



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

(11) PI 0606179-6 B1

(22) Data do Depósito: 23/02/2006

(45) Data de Concessão: 29/05/2018



(54) Título: PROMOTOR ISOLADO DE ÁLCOOL OXIDASE 1 (AOX1) DE PICHIA PASTORIS, VETOR, CÉLULA, KIT, MÉTODO PARA A EXPRESSÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE, PEPTÍDEO OU ÁCIDO NUCLÉICO FUNCIONAL, EM UMA CÉLULA, MÉTODO PARA A EXPRESSÃO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO PARA A EXPRESSÃO DE UMA PROTEÍNA, PEPTÍDEO OU ÁCIDO NUCLÉICO FUNCIONAL, E MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE CLONES DE SUPEREXPRESSÃO

(51) Int.Cl.: C12N 15/00

(30) Prioridade Unionista: 23/02/2005 AT A 304/2005

(73) Titular(es): TECHNISCHE UNIVERSITÄT GRAZ. VTU HOLDING GMBH

(72) Inventor(es): FRANZ HARTNER; ANTON GLIEDER

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROMOTOR ISOLADO DE ÁLCOOL OXIDASE 1 (AOX1) DE *PICHIA PASTORIS*, VETOR, CÉLULA, KIT, MÉTODO PARA A EXPRESSÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE, PEPTÍDEO OU ÁCIDO NUCLEÍCO FUNCIONAL, EM**
5 **UMA CÉLULA, MÉTODO PARA A EXPRESSÃO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO PARA A EXPRESSÃO DE UMA PROTEÍNA, PEPTÍDEO OU ÁCIDO NUCLEÍCO FUNCIONAL, E MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE CLONES DE SUPEREXPRESSÃO**".

A presente invenção refere-se a promotores de *AOX1* de *Pichia*
10 *pastoris* mutantes.

S. cerevisiae tem dominado (e ainda domina) o uso científico e biotecnológico como organismo modelo eucariótico e sistema de produção. No último século, outra levedura ganhou grande atração: a levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe*. Por seu atributo de se reproduzir somente por meio de fissão, *S. pombe* ganhou notável atenção como organismo
15 modelo e, atualmente, é a espécie de levedura mais intensivamente estudada em termos de genética molecular e biologia celular, em conjunto com *S. cerevisiae*. Dentre 700 diferentes espécies de leveduras conhecidas até agora, as duas leveduras mencionadas acima podem fornecer somente um limitado conjunto de atributos interessantes para aplicações tecnológicas e científicas. Desde os anos de 1970 e de 1980, mais e mais espécies de leveduras com características notáveis foram investigadas para biotecnologia e pesquisa. Essas assim chamadas leveduras não convencionais (NCY) ou leveduras não *Saccharomyces* (neste caso, o termo *Saccharomyces* inclui a
20 levedura *Schizosaccharomyces pombe*) são desenvolvidas por várias razões: elas possuem ou importância médica, como a *Candida albicans*, ou relevância tecnológica, como a *Yarrowia lipolytica* e *Kluyveromyces lactis*, que têm a capacidade de crescerem em substratos particulares (por exemplo, n-alcanos, lactose). Por exemplo, o patógeno fúngico humano mais comum, *C. albicans*, é estudado extensivamente para revelar a natureza dos
30 fatores de virulência envolvidos na patogênese, portanto, tornando o organismo modelo para leveduras patogênicas. Outro grupo bem-estabelecido de

Segue-se folha 1a

crescerá rapidamente nos próximos anos.

Açúcares, a classe mais abundante de moléculas na natureza, são utilizados por todas as leveduras conhecidas. Embora haja grandes diferenças na aceitação de substratos de espécie para espécie (vide a Tabela 1), a conversão de 6-fosfato de glicose ou de 6-fosfato de frutose em piruvato é o tema mais comum em seus metabolismos. De alguma maneira, o equipamento enzimático para a via glicolítica varia significativamente dentre as diferentes leveduras. Embora, na *S. cerevisiae*, a maioria das enzimas sejam conhecidas e estejam caracterizadas, pelo menos parcialmente, somente umas poucas enzimas foram descritas em NCYs. Algumas das funções necessárias para glicólise são mediadas por vários genes/enzimas em algumas leveduras, especialmente aqueles desempenhando um papel adicional no controle ou na regulação do metabolismo e/ou estando em um ponto de ramificação, como glicoquinase/hexoquinase, fosfofrutoquinase e 3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase. Normalmente, as isoenzimas são reguladas diferencialmente, indicando diversas funções sob pré-requisitos ambientais que se modificam. Alguns dos genes que codificam enzimas glicolíticas são constitutivos e altamente expressos, por exemplo, o *PGK1* de *S. cerevisiae* (fosfoglicerato quinase) ou o gene *GAP* de *P. pastoris* (3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase), embora outras enzimas sejam reguladas de maneira estrita como o gene *ENO1* (enolase) de *S. cerevisiae*.

Tabela 1: leveduras selecionadas de interesse biotecnológico com substratos comerciais relevantes diferentes de glicose e frutose

<i>Levedura</i>	<i>Metabolismo de Energia</i>	<i>Substratos selecionados</i>
<i>S. cerevisiae</i>	Crabtree positivo	sacarose, maltose, rafinose, etanol
<i>S. pombe</i>	Crabtree positivo	sacarose, maltose, rafinose
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Crabtree positivo	ácido acético, etanol, glicerol
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Crabtree negativo	n-alcanos, ácidos graxos, etanol
<i>Pichia stipitis</i>	Crabtree negativo	xilose

<i>Levedura</i>	<i>Metabolismo de Energia</i>	<i>Substratos selecionados</i>
<i>Pichia pastoris</i>	Crabtree negativo	metanol, glicerol
<i>Hansenula polymorpha</i>	Crabtree negativo	metanol, glicerol
<i>Schwanninomyces occidentalis</i>	Crabtree negativo	amido, n-alcanos, xilose, sacarose, rafinose, trealose, lactose, etanol
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Crabtree negativo	lactose, sacarose, maltose, rafinose, etanol, glicerol, xilitol, lactato

O destino de piruvato no metabolismo varia de maneira significativa entre as espécies de levedura e condições de cultura. Em *S. cerevisiae* e outras assim chamadas leveduras Crabtree positivas, a respiração é inibida por glicose e açúcares relacionados. Isso conduz à transformação de piruvato via a piruvato descarboxilase para formar etanol e CO₂, mesmo sob elevadas quantidades de oxigênio, o que é também conhecido como fermentação. Em leveduras Crabtree negativas, às quais pertencem a maioria das NCYs, a transformação de piruvato em etanol ocorre somente sob condições anaeróbicas. Sob condições aeróbicas, o piruvato é oxidado a CO₂ via a piruvato desidrogenase e o ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA). O ciclo TCA é de notável interesse para o metabolismo celular devido ao fato de que ele é a única maneira para a oxidação de açúcares para formar CO₂. A oxidação a CO₂ resulta na produção de NADH, que é usado para a produção de energia. Além disso, os intermediários de ciclo TCA são as fontes principais de metabólitos para finalidades biossintéticas. Devido à remoção de intermediários, o ciclo TCA tem que ser reabastecido para manter o seu funcionamento. As reações anapleróticas principais em leveduras são o ciclo da piruvato carboxilase e o ciclo do glioxilato. O primeiro é a via principal quando se cultiva em amônio como única fonte de nitrogênio, embora o último seja necessário quando se cultiva em fontes de carbono com menos do que 3 átomos de carbono. Em contraste a este interesse eminente, quase nada é conhecido sobre os genes e as enzimas envolvidos no ciclo TCA em NCYs. NADH gerado por reações catabólicas, seja no citossol, seja na mitocôndria, tem

que ser reoxidado a NAD^+ , para manter as reações em andamento. Em leveduras Crabtree negativas (por exemplo, *Pichia pastoris*), sob condições aeróbicas, NADH é reoxidado principalmente através da cadeia respiratória. A situação é significativamente diferente em leveduras Crabtree positivas, como *S. cerevisiae*, nas quais a respiração e a fermentação coexistem. Quando cultivadas em glicose sob condições aeróbicas, a respiração é reprimida pela glicose e a fermentação ocorre. Sob essas condições, NAD^+ é regenerado pela formação de etanol (NADH produzido por glicólise) ou glicerol. A respiração em leveduras difere do paradigma animal dessa via, conforme descrito em cada livro texto de bioquímica. Primeiro, algumas leveduras, como *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, são carentes do complexo I da cadeia respiratória. Nessas leveduras, a regeneração de NAD^+ é feita sem o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, por NADH desidrogenases externas e internas. A segunda diferença principal, encontrada em leveduras, fungos e plantas Crabtree negativas, é uma via de respiração alternativa em paralelo aos complexos III e IV da cadeia de citocromo. Essa respiração alternativa é mediada por uma assim chamada oxidase alternativa, que transfere elétrons diretamente a partir do conjunto de ubiquinona para o oxigênio, sem bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna.

NADPH para finalidades biossintéticas é produzido na parte oxidativa da via de fosfato pentose (PPP). Outros metabólitos muito importantes fornecidos por essa via são 5-fosfato de ribose e 4-fosfato de eritrose, necessários para a síntese de ácidos nucleicos e co-fatores de nucleotídeo e para a síntese de aminoácidos aromáticos, respectivamente. Existem ainda muitas lacunas na informação sobre genes e suas enzimas correspondentes envolvidas na PPP em leveduras não convencionais. Umas poucas enzimas foram isoladas a partir de *Candida utilis*, *S. pombe* e *K. lactis*. A caracterização quanto à composição e cinética revelou várias diferenças entre essas enzimas. Devido à ausência de informação da influência sobre a PPP nessas leveduras, não pode ser estimada, mas, mostrou-se que, por exemplo, mutantes de fosfoglicose isomerase de *K. lactis*, que são deficientes em gli-

cólise, são capazes de crescerem em meios de glicose, ao contrário de *S. cerevisiae*. Essa observação indica que a capacidade da via de fosfato pentose em *K. lactis* é suficiente para crescimento em glicose como fonte de carbono. Em leveduras metilotróficas, uma transcetolase adicional (dihidroxiacetona sintase) poderia ser encontrada. Essa enzima está localizada em peroxissomas e confere a assimilação de formaldeído no metabolismo celular por condensação com 5-fosfato de xilulose, com formação de dihidroxiacetona e 3-fosfato de gliceraldeído.

Leveduras, como organismos eucarióticos unicelulares, fornecem sistemas de expressão atraentes para produção de proteína recombinante. Elas combinam os prós de bactérias, como técnicas de manipulação genética bem-desenvolvidas, técnicas de cultivo simples, seguras e, portanto, econômicas (em grande escala), com o benefício principal de sistemas de expressão eucarióticos, a saber, processamento de proteínas eucarióticas. Devidos à razões mencionadas acima, *S. cerevisiae* dominou esse campo durante muitos anos, resultando em um grande número de proteínas (por exemplo, insulina, HBsAg, HSA) produzidas neste organismo. *S. cerevisiae* mostra algumas limitações devido à hiperglicosilação, retenção de proteínas secretadas no espaço periplásmico, instabilidade de plasmídeo e baixos rendimentos em produtos. Para superar as limitações desse simples organismo, um pequeno conjunto de leveduras não convencionais foi desenvolvido como hospedeiros para a expressão de genes heteróloga. Dentre outras, *K. lactis*, *Y. lipolytica* e as leveduras metilotróficas *Candida boidinii*, *H. polymorpha* e *P. pastoris* foram usadas, mas, somente as 2 últimas espécies ganharam notável interesse comercial. *Schizosaccharomyces pombe* exibe algumas características com íntima proximidade a eucariotas superiores, o que torna essa levedura um hospedeiro muito atraente para produção de proteínas heterólogas: (1) o mecanismo de iniciação de transcrição é mais semelhante àquele de eucariotas superiores, (2) alguns promotores de mamíferos em *S. pombe*, (3) a capacidade de clivagem de RNA, destacando-se em uma similaridade de compostos do clivossoma em relação àquele de mamíferos, (4) o sinal de retenção de retículo endoplasmático de mamífero

KDEL pode ser reconhecido, (5) a existência de resíduos de galactose em glicoproteínas e (6) algumas outras modificações pós-traducionais, como acetilação e isoprenilação de proteínas são realizadas de uma maneira mais similar a células de mamífero do que a células de levedura. Várias das características mencionadas acima poderiam aumentar a importância de *S. pombe* na produção de proteína recombinante, no futuro próximo, no que refere-se à produção de proteínas heterólogas autênticas e as suas aplicações de elevada capacidade, como a genômica estrutural e funcional.

Todos os microorganismos possuem mecanismos para adaptar seus metabolismos para a utilização ótima de nutrientes disponíveis no ambiente. A adaptação rápida e acurada a essas limitações ambientais é o fator principal controlando o crescimento e outros parâmetros fisiológicos de todos os organismos. Para a levedura, como para a maioria dos microorganismos, a glicose é a fonte de carbono e de energia preferida. Portanto, não é surpreendente que a glicose, o monossacarídeo mais abundante na natureza, é o principal mensageiro para células que afeta o crescimento e o desenvolvimento desses organismos por regulação de expressão de genes, principalmente, mas, não exclusivamente, no nível de controle transcricional. A análise de transcrição genômica revelou que uma quantidade considerável de genes é regulado pelo nível de glicose determinado ambientalmente. Genes com função metabólica conhecida na utilização de glicose, como transportadores de glicose de baixa afinidade e enzimas glicolíticas, assim como genes que codifiquem proteínas ribossomais, são induzidos por glicose. Por outro lado, a glicose reprime um grande conjunto de genes, incluindo genes envolvidos na utilização de fontes de carbono alternativas, gliconeogênese, o ciclo de glioxilato, funções peroxissomais e respiração. A repressão da respiração (efeito Crabtree) ocorre somente em umas poucas espécies (leveduras fermentativas, Crabtree positivas) como *Saccharomyces cerevisiae*, embora na maioria das espécies de levedura, a glicose não reprime a respiração (Crabtree negativas). Embora um amplo conhecimento sobre o mecanismo de repressão de glicose tenha sido alcançado durante os últimos 20 anos, principalmente com base na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seu

mecanismo real, especialmente as partes a montante de sensoriamento e de sinalização de glicose, não é completamente entendido. No entanto, para se conseguir um melhor entendimento do presente trabalho, uns poucos agentes principais da repressão catabólica de carbono, conforme descrito para *S. cerevisiae*, são descritos brevemente abaixo.

5 O gene *SNF1* codifica uma proteína quinase Ser/Thr, que pode ser encontrada em complexos de massa molecular elevada em células de levedura. Ele é regulado por mudanças conformacionais dentro do complexo, causadas por fosforilação na subunidade reguladora de Snf1p. Atualmente, 3 quinases a montante (Pak1p, Elm1p e Tos3p) são identificadas para fosforilar e, portanto, ativar Snf1p. Sua atividade é absolutamente necessária para a desrepressão de uma ampla variedade de genes reprimidos por glicose. Desse modo, não é surpreendente que Snf1p ou homólogos estejam amplamente conservados em eucariotas.

15 A proteína de dedo de zinco Mig1p é capaz de se ligar às regiões de promotor de uma ampla variedade de genes reprimidos por glicose. Ela é atuante, muitíssimo provavelmente, por recrutamento do complexo repressor geral Ssn6-(Cyc8)-Tup1p. A função de Mig1p é controlada pela proteína quinase Snf1, embora não haja evidência clara para uma fosforilação direta. Mig1p está localizado no núcleo em sua forma não fosforilada. A depleção de glicose causa a fosforilação de Mig1p, seguida por deslocamento para o citoplasma. Quando a glicose for adicionada às células, Mig1p se move rapidamente de volta para o núcleo e reprime a transcrição.

25 Adr1p também pertence à família de proteínas de dedo de zinco foi constatada como sendo um efetor positivo de proteínas peroxissomais e o gene *ADH2*, que codifica a álcool desidrogenase II reprimida por glicose. A expressão de *ADR1* é regulada a jusante por glicose através da proteína quinase dependente de AMP (cAMP) cíclica, em níveis elevados de cAMP. O efeito regulador principal aparece no nível de tradução com mRNA, porém, os efeitos reguladores sobre a transcrição, assim como a estabilidade de mRNA são também observados, dependendo da cepa de *S. cerevisiae* analisada.

Para um grande número de genes, incluindo muitos dos genes envolvidos no metabolismo respiratório, a transcrição é ativada, em fontes de carbono não fermentáveis, pelo complexo Hap2/3/4/5. Para uns poucos genes envolvidos na respiração, como *CYC1* (codificando iso-1-citocromo c) e *COX6* (subunidade VI de citocromo c oxidase), foi estabelecido que Snf1 é necessário para a desrepressão depois do crescimento em glicose. A transcrição de *HAP4* é reprimida quando a glicose estiver presente, entretanto, um envolvimento direto ou de Hap4p ou de Snf1p na desrepressão não pôde ser mostrado.

Gcr1p é uma proteína de ativador de transcrição principal de genes glicolíticos (por exemplo, enolase, 3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase). Gcr1p, em conjunto com o fator de transcrição geral Rap1p, é o item principal de expressão de gene glicolítico, no que refere-se à coordenação de transcrição e ele é absolutamente necessário para expressão em alto nível. O padrão de expressão genômica de tipo selvagem e de mutante *gcr1* de *S. cerevisiae* crescendo em várias fontes de carbono, revelou 53 quadros de leitura abertos (ORFs), incluindo genes da glicólise, como dependentes de Gcr1p.

Essa descrição de alguns fatores de transcrição e da via de Snf1p e de Mig1p deveria dar um breve panorama de alguns agentes na rede de repressão por glicose. Deve ser observado que existem mais ciclos reguladores do que a via de Snf1p para repressão por glicose. Embora um amplo conhecimento sobre o sensoramento e a sinalização de glicose tenha sido conseguido durante os últimos 20 anos, questões importantes ainda permanecem sem resposta: qual é a natureza do sinal de glicose e como são reguladas e integradas as vias de sinalização conhecidas.

Um número limitado de espécies de levedura é capaz de crescer em metanol como única fonte de carbono e de energia. Elas são pertencentes a um dos quatro gêneros *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* e *Torulopsis*, e compartilham uma via de utilização de metanol geral, que é expressa depois de desrepressão ou indução com metanol (vide 1.3.1). Já que reações iniciais dessa via estão compartimentalizadas dentro de peroxissomas, essas

organelas são também induzidas. Devido à forte indução de peroxissomas, as leveduras *Candida boidinii*, *Pichia methanolica*, *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha*, foram freqüentemente usadas em biologia celular para se estudar a função e a biogênese de peroxissomas.

