanqueado por região homóloga das extremidades 5' e 3' do gene que será inativado (SHERMAN, 2001).

Como pode ser observado na figura 9 o fragmento de DNA linear, contendo a marca de seleção a geneticina (*KanMX*), flanqueado por uma região homóloga ao gene *PDR5* de 85 nucleotídeos na extremidade 5' e 1084 na extremidade 3', foi obtido por PCR do DNA genômico da cepa BY4741 *pdr5*Δ. A inserção do fragmento contendo o gene *KanMX* e a cauda homóloga ao gene *PDR5* foi realizada por transformação através do método de acetato de lítio Gietz e Woods (2002) descrito no item 5.4.

A confirmação da integração foi feita por amplificação do DNA genômico, utilizando o kit Taq DNA Polimerase (*Life Technologies*, USA).

Na tabela 1 é possível observar as sequências de oligonucleotídeos utilizadas para a amplificação do fragmento utilizado na mutação (*pdr5-KanMX-F* e *pdr5-KanMX-R*) e para o PCR de confirmação da integração (*pdr5-450up-F* e *KanB*).

Figura 9. Esquema da técnica de Rompimento Gênico em Passo Único. (A) Amplificação do gene *KanMX* a partir da cepa de *S. cerevisiae* BY4741 *pdr5Δ* utilizando os oligonucleotídeos com cauda de *pdr5*. (B) Gene *KanMX* com cauda de *PDR5*. (C) Recombinação homóloga do fragmento *pdr5*-*KanMX* com o gene *PDR5* de *S. cerevisiae* W303-1A. (D) Gene *PDR5* de *S. cerevisiae* W303-1A inativado. **Fonte:** Adriani, P.P., 2016.

5.8 Ensaio de resistência para Triton X-100

Para a realização do ensaio de resistência ao Triton X-100, cresceram-se as células de seis transformantes e um controle até $Abs_{600} = 1$ e submeteram-se a 4 diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). Depositou-se 3 μ l de cada diluição sobre placas YPD contendo 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, cat. X100) e placas sem a presença Triton X-100. Para observar o crescimento diferencial dos mutantes incubou-se a 30 °C por 3 dias e foi fotografado o crescimento após esse período.

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 absorbância (Abs), 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 μ L de meio YP contendo diferentes fontes de carbono (Glicose 2%, Sacarose 2%, Glicerol 2% e Galactose 2%) de forma que a absorbância inicial fosse 0,1. Após seleção da fonte de carbono, foi realizada curva de crescimento seguindo os parâmetros anteriores, porém as células foram inoculadas em 200 μ L de meio YP Sacarose 2% suplementado com diferentes concentrações de 17- β -estradiol (Sigma-Aldrich, cat. E8875) (0, 100 pM, 1 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M). 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 nm foram feitas a cada hora, durante 24 horas. Os resultados foram analisados no Microsoft Office Excel.

5.10 Análise da atividade Enzimática da celobiohidrolase I

Os oligossacarídeos e os polissacarídeos, como a carboximetilcelulose (CMC), são moléculas de monossacarídeos unidas por ligações β -glicosídicas). A enzima celobiohidrolase I, também chamadas de exoglucanases, agem nas ligações β -glicosídicas mais externas presentes nos polissacarídeos. A ação da enzima nessas ligações, resultam na liberação do açúcar redutor celobiose (BISCHOFF et al., 2006).

O teste colorimétrico DNS (ácido dinitrosalicílico) utilizado no presente trabalho, baseia-se na reação entre o açúcar redutor celobiose e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelada), que é reduzido ao composto ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Essa reação emite a coloração avermelhada, devido a oxidação do monossacarídeo redutor, a qual pode ser quantificada por absorção à 540nm.

A atividade enzimática *cbh1* foi medida de maneira indireta utilizando-se de uma modificação do método de DNS descrito por Wood e Bhat (1988), todos os testes foram realizados em triplicata. Para a realização dos testes, foram obtidas alíquotas de 5 mL das culturas induzidas e em seguida a Abs₆₀₀ foi determinada. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos à 4500 rpm, e então célula e sobrenadante foram separados.

Para iniciar a reação, foram adicionados em um microtubo de 1,5 mL, 20 μ L de tampão citrato de sódio, pH 6.0 / 50 μ L do substrato CMC 1%, 30 μ L de H₂O e 100 μ L da amostra de sobrenadante. Após 60 min de incubação a 40 °C, foi adicionado 400 μ L de solução de DNS (10 g/L de ácido 3,5 dinitrossalicílico, 16 g/L de NaOH e 300 g/L de tartarato de sódio e potássio), a amostra foi então fervida durante 5 min e em

seguida foi adicionado 400 μ l de H₂O. A leitura da Abs 540 nm foi realizada em placas de 96 poços no leitor de microplacas (*Infinite220 PRO series – TECAN*).

A atividade enzimática foi mensurada utilizando-se como comparativo uma curva padrão de glicose. A curva padrão foi realizada dentro de um intervalo de concentração conhecido, e respeitando a lei de Beer - Lambert (JEFFREY et al., 1992) objetivando determinar a relação entre a absorbância obtida e a concentração da molécula de interesse em determinada amostra. Foram realizadas 5 diluições visando as seguintes concentrações de glicose: 36,36 μ g/mL, 72,72 μ g/mL, 109,08 μ g/mL, 145,44 μ g/mL, 181,80 μ g/mL e 218,16g/mL. Adicionou-se 40 μ L de solução de DNS, a amostra foi então fervida durante 5 min e em seguida foi adicionado 40 μ l de H₂O atingindo o volume final de 100 μ L. As reações foram realizadas em triplicatas e Abs 540 nm foi lida em placas de 96 poços no leitor de microplacas (*Infinite220 PRO series – TECAN*). A curva padrão foi construída com o auxílio do programa Microsoft Office Excel 2013.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenho e Construção do Sistema de Expressão

Após análise da literatura, foram selecionadas as sequências das proteínas que serão utilizadas na construção do sistema de expressão induzido por estradiol. Sendo elas, as sequências do fator de transcrição quimérico (LOUVION; HAVAUX-COPF; PICARD, 1993; LYTTLE et al., 1992; NALLEY; JOHNSTON; KODADEK, 2006; QUINTERO et al., 2007; TANAKA et al., 1989) para reconhecimento do indutor estrogênio e a sequência do promotor quimérico *cbh1* do *T. reesei* (CARRARO et al., 1998; HENRIQUE-SILVA et al., 1996; NEVALAINEN; TE'O; BERQQUIST, 2005).

Diversos promotores induzíveis para a expressão de proteínas em leveduras já foram descritos, por exemplo, o promotor GAL1-10 induzido por galactose (GEYMONAT; SPANOS; SEDGWICK, 2007; JOHNSTON, 1987), o promotor PH05 induzido por fosfato inorgânico (MEYHACK et al., 1982) e o promotor CUPI induzido por metais pesados (BUTT et al., 1984).

O promotor GAL1-10, é o mais utilizado no desenvolvimento de sistemas de expressão em leveduras, porém a utilização desse promotor possui diversas desvantagens. Entre elas, a necessidade de ser induzido por galactose e consequentemente ser reprimido pelo seu produto de degradação, ou seja, a glicose fazendo com que haja uma alteração na expressão do produto de interesse. Outra desvantagem é que a utilização de outros carboidratos como indutores interfere no metabolismo celular afetando a expressão de outros genes (LOUVION; HAVAUX-COPF; PICARD, 1993).

Considerando o contexto acima Tanaka e colaboradores (1989) realizaram um estudo com receptores de esteroides de vertebrados, no qual foi possível observar a funcionalidade de um sistema de expressão dependente de hormônio em leveduras. A vantagem desse sistema é que os esteroides são indutores específicos, ou seja, eles possuem pouco ou nenhum efeito no metabolismo celular. Por outro lado, é necessário o desenvolvimento de sistemas contendo elementos de resposta hormonal para que haja a expressão do gene de interesse (LOUVION; HAVAUX-COPF; PICARD, 1993; TANAKA et al., 1989).

Com a finalidade de construir um sistema de expressão com baixa ou nula interferência no metabolismo celular do microrganismo em estudo, foi desenhado um sistema de expressão composto por dois plasmídeos:

1. Plasmídeo regulador que codifica o fator de transcrição quimérico constituído pela fusão da sequência de uma série de proteínas proveniente de diversos organismos, são elas: o epítopo da proteína c-myc do proto-oncogene humano (HILPERT et al., 2001), domínio de ligação ao DNA de Gal4p de *S. cerevisiae* (BUSSEY et al., 1997), domínio de ligação ao estradiol do receptor de estrógeno α humano (MÉTIVIER et al., 2003; SHANG et al., 2000;) e o domínio de ativação transcricional VP16 do Vírus Herpes Simples 1 (MACDONALD et al., 2012). O fator de transcrição quimérico é de extrema importância, pois ele é necessário para que haja reconhecimento da molécula indutora do sistema construído.

Cada um dos componentes envolvidos na construção do fator de transcrição desempenham um papel específico, os quais serão citados a seguir. Entre suas diferentes funcionalidades, o epítopo c-myc é utilizado para medir a expressão de diversas proteínas, pois estes não apresentam interferência na proteína de interesse, sendo utilizado somente como marcador de expressão (HILPERT et al., 2001).

Já a proteína Gal4 (Gal4p) é conhecida devido a sua capacidade de ligação a sequências UAS_{GAL} (presentes em alguns promotores de leveduras) e eficiência em propiciar a ativação da expressão gênica. Diversos estudos já foram realizados com a Gal4p, nos quais demonstraram a funcionalidade dessas proteínas de ativarem a expressão gênica utilizando-se somente das sequências responsáveis pela ligação ao DNA correspondente (*DNA binding domain*, DBD), presentes no promotor (MARMORSTEIN et al., 1992; SEIPEL; GEORGIEV; SCHAFFNER, 1992). Como consequência, essas proteínas começaram a ser amplamente utilizadas fusionadas a diferentes domínios de ativação, entre eles o VP16, para o desenvolvimento de sistemas de expressão. O domínio de ativação VP16 é conhecido pela sua eficiência em promover ativação transcricional através do recrutamento da RNA pol II em diferentes organismos (LOUVION; HAVAUX-COPF; PICARD, 1993; TILEY et al., 1992).

Como o sistema de expressão será induzido utilizando o hormônio feminino estrogênio, para que houvesse o reconhecimento desse indutor foi utilizada a sequência hER α fusionada as sequências Gal4p e VP16 (SHANG et al., 2000).

O fator de transcrição descrito acima tem por objetivo a ativação da expressão gênica do promotor quimérico denominado p5xUAS_{GAL}-UARcb1.

2. Plasmídeo de expressão: que apresenta o promotor quimérico constituído pela região mínima promotora do gene *cbh1* de *T. reesei* (CARRARO et al., 1998; HENRIQUE-SILVA et al., 1996; NEVALAINEN; TE'O; BERQQUIST, 2005) contendo cinco sequências de ativação UAS_{GAL}, que regulam a transcrição do gene repórter *cbh1* de *T. reesei*.

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. Existem vários trabalhos utilizando o promotor nativo ou modificado em sistemas de expressão, apresentando resultados positivos (LIU et al., 2008; ZOU et al., 2012), o que determinou a escolha deste promotor para o desenvolvimento deste trabalho. Outro fator importante foi a demonstração funcional do promotor *cbh1* em controlar a expressão de proteínas em *S. cerevisiae*, atestando a premissa da conservação dos mecanismos transcricionais em eucariotos (CARRARO et al., 1998).

No promotor *cbh1*, a região que controla a expressão induzida por celulose no gene *cbh1*, chamada de UARcb1 (HENRIQUE-SILVA et al., 1996), 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 e colaboradores (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 da 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*.