5 Conforme mencionado acima, leveduras metilotróficas compartilham uma via de utilização de metanol comum. A primeira etapa é a oxidação de metanol a formaldeído e peróxido de hidrogênio, catalisada por álcool oxidases (AOX, EC 1.1.3.13). O H_2O_2 tóxico é decomposto em oxigênio e água pela ação de catalase. Ambas as enzimas são seqüestradas em peroxissomas. O formaldeído ou é oxidado por duas reações de desidrogenase subseqüentes ou assimiladas no metabolismo celular pela condensação com 5-fosfato de xilulose (Xu5P). O formaldeído é oxidado a formato e, posteriormente, a dióxido de carbono, por uma formaldeído desidrogenase dependente de glutathione (GSH) e uma formato desidrogenase, ambas localizadas no citossol. NADH, gerado em ambas as reações, é usado para produzir energia para crescimento em metanol. A reação de condensação ocorre dentro dos peroxissomas e é catalisada pela transcetolase dihidroxiacetona sintase mencionada acima. Os compostos de C3 resultantes, dihidroxiacetona (DHA) e 3-fosfato de gliceraldeído (GAP), são ulteriormente metabolizados no citossol. Depois de uma fosforilação de DHA, 1,6-bifosfato de frutose (FBP) é formada por uma reação de aldolase de fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) e GAP. A FBP é convertida em 6-fosfato de frutose por uma fosfatase e 5-fosfato de xilulose (Xu5P) é gerada na via de fosfato de pentose. Um terceiro do GAP gerado entra na via de gliconeogênese para a síntese de

10

15

20

25

As enzimas chave da via de utilização de metanol, álcool oxidase e formato desidrogenase, são produzidas em níveis muito elevados, depois da indução com metanol. A álcool oxidase pode responder por mais do que 30% da proteína solúvel total, a dihidroxiacetona sintase e a formato desidrogenase por até 20%. Os peroxissomas, que são também induzidos, podem responder por cerca de 80% do volume celular. Seqüências de promotor de vários genes de utilização de metanol foram desenvolvidas para

30

produção de proteínas recombinantes. Dentre outras, esses promotores fortes e indutíveis são uma importante razão para o amplo uso de *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha* como hospedeiros para produção de proteínas.

Em *H. polymorpha* e *C. boidinii*, um gene codifica uma álcool oxidase: *MOX* (metanol oxidase, *H. polymorpha*) e *AOD1* (álcool oxidase: *C. boidinii*). Dois genes foram encontrados em duas espécies de *P. pastoris* (*AOX1* e *AOX2*) e *P. methanolica* (*AUG1* e *AUG2*, gene de utilização de álcool, ou *MOD1* e *MOD2*), com Aox1p e Aug1p sendo a principal álcool oxidase). A comparação de regiões de codificação revelou 73 - 85% de similaridade no nível de aminoácidos entre as leveduras metilotróficas [1]. A homologia entre os ORFs (quadros de leitura abertos) de *AOX1* e *AOX2* de *P. pastoris* é de 92% e 97% nos níveis de sequência de nucleotídeos e de aminoácidos, respectivamente [2,3]. A álcool oxidase é uma flavoproteína octamérica contendo um FAD ligado de maneira não covalente ou um análogo modificado (mFAD) por subunidade. A tradução de AOX ocorre em ribossomos livres seguida por uma importação pós-traducional para peroxissomas. O deslocamento para peroxissomas é direcionada por uma sequência de PTS1 (sinal de direcionamento de peroxissoma do tipo 1) em seu terminal C extremo. Oligômeros de Aox são formados somente depois da importação para a matriz de peroxissoma.

Em *C. boidinii* e *P. pastoris*, nenhum oligômero de Aox pôde ser encontrado no citossol, ao contrário da dihidroxiacetona sintase, que forma um dímero no citossol antes de seu deslocamento para a matriz peroxissomal. Não somente a sequência de promotor de álcool oxidase 1 de *Pichia pastoris*, mas, também, a enzima é de interesse biotecnológico devido a uma ampla gama de substratos (álcoois primários saturados e insaturados com comprimento de cadeia de curto a moderado) e uma elevada estabilidade sob várias condições de reação. A regulação de todos os genes de álcool oxidase ocorre no nível de transcrição e muitíssimo provavelmente no estágio de iniciação de transcrição. Embora *AOX1* e *AOX2* sejam reguladas de maneira similar (mRNA não detectável em glicerol ou glicose, detectável na fase de privação de carbono, elevadas quantidades em metanol), suas regi-

ões 5-flanqueantes não compartilham homologia significativa [2,4].

Cada locus de AOX exibe um sítio de ligação a RNA polimerase putativo (TATAAA; Goldberg-Hogness ou caixa TATA) na posição -43 com relação ao sítio de iniciação de transcrição primária. Ambas as seqüências líderes de mRNA de AOX de *P. pastoris* são extremamente ricas em resí-
duos de A e são incomumente longas para leveduras (115 nucleotídeos (nt) para AOX1 e 160 nt para AOX2). As regiões de iniciação de tradução em torno do códon de iniciação ATG (seqüência Kozak; AOX1: CGAAACG ATG GCT, AOX2: GAGAAAA ATG GCC) são consistentes com seqüências de
consenso previamente descritas para *S. cerevisiae* e eucariotas superiores. O papel fisiológico do segundo gene de álcool oxidase em *P. pastoris* e *P. methanolica* é ainda obscuro. A interrupção de AOX1 ou AUG1 causa severos defeitos de crescimento nessas cepas (o assim chamado fenótipo lento de utilização de metanol (Mut^s)) embora cepas com *aox2* e *aug2* mostrem
taxas de crescimento comparáveis à cepa de tipo selvagem. Nove formas múltiplas de álcool oxidase foram observadas em *P. methanolica*, representando uma oligomerização aleatória dos 2 produtos de gene Aug1p e Aug2p. AUG1 e AUG2 são regulados de maneiras diferentes: em privação de carbono e baixa concentração de metanol somente Aug1p pôde ser detectado,
e com concentração de metanol crescente a Aug2p e Aug1p aumenta. O deslocamento para octâmeros com elevado teor em Aug2p é devido a um aumento de expressão de AUG2, regulado no nível de transcrição. Valores de K_m para metanol dos dois homooctâmeros de Aug1p e Aug2p são de cerca de 0,56 e 5,6 mM, respectivamente. Em conjunto com a constatação de
que a interrupção de AUG1 causa um defeito de crescimento em baixas concentrações de metanol [5], esses resultados implicam em que AUG2 é uma vantagem para *P. methanolica* quando se cultiva em concentrações de metanol mais elevadas. Em *Pichia pastoris*, nem o papel do gene AOX2 foi analisado em maiores detalhes, nem foram encontradas condições favoráveis para se possuir um segundo gene de álcool oxidase. Uma vez que as condições de laboratório representam somente uma fração muito pequena de condições com as quais os microorganismos de vida livre são confronta-

dos, deve haver situações na natureza, nas quais o gene *AOX2* seja de importância seletiva para *Pichia pastoris*.

A expressão de *AOD1* de *C. boidinii* e de *MOX* de *H. polymorpha* são expressamente reprimidas durante o crescimento em glicose ou etanol como fonte única de carbono, desreprimidas em glicerol e fortemente induzidas em metanol. A expressão dessas duas enzimas é também reprimida quando glicose e metanol estiverem presentes no meio. Se glicerol estiver presente, metanol é capaz de induzir a expressão de gene. A transcrição de *AOD1* e *MOX* é também desreprimida em privação de carbono e reprimida quando etanol estiver presente [6 - 9]. Dois mecanismos reguladores diferentes são responsáveis pela repressão do metabolismo de utilização de metanol por etanol ou glicose. [10,11]. Em *Pichia pastoris*, a situação é significativamente diferente: *AOX1* é reprimida quando glicose, etanol ou glicerol estiver presente nos meios (em concentrações não limitantes de crescimento). A desrepressão em privação de carbono e a indução por metanol são similares a *AOD1* e *MOX*. Fontes de carbono, com as quais a expressão de *AOX1* é desreprimida, são, por exemplo, sorbitol, manitol, trealose e alanina [12].

Quando do deslocamento de metanol para uma fonte de carbono repressora, como glicose ou metanol, os peroxissomas são degradados dentro de horas durante a adaptação a uma nova fonte de carbono. A degradação proteolítica no vacúolo de levedura novamente segue dois mecanismos distintos, quando adaptada a glicose ou etanol, denominados de micro- e macroautofagia.

Conforme mencionado acima, as leveduras metilotróficas *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha* são amplamente usadas para a produção de proteína recombinante. Até agora, mais do que 500 proteínas foram produzidas em *P. pastoris*. Seu desenvolvimento foi impelido por umas poucas características, que lhes trazem vantagens entre os hospedeiros de expressão recombinante: 1) elas compartilham a vantagem geral de leveduras em termos de manipulação genética e tecnologia de cultivo (em escala de laboratório e em grande escala); 2) a capacidade de crescer em até densidades

de células extremamente elevadas; e 3) a produção de nível elevado de proteína recombinante (secretada ou intracelular). Os promotores de genes indutíveis fortes, que codificam reações da via de utilização de metanol, foram desenvolvidos para produção de proteína recombinante. Aqueles mais amplamente usados são as regiões de promotor dos genes de álcool oxidase *AOX1* e *MOX* de *P. pastoris* e *H. polymorpha*, respectivamente. Contudo, também outras regiões de promotor dos genes da via de utilização de metanol foram usadas para impelir a produção de proteína recombinante: promotores de FMD (formato desidrogenase) e de *DAS1* (dihidroxiacetona desidrogenase) em *H. polymorpha* e *C. boidinii* e o promotor de *FLD1* (formaldeído desidrogenase) em *P. pastoris*. O último desses também pode ser induzido com metilamina como única fonte de nitrogênio com glicose como a fonte de carbono. Promotores para a expressão constitutiva de genes exógenos também estão disponíveis: o elemento promotor de GAP (3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase) em *P. pastoris* e o promotor de *PMA1* (que codifica a H⁺-ATPase de membrana plasmática) em *H. polymorpha*. Várias combinações cepa de hospedeiro auxotrófica/gene marcador foram desenvolvidas para *P. pastoris* (por exemplo, *HIS4*) e *H. polymorpha* (por exemplo, *LEU2* e *URA3*). Marcadores de seleção dominantes também estão disponíveis (por exemplo, Zeocin[®], resistência a G418). A integração de gene em leveduras metilotróficas é feita principalmente (se não exclusivamente) por integração homóloga. Vetores suportando uma região de ARS (seqüência replicante de maneira autônoma) também estão disponíveis, contudo, usualmente eles são muito instáveis se a pressão de seleção for liberada, o que resulta em sua aplicação tecnológica limitada. Em *P. pastoris*, o gene exógeno é integrado de maneira específica quanto ao sítio ou no locus de *AOX1* ou no locus de *HIS4*. Outros sítios de integração possíveis são, por exemplo, o locus de *GAP* (para expressão de GAP) ou quais outros loci de marcador de seleção (por exemplo, *ADE1*, *URA3*, *ARG4* e *LEU2*). Em *H. polymorpha*, os casetes de expressão são integrados aleatoriamente em uma disposição de cabeça para cauda, conduzindo a integrantes mitoticamente estáveis com um elevado número de cópias (até 100). Entretanto, um elevado número de

cópias freqüentemente não resulta em uma expressão de nível elevado. Fatores adicionais de grande influência são: estrutura do cassete de integração, natureza e estrutura da proteína a ser expressa e o sítio de integração. Especialmente a estrutura do cassete de integração é de grande influência

5 sobre o efeito da dosagem de gene. Uma discussão adicional de como otimizar o cassete de expressão e a dosagem do gene é dada em [13,14]. Leveduras metilotróficas são pertencentes ao grupo de leveduras Crabtree negativas, portanto, a produção de etanol ocorre em nível muito baixo, quando cultivadas sob condições aeróbicas. Devido a esse fato, essas leveduras

10 podem ser cultivadas até densidades de células muito elevadas em culturas de fermentador, resultando em elevados rendimentos em produto. Produção de proteína impelida por *AOX1* podem ser aumentadas adicionalmente 3 - 5 vezes, quando a concentração de metanol no biorreator estiver em esferas limitantes de crescimento. O fato de que *P. pastoris* secreta, sob condições

15 padrão, somente baixas quantidades de proteínas endógenas, torna cada proteína recombinante secretada a mais abundante no meio. A secreção pode servir como uma primeira etapa substancial no processo de purificação a jusante. Para secreção de proteína, a seqüência líder pré-pro de *S. cerevisiae* (fator de pareamento α) e seqüências derivadas da fosfatase ácida

20 (*PHO1*) são amplamente usadas em *P. pastoris* e *H. polymorpha*. Em alguns casos, secreção suficiente foi obtida com proteínas de plantas, fungos e mamíferos, possuindo seus sinais de secreção naturais. Conforme mencionado acima, as leveduras são capazes de realizar modificações pós-traducionais, como formação de ligações dissulfeto, processamento de seqüências de sinal (por exemplo, seqüência líder pré-pro de MF α 1), adição de

25 lipídeo e glicosilação N- e O-ligada. Embora em células de mamífero, estruturas de oligossacarídeos N- e O-ligadas altamente complexas compostas de uma variedade de açúcares (por exemplo, N-acetilglicosamina, galactose e ácido siálico) são formadas, a maioria das leveduras gera estruturas do

30 tipo manose carecendo de algumas entidades de açúcar, como galactose ou ácido siálico. Essas estruturas de não mamífero podem resultar em severos problemas para a aplicação terapêutica, principalmente devido a seu eleva-

do potencial de imunogenicidade. Em *H. polymorpha* e *P. pastoris*, ao contrário de *S. cerevisiae*, a hipermanosilação é menos abundante e nenhuma manose α -1,3-ligada terminal imunogênica é incorporada em oligossacarídeos N-ligados. Para superar os problemas de imunogenicidade (e alguns
5 outros como baixa estabilidade na corrente sanguínea), os esforços estão na maneira de humanizar estruturas de oligossacarídeos derivadas de levedura, e, como a literatura recente revela, especialmente em *P. pastoris*. Até agora, a vasta maioria de matérias de pesquisa e processos comerciais se baseiam na levedura bem-conhecida *S. cerevisiae*. Devido ao conhecimento crescen-
10 te sobre leveduras não convencionais, em conjunto com as vantagens evidentes em termos de fermentação em grande escala e matérias de glicosilação, *H. polymorpha* e *P. pastoris* estão se tornando rapidamente as leveduras de escolha. Isso é enfatizado pelo fato de que vários processos de produção foram implantados na indústria.

15 No documento WO 02/081650, a identificação de regiões de promotor de *AOX1* é revelada, a qual pode ser usada para a construção de promotores de *AOX1* mutantes. Uma vez que as regiões de seqüência eliminadas do promotor de *AOX1* aqui reveladas são muito longas, o efeito acumulado, e não os efeitos únicos das seqüências reguladoras distintas do
20 promotor, pode ser observado. No entanto, uma tal abordagem não permitirá o desenvolvimento de promotores fortemente intensificados. Especialmente quando são construídos novos promotores, tendo características intensificadas por eliminação ou duplicação de partes do promotor original, é necessário o conhecimento da exata largura da seqüência reguladora.

25 É um objetivo da presente invenção fornecer um promotor de *AOX1* aperfeiçoado com propriedades intensificadas, a fim de facilitar o processamento a jusante na produção de proteína, para aumentar os rendimentos espaço-tempo e para auxiliar a aumentar a qualidade de produto.

Outro objetivo é fornecer um forte promotor de *AOX1* em um
30 vetor ou uma cepa de hospedeiro, que antecipe parcialmente ou inteiramente a repressão por glicose. É vantajoso ter um promotor que impulse forte expressão, na presença de elevadas concentrações de glicose.

Um outro objetivo da presente invenção é fornecer um promotor de *AOX1*, que permita a produção de uma proteína empregando uma reduzida quantidade de metanol ou sem metanol. Tais promotores teriam um impacto significativo sobre processos de produção industrial. Devido a questões de segurança, é necessário equipamento especial para plantas de produção empregando metanol como um indutor. Isso contradiz aplicações de *P. pastoris* em plantas de produção muito menos especializadas. Em adição, a estabilidade de proteína na presença de metanol pode embarçar a indução com base em metanol de expressão de proteína. Isso é menos crítico para a produção de proteínas industriais robustas, porém, se torna uma questão importante para, por exemplo, proteínas terapêuticas secretadas.

A construção de tais promotores demanda o conhecimento de porções específicas (por exemplo, elementos reguladores, sítios de ligação a fator de transcrição) do promotor de *AOX1* de *P. pastoris* de tipo selvagem, que - quando submetido à mutação de alguma maneira - exibe um efeito sobre o comportamento de expressão. Portanto, é um objetivo da presente invenção identificar essas porções e, por conseguinte, fornecer o meio de criar promotores de *AOX1* com características intensificadas.

Portanto, a presente invenção se refere a um promotor de álcool oxidase 1 (*AOX1*) de *Pichia pastoris* mutante do promotor de *AOX1* de *Pichia pastoris* de tipo selvagem (SEQ ID Nº 1) compreendendo pelo menos uma mutação selecionada a partir do grupo consistindo em:

- a) um sítio de ligação a fator de transcrição (TFBS),
- b) nucleotídeos 170 a 235 (-784 a -719) , nucleotídeos 170 a 191 (-784 a -763), nucleotídeos 192 a 213 (-762 a -741), nucleotídeos 192 a 210 (-762 a -744), nucleotídeos 207 a 209 (-747 a -745), nucleotídeos 214 a 235 (-740 a -719), nucleotídeos 304 a 350 (-650 a -604), nucleotídeos 364 a 393 (-590 a -561), nucleotídeos 434 a 508 (-520 a -446) , nucleotídeos 509 a 551 (-445 a -403), nucleotídeos 552 a 560 (-402 a -394), nucleotídeos 585 a 617 (-369 a -337), nucleotídeos 621 a 660 (-333 a -294), nucleotídeos 625 a 683 (-329 a -271), nucleotídeos 736 a 741 (-218 a -213), nucleotídeos 737 a 738 (-217 a -216), nucleotídeos 726 a 755 (-228 a -199), nucleotídeos 784 a 800 (-170 a

-154) ou nucleotídeos 823 a 861 (-131 a -93) de SEQ ID Nº 1, e suas combinações. Os números (negativos) entre parênteses ao longo de toda a descrição refletem as posições correspondentes do promotor em relação ao códon de início da tradução (por exemplo, ATG). Por exemplo, "A" de "ATG" em
5 uma seqüência de ácidos nucleicos compreendendo $N_x\text{GACTATGN}_y$, corresponde à posição +1, enquanto que "T" antes de "A" de "ATG" corresponde à posição -1.