Dentre os diversos componentes das vias regulatórias já identificados em *S. cerevisiae*, podemos citar a proteína Mig1 responsável por se ligar a sequências específicas presentes nos promotores dos genes reprimidos por glicose e recrutar os repressores Ssn6 e Tup1 (RONNE, 1995). Apesar de não ter nenhum estudo que apresente diretamente a relação entre o sítio de repressão por glicose Cre1 de *T. reesei* e Mig1 de *S. cerevisiae*, acredita-se que haja uma similaridade entre esses fatores devido a um trabalho realizado por Vautard e colaboradores (1999). De

acordo com o trabalho citado, os fungos *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger* apresentam um gene denominado CreA que possui 84% de similaridade com Mig1, sendo que um trabalho realizado por Strauss e colaboradores (1995) definiu o fator Cre1 de *T. reesei* como o homólogo funcional do fator CreA de *Aspergillus*.

A similaridade entre esses fatores leva a premissa de um sistema de repressão por glicose semelhante entre leveduras e outros fungos. O que pôde ser confirmado por Carraro e colaboradores (1998), quando verificaram que a transcrição em *S. cerevisiae* mediada pela região UARcb1 do *Pcbh1* sofreu repressão devido a presença das proteínas Ssn6 e Tup1. Sendo assim, a deleção dos sítios Cre1 (sequência de ligação dos repressores Ssn6 e Tup1) presentes no promotor *cbh1* resultaria no aumento da expressão do gene repórter e permitiria a realização da cultura na presença de glicose.

Em 2008, Liu e colaboradores realizou a modificação do promotor *Pcbh1* através da deleção dos sítios Cre1 e inserção de sítios de ligação de proteínas ativadoras da transcrição, sendo possível observar um aumento significativo nas taxas de transcrição do gene repórter. Outro estudo realizado por Zou e colaboradores (2012) também confirmaram que a deleção dos sítios Cre1 no *Pcbh1* aumenta a taxa de expressão gênica.

Baseando-se nos trabalhos realizados por Liu et al., (2008) e Zou et al., (2012) o promotor quimérico desenhado no presente trabalho utilizou-se da sequência do promotor *cbh1* de *T. reesei* sem a região responsável pela repressão catabólica, ou seja, dos sítios Cre1 e inserção de sequências ativadoras conhecidas como motivos UAS_{GAL} (região de ligação ao fator de transcrição quimérico) para que haja o aumento significativo nas taxas de transcrição do gene repórter.

De acordo com Struhl (1989), para genes cujas taxas de transcrição variam de acordo com as condições fisiológicas, o elemento de ativação presente no promotor é geralmente o principal determinante da atividade transcricional. Levando em consideração essa afirmação e o fato do promotor quimérico possuir cinco motivos UAS_{GAL}, espera-se que o gene repórter *cbh1* seja cinco vezes mais expresso quando comparado com um promotor contendo apenas um único motivo de ativação.

Já a enzima *cbh1* foi escolhida por ser uma exoglucanase envolvida no processo de degradação de biomassa vegetal, também vale ressaltar que ela é um componente do sistema celulolítico de *T. reesei* e produzida em maior quantidade

quando comparada com as outras enzimas desse sistema (EL-GOGARY et al., 1989).

Em resumo o sistema de expressão desenhado e construído no presente trabalho é descrito a seguir:

1. **Plasmídeo regulador** (figura 10A) que codifica o fator de transcrição quimérico: c-myc-Gal4(DBD)-hER α (LBD)-VP16(AD), sob o controle do promotor TEF2 e CYC1. O fator de transcrição é responsável pela interação com o indutor estrogênio e funcionará como ativador transcricional para o plasmídeo de expressão. A figura 11 mostra a sequência de DNA e aminoácidos do fator de transcrição quimérico e sequências reguladoras.
2. **Plasmídeo de expressão** (figura 10B) com a construção do promotor quimérico p5xUAS_{GAL}-UARcb1-*Trcbh1*-CYC1 TT. A região promotora deve interagir com o fator de transcrição codificado pelo plasmídeo regulador, ativando a expressão e produção da proteína repórter. A figura 12 mostra a sequência de DNA e aminoácidos da proteína *cbh1* sob controle do promotor quimérico e terminador CYC1.

Figura 10. Mapa esquemático dos plasmídeos. (A) plasmídeo regulador: pTEF2-c-myc-Gal4(DBD)-hER α (LBD)-VP16(AD)-CYC1 TT/YIplac128, contendo 6601pb; (B) plasmídeo de expressão: p5xUAS_{GAL}-UARcb1-*Trcbh1*-CYC1 TT/pYES2, contendo 8050pb. **Fonte:** Adriani, P.P. (2016)

Por ser controlada pelo promotor constitutivo TEF2 o fator de transcrição quimérico deve ser produzido constantemente. Na ausência do estrogênio o fator de transcrição fica retido no citoplasma da célula, devido a ligação da sua região hER α (LBD) com a proteína chaperona Hsp90, deixando o complexo proteico inativado. Após adição do indutor estradiol, a chaperona Hsp 90 dissocia-se, favorecendo a dimerização do hER α (LBD) e ativação do fator de transcrição que migra para o núcleo celular. Dessa forma, o fator de transcrição quimérico fica na sua forma ativa e migra para o núcleo da célula (PRATT; TOFT, 1997). A região Gal4 (DBD), presente no fator de transcrição quimérico, liga-se aos motivos UAS_{GAL} presentes no promotor quimérico, induzindo a expressão do gene repórter *Trcbh1*. (Ver figura 7, item 2.5.3).

```

-453                                     GAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGA
-420  ATTGGCGGAAGGCCGTCATTACCCATAAGGTTGTTTGTGACGGCGTCGTACAAGAGAACG
-360  TGGGAACCTTTTATAGGCTCACCAAAAAAGAAAGAAAAAATACGAGTTGCTGACAGAAGCCT
-300  CAAGAAAAAATAATTTCTTCTCGACTATGCTGGAGGCAGAGATGATCGAGCCGGTAGTT
-240  AACTATATATAGCTAAATTGGTTCCATCACCTTCTTTTCTGGTGTCGCTCCTTCTAGTGC
-180  TATTTCTGGCTTTTCCTATTTTTTTTTTTTCCATTTTTCTTTCTCTCTTTCTAATATATAA
-120  ATTCTCTTGCATTTTCTATTTTCTCTCTATCTATTCTACTTGTTTATTCCTTCAAGGT
-60   TTTTTTTTAAGGAGTACTTGTTTTTAGAATATACGGTCAACGAACATAATTAACATAAC

1   ATGGAACAAAACTTATTTCTGAAGAAGATCTGATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAACAA
    M E Q K L I S E E D L M K L L S S I E Q      20
61  GCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGCTCAAGTGCTCCAAAGAAAAACCGAAGTGCGCC
    A C D I C R L K K L K C S K E K P K C A      40
121 AAGTGCTGAAGAACAACCTGGGAGTGTGCTACTCTCCCAAACCAAAGGTCTCCGCTG
    K C L K N N W E C R Y S P K T K R S P L      60
181 ACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGAATCAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTA
    T R A H L T E V E S R L E R L E Q L F L      80
241 CTGATTTTTCTCCTCGAGAAGACCTTGACATGATTTTGAATGGATTCTTTACAGGATATA
    L I F P R E D L D M I L K M D S L Q D I      100
301 AAAGCATTTGTTATCTGCTGGAGACATGAGAGCTGCCAACCTTTGGCCAAGCCCGCTCATG
    K A L L S A G D M R A A N L W P S P L M      120
361 ATCAAACGCTCTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCTGACGGCCGACCAGATGGTCAGT
    I K R S K K N S L A L S L T A D Q M V S      140
421 GCCTTGTTGGATGCTGAGCCCCGATACTCTATTCCGAGTATGATCCTACCAGACCCTTC
    A L L D A E P P I L Y S E Y D P T R P F      160
481 AGTGAAGCTTCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCAGACAGGGAGCTGGTTACATG
    S E A S M M G L L T N L A D R E L V H M      180
541 ATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTGGATTTGACCCTCCATGATCAGGTCCAC
    I N W A K R V P G F V D L T L H D Q V H      200
601 CTTCTAGAATGTGCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTCTCGTCTGGCGCTCCATGGAG
    L L E C A W L E I L M I G L V W R S M E      220
661 CACCCAGGGAAGCTACTGTTTGCTCCTAACTTGCTCTTGGACAGGAACCAGGGAAAATGT
    H P G K L L F A P N L L L D R N Q G K C      240
721 GTAGAGGGCATGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTTCCGCATG

```

V E G M V E I F D M L L A T S S R F R M 260
 781 **ATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATCTATTATTTTGCCTTAATCTGGA**
 M N L Q G E E F V C L K S I I L L N S G 280
 841 **GTGTACACATTTCTGTCCAGCACCTTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGA**
 V Y T F L S S T L K S L E E K D H I H R 300
 901 **GTCCTGGACAAGATCACAGACACTTTGATCCACCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCCTG**
 V L D K I T D T L I H L M A K A G L T L 320
 961 **CAGCAGCAGCACAGCGGCTGGCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCCACATCAGGCACATG**
 Q Q Q H Q R L A Q L L L I L S H I R H M 340
 1021 **AGTAACAAAGGCATGGAGCATCTGTACAGCATGAAGTGAAGAACGTGGTGCCCTCTAT**
 S N K G M E H L Y S M K C K N V V P L Y 360
 1081 **GACCTGCTGGAGATGCTGGACGCCACCTTACATGCGCCCACTAGCCGTGGAGGG**
 D L L L E M L D A H R L H A P T S R G G 380
 1141 **GCATCCGTGGAGGAGACGGACCAAAGCCACTTGGCCACTGCGGGCTCTACTTCATCGCAT**
 A S V E E T D Q S H L A T A G S T S S H 400
 1201 **TCCTTGCAAAAAGTATTACATCACGGGGGAGGCAGAGGGTTTCCCTGCCACGGTCTCCAC**
 S L Q K Y Y I T G E A E G F P A T V L H 420
 1261 **TTAGACGGCGAGGACGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCGCTAGACGATTTGATCTGGAC**
 L D G E D V A M A H A D A L D D F D L D 440
 1321 **ATGTTGGGGGACGGGATTCCCCGGGTCCGGGATTTACCCCCACGACTCCGCCCCCTAC**
 M L G D G D S P G P G F T P H D S A P Y 460
 1381 **GGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAGCAGATGTTTACCGATGCCCTTGAATT**
 G A L D M A D F E F E Q M F T D A L G I 480
 1441 **GACGAGTACGGTGGGTAGACAGGCCCTTTTCCTTTGTCTGATATCATGTAATTAGTTATG**
 D E Y G G - 485
 1501 **TCACGCTTACATTCACGCCCTCCTCCCACATCCGCTCTAACCAGAAAGGAAGGAGTTAGA**
 1561 **CAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTAATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGT**
 1621 **TATTTATATTTCAAATTTTCTTTTTTTTCTGTACAAA**

Figura 11. Sequência de DNA e aminoácidos da construção presente no plasmídeo regulador. Sublinhado, promotor TEF2; Na caixa, epítipo da proteína c-myc; Em letra branca e fundo preto, domínio de ligação ao DNA de Gal4p; Em negrito, domínio de ligação ao ligante hER α ; Em itálico, domínio de ativação VP16; Em cinza, terminador CYC1.