De acordo com a presente invenção, o promotor de *AOX1* mutante compreende pelo menos uma mutação dentro de um sítio de ligação a
10 fator de transcrição e/ou uma das larguras de seqüência de ácido nucleicos destacadas acima. Tornou-se conhecido que especialmente essas regiões do promotor de *AOX1* são adequadas para modificar o promotor a fim de se alterar a suas características. Obviamente, também uma combinação das mutações destacadas acima pode ser introduzida para intensificar as características
15 peculiares de um promotor de *AOX1* (por exemplo, duas mutações de TFBS selecionadas a partir de a), uma mutação de TFBS selecionada a partir de a) e uma mutação selecionada a partir de b), uma mutação selecionada a partir de a) e duas mutações selecionadas a partir de b)). Por exemplo, uma mutação de uma TFBS pode ser combinada com uma mutação
20 dentro dos nucleotídeos 737 a 738 (-217 a -216) e/ou nucleotídeos 207 a 209 (-747 a -745) de SEQ ID Nº 1. A expressão de uma proteína, sob o controle de um promotor de *AOX1* em *Pichia pastoris*, é, em geral, induzida pela adição de metanol e inibida pela presença de glicose no meio. A fim de intensificar ou de reduzir o efeito dos aditivos ao meio na expressão de proteína,
25 na, o promotor é, de preferência, submetido à mutação nas regiões de promotor, conforme destacado acima. A eficácia dos promotores de *AOX1* submetidos à mutação para produzir uma proteína de interesse varia, dependendo da quantidade (isto é, cópias) de vetor integrado ao cromossoma do hospedeiro. Especialmente cepas de multicópias tornaram-se conhecidas
30 para exibirem efeitos de promotor intensificados. Uma vez que a resistência a antibióticos de *Pichia pastoris* depende do número de cassetes de resistência a antibiótico (vetores introduzidos em um hospedeiro compreendem,

de preferência, um cassete de resistência a antibiótico, permitindo ao hospedeiro crescer sobre/em um meio compreendendo um antibiótico como marcador seletivo) integrados ao cromossoma do hospedeiro, cepas de multicópias podem ser produzidas pela aplicação de concentrações crescentes de antibiótico (dentro da faixa de 10 µg/mL a 10 mg/mL, de preferência, de 50 µg/mL a 1,000 µg/mL; dependendo do antibiótico usado; por exemplo, geneticina: 0,1 a 10 mg/mL, de preferência, 0,2 a 5 mg/mL, particularmente, 0,25 a 4 mg/mL, zeocina: 10 a 5,000 µg/mL, de preferência, 50 a 3.000 µg/mL, particularmente, 100 a 2,000 µg/mL) por sobre placas de agar seletivas, para aumentar a pressão de seleção (por exemplo [14]; Scorer, CA. et al. (1994) *Bio/Technology* 12:181- 184). No entanto, foi constatado que o crescimento de células abrigando uma multiplicidade de cassetes de resistência a antibiótico é dependente não somente da concentração do antibiótico, mas, também, dependentes do tempo. Portanto, cepas multicópias são capazes de crescerem em uma colônia detectável em um meio contendo a mesma concentração de antibiótico em um período mais curto de tempo do que cepas de cópia única. Esse comportamento permite ao versado na técnica detectar e isolar cepas de multicópias antes que cepas de cópia única comecem a crescer. Por exemplo, uma cepa, abrigando uma cópia de um cassete de resistência a antibiótico, cresce em uma placa de agar até um tamanho de colônia detectável, em 72 h, enquanto que a mesma cepa, abrigando mais do que uma cópia do cassete, cresce em 24 a 48 h, até o mesmo tamanho.

Especialmente cepas de multicópias abrigando um promotor de *AOX1* com mutações dentro dos nucleotídeos 694 a 723 (-260 a -231) e dentro de nucleotídeos 737 a 738 (-217 a -216) mostraram taxas de expressão surpreendentemente intensificadas.

A fim de aumentar a eficiência de expressão de proteína de um hospedeiro, na presença de metanol, nucleotídeos 170 a 235 (-784 a -719) do promotor de *AOX1* (SEQ ID Nº 1) estão, de preferência, submetidos à mutação. Uma mutação nessa região aumenta a expressão de proteína em 120 a 130%, comparado ao promotor de *AOX1* de tipo selvagem, contanto

que o plasmídeo portanto o promotor de *AOX1* mutante seja integrado somente uma vez ao cromossoma/genoma do hospedeiro (mutante de cópia única). No entanto, mutações dentro de outras regiões mencionadas acima reduzem ou não afetam a eficácia de metanol em induzir a expressão de proteína. Ao contrário disso, mutações nas regiões de promotor do promotor de *AOX1* de tipo selvagem (conforme destacado acima) conduzem - dependendo da mutação - a expressão de proteína aumentada ou diminuída, sob condições de desrepressão (vide, por exemplo, a tabela 13, exemplo 1).

No entanto, cepas recombinantes, abrigando mais do que uma cópia de promotores de *AOX1* submetidos à mutação, resultam em cepas tendo uma atividade intensificada sob desrepressão e condições induzidas por metanol (cepas de multicópias, vide, por exemplo, a figura 7, exemplo 2). Em detalhe, cepas de multicópias abrigando mutações dentro dos nucleotídeos 694 e 723 de SEQ ID Nº 1 (d6), dentro dos nucleotídeos 694 e 723 (-260 e -231) de SEQ ID Nº 1 (d6), dentro dos nucleotídeos 694 e 723 (-260 e -231) e dentro dos nucleotídeos 304 e 350 (-650 e -604) de SEQ ID Nº 1 (d2d6), dentro de TFBS, especialmente dentro de Rap1, Gcr1, QA-1F, Hsf_1, Adr1, Hsf_2, Mat1MC, abaA e Hap2345, mostram uma expressão aumentada sob condições de desrepressão e/ou sob indução por metanol, comparadas à expressão de proteínas sob o controle do promotor de *AOX1* de tipo selvagem. Sob condições de desrepressão, algumas dessas cepas de multicópias mostram expressões de proteína, que são aumentadas em cerca de 10 vezes, comparadas às expressões sob o controle do promotor de tipo selvagem. Em presença de metanol como indutor, a eficiência de expressão é aumentada em mais do que 5 vezes, quando um promotor de acordo com a presente invenção for empregado. Portanto, essas mutações, especialmente quando presentes no hospedeiro em uma forma de multicópias, de preferência, são empregadas para a expressão de proteínas. A combinação de duas ou mais das mutações mencionadas acima podem intensificar adicionalmente a força do promotor (vide, por exemplo, a figura 7, exemplo 2).

Os sítios de ligação a fator de transcrição podem ser identificados experimentalmente (por exemplo, por deslocamento de mobilidade ou

análise de pegada) ou por comparação de seqüências com sítios de ligação a fator de transcrição conhecidos (por exemplo, por análise por computador, [15]).

O conhecimento de regiões de promotor, que influenciam a força e as características do promotor pode ser usado para projetar promotores com propriedades distintas (elevada expressão de proteína sob condições de desrepressão e/ou elevada expressão de proteína em presença de metanol). Além disso, essas propriedades podem ser intensificadas ou alteradas se esses promotores mutantes forem integrados uma ou mais vezes ao genoma do hospedeiro (por exemplo, vide os exemplos 1 a 3).

No entanto, em alguns casos, a atividade de promotor deve ser diminuída ao invés de aumentada. Especialmente, a co-expressão de proteínas reguladoras, como quinases, fosforilases e proteínas auxiliares, tais como, por exemplo, chaperonas, dissulfeto isomerase de proteína, cis-trans isomerases, dobrases, dissulfeto isomerases de proteína e proteases, é, em muitos casos, necessária a ser baixa em comparação com o produto principal, o que pode ser produzido pela célula sob o promotor de tipo selvagem ou sob um promotor intensificado de acordo com a presente invenção. Especialmente, a expressão combinada de dois diferentes produtos (por exemplo, uma proteína auxiliar e o produto principal), sob o controle de um promotor de *AOX1* com atividade aumentada e um promotor de *AOX1* com atividade diminuída (em comparação com a atividade de tipo selvagem), respectivamente, tornou-se conhecida por ser vantajosa, porque a taxa de expressão do produto principal e do produto secundário difere ainda mais, ao invés de se usar promotores de *AOX1*. A expressão reduzida pode ser obtida, de maneira preferida, por eliminação de sítios de ligação a inibidor, como HSF ou HAP ou por inserção de sítios de ligação a repressor no promotor de *AOX1* de tipo selvagem. Portanto, o uso de promotor de *AOX1* com atividade reduzida previne a sobrecarga da maquinaria de expressão de proteína da célula, o que poderia ter a conseqüência de que o rendimento no produto principal seria reduzido. Por exemplo, Bessette PH et al. (PNAS EUA (1999) 96:13703-13708) poderia mostrar que a expressão de um polipeptídeo ativo

poderia ser aumentada de maneira significativa pela co-expressão de uma tio-redoxina.

De acordo com uma concretização preferida, o promotor compreende adicionalmente uma mutação dentro dos nucleotídeos 694 a 723 (-260 a -231) e/ou nucleotídeos 729 a 763 (-225 a -191) de SEQ ID N° 1.

Uma mutação afetando essas faixas de nucleotídeos, em combinação com uma mutação conforme destacado acima, resulta em atividade de promotor ainda mais intensificada. Por exemplo, uma mutação dupla afetando os nucleotídeos 694 a 723 (-260 a -231) e os nucleotídeos 737 a 738 (-217 a -216) de SEQ ID N° 1 conduziu a um promotor exibindo níveis de expressão mais elevados sob desrepressão, assim como sob condições induzidas, comparado aos níveis de expressão sob as mesmas condições do promotor de tipo selvagem. O efeito dessa mutação dupla pode ser intensificado quando o ácido nucléico, compreendendo o promotor, for introduzido na célula em mais do que uma cópia (resultando em um clone com multicópias).

A mutação é, de preferência, uma eliminação, uma substituição, uma inserção, uma inversão e/ou uma multiplicação.

A fim de modificar as características do promotor de *AOX1* de tipo selvagem de *Pichia pastoris*, são possíveis vários tipos de mutação. O promotor se estica compreendendo as regiões mencionadas acima (sítios de ligação a fator de transcrição (TFBS), nucleotídeos 170 a 235 (-784 a -719), 170 a 191 (-784 a -763), 192 a 213 (-762 a -741), 192 a 210 (-762 a -744), 207 a 209 (-747 a -745), 214 a 235 (-740 a -719), 304 a 350 (-650 a -604), 364 a 393 (-590 a -561), 434 a 508 (-520 a -446), 509 a 551 (-445 a -403), 552 a 560 (-402 a -394), 585 a 617 (-369 a -337), 621 a 660 (-333 a -294), 625 a 683 (-329 a -271), 694 a 723 (-260 a -231), 729 a 763 (-225 a -191), 736 a 741 (-218 a -213), 737 a 738 (-217 a -216), 726 a 755 (-228 a -199), 784 a 800 (-170 a -154) ou 823 a 861 (-131 a -93) de SED ID N° 1) podem ser parcialmente ou completamente eliminados, parcialmente ou completamente substituídos por outros nucleotídeos ou seqüências de ácidos nucléicos, interrompidos por inserção de nucleotídeos únicos ou seqüências de

ácidos nucléicos, invertidos parcialmente ou completamente ou multiplicados. Todas essas mutações conduzem a uma mudança de atividade de promotor, porque características estruturais e/ou sítios de reconhecimento/ligação para, por exemplo, fatores de transcrição são afetados pelas mutações. Entretanto, essas mudanças podem conduzir a uma atividade aumentada ou diminuída do promotor, comparado ao promotor de tipo selvagem.

É bem-conhecido na técnica anterior o fato de que a multiplicação/duplicação de segmentos de ácido nucléicos específicos podem aumentar a atividade de promotor. A regulação de expressão de gene de muitos promotores eucarióticos, especialmente promotores de leveduras, envolve interações múltiplas entre fatores de transcrição ligados dentro de um promotor. Podem ser necessários múltiplos sítios para o funcionamento mesmo dos menores elementos cis-atuantes. Em células de levedura, seqüências de ativador a montante (UAS) são necessárias para transcrição. Elas funcionam em qualquer orientação e em distância variável no que refere-se à caixa TATA e ao sítio de iniciação de transcrição, mas, ao contrário dos intensificadores em eucariotas superiores, elas têm que estar a montante destes elementos basais. UAS são alvo de vários ativadores transcricionais.

A maioria dos fenômenos de repressão em células de levedura resultam da inativação ou da ausência de fatores de transcrição. No entanto, alguns sítios reguladores negativos (seqüências de repressão a montante (URS)) também poderiam ser identificadas.

Com base em análise de eliminação do promotor de *AOX2* de *P. pastoris*, foram encontradas três regiões reguladoras, duas regiões que atuam de maneira negativa (URS1 e URS2) e um domínio que atua de maneira positiva (UAS) [3]. Para o promotor de *MOX* de *H. polymorpha*, duas seqüências de ativação a montante (UAS1 e UAS2) e um sítio de ligação a repressor (URS1) também foram descritos [8]. Seqüências correspondentes também poderiam ser identificadas em promotores de *AOX1* (nucleotídeos 585 a 614 (-369 a -340) e 725 a 756 (-229 a -198), mostrando similaridades a UAS de *AOX2* [3], assim como nucleotídeos 622 a 656 (-332 a -298) [8]). A

multiplicação (2, 3, 4, 5, 6 ou 7 vezes de UAS) desses segmentos de ácido nucléico podem resultar em um promotor com uma força intensificada, conduzindo a expressão de proteína ainda mais poderosa. Portanto, a construção de promotores compreendendo UAS múltiplas, de preferência, envolvendo as regiões de seqüência mencionadas acima similares às UAS de AOX2 e MOX, ou outros segmentos de seqüência múltiplos (por exemplo, as faixas de seqüências de ácidos nucléicos destacadas acima) recaem também dentro do escopo da presente invenção e é considerada como sendo uma concretização preferida. Uma seqüência de ativação está, usualmente, dentro de umas poucas centenas de pares de base de um promotor. Por exemplo, a maioria das seqüências de ativação estão dentro de cerca de 200 a 400 pares de base do promotor que é intensificado. Mais além a montante, o promotor usualmente contém intensificadores e sítios de ligação a fator de transcrição adicionais.

Pelo menos uma mutação do promotor de AOX1 pode ser introduzida por métodos padrão conhecidos pelo versado na técnica (por exemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Terceira Edição), J. Sambrook e D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

De acordo com uma concretização preferida da presente invenção, o sítio de ligação a fator de transcrição (TFBS) é selecionado a partir do grupo consistindo em Hap1, Hsf, Hap234, abaA, Stre, Rap1, Adr1, Mat1MC, Gcr1 e QA-1F.

A mutação de pelo menos um desses TFBS resulta em promotores mutantes com características variáveis (vide o exemplo 2).

De preferência, o sítio de ligação a fator de transcrição (TFBS) Hap1 compreende os nucleotídeos 54 (-900) a 58 (-896) de SEQ ID Nº 1, nucleotídeos de Hsf 142 (-812) a 149 (-805) e 517 (-437) a 524 (-430) de SEQ ID Nº 1, nucleotídeos de Hap234 196 (-758) a 200 (-754), 206 (-748) a 210 (-744) e 668 (-286) a 672 (-282) de SEQ ID Nº 1, nucleotídeos de abaA 219 (-735) a 224 (-730) de SEQ ID Nº 1, nucleotídeos de Stre 281 (-673) a 285 (-669) de SEQ ID Nº 1, nucleotídeos de Rap1 335 (-619) a 339 (-615) de SEQ ID Nº 1, nucleotídeos de Adr1 371 (-583) a 377 (-577) de SEQ ID Nº 1,

nucleotídeos de Mat1MC 683 (-271) a 687 (-267) de SEQ ID Nº 1, nucleotídeos de Gcr1 702 (-252) a 706 (-248) de SEQ ID Nº 1 e nucleotídeos de QA-1F 747 (-207) a 761 (-193) de SEQ ID Nº 1.

- Esses TFBS podem ser identificados experimentalmente, ou por
- 5 comparação com TFBS conhecidos de outros promotores (por exemplo, promotores de eucariotas) com o auxílio de programas de computador (por exemplo, vide o exemplo 3).

- Um sumário da influência de promotores de *AOX1* mutantes sobre a expressão de proteínas, peptídeos ou ácidos nucléicos funcionais é
- 10 fornecido na tabela 2 (em comparação com a atividade de tipo selvagem).

Tabela 2: influência de mutantes do promotor de *AOX1* de tipo selvagem sobre a expressão de proteínas, peptídeos ou ácidos nucléicos funcionais

Mutação	Clone de cópia única		Clone de multicópias	
	Condição de desrepressão ¹	Condição induzida por metanol ¹	Condição de desrepressão ¹	Condição induzida por metanol ¹
ΔHap1		+		
ΔHsf_1	-	+	+	+
Δ1	+	+		
ΔHap2345_1		+		+
ΔHap2345_2	-	+		+
ΔabaA	-		+	+
ΔStre	+	+		
Δ2		-		
ΔRap1	-		+	+
Δ3	-	-		
ΔAdr1	-	-	+	+
Δ4	-	-		
ΔHsf_2				
Δ5	-	-		
ΔHap2345_3			+	+
ΔMat1MC				

Mutação	Clone de cópia única		Clone de multicópias	
	Condição de desrepressão ¹	Condição induzida por metanol ¹	Condição de desrepressão ¹	Condição induzida por metanol ¹
Δ6	+	+	+	+
Δ6*	+	-	+	+
ΔGcr1	-	+	+	+
Δ7	-	-		
ΔQA-1F	+		+	+
ΔQA-1Fzus	+	-		
ΔHsf_2_dHap2345_1		+	+	+
ΔHsf_2_dHap2345_1zus		+		
ΔHsf_2_Mat1MC	-		+	+
Δ8	-	-		
Δ9	-	-		
Δ2Δ6		-	+	+
Δ736-41		-		
Δ737-38				
ΔInD-d4m				
ΔD-d4				
Δ1-1				
Δ1-2				
Δ1-3				
Δ1-Sacl				

¹Taxa de expressão em comparação ao promotor de *AOX1* de tipo selvagem: - diminuiu, + aumentou

Outro aspecto da presente invenção se refere a uma molécula de ácido nucléico compreendendo um promotor de álcool oxidase 1 (*AOX1*) de *Pichia pastoris* mutante de acordo com a presente invenção, e um ácido nucléico que codifica uma proteína, peptídeo ou ácido nucléico funcional, sendo que o promotor e o ácido nucléico estão ligados de maneira operável em conjunto.