-473 TCGAT **CGGAAGACTCTCCTCC** GACGTCGTGTTTGCAGCACAAACGTCGTGTTTG
 -420 CAGC **CGGAAGACTCTCCTCC** GACGTCGTGTTTGCAGCACAAACGTCGTGTTTGCAGC **CGGA**
 -360 **AGACTCTCCTCC** GACGTCGTGTTTGCAGCACAAACGTCGTGTTTGCAGC **CGGAAGACTCTC**
 -300 **CTCC** GACGTCGTGTTTGCAGCACAAACGTCGTGTTTGCAGC **CGGAAGACTCTCCTCC** GACG
 -240 TCGTGTTTGCAGCACAAACGTCGTGTTTGCAGCGCTTAGCCAAGAACAATAGCCGATAAAG
 -180 ATAGCCTCATTAACCGGAATGAGCTAGTAGGCAAAGTCAGCGAATGTGTATATATAAAGG
 -120 TTCGAGGTCCGTGCCTCCCTCATGCTCTCCCATCTACTCATCAACTCAGATCCTCCAGG
 -60 AGACTTGTACACCATCTTTTGGAGGCACAGAAACCAATAGTCAACCGCGGACTGCGCATC
 1 **ATGTATCGGAAGTTGGCCGTCATCTCGGCCTTCTTGGCCACAGCTCGTGCTCAGTCGGCC**
 M Y R K L A V I S A F L A T A R A Q S A 20
 61 **TGCACTCTCCAATCGGAGACTCACCCGCCCTCTGACATGGCAGAAATGCTCGTCTGGTGGC**
 C T L Q S E T H P P L T W Q K C S S G G 40
 121 **ACGTGCACTCAACAGACAGGCTCCGTTGGTCATCGACGCCAACTGGCGCTGGACTCACGCT**
 T C T Q Q T G S V V I D A N W R W T H A 60
 181 **ACGAACAGCAGCACGAAGTGTACGATGGCAACACTTGGAGCTCGACCCTATGTCCTGAC**
 T N S S T N C Y D G N T W S S T L C P D 80
 241 **AACGAGACCTGCGCAAGAACTGCTGTCTGGACGGTGCCGCTACGCGTCCACGTACGGA**


```

      N E T C A K N C C L D G A A Y A S T Y G 100
301 GTTACCACGAGCGGTAACAGCCTCTCCATTGGCTTTGTCACCCAAGTCTGCGCAGAAGAAC
      V T T S G N S L S I G F V T Q S A Q K N 120
361 GTTGGCGCTCGCCTTTACCTTATGGCGAGCGACACGACCTACCAGGAATTCACCCTGCTT
      V G A R L Y L M A S D T T Y Q E F T L L 140
421 GGCAACGAGTTCTCTTTTCGATGTTGATGTTTCGCAGCTGCCGTGCGGCTTGAACGGAGCT
      G N E F S F D V D V S Q L P C G L N G A 160
481 CTCTACTTTCGTGTCCATGGACGCGGATGGTGGCGTGAGCAAGTATCCCACCAACACCGCT
      L Y F V S M D A D G G V S K Y P T N T A 180
541 GGCGCCAAGTACGGCACGGGGTACTGTGACAGCCAGTGTCCCCGCGATCTGAAGTTCATC
      G A K Y G T G Y C D S Q C P R D L K F I 200
601 AAAGGCCAGGCCAACGTTGAGGGCTGCGGAGCCGTCATCCAACAACGCGAACGCGGAGATT
      N G Q A N V E G W E P S S N N A N T G I 220
661 GGAGGACACGGAAGCTGCTGCTCTGAGATGGATATCTGGGAGGCCAACTCCATCTCCGAG
      G G H G S C C S E M D I W E A N S I S E 240
721 GCTCTTACCCCCACCCCTTGACGACTGTGCGCCAGGAGATCTGCGAGGGTGATGGGTGC
      A L T P H P C T T V G Q E I C E G D G C 260
781 GGCGGAACCTTACTCCGATAACAGATATGGCGGCACTTCGATCCCGATGGCTGCGACTGG
      G G T Y S D N R Y G G T C D P D G C D W 280
841 AACCCATACCGCCTGGGCAACACCAGCTTCTACGGCCCTGGCTCAAGCTTTACCCTCGAT
      N P Y R L G N T S F Y G P G S S F T L D 300
901 ACCACCAAGAAATTGACCGTTGTCACCCAGTTCGAGACGTGCGGTGCCATCAACCGATAC
      T T K K L T V V T Q F E T S G A I N R Y 320
961 TATGTCCAGAAATGGCGTCACCTTTCCAGCAGCCAACGCCGAGCTTGGTAGTTACTCTGGC
      Y V Q N G V T F Q Q P N A E L G S Y S G 340
1021 AACGAGCTCAACGATGATTACTGCACAGCTGAGGAGGCAGAATTCGGCGGATCCTCTTTC
      N E L N D D Y C T A E E A E F G G S S F 360
1081 TCAGACAAGGGCGGCCTGACTCAGTTCAAGAAGGCTACCTCTGGCGGCATGGTTCTGGTC
      S D K G G L T Q F K K A T S G G M V L V 380
1141 ATGACTCTGTGGGATGATTACTACGCCAACATGCTGTGGCTGGACTCCACCTACCCGACA
      M S L W D D Y Y A N M L W L D S T Y P T 400
1201 AACGAGACCTCCTCCACACCCGGTGCCGTGCGCGGAAGCTGCTCCACCAGCTCCGGTGTG
      N E T S S T P G A V R G S C S T S S G V 420
1261 CCTGCTCAGGTGCAATCTCAGTCTCCCAACGCCAAGGTCACCTTCTCCAACATCAAGTTC
      P A Q V E S Q S P N A K V T F S N I K F 440
1321 GGACCCATTGGCAGCACCGGCAACCCTAGCGGCGGCAACCCTCCCGGCGGAAACCCGCCT
      G P I G S T G N P S G G N P P G G N P P 460
1381 GGCACCACCACCACCCGCCGCCAGCCACTACCACTGGAAGCTCTCCCGGACCTACCCAG
      G T T T T R R P A T T T G S S P G P T Q 480
1441 TCTCACTACGGCCAGTGCGGCGGTATTGGCTACAGCGGCCCCACGGTCTGCGCCAGCGGC
      S H Y G Q C G G I G Y S G P T V C A S G 500
1501 ACAACCTTGCCAGGTCCCTGAACCCCTTACTACTCTCAGTGCCTGTAACTCGAGCATGCATCT
T T C Q V L N P Y Y S Q C L - 514
1561 AGAGGGCCGCATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTACGCCCTCCCCCACATC

1621 CGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTT
1681 TATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTA
1741 CAGACGCGTGTAACGATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACG
1701 CTCGAAGGCTTTAATTTGC

```

Figura 12. Sequência de DNA e aminoácidos da construção presente no plasmídeo de expressão. Nas caixas, motivos UAS_{GAL}; Grifado, região promotora mínima UARcb1 de *T. reesei*; Em negrito, gene celobiohidrolase I de *Trichoderma reesei* (*Trcbh1*); Em cinza, terminador CYC1.

As construções dos plasmídeos foram confirmadas por PCR, sendo que para o plasmídeo regulador foram utilizados os pares de oligonucleotídeos synth2-852F e

synth3-1538R (produto de PCR com ~700 pb) e synth2-852F e synth3-2128R (produto de PCR com ~1.3 kb) e para o plasmídeo de expressão os oligonucleotídeos cbh1-F e cbh1-R (produto de PCR com ~ 1.5 kb), as sequências dos oligonucleotídeos podem ser conferidas na tabela 1 (item 5.2). Na figura 13 e 14 é possível ver a região amplificada e a confirmação no gel de agarose 1% de ambos os plasmídeos.

Através da amplificação foi possível confirmar a integridade do sistema construído.

Figura 13. Análise da construção do plasmídeo regulador. A) Esquema do fator de transcrição quimérico sob controle do promotor TEF2 e terminador CYC1. As setas indicam a posição dos oligonucleotídeos utilizados na análise por PCR. **B) Eletroforese em Gel de Agarose 1% - PCR do DNA genômico e plasmidial.** Amplificação do DNA do plasmídeo regulador (linha 1) e DNA genômico de *S. cerevisiae* W303-1A transformada com o plasmídeo regulador e de expressão (linha 2) com os oligonucleotídeos synth2-852F e synth3-1538R, produto de PCR de ~0.7 kb; Amplificação do plasmídeo regulador (linha 3) e DNA genômico de *S. cerevisiae* W303-1A transformada com o plasmídeo regulador e de expressão (linha 4) com os oligonucleotídeos synth2-852F e synth3-2128R, produto de PCR de ~1.3 kb e PM: Peso Molecular 1 Kb ladder (Life Technologies, USA).

Figura 14. Análise da construção do plasmídeo de expressão.A) Esquema do promotor quimérico p5xUAS_{GAL}-URAcb1 controlando o gene repórter *Trcbh1*. As setas indicam a posição dos oligonucleotídeos utilizados na análise por PCR. Os oligonucleotídeos utilizados foram cbh1-F e cbh1-R resultando em produto de PCR de ~1.5 kb. B) Eletroforese em Gel de Agarose 1% - PCR do DNA plasmidial e genômico. Amplificação do DNA do plasmídeo de expressão (linha 1); Amplificação do DNA genômico de *S. cerevisiae* W303-1A transformada com o plasmídeo regulador e de expressão (linha 2) e PM: Peso Molecular 1 Kb ladder (*Life Technologies*, USA).

6.2 Transformação e Preparação de DNA de *Saccharomyces cerevisiae*

A transformação da cepa W303-1A de *S. cerevisiae* foi feita tanto com o plasmídeo regulador quanto com o plasmídeo de expressão de acordo com o protocolo de transformação descrito na metodologia (item 5.4). O protocolo utilizado foi escolhido devido a sua eficiência de transformação, que requer a linearização dos fragmentos de DNA a serem utilizados propiciando dessa forma a integração de regiões específicas do DNA plasmidial ao DNA genômico da levedura através de recombinação homóloga. A integração total do fragmento em estudo ao DNA genômico resulta em um transformante mais estável (KAWAI; HASHIMOTO; MURATA, 2010). Por outro lado, a cepa W303-1A de *S. cerevisiae* tem sido amplamente utilizada em pesquisas fisiológicas e genéticas (KOKINA; KIBILDS; LIEPINS, 2014); pesquisas de tolerância ao etanol ((AVRAHAMI-MOYAL; BRAUN; ENGELBERG, 2012), produção de proteínas recombinantes (SAMPAIO et al., 2008) e sistemas de expressão induzidos por estrogênio (QUINTERO et al., 2007) o que fez com que ela fosse viável para o desenvolvimento do presente trabalho.

Das cepas transformadas, quatro foram selecionadas e estabilizadas após três replicações em meio YNBD ágar, utilizando as marcas auxotróficas *LEU2* e *URA3*. Os transformantes foram estabilizados e submetidos a extração de DNA. Posteriormente, foi realizada a amplificação com os oligonucleotídeos específicos para confirmação da integração dos plasmídeos. As amplificações realizadas do DNA genômico podem ser observadas na figura 13 para o plasmídeo regulador e na figura 14 para o plasmídeo de expressão. As sequências amplificadas foram submetidas ao processo de sequenciamento, no qual os resultados obtidos comprovaram a integração dos plasmídeos de interesse proporcionando cepas estáveis.

6.3 Estabilização e confirmação da inativação do gene *PDR5*

Em *S. cerevisiae*, transportadores de cassete de ligação de ATP estão envolvidos em um fenômeno conhecido como resistência pleiotrópica a drogas (*Pleotropic drugs resistance*, PDR), similar a resistência multidrogas (MDR) presentes em células de mamíferos. Uma das proteínas mais caracterizadas, envolvidas no processo de resistência pleiotrópica a drogas em leveduras, é a proteína Pdr5p (BALZI et al., 1997; BISSINGER; KUCHLER, 1994; HIRATA et al., 1994; KRALLI; BOHEN; YAMAMOTO, 1995). Pdr5p é uma proteína de membrana plasmática que pertence à família de transportadores que se ligam ao ATP (*ATP binding cassette* – transportadores ABC) e conferem resistência a substâncias exógenas (MAHE; LEMOINE; KUCHLER, 1996). Essas proteínas são conhecidas por exportar centenas de xenobióticos estruturais e funcionais para o meio extracelular.