O promotor de *AOX1* mutante pode estar ligado a um gene que codifica uma proteína (por exemplo, enzima), um peptídeo (por exemplo, hormônio) ou ácido nucléico funcional (por exemplo, siRNA). O fragmento de ácido nucléico resultante pode ser usado para expressar, por exemplo, uma

5 proteína quando introduzida em um organismo, de preferência, uma levedura, especialmente uma cepa de *Pichia pastoris*. A construção da molécula de ácido nucléico é bem-conhecida pelo versado na técnica e pode ser realizada com métodos de biologia molecular padrão (por exemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Terceira Edição), J. Sambrook e D. Russell,

10 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press; manual "Pichia Expression Kit", Invitrogen Corp.).

"Ligado de maneira operável" se refere à(s) primeira(s) seqüência(s) estando posicionada(s) suficientemente próxima à(s) segunda(s) seqüência(s), de modo que a(s) primeira(s) seqüência(s) possa(m) exercer influência sobre a(s) segunda(s) seqüência(s) ou uma região sob controle daquela(s) segunda(s) seqüência(s). Por exemplo, um promotor pode estar

15 ligado de maneira operável a um gene, de modo que o gene será expresso sob o controle do promotor, que poderia estar, tipicamente, 5' com relação ao gene. Usualmente, um promotor de núcleo estaria dentro de umas poucas centenas de pares a partir do sítio de início de tradução. Cerca de 30 pb a jusante, usualmente, existe um elemento de promotor a jusante.

Outro aspecto da presente invenção se refere a um vetor compreendendo um promotor de álcool oxidase 1 (*AOX1*) de *Pichia pastoris* mutante de acordo com a presente invenção ou a uma molécula de ácido nucléico conforme destacada acima.

25

A fim de se introduzir o promotor mutante, opcionalmente ligado de maneira operável a um ácido nucléico que codifica uma proteína, peptídeo ou ácido nucléico funcional, a um hospedeiro, de preferência, a uma cepa de levedura metilotrófica (por exemplo, uma cepa de *Pichia pastoris*), o

30 promotor tem que ser fornecido em um vetor, que pode ser usado para a transformação do hospedeiro. Por exemplo, os vetores podem ser plasmídeos episomais de levedura (YE_p), plasmídeos integrativos de levedura

(Ylp) ou cromossomas artificiais de levedura. Tais vetores compreendem, usualmente, uma origem de replicação (se for necessária a amplificação em hospedeiros microbianos) e um marcador de seleção para a propagação de vetores em *E. coli*, promotores e terminadores para a expressão de proteína recombinante em levedura e marcadores de seleção para levedura. Vetores não integrativos compreendem adicionalmente uma sequência de replicação autônoma (ARS), o que assegura a estabilidade do vetor na célula (por exemplo, Myers, A. M., et al. (1986) Gene 45: 299-310). Vetores integrativos, que não abriguem seqüências AR, compreendem regiões de seqüência, que sejam homólogas a regiões do genoma. Alternativamente, DNA linear, por exemplo, originando-se a partir de PCR, pode ser usado para a transformação.

Outro aspecto da presente invenção se refere a uma célula compreendendo pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante, pelo menos um fragmento de ácido nucléico ou pelo menos um vetor conforme descrito acima. A introdução de uma molécula de ácido nucléico abrigando um promotor de AOX1 mutante (por exemplo, vetor, no qual o promotor esteja ligado de maneira operável a um ácido nucléico que codifica uma proteína), em um hospedeiro pode ser feito, por exemplo, por eletroporação. A molécula de ácido nucléico é integrada ao cromossoma depois de sua introdução ao hospedeiro, em uma cópia única ou em múltiplas cópias, ou está presente na célula como um plasmídeo replicante autônomo de cópia única ou de multicópias. Se vários promotores mutantes forem usados, eles podem todos estar ligados com um único gene (que codifique uma proteína ou ácido nucléico funcional (por exemplo, ribozima, RNA sem sentido, etc.), uma proteína idêntica ou proteínas diferentes (por exemplo, variante de promotor 1 está ligada a um marcador de seleção e outro promotor mutante está ligado a outra proteína, que deva ser expressa). Portanto, dentro do escopo da presente invenção, são, de preferência, produzidas cepas de multicópias compreendendo uma cópia do promotor de AOX1 ligada de maneira operável a um ácido nucléico, que codifica uma proteína, um peptídeo ou um ácido nucléico funcional, assim como cepas de multicó-

pias compreendendo mais do que uma, de preferência pelo menos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ou 20 cópias do promotor de *AOX1* ligadas de maneira operável a um ácido nucléico, que codifica uma proteína, um peptídeo ou um ácido nucléico funcional.

5 De acordo com uma concretização preferida da presente invenção, a célula é uma célula eucariótica, em uma célula de levedura particular, de preferência, uma célula de levedura metilotrófica.

De preferência, a célula de levedura metilotrófica é selecionada a partir do grupo consistindo em *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Toruplosis*,
10 especialmente, uma célula de *Pichia pastoris*.

Promotores de *AOX1*, assim como variantes submetidas à mutação dos mesmos, podem ser introduzidos de maneira funcional, em um grande número de células de levedura diferentes, incluindo células metilotróficas (por exemplo, *Pichia pastoris*) e não metilotróficas (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*). A transferibilidade de promotores para outros organismos, especialmente de promotores de *AOX1* e de *MOX*, é conhecida pelo
15 versado na técnica. Embora a especificidade quanto ao substrato e algumas características reguladoras sejam diferentes em leveduras diferentes (por exemplo, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* e *Saccharomyces cerevisiae*), um reconhecimento de promotores exógenos foi demonstrado (por exemplo, Raschke, W.C., et al., Gene, 1996. 177:163-7; Pereira, G.G. e C.P. Hollenberg, Eur J Biochem, 1996. 238:181-91). Por exemplo, o promotor de *MOX* de *H. polymorpha* e é reconhecido em *S. cerevisiae*, reprimido em presença de glicose e desreprimido sob limitação de fonte de carbono. Similar-
20 mente, o promotor de *AOX1* pode ser empregado em *H. polymorpha* e é regulado da mesma maneira que o promotor de *MOX*. O promotor de *ZZA1*, que está intimamente relacionado ao promotor de *AOX1* também poderia ser empregado de maneira bem-sucedida em *S. cerevisiae*.
25

Outro aspecto da presente invenção se refere a um kit para a
30 expressão de uma proteína selecionada ou transcrição para um RNA funcional, compreendendo

i) um vetor conforme definido acima, e

ii) uma célula capaz de expressar a proteína ou RNA funcional sob o controle de um promotor de acordo com a presente invenção.

O vetor de acordo com a presente invenção pode ser usado em um kit para a expressão de uma proteína selecionada ou transcrição de um
5 RNA funcional (por exemplo, ribozima, RNA sem sentido, RNAi).

De acordo com uma concretização preferida da presente invenção, a célula é uma célula de levedura, de preferência, uma célula de levedura metilotrófica.

De preferência, a célula de levedura metilotrófica é selecionada
10 a partir do grupo consistindo em *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Toruplosis*, especialmente, uma célula de *Pichia pastoris*.

Outro aspecto da presente invenção se refere a um método para a expressão de uma proteína, peptídeo ou ácido nucléico funcional recombinantes, em uma célula compreendendo as seguintes etapas:

- 15 - fornecimento de um vetor ou de uma molécula de ácido nucléico compreendendo um promotor de *AOX1* de acordo com a presente invenção e um ácido nucléico que codifica uma proteína, peptídeo ou ácido nucléico funcional, o promotor estando ligado de maneira operável ao ácido nucléico,
- transformação da célula com o vetor ou a molécula de ácido nucléico,
- 20 - cultivo da célula transformada em um meio de cultura adequado,
- opcionalmente, indução de expressão da proteína, peptídeo ou ácido nucléico funcional e
- isolamento da proteína, peptídeo ou ácido nucléico funcional expressos.

De acordo com uma concretização preferida de acordo com a
25 presente invenção, a célula é uma célula de levedura, de preferência, uma célula de levedura metilotrófica.

De preferência, a célula de levedura metilotrófica é selecionada a partir do grupo consistindo em *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Toruplosis*, especialmente, uma célula de *Pichia pastoris*. Outro aspecto da presente
30 invenção se refere ao uso de uma molécula de ácido nucléico, um vetor ou uma célula de acordo com a presente invenção, para a expressão de uma proteína, peptídeo ou ácido nucléico funcional.

Quando uma molécula de ácido nucléico, um vetor ou uma célula de acordo com a presente invenção for usado para a expressão de uma proteína, peptídeo ou ácido nucléico funcional, é vantajoso escolher um promotor de *AOX1* apropriado, que atenda às exigências impostas para a expressão (por exemplo, expressão elevada ou constitutiva sob condições de desrepressão (= sem a adição de glicose ao meio) ou sob condições induzidas por metanol). Promotores de *AOX1* mutantes adequados podem ser selecionados com o auxílio da tabela 2.

Outro aspecto da presente invenção se refere a um método para o isolamento de clones de superexpressão compreendendo as etapas de:

a) introdução de uma molécula de ácido nucléico ou vetor, compreendendo um promotor indutível por metanol submetido à mutação, de preferência, um promotor de *AOX1*, ligado de maneira operável a um ácido nucléico, que codifique uma proteína, ou a um ácido nucléico funcional e um gene de resistência de marcador, em uma célula,

b) transferência da célula da etapa a) para um meio compreendendo um marcador seletivo apropriado, uma fonte de carbono não repressora e metanol, para o crescimento seletivo de clones de superexpressão sob condições de indução, ou para um meio compreendendo um marcador seletivo apropriado e uma fonte de carbono não repressora sem metanol, para o crescimento seletivo de clones de superexpressão sob condições de desrepressão,

c) incubação da célula da etapa b) no meio,

d) isolamento de uma colônia da célula obtida a partir da etapa

c) e

e) detecção de clones de superexpressão por determinação da taxa de expressão da célula.

A construção de clones de superexpressão ou de expressão elevada, abrigando um vetor ou um ácido nucléico, compreendendo um promotor indutível por metanol submetido à mutação, exige métodos que permitam ao versado na técnica isolar estes clones. Um tal método é aqui fornecido. A primeira etapa do método é a introdução do promotor compreendendo

ácido nucléico (por exemplo, vetor) em uma célula adequada, que seja capaz de regular o promotor. O próprio promotor pode ser submetido à mutação por engenharia genética ou por mutagênese química (por exemplo, bis-sulfeto, nitrito, ácido fumárico, hidrazina) ou física (por exemplo, radiação, especialmente radiação UV). Em uma etapa adicional, as células abrigando o promotor submetido à mutação são transferidas para um meio, de preferência, para um meio sólido, diretamente ou via um meio líquido, que compreenda um antibiótico (por exemplo, zeocina) e sorbitol (ou outra fonte de carbono não repressora conforme descrito, por exemplo, em [12], em particular, alanina, manitol ou trealose), para o crescimento de clones de expressão elevada sob condições de desrepressão, e que compreenda, adicionalmente, metanol, se os clones de expressão elevada, sob condições induzidas, devam ser detectados. Por inclusão de glicose aos meios, em conjunto com metanol, transformantes não reprimidos por glicose e induzidos por metanol poderiam ser isolados (para evitar a volatilização de metanol, o meio pode ser armazenado, durante a incubação, em uma atmosfera saturada em metanol ou compreendendo metanol). Depois do cultivo das células em ou sobre um meio adequado, as células são isoladas a partir do meio e podem ser usadas para análise ulterior (por exemplo, determinação da taxa de expressão exata, isolamento do promotor, a fim de analisar as mudanças na sequência de ácidos nucléicos do promotor, comparado ao promotor de tipo selvagem). As fontes de carbono não repressoras, usadas no método de acordo com a presente invenção e descritos, por exemplo, em [12], são empregadas, de preferência, em uma quantidade de 0,1 até 10%, de preferência, em uma quantidade de 0,2 até 5%, mais preferivelmente, em uma quantidade de 0,3 até 3%, em particular, em uma quantidade de 0,5 a 1%. Uma fonte de carbono não repressora preferida é selecionada a partir do grupo consistindo em alanina, manitol, sorbitol, trealose, lactose e suas combinações.

A seleção de gene de resistência de marcador adequado depende do marcador usado para selecionar os transformantes. Por exemplo, se zeocina for usada como marcador, o gene de resistência de marcador, a

ser introduzido no vetor, sob o controle do promotor de *AOX1* mutante, é o gene *Sh ble*. Se o ácido nucléico codificar uma proteína ou um peptídeo a proteína resultante/expressa pode ser uma proteína de fusão. É especialmente vantajoso fornecer o gene de resistência de marcador sob o controle do promotor de *AOX1* mutante, porque, em tal caso, a taxa de expressão do produto de gene de resistência de marcador também depende da força do promotor e do comportamento do promotor submetido à mutação. Por exemplo, um promotor forte responsável pela expressão elevada do produto de ácido nucléico também aumentará a taxa de expressão do produto de gene de resistência de marcador. Tais clones têm uma vantagem seletiva sobre clones com um promotor exibindo uma força de promotor reduzida. Isso permite a seleção de clones de superexpressão diretamente depois da geração a partir da transformação das células.

A taxa de expressão é, de preferência, determinada por métodos como eletroforese em gel (por exemplo, SDS-PAGE), ligação a anticorpos (por exemplo, ELISA), PCR (por exemplo, RT-PCR em tempo real) quantitativa (transcriptase reversa), atividade enzimática (por exemplo, se a proteína expressa for uma enzima) ou fluorometricamente (proteína com um espectro de emissão característico semelhante à proteína fluorescente verde).

Promotores (transformantes) mostrando expressão aumentada em ausência de fontes de C de outra maneira repressoras (no caso de promotor de *AOX1*, glicose) são selecionados por crescimento seletivo de células transformadas em/sobre meios contendo uma fonte de carbono não repressora. Promotores (transformantes) mostrando expressão aumentada em presença de fontes de carbono de outra maneira repressoras (no caso de promotor de *AOX1*, glicose) em presença de um indutor (por exemplo, metanol) são selecionados por crescimento seletivo de células transformadas em/sobre meios contendo uma fonte de carbono não repressora e o indutor (metanol). O indutor também pode ser uma fonte de carbono não repressora. Clones de superexpressão são selecionados por combinação de uma multi-cópia conduzindo a antibióticos contra resistência mais elevada (por exemplo, zeocina) ou produtividade mais elevada de um componente de meio es-

sencial (por exemplo, Leu, His, Arg, Ura) com a seleção reguladora descrita acima.

As composições dos meios a serem usados em um método de acordo com a presente invenção podem ser obtidos diretamente a partir dos
5 fabricantes ou dos distribuidores dos kits, células e vetores relativos à *Pichia pastoris* (por exemplo, Invitrogen). A concentração de metanol no meio pode ser, de preferência, de 0,05 a 15%, mais preferivelmente, 0,1 a 10%, particularmente, 0,3 a 5%. Na literatura científica, são descritas diferentes concentrações de metanol para condições de cultivo diferentes. Por exemplo, frascos de agitação podem conter 1% de metanol ou menos (Guarna MM, et al.
10 (1997) Biotech. Bioeng. 56:279-286), processos de fermentação podem conter 0,5% de metanol (Damasceno LM, et al. (2004) Protein Expr Purif 37:18-26; Hellwig S., et al. (2001) Biotechnol Bioeng 74:344-352; Hellwig S., et al. (1999) Biotechnol Appl Biochem 30:267-275).

15 A expressão intensificada de clones de multicópias podem depender não somente da presença de mais do que uma cópia de promotor submetido à mutação em uma célula, mas, também, do fato de que existe uma carência de vários fatores de transcrição, porque esses fatores podem estar ligados ao elevado número de sítios de ligação a fator de transcrição
20 na célula. Isso poderia ser mostrado por comparação da taxa de expressão sob condições de indução por metanol com a taxa de expressão sob condições de desrepressão, nas quais poder-se-ia constatar que a taxa de expressão intensificada não é somente um efeito do número de cópias do promotor de *AOX1* submetido à mutação na célula (nenhum efeito linear). Por
25 exemplo, a cepa d6*F10 mostra tais características.

O meio usado para isolar os clones de superexpressão pode compreender componentes de meios adicionais, como leucina, uracila, arginina, histidina e/ou adenina e sorbitol, podem ser trocados por glicose a fim de identificar variantes de promotor, que mostram uma repressão reduzida
30 na presença de glicose, comparadas às variantes de promotor de tipo selvagem.

Quando cepas auxotróficas forem usadas, a célula pode ser

transferida para um meio compreendendo sorbitol (ou outras fontes de carbono não repressoras) e contendo componentes de meios individuais (por exemplo, leucina, uracila, arginina, histidina e adenina) para o crescimento seletivo de clones de superexpressão sob condições de desrepressão empregando marcadores auxotróficos (etapa b)).

O marcador de resistência p(TEF)-Zeo comumente usado em promotor de *AOX1*, compreendendo vetores, conduz à expressão constitutiva da proteína de resistência à zeocina e, portanto, permite o isolamento de clones de multicópias por resistência contra concentrações mais elevadas do antibiótico. O novo método descrito permite combinar esse efeito com características reguladoras para detectar promotores e clones de multicópias, que conduzam à expressão elevada sob certas circunstâncias reguladoras controláveis (por exemplo, expressão desreprimida, expressão induzida, etc.). Isso torna possível detectar novos promotores com propriedades reguladoras alteradas e também clones, nos quais clones de multicópias conduzem à expressão intensificada sob tais condições reguladoras especiais.