Apesar de ser amplamente conhecida a ação da Pdr5p ainda não está totalmente elucidada. Alguns trabalhos relacionados à transportadores ABC, como *PDR5*, indicam que a transcrição desses tipos de genes, é controlada por proteínas do tipo dedo de zinco Zn(II)₂Cys₆ conhecidas como Pdr1p e Pdr3p. Essas proteínas serviriam como sinalizadoras da presença de algum produto externo a célula e ativariam a produção da Pdr5p para que houvesse a expulsão do produto “invasivo” (BALZI et al., 1987; DELAVEAU et al., 1994; MAMNUN, 2002). Porém, dois trabalhos realizados em 2002 indicaram que o gene *PDR5* pode ser induzido

diretamente por algumas drogas como, 2,4-diclorofenol e alguns detergentes de membrana (TEIXEIRA; SA-CORREIA, 2002).

Com o intuito de analisar o nível intracelular do hormônio estradiol em leveduras, Mahe e colaboradores (1996), deletou o gene *PDR5* de uma cepa de *S. cerevisiae* contendo um elemento de resposta a estrogênio (ERE) controlando a expressão do gene *URA3*, ou seja, uma cepa estradiol-dependente. Dessa forma foi possível observar que as cepas que continham o gene *PDR5* deletado potencializavam a ação do estradiol no sistema, ao passo que as cepas contendo o gene *PDR5* intacto inibia a expressão de *URA3*. Concluindo dessa forma que a proteína Pdr5p atua como uma bomba de efluxo de estradiol, controlando os níveis intracelulares desse hormônio. As cepas *pdr5Δ* tem a capacidade de acumular quase 30 vezes mais estradiol que a cepa selvagem isogênica (MAHE; LEMOINE; KUCHLER, 1996).

Considerando os resultados obtidos por Mahe e colaboradores (1996) e para garantir o funcionamento do sistema de expressão, o presente trabalho desenvolveu uma cepa W303-1A *pdr5Δ*.

Para a inativação do gene *PDR5*, primeiramente o gene *KanMX* foi amplificado da cepa *S. cerevisiae* BY4741 *pdr5Δ* com adição da cauda do gene *PDR5* de 85 nucleotídeos na extremidade 5' e 1084 pb na extremidade 3' (figura 15). Posteriormente, o fragmento amplificado, de aproximadamente 1.8 kb, foi utilizado para transformação integrativa na cepa *S. cerevisiae* W303-1A contendo o plasmídeo regulador e de expressão, seguindo a metodologia descrita no item 5.7. Os transformantes obtidos foram selecionados devido a sua resistência pelo antibiótico geneticina (figura 16).

Quatro transformantes foram selecionados e estabilizados através de três replicações seguidas em meio YPD geneticina. Em seguida, os transformantes selecionados foram submetidos a extração de DNA (figura 17). Para confirmar a mutação, foi realizada amplificação do gene *KanMX* (figura 18), utilizando os oligonucleotídeos PDR5-450-up-F e KanB (tabela 2). Através do PCR e da seleção por geneticina é possível concluir que a inativação do gene *PDR5* foi realizada com sucesso.

Figura 15. Eletroforeses em gel de agarose 1% da amplificação do gene *KanMX* com cauda do gene *PDR5* amplificado a partir do DNA genômico da cepa *S. cerevisiae* BY4741 *pdr5* Δ (linha 1, 2, 3 e 4). Utilizando os oligonucleotídeos *pdr5-KanMX-F* e *pdr5-KanMX-R*, obtendo o fragmento de, aproximadamente, 1.8 kb. PM: Peso Molecular 1Kb ladder (*Life Technologies*, USA).

Figura 16. Placas de cultura demonstrando o crescimento de transformantes em meio YPD geneticina. A) *S. cerevisiae* W303-1A/*pdr5* Δ transformada com plasmídeo regulador e de expressão e B) *S. cerevisiae* W303-1A transformada com o plasmídeo regulador e de expressão.

Figura 17. Eletroforeses em gel de agarose 1% da extração de DNA genômico. Linhas: 1, 2, 3 e 4 - *S. cerevisiae* W303-1A/*pdr5*Δ transformada com o plasmídeo regulador e de expressão.

Figura 18. Eletroforeses em gel de agarose 1% para confirmação da integração do gene *KanMX* no locus de *PDR5* por PCR. Amplificação utilizando os oligonucleotídeos PDR5-450-up-F e KanB (fragmento de aproximadamente 1.3 kb), e DNA genômico de *S. cerevisiae* W303-1A (linha 1); *S. cerevisiae* BY4741 *pdr5*Δ (linha 2); *S. cerevisiae* W303-1A/*pdr5*Δ (linha 3); *S. cerevisiae* W303-1A/*pdr5*Δ transformada com o plasmídeo regulador e de expressão (linha 4). PM: Peso Molecular 1Kb ladder (Life Technologies, USA).

6.4 Teste de resistência a Triton X-100

De acordo com o trabalho realizado por Schüller e colaboradores (2007) o gene *PDR5* codifica uma proteína de membrana responsável pela captação por endocitose e o direcionamento vacuolar de lipídios indesejáveis ou tóxicos, muitos dos quais tem características semelhantes aos xenobióticos hidrofóbicos, como no caso do triton X-100 e até mesmo de esteroides estrogênicos. Assim, a inativação do gene *PDR5* permite o ingresso de substâncias hidrofóbicas, como no caso do Triton X-100, ao meio intracelular afetando a longevidade da célula.

Com o objetivo de confirmar a inativação do gene *PDR5* na cepa W303-1A em estudo, foi realizado o teste de resistência à Triton X-100 na concentração de 1% proposto por Schüller e colaboradores (2007), no qual foi possível observar o crescimento diferencial dos mutantes, após 3 dias de incubação.

Como é possível observar na figura 19, todas as cepas crescidas em meio YPD demonstraram o mesmo padrão de crescimento nas diferentes diluições realizadas. Já as cepas transformadas crescidas em meio YPD contendo 1% de Triton X-100 demonstraram uma diferença significativa de crescimento quando comparadas a cepa controle W303-1A (figura 19A), ou seja, todos os transformantes apresentaram resistência reduzida quando comparados a cepa controle. Também é possível observar que somente a cepa controle apresenta crescimento na diluição 10^{-4} . Dessa forma, pode-se concluir que a inativação do gene *PDR5* foi realizada com sucesso.

Na análise da figura 19B é possível observar o crescimento diferencial na presença do Triton X-100 dos transformantes 2, 4 e 5 comparado com a cepa selvagem W303-1A, motivo pelo qual esses transformantes foram selecionados para os ensaios posteriores. Entre os três transformantes selecionados o transformante 2 é o que apresenta melhor crescimento diferencial até a diluição 10^{-3} , os transformantes 3 e 4 apresentam crescimento somente até a diluição 10^{-2} porém, o transformante 4 foi selecionado por apresentar maior número de colônias, já o transformante 5 foi selecionado devido a seu menor número de colônias na diluição 10^{-3} (figura 19B).

Figura 19. Teste de crescimento diferencial. Deleção do gene *PDR5* causa aumento da sensibilidade à detergente. Todas as cepas foram crescidas até a fase exponencial e posteriormente diluída para uma Abs 600 nm de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . **(A)** Crescimento da cepa controle e transformantes 1 a 6 no meio YPD. **(B)** Crescimento da cepa controle e transformantes 1 a 6 no meio YPD contendo 1% de Triton X-100.

6.5 Análise do Crescimento

A expressão gênica é um mecanismo de regulação básico de todos os seres vivos, necessário para a sua sobrevivência. Em microrganismos a glicose ou outras fontes de carbono metabolizáveis (açúcares que sejam convertidos em glicose) reprimem a expressão de genes responsáveis pela produção de enzimas relacionadas com o metabolismo de outras fontes de carbono. Esse processo chamado de repressão catabólica permite que os microrganismos sejam capazes de lidar eficazmente com as alterações de fontes de carbono presentes no meio ambiente (RETTORI; VOLPE, 2000).

Por ser um monossacarídeo, a glicose é conhecida como fonte de carbono e energia preferencial em levedura. Porém, quando presente em meio de cultura faz com que ocorra o processo de repressão catabólica mas facilmente. A *S. cerevisiae* é conhecida por apresentar dois perfis de crescimento, denominado diauxismo. Por exemplo, na presença de glicose, a *S. cerevisiae* realiza a proliferação celular, produzindo como subproduto o etanol, até que a fonte de carbono disponível se esgote. Após a exaustão da glicose e cessamento do crescimento começa haver o

consumo do subproduto, no caso o etanol, e então a proliferação celular se inicia novamente (RETTORI; VOLPE, 2000).

A levedura *S. cerevisiae* é conhecida devido a sua capacidade de fermentação, ou seja, ela utiliza-se de fontes de carbono como, glicose, sacarose, galactose, entre outras fontes para que haja propagação celular.

Como visto anteriormente a levedura tem um mecanismo de repressão por glicose, sendo este um dos responsáveis pelo surgimento do diauxismo. Na presença de altos níveis de glicose ocorre o processo de repressão catabólica, fazendo com que a glicose seja fermentada produzindo etanol. O mecanismo de repressão catabólica baseia-se na interação entre um sinal, decorrente da presença de glicose, e as proteínas regulatórias da expressão gênica, ativando proteínas repressoras ou inibindo proteínas ativadoras. Uma alternativa para minimizar o impacto causado pela glicose é a utilização de fontes de carbono metabolizáveis alternativas (sacarose, galactose, glicerol, entre outras) (GANCEDO, 1992).

No sistema de expressão desenvolvido os sítios de repressão por glicose foram removidos do promotor em estudo, porém a presença de altas concentrações de glicose pode afetar outras vias regulatórias interferindo na produção de enzimas como, por exemplo, maltase (ENTIAN; ZIMMERMANN, 1982), frutose 1.6-bisfosfatase (GANCEDO; SCHWERZMANN, 1976) e galactokinase (TORCHIA et al., 1984) podendo interferir indiretamente na formação do produto de interesse.

Com a finalidade de selecionar uma fonte de carbono alternativa a glicose foi realizada uma análise da curva de crescimento dos transformantes 2, 4 e 5 na presença de diferentes fontes de carbono: glicose 2%; glicerol 2%; galactose 2% e sacarose 2%, sendo essas selecionadas por serem as mais comumente usadas em estudos com diferentes tipos de leveduras.

Como é possível observar nos gráficos a seguir as fontes de carbono que apresentaram melhor crescimento, foram glicose 2% (figura 20) e sacarose 2% (figura 21). As duas fontes de carbono supracitadas demonstraram um perfil inicial de crescimento (fase *lag*) parecido com duração de aproximadamente 3 horas. Ambas entraram em crescimento exponencial (fase *log*) em torno de 4 horas após o inóculo. Porém, todos os transformantes e a cepa controle se mantiveram por mais tempo em fase exponencial na presença de sacarose 2% como fonte de carbono, entrando em fase estacionária somente após de 18 horas, atingindo Abs₆₀₀ de aproximadamente 1,4. Quando comparadas a glicose todas as cepas entraram em

fase estacionária por volta de 15 horas após o inóculo, atingindo Abs₆₀₀ de aproximadamente 1,2. É importante destacar que na presença de glicose 2% ou sacarose 2%, os transformantes, em especial o transformante 2, demonstraram um crescimento melhor em comparação com a cepa controle (W303-1A).

Figura 20. Curva de crescimento em YPD. Curva de crescimento comparativo entre as cepas controle (W303-1A), transformante 2, transformante 4 e transformante 5 em meio YPD.

Figura 21. Curva de crescimento YP Sacarose 2%. Curva de crescimento comparativo entre as cepas controle (W303-1A), transformante 2, transformante 4 e transformante 5 em meio YP Sacarose 2%.

Nas figuras 22 e 23, é possível visualizar o crescimento da cepa controle e transformantes nos meios contendo como fonte de carbono, glicerol 2% e galactose 2% respectivamente. Pode-se observar que tanto na presença de glicerol, como na presença de galactose a cepa controle tem o comportamento de crescimento diferente dos transformantes 2, 4 e 5. Sendo que, nessas duas últimas fontes de carbono citadas, todas as cepas possuem a fase *lag* mais extensa (7 à 8 horas para glicerol 2% e 13 à 14 horas para galactose 2%). Em relação a fase exponencial, os transformantes demonstraram um encurtamento dessa fase no meio contendo galactose 2% (Abs₆₀₀ 1,2), aproximadamente de 3 a 4 horas, chegando a fase estacionária mais rapidamente. Já as curvas de crescimento na presença de glicerol 2%, demonstraram um ingresso na fase estacionária mais tardia.

Figura 22. Curva de crescimento em YP Glicerol 2%. Curva de crescimento comparativo entre as cepas controle (W303-1A), transformante 2, transformante 4 e transformante 5 em meio YP Glicerol 2%.

Figura 23. Curva de crescimento em YP Galactose 2%. Curva de crescimento comparativo entre as cepas controle (W303-1A), transformante 2, transformante 4 e transformante 5 em meio YP Galactose 2%.

Após análise das figuras 19, 20, 21, e 22, concluiu-se que a melhor fonte de carbono a ser utilizada no presente estudo era sacarose 2%. A sacarose é conhecida por ser um substrato abundante e de baixo custo para os processos de biotecnologia industrial, principalmente os relacionados a produção de etanol. Esse tipo de açúcar é amplamente utilizado em estudos com leveduras, por ser consumido de forma muito eficiente (MARQUES et al., 2016), como pode ser comprovado através da figura 21. Apesar de ser muito utilizado, existem poucos estudos relacionados ao metabolismo da sacarose em leveduras, fazendo com que haja pouco conhecimento dos efeitos desse açúcar no metabolismo desse microrganismo.

Diferente da sacarose, o metabolismo da galactose é muito estudado e conhecido. A indução dos genes GAL por galactose é dependente da ligação dos fatores de transcrição de Gal4 as sequências UAS_{GAL} localizados a montante da região promotora. Essas sequências estão diretamente relacionadas ao nível de indução de determinados genes (CONRAD et al., 2014). O sistema de expressão desenvolvido no presente trabalho utiliza-se de sequências UAS_{GAL} no promotor quimérico, o que nos leva a crer que as alterações no crescimento devido a

utilização de galactose como fonte de carbono estejam relacionadas com a presença do promotor e a sua consequente ativação ou repressão.

Outro fator importante analisado foi a influência de diferentes concentrações do hormônio 17- β -estradiol no crescimento celular das cepas em estudo. Pois, em *S. cerevisiae* existem três genes (*PDR5*, *SNQ2* e *YOR1*) de resistência a multidrogas que são responsáveis pela resistência das células contra uma grande variedade estrutural e funcional de moléculas xenobióticas, como o estradiol, garantindo dessa forma a integridade e funcionalidade do metabolismo celular (CADEK et al., 2004; MITTERBAUER et al., 2002).

No entanto, no trabalho realizado por Quintero e colaboradores (2007), demonstraram a funcionalidade de um sistema de expressão dependente de estrogênio utilizando a cepa W303-1A, sem a necessidade da deleção/inativação de genes de resistência a multidrogas. Baseando-se no trabalho citado anteriormente, o presente estudo utilizou-se da cepa W303-1A, porém foi decidida a inativação da expressão do gene *PDR5* a fim de garantir o ingresso da molécula indutora.

A inativação do gene *PDR5*, pode tornar a célula mais sensível afetando o seu desenvolvimento e crescimento. Com a finalidade de garantir a mínima interferência do indutor em questão no sistema de expressão em estudo, foi realizado uma curva de crescimento em diferentes concentrações de estrogênio. Os resultados podem ser vistos nas figuras a seguir.

A figura 24 mostra a curva de crescimento da cepa controle (W303-1A) no meio YP Sacarose 2%, suplementado com hormônio 17- β -estradiol. É possível verificar que o período de duração da fase *lag* (5 à 7 horas), quanto da fase exponencial (aproximadamente 18 horas) se mantém parecidos independente da concentração de hormônio, porém com o aumento da concentração hormonal no meio a concentração celular diminuiu.

Figura 24. Curva de crescimento cepa controle (W303-1A) em meio YP Sacarose 2% suplementado com diferentes concentrações de 17-β-estradiol.

Em relação aos transformantes 2 (figura 25), 4 (figura 26) e 5 (figura 27) eles não mantiveram um padrão de crescimento entre eles. Acredita-se que isso seja explicado devido à presença de outros genes de resistência a multidrogas (*SNQ2* e *YOR1*), que pode funcionar com mais ou menos eficiência dependendo do transformante a ser analisado. Também é possível observar que tanto na cepa controle quanto nos transformantes a concentração de 100 μM é tóxica para célula, independente do gene *PDR5* estar ou não funcional fazendo com que a célula não se prolifere com essa concentração de hormônio.

Figura 25. Curva de crescimento do transformante 2 em meio YP Sacarose 2% suplementado com diferentes concentrações de 17-β-estradiol.

Figura 26. Curva de crescimento do transformante 4 em meio YP Sacarose 2% suplementado com diferentes concentrações de 17-β-estradiol.

Figura 27. Curva de crescimento do transformante 5 em meio YP Sacarose 2% suplementado com diferentes concentrações de 17-β-estradiol.

A análise das curvas de crescimento contendo as diferentes concentrações de 17-β-estradiol selecionada, pode-se concluir que o indutor utilizado não interfere significativamente no crescimento celular em concentrações abaixo de 100 μM.

6.6 Atividade enzimática

Tendo em vista o alto grau de conservação da rede regulatória entre os organismos eucariotos, a análise da habilidade do promotor p5xUAS_{GAL}-UARcb1 em dirigir a expressão induzida por estrogênio do gene repórter *cbh1* em *S. cerevisiae*, foi um dos objetivos do presente trabalho.

Para avaliar a expressão do gene repórter *cbh1* e, conseqüentemente a atividade do promotor p5xUAS_{GAL}-UARcb1 em *S. cerevisiae*, os transformantes 2, 4 e 5 foram analisados pela atividade da enzima *cbh1* utilizando-se do teste de DNS, cuja a atividade é apresentada em μg/mL de glicose.

Os pré-inóculos crescidos em meio YPD foram inoculados em 50 mL de meio YP Sacarose 2%, de forma que a Abs₆₀₀ inicial fosse 0,4. Para as análises iniciais o meio foi suplementado com as seguintes concentrações de 17-β-estradiol (E₂): zero, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 5 μM e 10 μM. As concentrações foram escolhidas de acordo

com os protocolos realizados por McIsaac et al., (2014), Nalley; Johnston; Kodadek (2006), Pierrat et al., (1994) e Quintero et al., (2007).

Inicialmente a avaliação da atividade enzimática foi realizada após 12 horas de indução com os transformantes 2, 4 e 5, nas concentrações de E₂ supracitadas. Sendo que foi possível observar que a atividade das amostras contendo 10 nM, 100 nM e 1 µM de hormônio foi próxima ou igual a atividade enzimática das amostras sem presença de hormônio. Indicando dessa forma que o sistema com essas concentrações não estava sendo induzido e que o mesmo possui atividade basal.

A atividade basal pode ser explicada devido ao sistema de expressão desenhado ser composto por dois plasmídeos, sendo: plasmídeo regulador e plasmídeo de expressão. O plasmídeo regulador é responsável pela produção do fator de transcrição quimérico, este por sua vez tem sua expressão controlada pelo promotor constitutivo TEF2, ou seja, é produzido constantemente. O fator de transcrição quimérico no citoplasma se liga a proteína chaperona Hsp90 o que o deixa na sua forma inativa. Porém, a proteína Hsp90 faz parte de diversas funções celulares, entre elas, dobramento de proteínas, ativação e montagem de complexos multiproteicos (JONHSON, 2012). Devido à diversidade funcional dessas proteínas nem sempre elas estão disponíveis em quantidade suficiente no citoplasma, fazendo com que alguns fatores de transcrição quimérico fiquem ativos por estarem dissociados das Hsp90. Dessa forma, os fatores de transcrição quimérico ficam disponíveis para ingressar no núcleo celular e consequentemente ativar a expressão do gene repórter.

Após os experimentos iniciais foi possível determinar as concentrações de estrogênio a serem utilizadas no presente trabalho (zero, 5 µM e 10 µM). Em seguida foi realizado um ensaio para análise comparativa da expressão do gene *cbh1* nos transformantes 2, 4 e 5. No qual, passadas 12 horas de indução, foram retiradas alíquotas de 1 mL do sobrenadante para realização dos testes de DNS. O teste utilizado baseia-se na reação do DNS com açúcares redutores, ou seja, com o produto da clivagem do substrato devido a ação da enzima *cbh1*.

A atividade do gene *cbh1* foi determinada em comparação com a curva-padrão de glicose (açúcar redutor), que foi realizada devido a relação gráfica entre os valores de absorbância e os de concentração de glicose. Com base na análise gráfica é possível verificar a linearidade da reação e calcular um fator de conversão de valores de absorbância em concentração de glicose.

Na figura 28 é possível observar os resultados dos experimentos realizados com os transformantes 2, 4 e 5. Todos os transformantes apresentaram atividade basal de aproximadamente 6 $\mu\text{g/mL}$ e maior concentração de glicose após indução com meio suplementado com 5 μM de E_2 . O transformante 2 apresentou maior concentração de glicose (24,86 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado com os transformantes 4 (17,70 $\mu\text{g/mL}$) e 5 (19,15 $\mu\text{g/mL}$). A concentração de 10 μM de E_2 demonstrou uma queda da atividade enzimática, sendo considerada inibidora do sistema.

Figura 28. Determinação da atividade enzimática da enzima *cbh1*. Os transformantes 2, 4 e 5 foram induzidos no meio YP Sacarose 2% sob diferentes concentrações de 17- β -estradiol (zero, 5 μM e 10 μM). A análise da atividade da celobiohidrolase I foi feita após 12 horas de indução pelo teste de DNS, cujo resultado é apresentado no gráfico em $\mu\text{g/mL}$. **Fonte:** ADRIANI, P.P (2016).

Alguns trabalhos (LYTTLE et al., 1992; QUINTERO et al., 2007) utilizando-se de sistemas induzidos com estrogênio analisaram a expressão do gene repórter *LacZ*, no qual foi demonstrado atividade basal na ausência de hormônio, confirmando os resultados obtidos. Também foi possível observar que no trabalho desenvolvido por Lyttle et al., 1992 as concentrações utilizadas de E_2 (5 à 100 nM) foram bem menores que as concentrações utilizadas neste trabalho. Essas concentrações podem ser justificadas devido a inativação de dois genes de

resistência a multidrogas (*pdr5Δ* e *snq2Δ*) o que facilita o ingresso das moléculas indutoras na célula.

Comparando as atividades apresentadas pelos três transformantes, a cepa transformante de número 2 destacou-se por apresentar atividade maior entre as demais cepas. Essa resposta positiva motivou a sua seleção para a realização dos testes de indução posteriores.

Com a finalidade de avaliar o melhor período de produção enzimática e se a diferença de estrogênio poderia interferir na atividade do promotor, o transformante selecionado foi analisado novamente pela atividade *cbh1*. Nessa etapa, os pré-inóculos crescidos em meio YPD foram inoculados em meio YP Sacarose 2% suplementados com 0 μ M, 5 μ M e 10 μ M de E₂ e DES (Dietilestilbestrol). Após 6, 12 e 24 horas de indução foram retiradas alíquotas de 1 mL da cultura para realização dos testes de DNS.

A atividade do gene *cbh1* foi determinada em comparação com a curva-padrão de glicose, que foi realizada devido a relação gráfica entre os valores de absorbância e os valores de concentração de glicose conhecido. Com base na análise gráfica é possível verificar a linearidade da reação e calcular um fator de conversão de valores de absorbância em concentração de glicose.

As análises foram feitas em triplicatas e as médias são apresentadas em μ g/mL de glicose.