"Clones de superexpressão" são clones de expressão, que expressam mais de uma proteína ou de um ácido nucléico funcional sob o controle do promotor submetido à mutação, do que sob o controle do promotor de tipo selvagem, ou mais de uma proteína ou ácido nucléico funcional, do que por aplicação de vetores com combinações de marcadores de promotor-seleção, tais como P(TEF)-Zeo. A taxa de expressão dos "clones de superexpressão" de acordo com a presente invenção pode ser aumentada em pelo menos 20%, de preferência, em pelo menos 50%, mais preferivelmente, em pelo menos 100%, particularmente, em pelo menos 500%, em comparação com a taxa de expressão da mesma proteína ou peptídeo ou ácido nucléico funcional, sob o controle do promotor de tipo selvagem (valor médio mais duas a três vezes o desvio-padrão). "Clones de superexpressão" podem compreender, de preferência, mais do que uma cópia do promotor ou molécula de ácido nucléico submetidos à mutação de acordo com a presente invenção. Alternativamente, "clones de superexpressão" também podem ser denominados "clones de expressão elevada".

De acordo com a presente invenção, "promotores indutíveis por metanol" são promotores cuja atividade é regulada pela presença de metanol no meio de cultura. Tais promotores são, de preferência, promotores de *AOX1* (de *Pichia pastoris*) ou de *MOX* (de *Hansenula polymorpha*) ou qualquer outro promotor indutível por metanol e reprimido por glicose derivado a partir de leveduras metilotróficas, tais como, por exemplo, FMD, FLD, DAS (por exemplo, vide a tabela 6, exemplo 1).

De acordo com uma concretização preferida da presente invenção, o marcador seletivo é um antibiótico, de preferência, zeocina.

O marcador seletivo a ser usado no meio depende do fato de que a característica molecular da célula possa ser usada para distinguir uma célula abrigando o ácido nucléico ou vetor compreendendo um promotor indutível por metanol de tipo selvagem, a partir de uma célula que não abrigue o ácido nucléico ou vetor. Marcadores seletivos, portanto, podem ser antibióticos (os genes para resistência a antibiótico podem ser encontrados no vetor ou ácido nucléico introduzidos na célula). Para compensar a auxotrofia de certas cepas, o marcador seletivo no meio pode ser uma substância, como leucina, uracila, arginina, histidina e adenina, dependendo do tipo de auxotrofia.

De preferência, a molécula de ácido nucléico, o vetor e a célula são um ácido nucléico, um vetor e uma célula de acordo com a presente invenção.

De acordo com uma concretização preferida da presente invenção, a molécula de ácido nucléico ou vetor é introduzido na célula por transformação por métodos padrão conhecidos pelo versado na técnica, de preferência, eletroporação, transformação química, fusão de protoplastos ou por bombardeamento com partículas (vide, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Editado por: Fred M. Ausubel et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Terceira Edição), J. Sambrook e D. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

A presente invenção é adicionalmente ilustrada pelas seguintes figuras e exemplo, sem estar a eles restritos.

A figura 1 mostra SDS-PAGE de cepas de *P. pastoris* que expressam GFP-Zeo em microescala antes de indução com metanol (A) e 24 (B) e 72 (C) horas depois de indução. Foram preparadas amostras conforme descrito no exemplo 1 h). A pista 1 é X-33 (controle negativo),
5 as pistas 2 - 4 são cepas GFP-Zeo de X-33 Mut^s A9, D2 e E2, a pista 5 é X-33 d6*F10. Uma banda forte em 42 KDa está presente em todos os clones GFD-Zeo.

A figura 2 mostra um panorama de eliminações de sequência dentro da região de promotor de *AOX1* e alguns sítios de ligação a fator de
10 transcrição. As regiões delta1-9 foram eliminadas por PCR de extensão de superposição.

A figura 3 mostra um diagrama de barras de intensidade de fluorescência de variantes de promotor de *AOX1* em microescala depois de desrepressão (privação de carbono). As células foram cultivadas em 1% de glicose em microescala. Os dados representam a média $\pm$ SD de 4 medições independentes. RFU: unidades de fluorescência relativa; WT: cepa de *P. pastoris* GFP-Zeo D2 com GFP-Zeo sob o controle do promotor de *AOX1* de tipo selvagem; D1-D9: cepas de *P. pastoris* com construtos de eliminação *AOX1* Δ 1- Δ 9 em frente do gene GFP-Zeo; EX: comprimento de onda excitação; EM: comprimento de onda de emissão.
15
20

A figura 4 mostra um diagrama de barras da intensidade de fluorescência de variantes de promotor de *AOX1* em microescala depois de indução por metanol. As células foram cultivadas em 1% de glicose em microescala. Os dados representam a média $\pm$ SD de 4 medições independentes.
25 RFU: unidades de fluorescência relativa; WT: cepa de *P. pastoris* GFP-Zeo D2 com GFP-Zeo sob o controle do promotor de *AOX1* de tipo selvagem; D1-D9: cepas de *P. pastoris* com construtos de eliminação *AOX1* Δ 1- Δ 9 em frente do gene GFP-Zeo; EX: comprimento de onda excitação; EM: comprimento de onda de emissão.

30 A figura 5 mostra um diagrama de barras da intensidade de fluorescência de variantes de promotor de *AOX1* selecionados em microescala. Níveis de expressão sob condições de desrepressão, assim como condições

de indução de cepas de cópia única e cepas de multicópias com variantes de tipo selvagem e de promotor de $\Delta 6$ são mostradas. Os dados representam a média $\pm$ SD de 4 medições independentes. WT: cepa GFP-Zeo de cópia única com promotor de *AOX1* de tipo selvagem (GFP-Zeo D2), D6: clone *AOX1* $\Delta 6^*$ de cópia única; WT_E2: clone GFP-Zeo de multicópias com promotor de *AOX1* de tipo selvagem; D6*F10: clone *AOX1* $\Delta 6^*$ de multicópias (X-33 d6F10).

A figura 6 mostra o resultado de um teste de gota de cepas de *P. pastoris* em placas de MD e de MDM, com diferentes concentrações de Zeocin[®]. As células foram cultivadas em meio BMD(1%) até uma OD₅₉₅ de 1,5, diluídas em etapas de 10 até uma taxa de diluição final de 10⁵ e transferidas para as placas de agar usando-se um replicador de 48 pinos. Os números no topo da figura denotam o fator de diluição, que é o mesmo para todas as placas. O meio MD foi preparado conforme descrito acima. Metanol em placas MDM-Zeo foi adicionado até uma concentração final de cerca de 0,5%. Zeocin[®] foi adicionado até uma concentração final de 100, 200 e 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. X-33: *P.pastoris* X-33, A9: *P. pastoris* GFP-Zeo Mut^s A9, D2: *P. pastoris* GFP-Zeo D2, E2: *P. pastoris* GFP-Zeo E2.

A figura 7 mostra o nível de expressão de várias cepas de multicópias em comparação às cepas de referência; a) atividade sob condições de desrepressão; b) atividade depois de indução por metanol.

A figura 8 mostra o nível de expressão de cepas de multicópias de $\Delta 6^*$ sob condições de desrepressão e induzidas comparadas às cepas de referência.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Material e Métodos:

a) Kits de Preparação/Purificação de DNA:

Vários kits de preparação e de purificação de DNA disponíveis comercialmente foram utilizados de acordo os manuais fornecidos (vide a tabela 3).

Tabela 3: kits de Preparação e de Purificação de DNA

Kit	Produtor
Kit Easy-DNA®	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA
Kit QIAprep® Spin Miniprep	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Sistema de Purificação de DNA Wizard® Plus SV Minipreps	Promega GmbH, Mannheim, Germany
Kit Alemanha de Miniprep de Alto Desempenho (HP) GenElute®	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Vienna, Áustria
Kit de Extração de Gel QIAquick®	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Colunas Spin de Extração de Gel de DNA Quantum Prep® Freeze N Squeeze	Bio-Rad Laboratories GmbH, Vienna, Áustria
Kit de Purificação por PCR QIAquick®	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany

b) Clonagem com TOPO®:

- Clonagem com TOPO® foi realizada de acordo com os manuais fornecidos (para clonagem em pCR®4Blunt-TOPO® e para clonagem em pCR®-Blunt II-TOPO®). Foram usados sempre 4 µL de produto de PCR para clonagem. 2 e 4 µL de cada reação de clonagem foram transformados em células TOP10F' de *E. coli* quimicamente competentes de One Shot® (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA) de acordo com os protocolos mencionados acima.

10 c) Transformação de *E. coli*:

Transformação de reações de ligação e plasmídeos em *E. coli* foi realizada de acordo com o Protocolo SEM (método simples e eficiente) [16]. Células TOP10F' de *E. coli* quimicamente competentes foram usadas para transformação.

15 d) Transformação em *Pichia pastoris*:

Preparação de células de *Pichia pastoris* competentes: uma única colônia da cepa de hospedeiro de *Pichia pastoris* desejada foi usada para inocular 50 mL YPD (2% de glicose) em um frasco Erlenmeyer de boca larga constrita de 300 mL. Depois de uma incubação durante uma noite à 30°C,

60% de umidade e 130 rpm (Pilot Shake® RC-2 TE), um certo volume dessa pré-cultura foi usado para inocular 200 mL de YPD (2% de glicose) em um frasco Erlenmeyer de boca larga constrita de 2 L até uma densidade óptica de cerca de 0,1 à 595 nm (OD₅₉₅). A cultura foi cultivada sob as mesmas condições que a pré-cultura até uma densidade óptica de 1,0 a 1,5. As células foram peletizadas à 4°C e 4,000 rpm durante 10 minutos e ressuspensas em 200 mL de água estéril gelada. Esse procedimento foi repetido 3 vezes com ressuspensão das células em 100 mL de água, 10 mL de sorbitol 1 M e 0,5 mL de sorbitol 1 M, respectivamente.

10 10 µg do plasmídeo desejado foram linearizados com *BglII* e *NotI* (cada 50 u) durante uma noite, em um volume final de 300 µL. Depois digestão de restrição de acordo com um protocolo padrão [16]. DNA foi dissolvido dissolvido em 11 µL de ddH₂O estéril e dessalinizado usando um filtro de membrana MF-Millipore® (vide a tabela 12) durante cerca de 1 - 2 h. Se o produto de PCR for usado para transformação, cerca de 4 - 5 µg de DNA foram processados conforme descrito acima, iniciando na precipitação com EtOH.

Para cada transformação, 80 µL das células preparadas foram misturados com 10 µg de DNA, conforme descrito acima, e incubados durante 5 minutos sobre gelo. A mistura foi transferida para cubetas de eletrotransformação (Bio-Rad) resfriadas com gelo e pulsada em 200 Ω, 25 µF e 2,5 KV. 1 mL de sorbitol 1 M resfriado com gelo foi adicionado imediatamente. A suspensão foi transferida para um tubo de PP (Greiner, Frickenhausen, Alemanha, Nº 184261) de 12 mL estéril e incubada durante 2 horas, à 30°C, sem agitação. Depois dessa fase de regeneração, alíquotas foram plaqueadas em placas de seleção. Para seleção de transformantes com expressão elevada sob condição de indução, as células foram plaqueadas em placas MSM-Zeo contendo meios mínimos com sorbitol (ou qualquer outra fonte de carbono não repressora) metanol ou zeocina. Para a seleção de clones exibindo elevada expressão sob condições de desrepressão, as células podem ser plaqueadas em placas de zeo com sorbitol mínimo carecendo de metanol. A inclusão de glicose a placas de seleção contendo metanol permite a

detecção de clones de expressão não reprimidos por glicose e de seus promotores.

e) PCR de Colônia:

Uma única colônia da cepa de *Pichia* desejada foi ressuspensa, em 100 µL de ddH₂O em um microtubo de 100 µL, e aquecida durante 5 a 10 minutos, a 95°C. Depois de centrifugação à 13,200 rpm durante 1 minuto, 10 µL de sobrenadante foram usados como molde para reação de PCR. 5 µL desse primeiro produto de PCR foram usados como molde para um segundo produto. 5 µL do segundo produto de PCR foram usados para um gel de controle. Reações de PCR continham 10 pmols de cada iniciador (A-OX1_col e GF-Prev), 200 µM de cada dNPT e 2,5 unidades de DNA polimerase Hot Star Taq® (QIAGEN) ou Taq DNA polimerase (Promega), sob condições tampão de acordo com os manuais fornecidos, em um volume final de 50 de µL. Para seqüenciamento, o segundo produto de PCR foi purificado usando-se o Kit de Purificação para PCR QIAquick®.

Tabela 4: Programa de temperatura para PCR de colônia

Temperatura	Taq	Hot Star Taq®	Ciclos
95°C	5 minutos	15 minutos	1
95°C	30 segundos	30 segundos	
57°C	30 segundos	30 segundos	
72°C	1 min 30 seg	1 min 30 seg	30
72°C	10 minutos	10 minutos	1

f) Isolamento de DNA genômico de *Pichia pastoris*:

A cepa de *P. pastoris* desejada foi cultivada durante uma noite em 5 mL de YPD, em um tubo de PP de 12 mL estéril em um barril de rotação a 30°C até uma OD₅₉₅ de 5 - 10. 1,5 mL da cultura foram usados para o isolamento de DNA usando-se o Kit Easy-DNA® de acordo com o protocolo fornecido.

g) Ensaio com proteína:

A medição de concentração de proteína em solução tem sido usada há muito tempo em bioquímica. Uma de suas principais aplicações é normalizar uma ampla variedade de métodos bioquímicos, com relação à

quantidade de proteína total, conforme é feita no presente caso, para as taxas de consumo de oxigênio. Os caminhos mais comumente usados, para se determinar as concentrações de proteína, são os métodos Bradford, Lowry e BCA®. Esses métodos têm limitações definidas no que refere-se à sensibilidade, à faixa dinâmica e à compatibilidade a reagentes específicos. Dentre esses 3 ensaios, Bradford e Lowry são mais confiáveis e reproduzíveis do que o BCA®. Por outro lado, Lowry e Bradford possuem severas limitações quando detergentes e/ou agentes redutores estiverem presentes, o que resulta em elevados valores de branco. Portanto, o ensaio de BCA® é o método de escolha, depois da lise química. Concentrações de proteína foram determinadas usando-se o ensaio com BCA®, depois da lise química de células com Y-Per® e BSA como padrão, de acordo com os manuais de instrução (Pierce Biotechnology Inc.), portanto, somente as etapas principais serão descritas brevemente abaixo. 200 µL das culturas foram centrifugados a 4,000 rpm e 4°C, durante 5 minutos. Depois do descarte do sobrenadante, o pélete foi ressuspenso em 100 µL de Y-Per®, pipetando-se para cima e para baixo. A suspensão foi incubada em microtubos de 1,5 mL em um termomisturador, à temperatura ambiente e 600 rpm, durante 20 minutos. Depois que os detritos celulares forem peletizados a 13,200 rpm e à temperatura ambiente, durante 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado a 4°C, para o ensaio de BCA® ou SDS-PAGE. Amostra de 25 µL foi misturada, em um cavidade de microplaca, com reagente de operação de BCA® 200 µL (reagente A: reagente B = 50:1) durante 30 segundos, e recoberta firmemente com seladores de placa (Promega). Depois de incubação durante 30 minutos, a 37°C, e resfriamento para a temperatura ambiente, a absorção foi determinada a 562 nm, usando-se um leitor de placa Spectramax Plus 384. Se necessário, amostras foram diluídas com ddH₂O antes do ensaio com BCA.

h) SDS-PAGE:

Amostras para SDS-PAGE foram preparadas por lise química de células usando-se Y-Per® como reagente, conforme descrito na seção acima. 10 µL de lisado foram misturados com 10 µL 2x SSB (tampão de amos-

tra sigma) e incubados a 95°C durante 5 - 10 minutos, e 15 µL desta mistura foram carregados no gel de proteína. A eletroporese foi realizada com 180 V durante cerca de 1 h e as bandas de proteína foram detectadas usando-se tingimento de azul com Coomassie®.

5 **Tabela 5:** Preparação de gel para SDS-PAGE

	Gel de empilhamento (4%)	Gel de resolução (12%)
ddH ₂ O	3,05 mL	3,35 mL
Acrilamida a 30%/bis	650 µL	4 mL
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 mL	
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8		2,5 mL
SDS a 10% (p/v)	50 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL
APS a 10%	25 µL	50 µL

i) Teste de Glicose:

Concentrações de glicose foram determinadas usando-se o método de Glicose-Hexoquinase UV sem desproteinização (DIPRO med Handels GmbH, Weigelsdorf, Áustria, Nº de produto D590522). 50 µL de culturas de *Pichia* foram transferidos em uma microplaca de PCR e centrifugados a 4,000 rpm, durante 5 minutos. 10 µL de sobrenadante foram adicionados a 190 µL de reagente de hexoquinase em uma microplaca UV-Star e incubados a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Depois da incubação, a absorção a 340 nm foi determinada usando-se uma leitora de placa Spectramax Plus 384.

j) Testes de gotas:

Cepas de *P. pastoris* foram cultivadas em BMD(1%) até uma OD₅₉₅ de 1,5 e diluídas em etapas de 10 até uma taxa de diluição final de 10⁵. A transferência por sobre placas de agar foi feita com um replicador de 48 pinos. As placas foram incubadas a 30°C, até que colônias aparecessem (usualmente, 2 dias em placas de MD).

k) Alinhamentos de seqüências:

Todos os alinhamentos de seqüências foram feitos usando-se

MultiAlin na *homepage* da INRA (Institut National de La Recherche Agronomique, Paris, França) (prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html) [17], ou com ClustalW, e do European Bioinformatics Institute (EBI, www.ebi.ac.uk/clustalw) [18]. Para comparação de seqüências com MultiAlin, sempre a matriz de similaridade de seqüência de DNA foi usada para a comparação.

Genes da via de utilização de metanol e a maioria dos genes peroxissomais são regulados de uma maneira similar, no que refere-se à repressão por glicose, à desrepressão em privação de carbono e à indução por meio de metanol. Uma regulação transcricional similar, com um conjunto definido de fatores de transcrição (repressores, assim como indutores) deve ser responsável por esse padrão de regulação. Sítios de ligação a fator de transcrição, dentro dessas regiões de promotor, devem exibir algumas regiões conservadas. Alinhamento de seqüências múltiplas, entre regiões de promotor de genes co-regulados deve revelar os sítios de ligação conservados dos fatores de transcrição envolvidos na regulação dos genes em acordo. Vários genes das leveduras metilotróficas *P. pastoris*, *H. polymorpha* e *C. boidinii* foram relatados como sendo co-regulados e suas seqüências de promotor foram isoladas (Tabela 6).