Conforme é possível visualizar na figura 29, a atividade da enzima *cbh1* é maior na presença de 5 μ M tanto de E₂ quanto de DES. Também é possível observar a queda na concentração de glicose na presença de 10 μ M de hormônio, indicando novamente que essa concentração pode ser inibidora do sistema. Ainda na figura 28 pode-se notar que depois de 6 horas de indução, na concentração de 5 μ M, os dois tipos de hormônios utilizados apresentam resultados próximos à 33 μ g/mL de glicose. Após 12 horas de indução observa-se um aumento da concentração de glicose, indicando um aumento da atividade enzimática na amostra suplementada com 5 μ M de DES atingindo aproximadamente 37 μ g/mL de glicose, em contrapartida as amostras suplementadas com 5 μ M de E₂ tiveram queda da atividade enzimática no mesmo tempo de indução. Todas as amostras demonstraram queda na concentração de glicose e consequentemente queda na atividade promotora após 24 horas de indução. Como esperado, a atividade basal observada no experimento da figura 28, se manteve no experimento da figura 29.

Embora a maior atividade enzimática tenha sido observada na indução com 5 μ M de E₂ e DES, após 12 horas de indução. Pode-se considerar que o melhor tempo de indução foi 6 horas, pois os valores de concentração de glicose obtidos em 6 horas e 12 horas sofreram pouca variação, sendo mais economicamente viável o menor tempo de indução.

De acordo com o trabalho de Quintero e colaboradores (2007), o tempo de indução está dentro do esperado. Pois, utilizando-se do promotor GAL1 os melhores tempos de indução observado no sistema desenvolvido por eles foram entre o intervalo de 5 e 15 horas, no qual obtiveram melhor atividade enzimática da β -galactosidase.

Figura 29. Determinação da atividade enzimática de *cbh1*. O transformante 2 foi submetido à indução no meio YP Sacarose 2% sob diferentes concentrações de DES e E₂ (zero, 5 μ M e 10 μ M). A análise da atividade da celobiohidrolase I foi feita pelo teste de DNS nos intervalos de tempo de 6, 12 e 24 horas, cujo resultado é apresentado no gráfico em μ g/mL. Fonte: ADRIANI, P.P (2016).

Com os resultados obtidos, a hipótese inicial de que o sistema de expressão induzido pelo hormônio estrogênio seria um sistema independente pode ser confirmada por apresentar maior atividade enzimática na presença do hormônio estrogênio.

7 CONCLUSÕES

Estima-se que no ano de 2015 o mercado mundial de enzimas atingiu um valor de USD \$ 4.4 bilhões, com uma expectativa de crescimento de 6% nos próximos anos (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016). Considerando o cenário anterior e o fato do Brasil ser um país em pleno desenvolvimento, o qual mostra um grande potencial no mercado de produtos biotecnológicos, entre eles, a produção de enzimas industriais.

A conservação das vias regulatórias da expressão gênica entre organismos eucarióticos tem nos permitido desenvolver um sistema de expressão de proteínas recombinantes através da utilização de componentes transcricionais provenientes de diferentes organismos, o qual tem se mostrado eficiente na produção da proteína repórter do presente estudo em *Saccharomyces cerevisiae*.

Neste trabalho, descrevemos:

- I) O desenho do promotor quimérico controlando a expressão do gene repórter *cbh1* de *Trichoderma reesei*.
- II) O desenho do fator de transcrição quimérico, a partir das sequências do proto-oncogene humano c-myc, o domínio de ligação ao DNA Gal4, domínio de ligação ao ligante do receptor de estrógeno humano α HER α (LBD) e o domínio de ativação VP16 proveniente do vírus herpes simples 1.
- III) A inativação do gene *PDR5*.
- IV) A habilidade funcional do sistema de expressão em *S. cerevisiae* W303-1A.

O plasmídeo regulador contendo a construção do fator de transcrição quimérico, demonstrou-se funcional conforme esperado. Pois, foi capaz de ativar a transcrição da proteína repórter *cbh1* (presente no plasmídeo de expressão), aumentando sua habilidade na presença do indutor estradiol.

Para garantir o funcionamento do sistema foi necessária a geração de uma cepa mutante através da deleção do gene *PDR5*, sem o qual o sistema poderia não ser tão eficiente.

Os ensaios de atividade enzimática demonstraram a expressão da enzima repórter *cbh1* na presença de diferentes concentrações do indutor estradiol (0 μ M, 5 μ M e 10 μ M). Sendo que, a maior produtividade ocorreu na presença de 5 μ M de hormônio e concentrações maiores de 10 μ M foram consideradas inibitórias do sistema.

Quando na presença de diferentes estradióis (17- β -estradiol e DES), o sistema não obteve uma diferença significativa na produção da enzima.

Finalmente, este trabalho, que atingiu os objetivos propostos, irá contribuir para a produção de proteínas recombinantes de interesse comercial 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

Os resultados deste trabalho serão apresentados na 45a. Reunião Anual da SBBq (apêndice A) e aprimorados para publicação. Além do trabalho desenvolvido tive a oportunidade de colaborar na realização de outros projetos junto a colegas do laboratório, tendo assim participado como co-autora do trabalho intitulado “Analysis of Chimeric Promoter induced by zinc for the expression of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*” apresentado na 44a. Reunião Anual da SBBq e 23 Congresso Internacional da IUBMB (apêndice B), na publicação de um capítulo de livro intitulado “Biomass and Bioenergy” em *Energy Science and Technology*, volume 7: *bioenergy*, ISBN 1626990689 Studium Press LLC, USA (apêndice C), no pedido de patente referente ao trabalho “Enzima Recombinante Époxido Hidrolase de *Trichoderma reesei*, purificação, atividade enantioseletiva e aplicações (apêndice D) e artigo submetido para publicação intitulado “Epoxide hydrolase from the fungus *Trichoderma reesei*: biochemical properties and conformational characterization” (apêndice E).

Para a continuação desse trabalho, pretendemos testar a habilidade do sistema desenvolvido em controlar outras proteínas de interesse industrial, por exemplo, endoglucanases e β -glicosidases, em *S. cerevisiae*. Posteriormente pretende-se testar a habilidade do sistema desenvolvido no fungo *T. reesei*, por ser conhecido como o maior produtor de celulases.

O sistema de expressão desenhado nesse trabalho de Dissertação de Mestrado nos permitirá desenhar outros sistemas, apresentando motivos reguladores para outras substâncias, como o hormônio progesterona ou cobre, o que oferece uma contribuição significativa para a produção de proteínas recombinantes, estudos relacionados a engenharia genética e outros estudos de interesse biotecnológico.

REFERÊNCIAS*

- ABRAHAO-NETO, J. et al. Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Biochemistry**, v. 34, n. 33, p. 10456-10462, Aug 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.
- AVRAHAM-MOYAL, L.; BRAUN S.; ENGELBERG D. Overexpression of PDE2 or SSD1-V in *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A strain renders it ethanol-tolerant. **FEMS Yeast Res**, v. 12, n. 4, p. 447-455, 2012.
- BALZI, E. et al. The multidrug resistance gene PDR1 from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 35, p. 16871-16879, Dec 1987.
- BALZI, E. et al. PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 3, p. 2206-2214, Jan 1994.
- BARBERIS, A. et al. Contact with a component of the polymerase II holoenzyme suffices for gene activation. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 359-368, May 1995.
- BERGAMASCO, A. M. et al. Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. **J. Environ. Monit.**, v. 13, n. 11, p. 3288-3293, Nov 2011.
- BERKA, R. M.; BARNETT, C. C. The development of gene expression systems for filamentous fungi. **Biotechnol. Adv.**, v. 7, n. 2, p. 127-154, 1989.
- BISCHOFF, K. M. et al. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, n. 21, p. 1761-1765, Nov 2006.
- BISSINGER, P. H.; KUCHLER, K. Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* STS1 gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 6, p. 4180-4186, Feb 1994.
- BOHM, 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 Res.**, v. 25, n. 12, p. 2464-2469, Jun 1997.
- BON, E.P.S. E FERRARA, M.A. Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of

* De acordo com:

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

cellulosic biomass. **The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries**. FAO seminar held in Rome on 12 October 2007.

BOUWS, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomes--nature's toolbox for white biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 80, n. 3, p. 381-388, Sep 2008.

BRACHMANN, C. B. et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast**, v. 14, n. 2, p. 115-132, Jan 1998.

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

BUSSEY, H. et al. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XVI. **Nature**, v. 387, n. 6632, p. 103-105, May 1997. Suppl.

BUTT, T. R. et al. Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 81, n. 11, p. 3332-3336, Jun 1984.

CADEK, R. et al. Impact of the growth phase on the activity of multidrug resistance pumps and membrane potential of *S. cerevisiae*: effect of pump overproduction and carbon source. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1665, n. 1-2, p. 111-117, Oct 2004.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2012, p. 989572, 2012.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, Jul 2010.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresour. Technol.**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, Sep 2007.

CARLE-URIESTE, J. C. et al. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 15, p. 10169-10174, Apr 11 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. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 253, n. 2, p. 407-414, Dec 1998.

CELIK, E.; CALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, n. 5, p. 1108-1118, Sep-Oct 2012.

CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Jan 2016.

CHENG, J. X. et al. Responses of four yeast genes to changes in the transcriptional machinery are determined by their promoters. **Curr. Biol.**, v. 12, n. 21, p. 1828-1832, Oct 2002.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 14, n. 4, p. 438-443, Aug 2003.

CLIFTEN, P. et al. Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. **Science**, v. 301, n. 5629, p. 71-76, Jul 2003.

CONRAD, M. et al. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 38, n. 2, p. 254-299, Mar 2014.

COOPER, T. G. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 26, n. 3, p. 223-238, Aug 2002.

COSTA, R. B. et al. Enzimas industriais e especiais: mercado nacional e internacional. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

CRAVCHIK, A.; MATUS, A. A novel strategy for the immunological tagging of cDNA constructs. **Gene**, v. 137, n. 1, p. 139-143, Dec 1993.

DAROCH, M. et al. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. **Applied Energy**, v. 102, p. 1371–1381, 2013.

DELAVEAU, T. et al. PDR3, a new yeast regulatory gene, is homologous to PDR1 and controls the multidrug resistance phenomenon. **Mol. Gen. Genet.**, v. 244, n. 5, p. 501-511, Sep 1994.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, n. 3, p. 297-306, May-Jun 2009.

DUFF, S.J.B., MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulotics to fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 55, p. 1–33, 1996.

EL-GOGARY, S. et al. Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 16, p. 6138-6141, Aug 1989.

ENTIAN, K. D.; ZIMMERMANN, F. K. New genes involved in carbon catabolite repression and derepression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**, v. 151, n. 3, p. 1123-1128, Sep 1982.

FELDMANN, H. **Yeast molecular and cellular biology**. Wiley-Blackwell, 2010.

FOULKES, N. S.; SASSONE-CORSI, P. More is better: activators and repressors from the same gene. **Cell**, v. 68, n. 3, p. 411-414, Feb 1992.

GANCEDO, C.; SCHWERZMANN, K. Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiol.**, v. 109, n. 3, p. 221-225, Sep 1976.

GANCEDO, J. M. Carbon catabolite repression in yeast. **Eur. J. Biochem.**, v. 206, n. 2, p. 297-313, Jun 1992.

GERSHON, H.; GERSHON, D. The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. **Mech. Ageing Dev.**, v. 120, n. 1-3, p. 1-22, Dec 2000.

GERTZ, J.; SIGGIA, E. D.; COHEN, B. A. Analysis of combinatorial cis-regulation in synthetic and genomic promoters. **Nature**, v. 457, n. 7226, p. 215-218, Jan 8 2009.

GEYMONAT, M.; SPANOS, A.; SEDGWICK, S. G. A *Saccharomyces cerevisiae* autoselection system for optimised recombinant protein expression. **Gene**, v. 399, n. 2, p. 120-128, Sep 2007.

GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods. Enzymol.**, v. 350, p. 87-96, 2002.

GILL, G.; SADOWSKI, I.; PTASHNE, M. Mutations that increase the activity of a transcriptional activator in yeast and mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 87, n. 6, p. 2127-2131, Mar 1990.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546, 563-567, Oct 1996.