Tabela 6: Genes co-regulados da via de utilização de metanol ou genes peroxissomais a partir das leveduras metilotróficas *P. pastoris*, *H. polymorpha* e *C. boidinii*

Levedura	Gene	Enzima	Nº conta Genbank	Literatura
<i>P. pastoris</i>	<i>AOX1</i>	álcool oxidase		www.invitrogem.com
	<i>AOX2</i>	álcool oxidase	X79871	
	<i>ZZA1</i>	álcool oxidase	S62281	
	<i>FLD1</i>	formaldeído desidrogenase	AF066054	
<i>H. polymorpha</i>	<i>MOX</i>	metanol oxidase	A11156	
	<i>DAS</i>	dihidroxiacetona sintase	A11168	

Levedura	Gene	Enzima	Nº conta Genbank	Literatura
	<i>CAT</i>	catalase	X56501	
<i>C. boidinii</i>	<i>AOD1</i>	álcool oxidase	M81702	
	<i>FLD1</i>	formaldeído desidrogenase	AB085186	
	<i>FDH1</i>	formato desidrogenase	AB035095	
	<i>DAS1</i>	dihidroxiacetona sintase	AB035094	
	<i>PMP20</i>	proteína de membrana peroxissomal	AB035096	
	<i>PMP47</i>	proteína de membrana peroxissomal	AB035097	
	<i>CTA1</i>	catalase	AB064338	

l) Análise de fator de transcrição:

A análise de fator de transcrição foi feita com MatInspector Release profissional 6.1, janeiro de 2003, dentro do GenomatixSuite 1.6.1 em Genomatix Software GmbH Servers [15]. A sequência de PAOX1 a partir de pPICZ B foi usada para se pesquisar em relação aos sítios de ligação a fator de transcrição usando-se o Matrix Family Library Version 3.1.1, abril de 2003 grupo ALL fungi.lib (www.genomatix.de).

m) Iniciadores:

Tabela 7: Lista de iniciadores usada para os exemplos descritos (sintetizados por MWG Biotech AG, Ebersberg, Alemanha)

SEQ ID Nº	Nome	Seqüência	T _m [°C]
2	P(AOX 1)forw	AAGGTACCAGATCTAACATCCAAAGACGAAAG	70
3	P(AOX 1)rev	CTAGCCATGGTTGAATTCTTTCGAATAATTAGT-TGTTTTTTG	
4	GFP-Zeo rev	GAAAGAATTCAACCATGGCTAGCAAAGGAG	70

SEQ ID Nº	Nome	Seqüência	T _m [°C]
5	GFP- Zeo rev	GATGATGGTCTAGAACGTGTCAGTCCTGCTCCTC	70
6	A- OX1TT forw	GACACGTTCTAGACCATCATCATCATCATTTG	67
7	A- OX1TT rev	ATAGCGGCCGCACAAACGAAGGTCTC	72
8	A- OX1Δ1f orw	CAACACCCACTTTAGGCTACTAACACCAT- GACTTTATTAG	71
9	A- OX1Δ1r ev	GTTAGTAGCCTAAAGTGGGTGTTGAGGAGAAGAG	70
10	A- OX1Δ2f orw	GTTTCATGTTTGTAGATGAGGGCTTTCTGAGTG	67
11	A- OX1Δ2r ev	GCCCTCATCTACAAACATGAACCTCGCCAG	71
12	A- OX1Δ3f orw	GAGGGCTTCCCAAATGGCCCAAACTG	70
13	A- OX1Δ3r ev	CCATTTGGGAAAGCCCTCATCTGGAGTG	70
14	A- OX1Δ4f orw	CGGCCAGTTGTTGGTATTGATTGACGAATGC	69
15	A- OX1Δ5r ev	CAATACCAACAACCTGGCCGTTAGCATTTTC	71
16	A- OX1Δ5f orw	GCTTCTGAACCTTGTCTCCACATTGTATGCTTC	68
17	A- OX1Δ5r ev	GTGGAGACAAGGTTTCAGAAGCGATAGAGAGAC	68
18	A- OX1Δ6f orw	GTCTCCCACTGCTGATAGCCTAACGTTC	66

SEQ ID Nº	Nome	Seqüência	T _m [°C]
19	A- OX1Δ6r ev	GGCTATCAGCAGTGTGGAGACAATGCATAATCATC	71
20	A- OX1Δ7f orw	GGAATACTGCTCTAACCCCTACTTGACAGC	65
21	A- OX1Δ7r ev	GTAGGGGTTAGAGCAGTATTCCCACCAGAATC	67
22	A- OX1Δ8f orw	CTTGACAGCAAGCTGCCCTGTCTTAAACC	66
23	A- OX1Δ8r ev	GGGCAGCTTGCTGTCAAGTAGGGGTTAG	68
24	A- OX1Δ9f orw	CTGTCTTAAACCTTACTGGTTCCAATTGACAAGC	68
25	A- OX1Δ9r ev	GGAACCAGTAAGGTTTAAGACAGGGCAGC	69
26	423forw	GATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAG- GACCTCCACTCC	87*
27	1372for w	GTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCT- TAAATTTATTTGC	81*
28	2325for w	CGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTTCTAGACCAT- CATC	86*
29	A- OX1_c ol	TCCAAAGACGAAAGGTTGAATG	72
30	GFPprev	CCGTATGTAGCATCACCTTCACC	74

*T_m calculada usando-se a Equação 2 (kit de mutagênese multi-sítio dirigida QuickChange®)

Exemplo 1.1: Clonagem do construto repórter

- GFP-Zeo foi usado como um repórter para expressão de gene
- 5 impelida por variantes de promotor de AOX1. Seqüências circundando o códon de iniciação de ATG foram construídas para atenderem às exigências

mínimas de seqüências de consenso de Kozac para genes altamente expressos em levedura. Para modificar as regiões de promotor em frente ao gene GFP-Zeo, foi inserido um sítio de restrição de *EcoRI* (Tabela 8) por PCR com extensão de superposição.

- 5 Tabela 8: Comparação de sítio de iniciação de tradução e seqüências circundantes entre a seqüência de *AOX1* usada nesse exemplo (derivada de pPICZ) e a seqüência de *AOX1* de *P. pastoris* de NRRL Y-11430 (Genbank AN: U96967, [2]). Sítio de restrição de *EcoRI* está sublinhado e exigências de Kozac mínimas em posições -3 e +4 estão marcados com letras em negrito.

				-3		+1		+4	
P(AOX1)-GFP	AAAACA	ACTA	ATTATT	gaAa	<u>gaattc</u>	AACc	ATGGCT	AgCa	
AOX1 (U96967)	AAAACA	ACTA	ATTATT	cga-	-----	AACg	ATGGCT	AtCc	

- 10 A produção com base em PCR de componentes de sistema de repórter P(AOX1) foi amplificada usando-se 10 ng do vetor pPICZ-B ARS1 como molde. A reação também continha 10 pmols de cada iniciador (P(AOX1)forw e P(AOX1)rev, respectivamente), 200 µM de cada dNTP e 2,5 U de polimerase Synergy® em condições tampão apropriadas, em um volume final de 50 µL.

- 15 AOX1 TT foi amplificado de maneira semelhante ao promotor de AOX1. AOX1TTforw e AOX1TTrev foram usados como iniciadores nessa reação. Ambas as reações foram realizadas em um termociclizador durante 30 ciclos (95°C, 1 min; 55°C, 30 s; 68°C, 2 min 30 s) com uma etapa de desnaturalização inicial de 5 min a 95°C, e uma etapa de extensão final de 10 min a 68°C. 2 µL de primeira corrida de PCR foram usados para amplificação em uma segunda corrida sob as mesmas condições acima. A única diferença foi um aumento de temperatura de extensão para 72°C.

- 25 GFP-Zeo [19] foi amplificado usando-se 25 ng do vetor pTracer®-CMV2 como molde. A reação também continha 10 pmols de cada iniciador (GFP-Zeo forw e GFP-Zeo rev, respectivamente), 200 µM de cada dNTP e 2,5 U de polimerase Synergy® em condições tampão apropriadas, em um volume final de 50 µL. PCR foi realizada em um termociclizador (vide Tabela

8) durante 30 ciclos (95°C, 1 min; 55°C, 30 s; 72°C, 2 min 30 s) com uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 95°C, e uma etapa de extensão final de 10 min a 72°C.

Todos os produtos de PCR foram purificados por eletroforese em gel de agarose antes de PCR com extensão de superposição. A reação continha 10 ng de P(AOX1), 5 ng de AOX1 TT e 50 ng de GFP-Zeo preparados conforme descrito acima como moldes, 200 µM de cada dNTP e 2,5 U de polimerase Synergy® em condições tampão apropriadas, em um volume final de 50 µL. PCR foi realizada em um termociclizador (vide tabela 8) durante 30 ciclos (95°C, 1 min; 53°C, 50 s; 68°C, 3 min 30 s) com uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 95°C, e uma etapa de extensão final de 10 min a 68°C. Depois de 10 ciclos, 10 µL de uma mistura contendo 10 pmols dos iniciadores exteriores P(AOX1)forw e AOX1TTrev, novamente 200 µM de cada dNTP e 2,5 U de polimerase Synergy® em condições tampão apropriadas, foram adicionados. A PCR foi continuada conforme programado depois dessa adição. O produto de PCR obtido, com o tamanho desejado de cerca de 2,4 Kb, foi purificado sobre um gel de agarose. O produto purificado foi clonado no vetor pCR®4Blunt-TOPO® e foi seqüenciado. O seqüenciamento revelou 4 mutações e uma eliminação dentro do construto de repórter.

O sítio de eliminação de par de bases foi encontrado na posição -15 da seqüência de promotor original. Uma vez que essa posição estava dentro do sítio de clonagem múltiplo de todos os vetores pPICZ (A, B e C; do lado de dentro do sítio de restrição de *SfuI*), a eliminação não deve influenciar a atividade de promotor e, portanto, não foi corrigida. A primeira mutação (T → C) foi encontrada na região de promotor, na posição -828. As outras 3 mutações foram encontradas dentro da seqüência de codificação de GFP-Zeo, nas posições +122, +507 e +1075, respectivamente.

A conversão de G → A, na posição + 122, muda o códon de GGA de Gly para um códon de GAA, que resulta em uma mudança de aminoácido G41A. A conversão de T → C, na posição +507, é uma mutação silenciosa, mudando somente um códon de R169. A última mutação (T →

C), na posição +1.075, muda o códon de parada de TGA para a CGA de códon de arginina. As mutações -828, +122 e +1.075 foram reparadas com o kit de mutagênese multi-sítio-dirigida QuikChange®, depois de construção do vetor pAOX. A mutação silenciosa, na posição +507, e a mutação no poli-
5 ligador não foram modificadas, uma vez que não se introduziu um códon raro.

pAOX foi construído por excisão do fragmento de P_{AOX1}-GFP-Zeo-AOXITT a partir de vetor pCR®4Blunt-TOPO® com *KpnI* e *NotI*, e inserindo-o no vetor pBlueScript® SK, entre os sítios de *KpnI* e de *NotI*.

10 As mutações encontradas no promotor de *AOX1* e na sequência de GFP-Zeo foram corrigidas usando-se o kit de mutagênese multi-sítio-dirigida QuikChange® (Stratagene, Amsterdã, Holanda). A reação de PCR foi realizada de acordo com o manual fornecido contendo 100 ng de pAOX, 100 ng de iniciadores mutagênicos (423forw, 1372forw e 2325forw, respectiva-
15 mente) e 1 µL de mistura de multienzimas QuikChange® em condições tampão apropriadas, em um volume final de 25 µL, em um termociclizador, durante 30 ciclos (95°C, 1 min; 55°C, 1 minuto; 65°C, 10 min 30 s) com uma etapa de desnaturação inicial de 1 min a 95°C. Digestão com *DpnI* e transformação química em células de *E. coli* XL10-GOLD® (Invitrogen Corp.) foi
20 feita de acordo com o manual fornecido. A correção de 3 mutações foi verificada por seqüenciamento.

Exemplo 1.2: Construção de eliminações de promotor de *AOX1*

Os braços esquerdos do promotor de *AOX1* foram sintetizados usando-se P(AOX1)forw como iniciador para frente e AOX n rev (n = 1 ... 9)
25 como iniciadores reversos. Os braços direitos foram sintetizados com 10 pmols de AOX n forw (n = 1 ... 9) como iniciadores para frente e P(AOX1)rev como iniciador reverso. Todos os braços foram sintetizados usando-se 12 ng do vetor pAOX como molde e 10 pg de cada iniciador. A reação também continha 10 pmols de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP e 0,6 U de polimerase de DNA *Pwo*, em condições tampão apropriadas, em um volume
30 final de 50 µL. PCR foi realizada em um termociclizador, durante 30 ciclos (95°C, 1 min; 55°C, 1 min; 68°C, 1 min 30 s) com uma etapa de desnatura-

ção inicial de 5 min a 95°C, e uma etapa de extensão final de 10 min a 68°C. Todos os braços foram purificados sobre gel de agarose, antes do uso como molde para PCR com extensão de superposição.

Tabela 9: Pares de iniciadores de superposição e comprimento de braço para eliminações de promotor

Construto	Braço Esquerdo		Braço Direito	
	Iniciador Interno	Comprimento de Braço [pb]	Iniciador Interno	Comprimento de Braço [pb]
PA-OX1Δ1	AOXΔ1 rev	184	AOXΔ1 forw	738
PA-OX1Δ2	AOXΔ2 rev	315	AOXΔ2 forw	624
PA-OX1Δ3	AOXΔ3 rev	374	AOXΔ3 forw	578
PA-OX1Δ4	AOXΔ4 rev	519	AOXΔ4 forw	421
PA-OX1Δ5	AOXΔ5 rev	636	AOXΔ5 forw	290
PA-OX1Δ6	AOXΔ6 rev	708	AOXΔ6 forw	247
PA-OX1Δ7	AOXΔ7 rev	742	AOXΔ7 forw	209
PA-OX1Δ8	AOXΔ8 rev	794	AOXΔ8 forw	171
PA-OX1Δ9	AOXΔ9 rev	833	AOXΔ9 forw	115

A reação continha 10 ng de cada braço, preparado conforme descrito acima, como moldes, 200 μM de cada dNTP e 0,6 U de polimerase de DNA *Pwo*, em condições tampão apropriadas, em um volume final de 50 μL. PCR foi realizada em um termociclizador, durante 30 ciclos (95°C, 45 min; 60°C, 45 s; 68°C, 2 min) com uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 95°C, e uma etapa de extensão final de 10 min a 68°C. Depois de 10 ciclos, 20 μL de uma mistura contendo 10 pmols dos iniciadores externos P(AOX1)forw e P(AOX1)rev, novamente 200 μM de cada dNTP e 0,6 U de

polimerase de DNA *Pwo*, em condições tampão apropriadas, foram adicionados. A PCR foi continuada, conforme depois de adição da mistura.

Os produtos de PCR obtidos, com o tamanho desejado de cerca de 898 - 947 pb, foram purificados em um gel de agarose e clonados em
5 vetor pCR®4Blunt-TOPO® ($\Delta 2$, $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 7$ e $\Delta 8$) ou em vetor pCR®-Blunt II-TOPO® ($\Delta 1$, $\Delta 3$, $\Delta 6$ e $\Delta 9$) e seqüenciados.

Vetores pAOX Δ foram construídos por excisão dos fragmentos P_{AOX1} Δ a partir de vetores TOPO® com *Bgl*III e *Eco*RI, e inserindo-os no vetor pAOX entre os sítios de *Bgl*III e de *Eco*RI, ao invés do promotor de AOX1 de
10 tipo selvagem. Os vetores resultantes foram verificados por seqüenciamento. Exemplo 1.3: Transformação em *Pichia pastoris* e análise de transformantes

A transformação em *Pichia pastoris* foi feita como descrita anteriormente. A seleção, para a integração de P_{AOX1} (ou P_{AOX1} Δ)-GFP-Zeo-AOX1 TT, foi feita espalhando-se as células de *Pichia* transformadas e rege-
15 neradas, em alíquotas, sobre placas de agar com MSM-Zeo.

Cepas de *Pichia pastoris* foram cultivadas em placas de cavidades profundos contendo 300 μ L de BMD (1%) por cavidade, a 28°C, 320 rpm e 80% de umidade, durante 60 horas, à temperatura ambiente. Depois desse tempo, 50 μ L foram tomados para determinação da fluorescência de GFP. A
20 indução foi realizada por adição de 250 μ L de BMM2/cavidade, por uma incubação adicional de 72 h. O metanol foi repostado por adição de 50 μ L de BMM10, depois de 10, 24 e 48 horas. Uma vez mais, foi medida a fluorescência de GFP, depois de 72 h de indução por metanol.

A análise de expressão de enzima de repórter Expressão de
25 GFP-Zeo em *Pichia pastoris* foi analisada por detecção de fluorescência de GFP na leitora de placas Spectramax Gemini XS, com excitação à 395 nm e emissão à 507 nm. 50 μ L de culturas de *Pichia pastoris*, cultivadas em placas de cavidades profundos, conforme descrito acima, foram diluídos 1 + 3 com ddH₂O, em placas de microtitulação FIA. Devido à limitada quantidade
30 de amostra, somente foram realizadas medições únicas. Todas as médias $\pm$ desvios padrão dados são calculados a partir de pelo menos 3 culturas diferentes (cavidades).

Se o cassete de integração for integrado no locus de *AOX1* sem substituição do gene de *AOX1*, a cepa de *Pichia* recombinante é capaz de crescer em metanol com uma taxa de tipo selvagem, enquanto que a substituição do gene de *AOX1*, por permuta dupla, resulte em uma taxa de crescimento muito mais lenta em metanol. Esses dois fenótipos de crescimento são denominados utilização de metanol mais (Mut^+) e utilização de metanol lento (Mut^s), respectivamente. Para análise do fenótipo de utilização de metanol, culturas em microescala de *Pichia pastoris* foram transferidas por sobre placas de agar com MM e MD, usando-se um replicador de 96 pinos, e incubadas a 30°C, durante 2 dias. Depois de 2 dias, colônias aparecem sobre ambas as placas, se a cepa de *Pichia* possui fenótipo Mut^+ , enquanto que, com cepa fenotípicas Mut^s , somente surgem colônias em placas com MD.

Todas as cepas de *Pichia*, que são derivadas a partir de transformações de pAOX ou de um dos plasmídeos de pAOX Δ , foram analisadas por PCR de colônia, e construtos de eliminação também por seqüenciamento, para se assegurar a seqüência de promotor em frente do gene de repórter (GFP-Zeo).

Exemplo 1.4: Evolução dirigida do promotor de *AOX1*

Embora a mutagênese com PCR, em regiões codificantes de genes, esteja bem desenvolvida e estabelecida, nada se sabe sobre a mutagênese em regiões de promotor. Devido à carência de conhecimento, várias condições de mutagênese foram realizadas: Para se minimizar tendenciosidade no espectro mutacional, foram usadas duas polimerases diferentes, uma polimerase de DNA Taq e a polimerase de DNA Mutazyme[®] (Stratagene Inc.). Devido ao fato de que o conhecimento sobre freqüência de evolução para evolução de seqüências de promotor é completamente deficiente, várias freqüências de mutações (teoricamente 1 a ~ 14/Kb) foram testadas.

Mutagênese usando-se polimerase de DNA Hot Star Taq[®]: Foi realizada PCR mutagênica sobre a seqüência de promotor, em um volume de reação de 100 μ L, de acordo com [20]. A reação continha 12 ng de pAOX, 40 pmols de cada iniciador, (P(AOX1)forw e P(AOX1)rev), dNTPs

(dGTP 200 μ M, aATP 200 μ M, dTTP 1 mM, dCTP 1 mM) e 5 U de polimerase de DNA Hot Star Taq[®], em condições tampão apropriadas. A concentração de MgCl₂ foi aumentada para 7 mM (usualmente, 3 mM) para alterar a taxa de erro da polimerase. A PCR foi realizada em um termociclizador durante 30 ciclos (95°C, 45 s; 55°C, 45 s; 72°C, 1 min 30 s), com uma etapa de desnaturação inicial de 15 min a 95°C, e uma etapa de extensão final de 10 min a 72°C.

O kit de mutagênese aleatória GeneMorph[®] foi implementado sobre a seqüência de promotor, em um volume final de 50 μ L, de acordo com o manual fornecido. Diferentes quantidades do vetor pAOX, como molde, foram usadas (vide Tabela 10). 12,5 pmols de cada iniciador, P(AOX1)forw e P(AOX1)rev, foram usados. A reação de PCR foi realizada em um termociclizador durante 30 ciclos (95°C, 30 s; 55°C, 30 s; 68°C, 1 min 30 s), com uma etapa de desnaturação inicial de 1 min a 95°C, e uma etapa de extensão final de 10 min a 68°C.

Tabela 10: Quantidade de molde usada na reação de PCR com GeneMorph[®]

Nº	freqüência de mutações	quantidade pAOX	mutações esperadas/Kb
1	baixa - média	12 ng	~ 3 ou menos
2	média	1,2 ng	3 - 7
3	média - elevada	120 pg	~ 7 ou mais

Foi realizada uma primeira corrida de mutagênese, com condições descritas acima (Taq, 3 x GeneMorph[®]). Para se conseguir freqüência de mutações mais elevada, a reação de número 3 foi usada como molde para uma segunda corrida de PCR. Foram usadas condições de números 2 e 3 para Taq e GeneMorph[®].

Antes da transformação em células X-33 GFP-Zeo Mut^s A9 de *Pichia pastoris*, todas as reações de PCR foram precipitadas e dessalinizadas, conforme descrito anteriormente. O procedimento padrão de transformação e regeneração foi usado. A seleção em relação a promotores induzidos em meio com glicose foi feita espalhando-se alíquotas de 150 μ L de suspensão de células transformadas sobre placas de agar com MD conten-

do 100 - 500 µg/mL de Zeocin® e por incubação à 30°C, durante 2 dias.

Exemplo 1.5: Resultados e discussão

1) Caracterização do sistema repórter

Até hoje, uma grande variedade de variantes de GFP estão em uso na biologia molecular. Embora diferindo somente em umas poucas mutações pontuais, as suas características diferem enormemente. Além de propriedades de dobramento aperfeiçoadas, seus espectros de fluorescência, assim como seus rendimentos em quantidade e, portanto, suas intensidades diferem bastante. Proteínas fluorescentes verdes podem ser divididas em dois grupos principais, dependendo de seus máximos de excitação: variantes de GFP de tipo selvagem, com um máximo de excitação em 395 nm e um máximo secundário em 470 nm, e variantes de GFP deslocadas para o vermelho, com um máximo de excitação em 480 - 490 nm. De acordo com sua seqüência de aminoácidos, ciclo-3-GFP pertence ao grupo de variante de GFP de tipo selvagem, com um máximo de excitação em 395 nm.

Para controlar as propriedades espectrais, quando expressas em *Pichia pastoris*, foram determinados espectros de fluorescência. O máximo de excitação global da ciclo-3-GFP, em GFP-Zeo, é de 395 nm, embora um segundo máximo em 478 nm seja evanescente. O espectro de emissão revela um máximo de emissão de 510 nm. Dos dois comprimentos de onda sugeridos pelo manual, 395 nm é preferido e foi usado para todas as medições ulteriores.

A auto-absorção é um fenômeno muito freqüente em espectroscopia de fluorescência. Em elevadas concentrações de fluoróforo, fótons emitidos em uma região que se superpõe ao espectro de absorção (excitação) podem ser absorvidos (transferência de energia radioativa). Intensidade de fluorescência mais baixa será observada se correr a auto-absorção (efeito de filtro interno de emissão). Isso conduz a uma subestimação de atividades de promotor. Com nenhum efeito de filtro interno, a intensidade de fluorescência aumenta de uma maneira linear conforme o fluoróforo aumente. Portanto, volumes crescentes de células de *Pichia pastoris* expressantes de GFP-Zeo foram testados com relação a sua intensidade de fluorescência.

Até 3.000 RFU, não foi detectado qualquer efeito de filtro interno de emissão no nível celular. A auto-absorção dentro das células, causada pelo acúmulo de GFP, não pôde ser avaliado. Foi detectado um aumento linear de fluorescência durante todas as 72 horas de fase de indução. Por aquela razão, um efeito de filtro interno dentro das células não parece ser provável. Portanto, o acúmulo de GFP-Zeo dentro do núcleo não é problema para sua quantificação. Nenhum efeito de filtro interno ocorre dentro da faixa de atividades de promotor de cópia única determinada nesse estudo. Devido à carência de auto-absorção, subestimação de atividades de promotor não é provável de ocorrer. O efeito de filtro interno observado por outros é muitíssimo provavelmente causado pelo uso de uma variante de GFP diferente, com um deslocamento de Stokes muito menor e, portanto, excitação de superposição e espectros de emissão. Há que se ter cuidado ao se comparar resultados de experimentos de expressão de GFP. O uso de várias variantes de GFP, com propriedades espectrais distintas, mas, também, com usos de códon otimizados e, portanto, níveis de expressão bem diferentes, em hospedeiros de expressão diferentes, complica a comparabilidade de resultados de laboratórios diferentes.

II) Atividade de promotor de *AOX1* em microescala

O cultivo em pequena escala de células microbianas (por exemplo, leveduras, bactérias) é usualmente feito em culturas em frascos com agitação. A inoculação e o cultivo de grandes bibliotecas microbianas em frasco com agitação são intensivos em mão-de-obra e em tempo, resultando em custos elevados. Em anos recentes, sistemas de cultivo em microescala, usando placas de microtitulação de cavidades fundas, foram desenvolvidos como uma alternativa. Devido ao manejo em paralelo de, por exemplo, 96 ou 384 cepas/culturas e a menos material necessário, sistemas de microtitulação são superiores aos frascos com agitação, em termos de intensidade de mão-de-obra, de tempo, e, portanto, de custos. Devido a várias razões, as principais desvantagens de sistemas de microtitulação, pequeno volume de amostra e baixa eficiência de aeração, são menos relevantes: (1) avanços técnicos em sistemas analíticos conduziram a limites de detecção mais bai-

xos de um grande número de compostos, resultando em volumes de amostras muito baixos necessários; (2) métodos e dispositivos para crescimento em placas de microtitulação de cavidades fundas também foram aperfeiçoados. Mostrou-se, em uns poucos estudos, que as taxas de aeração e, portanto, as condições de crescimento, em placas de microtitulação são similares às daquelas de frascos com agitação. Também foi demonstrado que estudos em tempo real sobre o promotor de *GAL1* em *S. cerevisiae*, usando ciclo-3-GFP, como proteína de repórter, são consistentes com estudos em frascos com agitação.

Expressão de GFP-Zeo impelida por promotor de *AOX1* foi estudada em placas de microtitulação de cavidades fundas, conforme descrito acima. Depois de crescimento celular em glicose, segue-se uma fase de indução com metanol, como fonte de carbono e de energia. A indução do promotor de *AOX1* com metanol em células de *Pichia pastoris* possuindo o cassete de expressão PAOX1-GFP-Zeo-AOX1 TT conduziu a um rápido aumento de fluorescência de GFP. Até 72 horas, a fluorescência de GFP aumentou de uma maneira linear. A expressão de GFP-Zeo continuaria, se metanol fosse adicionado. Se não, o metanol diminui através de evaporação e o consumo dentro de 24 horas e a expressão de GFP-Zeo diminui até um nível desreprimido.

O aumento de fluorescência de GFP-Zeo também estava de acordo com proteína de GFP-Zeo, conforme foi mostrado por SDS-PAGE. Quando da indução por metanol, apareceu uma banda de proteína de cerca de 42 KDa, a qual se tornou mais intensa conforme a fluorescência aumentou. A forte banda em 42 KDa foi constatada em todos os clones de GFP-Zeo, enquanto que, no controle negativo (X-33 de tipo selvagem) nenhuma banda apareceu. Também na amostra de d6*F10 de X-33, depois de 72 horas de indução por metanol, foi constatada uma forte banda (figura 1C, Pista 5). Embora não normalizada, uma clara correlação entre as intensidades das bandas de 42 KDa e os níveis de fluorescência apropriados está acessível.

III) Sítios de ligação a fator de transcrição

Conforme descrito anteriormente, são conhecidas seqüências de

- consenso para sítios de ligação de vários fatores de transcrição. A análise de sequência de promotor de *AOX1* revelou vários sítios de ligação a fator de transcrição putativos, com uns poucos itens de especial interesse. Entre
- 5 de ligação de uns poucos fatores de transcrição, geralmente conhecidos como estando envolvidos na regulação de glicose, foram encontrados. Os sítios de ligação mais interessantes estão resumidos na Tabela 11 e na figura 2.

- Tabela 11: Sítio de ligação a fator de transcrição (TF) encontrados dentro da
- 10 sequência de promotor de *AOX1*. Pares de bases em letras maiúsculas denotam seqüências de núcleo (os 4 mais altamente conservados, resíduos consecutivos da matriz), pares de bases sublinhados mostram um elevado teor em informação ($C_i > 60$ de um máximo de 100).

Matriz TF	Posição (5)*	Variante eliminação	Similaridade de núcleo	Similaridade de matrix	Sequência	SEQ ID Nº
HAP1.01	52-66 (-902 a -888)		1.000	0,802	ctgtg- gat gtCGGat	31
HSF.01	135 a 155 (-819 a -799)		1.000	0,784	AGAAgag- gagtg- gag- gtcctg	32
HAP234.01	193 a 205 (-761 a -749)	Δ1	1.000	0,895	caagc- CCAAtaac	33
HAP234.01	203 a 215 (-751 a -739)	Δ1	1.000	0,923	gagctCCA Atcaa	34
ABAA.01	213 a 227 (-741 a -727)	Δ1	1.000	0,949	ctcgct- CATTCcaa t	35
STRE.01	279 A 287 (-675 a -667)		1.000	1.000	ccAGGGgg g	36
RAP1.01	332 a 346 (-622 a -608)	Δ2	1.000	0,845	tacAC- CCgaa- catca	37
ADR1.01	371 a 377 (-583 a -577)	Δ3	1.000	1.000	tGGGGtc	38
HSF.03	516 a 536 (-438 a -418)	Δ4	1.000	0,862	AGAAactt ccaaaagt cggc	39
HAP234.01	665 a 677 (-289 a -277)	Δ5	1.000	0,883	at- catCCAAa aag	40
MAT1MC.01	680 a 690 (-274 a -264)		1.000	0,901	tgcAT- TGcttc	41
GCR1.02	699 a 713 (-255 a -241)	Δ6	1.000	0,872	at- gCTTCcaa gattc	42
QA-1F.01	743 a 763 (-211 a -191)	Δ7	0,785	0,775	acagt- taaatttt GATcatga	43

* A posição dada está marcada no que refere-se ao ponto de iniciação de tradução (ATG) do gene GFP-Zeo; seqüências de núcleo de sítios de ligação de fator de transcrição putativos são mostrados em letras maiúsculas e denota homologia com relação à fita complementar.

5 IV) Seqüências reguladoras em genes regulados por metanol

Várias seqüências são descritas na literatura como estando envolvidas na regulação de genes indutíveis por metanol. Com base na análise de eliminação do promotor de *AOX2* de *P. pastoris* três regiões reguladoras foram descritas, duas regiões de atuação negativa (URS1 e URS2, seqüências de repressão a montante) e um domínio de atuação positiva (UAS, seqüência de ativação a montante) [3]. Para o promotor *MOX*, de *H. polymorpha*, duas seqüências de ativação a montante (UAS1 e UAS2) e um sítio de ligação a repressor (URS1) também foram descritos [8].

V) Construtos de eliminação de promotor de *AOX1*

Com base na análise de fator de transcrição e no alinhamento de seqüências múltiplas, 9 regiões de promotor foram escolhidas para eliminação por PCR com extensão de superposição, conforme descrito anteriormente. Os construtos de eliminação de promotor de *AOX1* foram clonados no vetor pAOX, para substituir o promotor de "AOX1 de tipo selvagem", 5 em relação ao gene de repórter de GFP-Zeo. Os plasmídeos foram linearizados e integrados ao genoma de *Pichia pastoris*.

Tabela 12: Seqüências eliminadas nos construtos de promotor de *AOX1*

Construto	Posição*		Seqüência	SEQ ID Nº
	ext.5'	ext.3'		
PA-OX1Δ1	170-784	235-719	tttgccatcgaaaaaccagcccagttattgggcttgattggagctcgctcattccaattccttcta	44
PA-OX1Δ2	304(-650)	350 (-604)	ttatttccgaatgcaacaagctccgattacacccgaacatcactcc	45
PA-OX1Δ3	364(-590)	393 (-561)	ctgagtgtggggtcaaatagtttcagtgttc	46

Constru- to	Posição*		Seqüência	SEQ ID Nº
	ext.5'	ext.3'		
PA- OX1Δ4	509 (- 445)	551 (- 403)	gtcaaaaagaaacttccaaaagtgcg gcataccggtttgtcttgt	47
PA- OX1Δ5	625 (- 329)	683 (- 271)	ccggtgcacctgtgc- cgaaacgcaaatggggaaacac- ccgctttttggatgattatgca	48
PA- OX1Δ6	694 (- 260)	723 (- 231)	attgtatgcttccaagattctggtg gaat	49
PA- OX1Δ7	729 (- 225)	763 (- 191)	tgatagcctaacgttcatgat- caaaatttaactgt	50
PA- OX1Δ8	784 (- 170)	800 (- 154)	aatatataaacagaagg	51
PA- OX1Δ9	823 (- 131)	861 (-93)	tttttttatcatcattattagct- tactttcataattgcg	52

*As posições dadas estão marcadas no que refere-se a SEQ ID Nº 1.

Os integrantes são analisados com relação à expressão de GFP-Zeo e com relação à integração da seqüência de promotor correta em frente do gene de Zeo-GFP, conforme descrito acima. Integrantes de cópia simples foram analisados em detalhes adicionais, com relação a seus níveis de expressão de GFP-Zeo em diferentes fontes de carbono em microescala. Em todos os construtos (eliminação e tipo selvagem), nenhuma fluorescência pôde ser detectada, tanto quanto glicose ou glicérol estivesse presente no meio de cultura (com e sem metanol). Quando da privação de carbono, representando condições de desrepressão, um leve aumento de fluorescência de GFP foi detectada. Comparados ao tipo selvagem, algumas variantes de promotor exibiram diferenças notáveis (figura 3). Uma atividade de promotor significativamente mais baixa foi encontrada em 6 construtos (Δ3, Δ4, Δ5, Δ7, Δ8 e Δ9, vide a figura 3) sob condições de desrepressão. Δ1 possuía atividade de tipo selvagem, enquanto que os construtos Δ2 e Δ6* resultaram em expressão de GFP-Zeo significativamente mais elevada. O nível de expressão desses últimos foi notavelmente mais elevado do que o nível do tipo selvagem.

Quando da indução por metanol, todas as variantes mostraram significativa atividade de promotor diminuída, com somente uma expressão:

$\Delta 1$, o que resultou em atividade cerca de 20% mais elevada, comparada a do tipo selvagem. A diminuição de atividade de todas as outras variantes é muito significativa, conforme pode ser visto na figura 4.

A atividade de promotor de todas as variantes e construtos de tipo selvagem, normalizada em atividade de tipo selvagem induzida por metanol, está resumida na Tabela 13.

Tabela 13: Intensidade de fluorescência de variantes de promotor de AOX1 em microescala. Os dados representam a média $\pm$ SD de 4 medições independentes. A intensidade de fluorescência, depois de 72 horas de indução por metanol de promotor de WT (100%) é de 987 ± 81 . Nenhuma fluorescência foi detectável, tanto quanto glicose estivesse presente no meio.

Construto	intensidade de fluorescência relativa (%)	
	Desrepressão	Metanol
PAOX1	$2,8 \pm 0,1$	100
PAOX1 $\Delta 1$	$3,0 \pm 0,5$	120 ± 12
PAOX1 $\Delta 2$	$4,4 \pm 0,8$	40 ± 3
PAOX1 $\Delta 3$	$0,7 \pm 0,2$	68 ± 8
PAOX1 $\Delta 4$	$1,9 \pm 0,1$	72 ± 4
PAOX1 $\Delta 5$	$0,23 \pm 0,04$	30 ± 4
PAOX1 $\Delta 6^*$	$9,1 \pm 0,6$	42 ± 2
PAOX1 $\Delta 7$	$2,2 \pm 0,4$	$31,3 \pm 0,5$
PAOX1 $\Delta 8$	$0,3 \pm 0,2$	$17,1 \pm 0,7$
PAOX1 $\Delta 9$	$1,3 \pm 0,1$	61 ± 3

A eliminação da caixa TATA no construto $\Delta 8$ resultou em uma destruição em massa do promotor, com uma severa diminuição de atividade, em condições de desrepressão e de indução de cerca de 90% e 80%, respectivamente. Por eliminação, o começo da iniciação de transcrição ($\Delta 9$), determinado experimentalmente (Ellis, S. B., et al., Mol. Cell. Biol. (1985) 5:1111-1121), não foi observado qualquer forte efeito sobre o nível de expressão. Ele é um dos melhores construtos de eliminação depois de indução por metanol. Conforme esperado, a caixa TATA tem um severo impacto sobre o nível de transcrição. Ao contrário, o começo de iniciação de transcrição

parece não ser tão importante quanto a caixa TATA. Outra região na distância definida com relação à caixa TATA pode atuar como um início de transcrição, depois de eliminação do início original. Pode-se especular sobre o efeito dessa eliminação em vários estágios do processo de expressão (por exemplo, iniciação de transcrição, estabilidade de mRNA, iniciação de tradução), uma vez que a extremidade 5' do mRNA foi modificada pela eliminação.