GONSCHOROWSKI, G. P. C. **Caracterização química de hormônios sexuais em águas de poço da região da USP via cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas CG/EM**. 2013. 150 f. Dissertação - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2013.

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **Protein J.**, v. 32, n. 6, p. 419-425, Aug 2013.

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, n. 3, p. 705-736, Nov 2011.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMILTON, S. R.; GERNGROSS, T. U. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 18, n. 5, p. 387-392, Oct 2007.

HE, Z. et al. The transactivator proteins VP16 and GAL4 bind replication factor A. **Cell**, v. 73, n. 6, p. 1223-1232, Jun 1993.

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. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 228, n. 2, p. 229-237, Nov 1996.

HERNANDEZ, N. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? **Genes Dev.**, v. 7, n. 7B, p. 1291-1308, Jul 1993.

HILPERT, K. et al. Anti-c-myc antibody 9E10: epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. **Protein Eng.**, v. 14, n. 10, p. 803-806, Oct 2001.

HIRATA, D. et al. *Saccharomyces cerevisiae* YDR1, which encodes a member of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, is required for multidrug resistance. **Curr. Genet.**, v. 26, n. 4, p. 285-294, Oct 1994.

HOCHSCHILD A, D. S. Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. **Cell**, v. 6, n. 92, p. 597-600, 1998.

HOFFMAN, C. S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. **Gene**, v. 57, n. 2-3, p. 267-272, 1987.

HONG, J. et al. Development of a cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced cellobiohydrolase activity. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, n. 11, p. 2985-2993, Nov 2014.

HOU, L. et al. Effect of overexpression of transcription factors on the fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 49, n. 1, p. 14-19, Jul 2009.

HSIEH YJ, C. F. et al. The EIIAPA chimeric promoter for tumor specific gene therapy of hepatoma. **Mol. Imaging. Biol.**, v. 14, n. 4, p. 452-461, 2012.

ILMEN, M. et al. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 253, n. 3, p. 303-314, Dec 13 1996.

ILMEN, M.; THRANE, C.; PENTTILA, M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. **Mol. Gen. Genet.**, v. 251, n. 4, p. 451-460, Jun 24 1996.

IMMANUEL, C. M. G. et al. Production and partial purification of cellulase by

Aspergillus niger and *A. fumigatus* fermented in coir waste and sawdust. **Internet Journal of Microbiology**, v. 3, p. 1, 2007.

IYER V, S. K. Poly (dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. **EMBO J.**, v. 1, n. 14, p. 2570-2579, 1995.

JACKSON, S. P.; TJIAN, R. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. **Cell**, v. 55, n. 1, p. 125-133, Oct 1988.

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.

JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresour. Technol.**, v. 102, n. 1, p. 186-193, Jan 2011.

JOHNSON, J. L. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1823, n. 3, p. 607-613, Mar 2012.

JOHNSTON, M. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Rev.**, v. 51, n. 4, p. 458-476, Dec 1987.

JONES, S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. **Genome Biol**, v. 5, n. 6, p. 226, 2004.

JUVEN-GERSHON, T.; CHENG, S.; KADONAGA, J. T. Rational design of a super core promoter that enhances gene expression. **Nat. Methods**, v. 3, n. 11, p. 917-922, Nov 2006.

KAWAI, S.; HASHIMOTO, W.; MURATA, K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. **Bioeng. Bugs.**, v. 1, n. 6, p. 395-403, Nov-Dec 2010.

KLUG, A. Transcription. Opening the gateway. **Nature**, v. 365, n. 6446, p. 486-487, Oct 7 1993.

KOKINA, A.; KIBILDS, J.; LIEPINS, J. Adenine auxotrophy--be aware: some effects of adenine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae* strain W303-1A. **FEMS Yeast Res.**, v. 14, n. 5, p. 697-707, Aug 2014.

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, n. 2, p. 427-438, Feb 2014.

KOWALSKI, J. M.; PAREKH, R. N.; WITTRUP, K. D. Secretion efficiency in

Saccharomyces cerevisiae of bovine pancreatic trypsin inhibitor mutants lacking disulfide bonds is correlated with thermodynamic stability. **Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1264-1273, Feb 1998.

KRALLI, A.; BOHEN, S. P.; YAMAMOTO, K. R. LEM1, an ATP-binding-cassette transporter, selectively modulates the biological potency of steroid hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 92, n. 10, p. 4701-4705, May 1995.

LI, S. et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Comput. Struct. Biotechnol. J.**, v. 2, p. e201209017, 2012.

LIN CEREGHINO, G. P. et al. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Genet. Eng. (N Y)**, v. 23, p. 157-169, 2001.

LINTELMANN, J et al. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure. Appl. Chem.**, v. 75, n. 5, p. 631–681, 2003.

LIU, T. et al. Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbh1*) promoter optimization. **Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)**, v. 40, n. 2, p. 158-165, Feb 2008.

LOUVION, J. F.; HAVAUX-COPF, B.; PICARD, D. Fusion of GAL4-VP16 to a steroid-binding domain provides a tool for gratuitous induction of galactose-responsive genes in yeast. **Gene**, v. 131, n. 1, p. 129-134, Sep 1993.

LU, J. et al. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. **Energy Environ.**, v. 24, p. 2451-2466, 2011.

LYTTLE, C. R. et al. Human estrogen receptor regulation in a yeast model system and studies on receptor agonists and antagonists. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 42, n. 7, p. 677-685, Aug 1992.

MACDONALD, S. J. et al. Genome sequence of herpes simplex virus 1 strain KOS. **J. Virol.**, v. 86, n. 11, p. 6371-6372, Jun 2012.

MACPHERSON, S.; LAROCHELLE, M.; TURCOTTE, B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 70, n. 3, p. 583-604, Sep 2006.

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

MAHE, Y.; LEMOINE, Y.; KUCHLER, K. The ATP binding cassette transporters Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 41, p. 25167-26172, Oct 1996.

MAMNUN, Y. M. et al. The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers in vivo. **Mol. Microbiol.**, v. 46, n. 5, p. 1429-1440, Dec 2002.

MARMORSTEIN, R. et al. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. **Nature**, v. 356, n. 6368, p. 408-414, Apr 1992.

MARQUES, W. L. et al. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. **FEMS Yeast Res.**, v. 16, n. 1, Feb 2016.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nat. Biotechnol.**, v. 26, n. 5, p. 553-560, May 2008.

MCISAAC, R. S. et al. Synthetic biology tools for programming gene expression without nutritional perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, n. 6, p. e48, Apr 2014.

METIVIER, R. et al. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. **Cell**, v. 115, n. 6, p. 751-763, Dec 2003.

METZGER, D.; WHITE, J. H.; CHAMBON, P. The human oestrogen receptor functions in yeast. **Nature**, v. 334, n. 6177, p. 31-36, Jul 1988.

MEYHACK, B. et al. Two yeast acid phosphatase structural genes are the result of a tandem duplication and show different degrees of homology in their promoter and coding sequences. **EMBO J.**, v. 1, n. 6, p. 675-680, 1982.

MEYNIER DE SALINELLES V, B. F. et al. Design of a chimeric promoter induced by pro-inflammatory mediators in articular chondrocytes. **FEBS Lett.**, v. 518, n. 1-3, p. 67-71, 2002.

MITTERBAUER, R.; KARL, T.; ADAM, G. *Saccharomyces cerevisiae* URH1 (encoding uridine-cytidine N-ribohydrolase): functional complementation by a nucleoside hydrolase from a protozoan parasite and by a mammalian uridine phosphorylase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 3, p. 1336-1343, Mar 2002.

MOGNO, I. et al. TATA is a modular component of synthetic promoters. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 20, p. 1391-1397, 1992. ISSN 1088-9051/10.

MONTENECOURT, B.S. *Trichoderma reesei* cellulases. **Trends in Biotechnol.**, v. 1, p. 156-161, 1983.

MULHERN, S. M.; LOGUE, M. E.; BUTLER, G. *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. **Eukaryot. Cell**, v. 5, n. 12, p. 2001-2013, Dec 2006.

NA, J. K.; METZGER, J. D. Chimeric promoter mediates guard cell-specific gene expression in tobacco under water deficit. **Biotechnol. Lett.**, v. 36, n. 9, p. 1893-1899, Sep 2014.

NALLEY, K.; JOHNSTON, S. A.; KODADEK, T. Proteolytic turnover of the Gal4 transcription factor is not required for function in vivo. **Nature**, v. 442, n. 7106, p. 1054-1057, Aug 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.

NEVALAINEN, K. M.; TE'O, V. S.; BERGQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends. Biotechnol.**, v. 23, n. 9, p. 468-474, Sep 2005.

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

ORR-WEAVER, T. L.; SZOSTAK, J. W.; ROTHSTEIN, R. J. Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. **Methods. Enzymol.**, v. 101, p. 228-245, 1983.

PACHLINGER, R. et al. Metabolically independent and accurately adjustable *Aspergillus* sp. expression system. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 2, p. 672-678, Feb 2005.

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.

PEREIRA, C. et al. Production and purification of the VP1 capsid protein of a novel canine norovirus using the *Saccharomyces cerevisiae* expression system. **J. Microbiol. Methods.**, v. 91, n. 3, p. 358-360, Dec 2012.

PIERRAT, B. et al. A highly conserved region in the hormone-binding domain of the human estrogen receptor functions as an efficient transactivation domain in yeast. **Gene**, v. 143, n. 2, p. 193-200, Jun 1994.

PORRO, D. et al. Recombinant protein production in yeasts. **Mol. Biotechnol.**, v. 31, n. 3, p. 245-259, Nov 2005.

POSS, Z. C.; EBMEIER, C. C.; TAATJES, D. J. The Mediator complex and transcription regulation. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 48, n. 6, p. 575-608, Nov-Dec 2013.

PRATT, W. B.; TOFT, D. O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. **Endocr. Rev.**, v. 18, n. 3, p. 306-360, Jun 1997.

PTASHNE, M.; GANN, A. **Genes and signals**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

QUINTERO, M. J. et al. An improved system for estradiol-dependent regulation of gene expression in yeast. **Microb. Cell Fact.**, v. 6, p. 10, 2007.

RATNA, P.; BECSKEI, A. Construction of cis-regulatory input functions of yeast

promoters. **Methods Mol. Biol.**, v. 734, p. 45-61, 2011.

REECE, R. J.; PTASHNE, M. Determinants of binding-site specificity among yeast C6 zinc cluster proteins. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 909-911, Aug 1993.

REMENYI, A.; SCHOLER, H. R.; WILMANN, M. Combinatorial control of gene expression. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 11, n. 9, p. 812-815, Sep 2004.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 23, n.2, p. 257-261, 2000.

RIZK, M.; ANTRANIKIAN, G.; ELLEUCHE, S. End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes. **Biochem Biophys. Res. Commun.**, v. 428, n. 1, p. 1-5, Nov 2012.

ROCHA, S. N. **Expressão e secreção de proteínas heterólogas em levedura do gênero *Kluyveromyces***. 2010. 179 f. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Engenharia Química, 2010.

RONNE, H. Glucose repression in fungi. **Trends. Genet.**, v. 11, n. 1, p. 12-17, Jan 1995.

ROTHSTEIN, R. J. One-step gene disruption in yeast. **Methods Enzymol**, v. 101, p. 202-211, 1983.

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. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 105, n. 4, p. 305-312, Apr 2008.

SANSEVERINO, J. et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 8, p. 4455-4460, Aug 2005.

SCHLABACH, M. R. et al. Synthetic design of strong promoters. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 107, n. 6, p. 2538-2543, Feb 9 2010.

SCHULLER, C. et al. Membrane-active compounds activate the transcription factors Pdr1 and Pdr3 connecting pleiotropic drug resistance and membrane lipid homeostasis in *saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell**, v. 18, n. 12, p. 4932-4944, Dec 2007.

SEIPEL, K.; GEORGIEV, O.; SCHAFFNER, W. Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. **EMBO J.**, v. 11, n. 13, p. 4961-4968, Dec 1992.

SHANG, Y. et al. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated

transcription. **Cell**, v. 103, n. 6, p. 843-852, Dec 2000.

SHERMAN, F. An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Department of Biochemistry & Biophysics**, p. 1-44, 2001.

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

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 142, n. 1, p. 60-70, Jul 2007.

SMALE, S. T.; KADONAGA, J. T. The RNA polymerase II core promoter. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 72, p. 449-479, 2003.

SMITH, R. A.; DUNCAN, M. J.; MOIR, D. T. Heterologous protein secretion from yeast. **Science**, v. 229, n. 4719, p. 1219-1224, Sep 1985.

STARGELL, L. A.; STRUHL, K. The TBP-TFIIA interaction in the response to acidic activators in vivo. **Science**, v. 269, n. 5220, p. 75-78, Jul 1995.

STRAUSS, J. et al. Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. **FEBS Lett.**, v. 376, n. 1-2, p. 103-107, Nov 1995.

STRUHL, K. Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. **Cell**, v. 49, n. 3, p. 295-297, May 1987.

STRUHL, K. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 14, n. 4, p. 137-140, Apr 1989.

STRUHL, K. Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 1051-1077, 1989.

STRUHL, K. Duality of TBP, the universal transcription factor. **Science**, v. 263, n. 5150, p. 1103-1104, Feb 1994.

STRUHL, K. Yeast transcriptional regulatory mechanisms. **Annu. Rev. Genet**, v. 29, p. 651-674, 1995.

SWAMY, K. B. et al. Impact of DNA-binding position variants on yeast gene expression. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 21, p. 6991-7001, Nov 2009.

TAN, S. et al. Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex. **Nature**, v. 381, n. 6578, p. 127-151, May 1996.

TANAKA, S. et al. Estrogen can regulate the cell cycle in the early G1 phase of yeast by increasing the amount of adenylate cyclase mRNA. **Cell**, v. 57, n. 4, p. 675-681, May 1989.

TEIXEIRA, M. C. et al. The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. Database issue, p. D446-451, Jan 2006.

TEIXEIRA, M. C.; SA-CORREIA, I. *Saccharomyces cerevisiae* resistance to chlorinated phenoxyacetic acid herbicides involves Pdr1p-mediated transcriptional activation of TPO1 and PDR5 genes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 292, n. 2, p. 530-537, Mar 2002.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 72, n. 2, p. 211-222, Sep 2006.

TILEY, L. S. et al. The VP16 transcription activation domain is functional when targeted to a promoter-proximal RNA sequence. **Genes Dev**, v. 6, n. 11, p. 2077-2087, Nov 1992.

TORCHIA, T. E. et al. Disruption of regulatory gene GAL80 in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on carbon-controlled regulation of the galactose/melibiose pathway genes. **Mol. Cell Biol.**, v. 4, n. 8, p. 1521-1527, Aug 1984.

TYERS, M; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 193 – 197, Mar 2003.

URNOV, F. D. A feel for the template: zinc finger protein transcription factors and chromatin. **Biochem. Cell Biol.**, v. 80, n. 3, p. 321-333, 2002.

VAUTARD, G.; COTTON, P.; FEVRE, 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 Lett.**, v. 453, n. 1-2, p. 54-58, Jun 18 1999.

VINZANT, T. B. et al. Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 91-93, p. 99-107, Spring 2001.

XU, H. et al. Development of a rapid screening and surveillance for estrogenic chemicals in environment based on recombinant yEGFP yeast cell. **Toxicol. in vitro**, v. 24, n. 4, p. 1285-1291, Jun 2010.

WIEBE, M.G. Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi - problems and improvements. **Mycologist.**, v. 17, n. 3, p. 140–144, Aug 2003. Published online: 18 March 2004.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods Enzymol.**, v. 160, p. 87–117, 1988.

WINSTON, F. Analysis of SPT Genes: A Genetic approach towards analysis of tfiid, histones and other transcription factors of yeast transcriptional regulation. **Cold Spring Harbor Laboratory**, New York, p. 1271-1293, 1992.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnol. J.**, v. 7, n. 5, p. 620-634, May 2012.

YUH, C. H.; BOLOURI, H.; DAVIDSON, E. H. Cis-regulatory logic in the endo16 gene: switching from a specification to a differentiation mode of control. **Development**, v. 128, n. 5, p. 617-629, Mar 2001.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, n. 1-2, p. 17-34, Jul 2001.

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. **Mol. Genet. Genomics**, v. 266, n. 1, p. 56-63, Sep 2001.

ZOU, G. et al. Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering. **Microb. Cell Fact.**, v. 11, p. 21, 2012.

APÊNDICE A - Resumo de trabalho apresentado na 45a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).

45ª Reunião Anual da SBBq
18 a 21 de junho de 2016 - Natal, RN

Expression System Induced by Estradiol in *Saccharomyces cerevisiae*.

Adriani, P.P.¹; Borges, F.G.¹; Oliveira, G.S.¹ and Chamberg, F.S.¹

¹Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Due to its functional characteristics, the proteins are increasingly being used in different areas and activities of human society: food, industry, textile, pulp and paper, chemical and medical. The industrial production of commercially valuable proteins for various applications is increasingly being conducted through the development of systems of expression in different hosts such as *Saccharomyces cerevisiae*. This study aimed to design a metabolically independent expression system induced by estradiol hormone, which in *S. cerevisiae*, is able to produce and secrete effectively homologous and / or heterologous proteins of industrial interest. Thus, it was designed and built a regulatory plasmid (expressing the chimeric transcription factor c-myc-Gal4 (DBD) -hER α (LBD) -VP16 (AD)) and an expression plasmid (which contains the chimeric promoter 5xUAS_{GAL}-UARcb1, which is induced by the chimeric transcription factor, regulating the expression of the reporter protein cellobiohydrolase I - cbh1 of *Trichoderma reesei*). Both plasmids were used to transform ScW303-1A / *pdr5* Δ strain (constructed in this work) and induced with different concentrations of estradiol. To analyze the ability of the promoter to direct the expression of the reporter protein cbh1, the DNS testing, with the selected transformants was performed using 1% carboxymethylcellulose as a substrate. The highest enzymatic activity occurs in the induction system with 5 μ M of 17- β -estradiol and DES (diethylstilbestrol). The results show that the expression system induced by 17- β -estradiol and DES operates efficiently in *S. cerevisiae* and that it can be used for the biotechnological production of other proteins of interest.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. Expression system. Promoter. Yeast. Estrogen. *Trichoderma reesei*. Protein.

APÊNDICE B - Resumo de trabalho apresentado na 44a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e 23º Congresso da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.

23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology
44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology
Foz do Iguaçu, PR, Brazil, August 24th to 28th, 2015

ANALYSIS OF CHIMERIC PROMOTER INDUCED BY ZINC FOR THE EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS IN *Saccharomyces cerevisiae*

Borges, F.G.¹; Adriani, P.P.¹ e Chambergro, F.S.¹

¹Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

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: *Saccharomyces*; chimeric promoter; zinc

Brazilian Society for Biochemistry and
Molecular Biology (SBBq)

APÊNDICE C - Capítulo de livro intitulado “*Biomass and Bioenergy*” em *Energy Science and Technology*, volume 7: *bioenergy*, ISBN 1626990689 Studium Press LLC, USA.

2

Biomass and Bioenergy

FELIPE S. CHAMBERGO^{1*}, FLAVIA G. BORGES¹, PATRICIA P. ADRIANI¹,
GABRIEL S. DE OLIVEIRA¹ AND ESTELA Y. VALENCIA²

ABSTRACT

Significant advances in research and development of biomass-derived energy and fuels that aim the replacement of fossil fuels is an ongoing effort in many countries. We present an overview of the relevant literature and recent advances in bioenergy production with focus on crop energy, biomass potential as bioenergy resource, biomass chemical composition, microorganisms and enzymes used to biomass degradation. Sugarcane, maize, Miscanthus, sorghum, grass, micro- and macroalgae are the most important crop energy used /in study currently. Strategies for obtaining plants/algae which show improved biomass production have been developed. The research community and biotech industry are working to obtain a major crop for sustainable bioenergy production.

Key words: Crops and energy, Biomass, Bioenergy, Biofuel, Feedstocks, Enzymes, Bioethanol, Microorganisms

INTRODUCTION

Bioenergy refers to a renewable energy derived from biological sources that can be used for heat, electricity, fuel, chemical products and their co-products (Yuan *et al.*, 2008; Saibi *et al.*, 2013). The capture of solar energy and atmospheric carbon by plants, cyanobacteria, micro- or macroalgae

¹ Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Av. Arlindo Bettio 1000. Ermelino Matarazzo, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brazil.

² Departamento de Microbiología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid, España, Spain.

*Corresponding author: E-mail: fscha@usp.br

APÊNDICE D - Pedido de patente referente ao trabalho “Enzima Recombinante Époxido Hidrolase de *Trichoderma reesei*, purificação, atividade enantioseletiva e aplicações.

DECLARAÇÃO

Declaro para devidos fins que o pedido de patente sob o título: **“ENZIMA RECOMBINANTE EPÓXIDO HIDROLASE DE TRICHODERMA REESEI, PURIFICAÇÃO ATIVIDADE ENANTIOSSELETIVA E APLICAÇÕES”**, desenvolvido por Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcaide, Profa. Dra. Patricia Targon Campana, Sr. Gabriel Stephani de Oliveira e Sra. Patricia Pereira Adriani, lotados na Escola de Artes, Ciência e Humanidade - EACH da USP encontra-se nesta Agência USP de Inovação, segundo processo RUSP: 15.1.16494.1.2, em fase análise de viabilidade legal, social e econômica e caso aprovado entrará em fase de redação e subsequente depósito junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI.

São Paulo, 03 de fevereiro de 2016.

Maria Aparecida de Souza
Dir. Téc. Propr. Intelectual

APÊNDICE E - Artigo submetido para publicação intitulado “Epoxide hydrolase from the fungus *Trichoderma reesei*: biochemical properties and conformational characterization”

Epoxide hydrolase from the fungus *Trichoderma reesei*: biochemical properties and conformational characterization

Gabriel Stephani de Oliveira¹, Patricia Pereira Adriani¹, Flavia Garcia Borges¹, Adriana Rios Lopes², Patricia T. Campana¹, Felipe S. Chambergo^{1*}

Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo; Instituto Butantan², São Paulo, Brazil.

Running Head: Epoxide hydrolase from *Trichoderma reesei*

*Address correspondence to Felipe S. Chambergo. fscha@usp.br.

Abstract

Epoxide hydrolases (EHs) are enzymes present in all living organisms that catalyze the hydrolysis of epoxides to the corresponding vicinal diols. They have three main functions: detoxification, catabolism, and regulation of signaling molecules. EHs have biotechnological potential in chiral chemistry, for the preparation of enantiopure epoxides, vicinal diols or fine chemicals. In the present work, we report the cloning, purification, the enzymatic activity, and the conformational analysis by means of Circular Dichroism spectroscopy, of the TrEH gene from *Trichoderma reesei* strain QM9414 (anamorph of *Hypocrea jecorina*). The EH gene has an open reading frame encoding a protein of 343 amino acid residues resulting in a molecular mass of 38.2 kDa. The TrEH was purified and characterized using racemic styrene oxide (SO) as substrate. The enzyme presents a pH optimum = 7.2, it is highly active at temperature range from 23 to 50 °C and thermal inactivation at 70 °C ($t_{1/2}$ = 7.4 min). The Michaelis constant (K_m) were 4.6 mM for racemic substrate, 21.7 mM for (R)-(+)-styrene oxide and 3.0 mM for (S)-(-)-styrene oxide. k_{cat}/K_m analysis indicated that TrEH is enantioselective hydrolyzing preferentially (S)-(-)-styrene oxide. The conformational stability studies suggested that, despite the extreme conditions (high temperatures and extremely acid and basic pHs), TrEH is able to keep considerable part of its regular structures, including the preservation of native cores in some cases. The recombinant protein showed an enantioselectivity distinct from that presented by other fungus EHs, making this protein a potential biotechnological tool.