Somente dois construtos, $\Delta 2$ e $\Delta 6^*$ mostram uma significativa expressão mais elevada, depois de desrepressão. Sítios de ligação a fator de transcrição putativos de Rap1p e Gcr1p estão incluídos nas seqüências eliminadas. Além disso, o sítio de ligação de fator de transcrição putativo de QA-1F está muito próximo com relação às seqüências eliminadas de $\Delta 6^*$. De maneira notável, sítios de ligação de Rap1p e de Gcr1p são conhecidos como atuando de uma maneira sinérgica, quando presentes em seqüências de promotor [21]. O fator de transcrição geral Rap1p tem diversas funções celulares (por exemplo, estrutura de telômero, pareamento, tradução, glicólise) dependentes do contexto de seqüência de seu sítio de ligação e dos fatores de transcrição apropriados [22 - 24]. Conforme mencionado anteriormente, Gcr1p é o principal item de regulação e de coordenação de genes glicolíticos e é absolutamente necessário para expressão de alto nível em *S. cerevisiae*. Sítios de ligação de Rap1p e de Gcr1p são encontrados em íntima proximidade na região de núcleo de seqüência de ativação a montante (UAS) de genes glicolíticos, e a ligação a Gcr1p é aliviada por curvamento do DNA por Rap1p. Por outro lado, um sítio de ligação Rap1p adjacente não é um requisito absoluto para a ativação dependente de Gcr1p de genes. Parece que Gcr1p pode facilitar a ligação a seu sítio de ligação, quando números mais elevados de caixas de CT estiverem presentes. Embora fora descrita uma interação clara de Rap1p com Gcr1p, assim como de Gcr1p com Gcr1p, alguns outros fatores são sugeridos a interagirem com Gcr1p e/ou Rap1p modulando a atividade do complexo. Um amplo conhecimento sobre o mecanismo de modulação foi alcançado durante as últimas 3 décadas.

A proximidade íntima essencial descrita de sítios de ligação a

Gcr1p e a Rap1p, em UAS funcional, descrita acima, não pôde ser encontrada na sequência de promotor de *AOX1*. Em contraste, os dois sítios de ligação estão afastados por 367 pb. Entre o sítio de ligação a Grc1p putativo, sua sequência de núcleo CTTCC está presente 2 vezes na sequência de promotor de *AOX1*, mas, nenhum deles imediatamente adjacente ao sítio de ligação a Rap1p ou a outro motivo de CTTCC. Portanto, uma ação sinérgica desses dois sítios de ligação, conforme foi constatada em muitos genes glicolíticos, parece não ser provável. Devido ao fato de que os papéis putativos de Rap1p e de Gcr1p são proteínas repressoras para *AOX1* sob condições de desrepressão, é possível um novo modo de (inter-)ação das duas proteínas para essa função celular nova putativa.

Um envolvimento da eliminação de $\Delta 6^*$ (incluindo o sítio de ligação a Gcr1p putativo) em repressão quando da privação de carbono, é enfatizado pela observação de cepas de multicópias com expressão de GFP-Zeo muito elevada, sem indução por metanol. A expressão de GFP-Zeo do melhor clone da série de $\Delta 1$ - $\Delta 9$, denominado X-33 $\Delta 6^*$ F10 de *P. pastoris*, é mostrada na figura 5. A expressão de GFP-Zeo é cerca de 10% mais elevada depois de desrepressão (60 horas, em microescala) nessa cepa de multicópias $\Delta 6^*$, do que em uma cepa de promotor de tipo selvagem de cópia única (X-33 GFP-Zeo D2), depois de indução por metanol. O nível de expressão de X-33 $\Delta 6^*$ F10 de *P. pastoris*, depois de indução por metanol é também muito mais elevado do que em uma cepa de multicópias com promotor de tipo selvagem (X-33 GFP-Zeo E2).

Regiões de promotor de *AOX1* e *DAS1*, de *P. pastoris*, e de *MOX*, de *H. polymorpha*, promovem a expressão da enzima repórter beta-galactosidase (*lacZ* de *E. coli*) em *S. cerevisiae* [9]. O padrão de regulação desses genes em *S. cerevisiae* é similar a de seus hospedeiros naturais: glicose reprime a expressão de genes. Em condições de privação de carbono, a expressão é levemente desreprimida, e glicerol, como fonte de carbono, induz a expressão. Níveis de beta-galactosidase, expressos sob o controle de regiões reguladoras de *AOX1* e de *DAS1* em *S. cerevisiae*, são comparáveis àqueles obtidos com os fortes promotores de *CYC1* (constituti-

vo) e de *GAL2* (indutível), de *S. cerevisiae* [9]. Demonstrou-se que a expressão, impelida pelo promotor de *MOX*, é também induzida por etanol, metanol e ácido oléico, em *S. cerevisiae*. Outra constatação muito importante é o envolvimento de Adr1p na desrepressão/indução do promotor. Adr1p, um efeto

5 tor positivo de *ADH2* (álcool desidrogenase 2) e de algumas proteínas peroxissomais em *S. cerevisiae* [20], é também um efeto

10 tor positivo do promotor de *MOX*, quando glicose for carente no meio.

Conforme mencionado anteriormente, os padrões de regulação do gene de *AOX1* e do gene de *MOX* são significativamente diferentes em

10 seus hospedeiros naturais, devido à desrepressão de *MOX*, quando glicerol estiver presente. Usando a região de promotor de *AOX1*, em *H. polymorpha*, revelou-se que o promotor de *AOX1*, não é reprimido por glicerol no hospedeiro heterólogo [26]. Portanto, o promotor de *AOX1* heterólogo parece ser regulado como o promotor de *MOX* homólogo. Isso resulta na sugestão de

15 que as diferenças significativas no padrão de regulação entre *P. pastoris* e *H. polymorpha* se devem à resposta transcricional global a diferentes fontes de carbono nestas duas leveduras. Significativamente, enquanto que as maquinarias de repressão por glicerol e glicose sejam (praticamente) idênticas em *P. pastoris* e *H. polymorpha* (como em *S. cerevisiae*), a situação é diferente e glicerol não usa a maquinaria de repressão por glicose.

20

Dois dos três sítios de ligação a HAP2/3/4/5 putativo, encontrados na sequência de promotor de *AOX1*, estão dentro do construto de eliminação de $\Delta 1$, e o terceiro em $\Delta 5$. A eliminação de sequência de $\Delta 1$ resulta em um aumento de atividade de promotor, quando da indução de metanol,

25 enquanto que não foi observado qualquer efeito sobre o nível de promotor de desrepressão. Em contraste, a eliminação de $\Delta 5$ resulta em uma severa diminuição de atividade de promotor, sob condições de desrepressão, assim como de indução. Na eliminação de $\Delta 1$, foi constatado um sítio de ligação a *abaA* de *Aspergillus nidulans* putativo. O produto de gene *abaA* é um ativador transcricional, que está envolvido no desenvolvimento de conidióforo (aparelho reprodutivo assexuado) em *A. nidulans* [27]. Uma vez que todos os sítios de ligação putativos são seqüências de ativador possíveis [27], a

30

sua eliminação deve ter um efeito negativo sobre o nível de expressão, conforme constatado no construto de $\Delta 5$. Devido ao fato de que ambas as eliminações são muito longas, outro sítio de ligação poderia ser responsável pelo efeito observado. O fato de que a eliminação de $\Delta 1$ tem o efeito oposto sobre o nível de expressão indica que os sítios de ligação putativos é um motivo de repressor, ou que outro sítio de ligação está presente, que excede os efeitos de eliminação dos sítios de ligação a *abaA* e HAP putativos, por meio do que se aumenta o nível de expressão.

Apesar de tudo, o complexo de HAP é conhecido como sendo responsável pela regulação a montante de genes envolvidos no metabolismo respiratório e de energia em *S. cerevisiae*. A regulação de respiração é controlada pelo nível de oxigênio, assim como pela fonte de carbono presente no meio, ambos mediados pelo complexo de Hap. Na levedura fermentativa *S. cerevisiae*, vários genes e, portanto, funções da cadeia respiratória, assim como do ciclo de ácido cítrico, são reprimidos por glicose. A repressão por glicose de respiração é particularmente mediada pelo complexo de Hap, a saber, pela ausência de Hap4p, tanto quanto a glicose esteja presente. Em contraste, a regulação dependente de oxigênio parece ser regulada por Hap1p [28]. Homólogos dos genes complexos de Hap foram isolados na levedura respiratória de *K. lactis*. Genes envolvidos na respiração são expressos de maneira constitutiva em leveduras respiratórias, mesmo na presença de glicose. Até hoje, quase cada gene da cadeia respiratória tem se mostrado como sendo regulado de maneira independente a partir do complexo de Hap [29]. O papel do complexo de Hap parece estar na coordenação de assimilação de carbono e de nitrogênio, conforme tem sido constatado também em *S. cerevisiae* [30] e *Aspergillus nidulans* [29].

A primeira etapa na via de utilização de metanol, principalmente catalisada pelo produto de gene de *AOX1* em *P. pastoris*, é o consumo de oxigênio. A maioria dos genes envolvidos no metabolismo de energia e de quase cada gene que codifique enzimas de consumo de oxigênio é regulada por oxigênio, principalmente por Hap1p e/ou Hap2/3/4/5p [28]. Quando cultivadas em metanol como única fonte de e-

nergia e de carbono, a via de utilização de metanol resulta em assimilação de carbono e em produção de energia. Um envolvimento do motivo de reconhecimento de complexo de Hap TTCAA na regulação do promotor de *AOX1* faz sentido intuitivo.

- 5 O construto de $\Delta 4$, que inclui um segundo sítio de ligação a HSF putativo, resultou em uma diminuição de 30% de atividade de promotor depois de desrepressão e de indução. Portanto, HSF é um intensificador geral de expressão de genes de *AOX1* sob condições de desrepressão, assim como de indução. Em *S. cerevisiae*, várias condi-
- 10 ções de estresse, como choque térmico, estresse oxidativo e privação de glicose conduziram à ativação de HSF. Também foi demonstrado que a proteína quinase Snf1p, uma dos "comutadores-mestre metabólitos", está envolvida na fosforilação e, portanto, na ativação de HSF, quando da privação de carbono [31]. Portanto, ocorre um envolvimento de HSF na ati-
- 15 vação completa de *AOX1*, quando de privação de glicose (com ou sem indução).

Estudos sobre expressão no promotor de *AOX1* usando versões truncadas, assim como variantes com seqüências eliminadas são reveladas na técnica anterior [32, 33].

- 20 Tabela 14: Resultados dos estudos com promotor por Inan et al. [32, 33]; Indução foi realizada com 0,5% de metanol como fonte de carbono, repressão com 0,5% de metanol e 0,5% de etanol; Posições de iniciação denotam a extremidade 5' da seqüência no promotor de *AOX1* no que refere-se ao ponto de iniciação de tradução (ATG)

Fragmento de promotor	Eliminação por referência à SEQ ID Nº 1	atividade relativa (%)	
		induzida	reprimida
InanABCDEF	-	100	3,1 $\pm$ 0,3
Inan_BCDEF	7 a 152 (-947 a -802)	76 $\pm$ 5	1,9 $\pm$ 0,2
Inan_CDEF	1 a 292 (-947 a -661)	49 $\pm$ 4	2,2 $\pm$ 0,5
Inan_DEF	1 a 432 (-947 a -521)	14 $\pm$ 3	1,3 $\pm$ 0
Inan_EF	1 a 559 (-947 a -394)	24 $\pm$ 7	1,8 $\pm$ 0
Inan_F	1 a 798 (-947 a -245)	7 $\pm$ 2	1,8 $\pm$ 0,2

InanA_CDEF	153 a 292 (-801 a -661)	63 ± 3	$2,1 \pm 0,2$
InanAB_DEF	293 a 432 (-660 a -521)	109 ± 12	$3,8 \pm 0,4$
InanABC_EF	433 a 559 (-520 a -394)	128 ± 6	$5,0 \pm 0,6$
InanABCD_F	560 a 798 (-393 a -245)	16 ± 1	$0,8 \pm 0,2$

- O construto de Inan_BCDEF, que se inicia em 153 (-801) (Tabela 14) revelou um sítio de ligação de pelo menos uma proteína de ativador a montante de 153 (-801). Candidatos para esse sítio de ligação a ativador são os sítios de ligação de Hap1p (52 a 66, -902 a -888) e de HSF (135 e 155, -819 a -799) na fita complementar encontrada com MatInspector. O truncamento no sítio de restrição de SacI (210 - 215 (-744 a -739)) resultou em um promotor alcançando aproximadamente a atividade de promotor de tipo selvagem (Geoff Lin Cereghino, Poster, Sixth Meeting on "Current Topics in Gene expression and Proteomics", San Diego, 19 a 22 de Outubro de 2003).
- Para se alcançar o nível de promotor de tipo selvagem com o construto de promotor truncado de SacI (pHWG0, Geoff Lin Cereghino, poster), um segundo sítio de ligação para uma proteína de repressor pode estar presente a montante de 210 (-744), cuja eliminação tem o mesmo impacto, mas, na direção oposta, sobre a atividade de promotor. A localização da proteína de repressor está entre 169 (-784) e 210 (-744) porque o construto de $\Delta 1$ ($\Delta 169$ (-784) a 234 (-719)) contém um sítio de ligação a repressor. A eliminação de $\Delta 1$ resulta em um aumento de 20% de atividade de promotor (Tabela 14), que está na faixa da diminuição por eliminação do sítio de ligação de proteína de ativador.
- Por comparação com $\Delta 4$ ($\Delta 508$ (-445) a 550 (-403)), a localização do sítio de ligação a repressor pode ser ulteriormente refinada para uma sequência entre 433 (-520) e 508 (-445) porque a eliminação de $\Delta 4$ inclui um fator de transcrição que atua positivamente, HSF em 516 a 536 (-438 a -418). Se o HSF que atua positivamente (se ele for HSF) estiver localizado dentro da região proposta, pode ser sugerido um efeito mais forte do sítio de ligação a repressor entre 433 e 508 (-520 e -445). Se o sítio de ligação para HSF estiver localizado na região entre 508 e 536 (-445 e -418), outro sítio de ligação a ativador estará localizado entre 536 e 560 (-418 e -393). Se não, é

provável que seja o mesmo sítio de ligação. Como o InanABCD_F (Δ 560 a 709 (-393 a -245)), variante com atividade de tipo selvagem de somente 16%, também o construto de Δ 5 (624 a 682 (-329 a -271)) resulta em uma diminuição de cerca de 70% do nível de tipo selvagem. Conforme esperado, a eliminação do fragmento de Inan B a partir do promotor de comprimento completo (resulta em InanA_CDEF), assim como a partir de Inan_BCDEF (resulta em Inan_CDEF) resulta em uma diminuição para 63% e 64% do fragmento mais longo, respectivamente. Em contraste, enquanto que a eliminação do fragmento C a partir do promotor de comprimento completo resulta em um aumento de cerca de 10% de atividade de promotor, a eliminação a partir do fragmento de Inan_CDEF truncado conduz a uma diminuição de 49 a 14% (Tabela 14). A explicação é uma ligação sinérgica de fatores de transcrição dependentes do contexto de seus sítios de ligação. Entre 713 e 760 (-241 a -194), um último sítio de ligação à proteína de ativador está localizado (Geoff Lin Cereghino, Poster San Diego). Novamente, no construto de Δ 7 (Δ 729 a 763, -225 a -191) a localização do ativador poderia ser refinada a jusante de 729 (-225).

Para concluir, várias regiões foram encontradas, as quais tiveram um forte impacto sobre o nível de expressão do promotor de *AOX1*. Combinando-se todos os sítios reguladores conhecidos a partir do exemplo fornecido aqui e a partir de outros autores, excluindo-se as regiões contendo a caixa TATA e o sítio de iniciação de transcrição, pelo menos 10 sítios reguladores existem na sequência de promotor de P_{AOX1} .

Os dados fornecidos revelaram a regulação orquestral do promotor de *AOX1*: vários fatores são necessários para se ligar ao DNA para máximo nível de expressão. Sob condições de indução, vários fatores de transcrição que atuam de maneira positiva (ativadores) se ligam ao DNA, enquanto que a maioria das proteínas de repressor não se ligaram resultando em elevado nível de expressão. Embora desreprimida, a atividade de promotor alcançou somente uma pequena porcentagem (~3%) do nível induzido. Isso é muitíssimo provavelmente devido a menos proteínas de ativador e a mais proteínas de repressor se ligando à região de promotor. Sob

condições de desrepressão, pode-se assumir que nenhum ativador e vários repressores se ligam ao DNA, com aumento adicional da razão repressor/ativador, sob condições de repressão.

Foi demonstrado, para o promotor de *ADH2* (álcool desidrogenase 2) reprimida por glicose, de *S. cerevisiae*, que a ligação de proteínas de ativador (por exemplo, Adr1p), imediatamente adjacente aos nucleossomos, conduz à desestabilização e, portanto, ao rearranjo da cromatina, quando da desrepressão. O rearranjo ocorre na região da caixa TATA e do sítio de iniciação de transcrição, portanto, aumentando a sua acessibilidade.

5 Devido à formação de acessibilidade mais elevada de um complexo de pré-iniciação estável, ocorre, portanto, aumento da atividade de promotor com relação a um nível basal. Dentre a ligação de vários fatores de transcrição, para intensificar a expressão impelida por P_{AOX1} , é presumível um mecanismo similar, pelo menos para a desrepressão. Tomando-se todos os dados e

10 assunções em conjunto, a regulação do promotor de *AOX1* é altamente complexa e os sítios de ligação putativos de vários fatores de transcrição (que atuam positivamente e negativamente) revela maquinaria altamente coordenante, que seja capaz de integrar uma ampla variedade de sinais, para a regulação do promotor de *AOX1*.

20 VI) Mutagênese por PCR de promotor de *AOX1*

Demonstrou-se, aqui, que mutações específicas, dentro das seqüências de núcleo de sítios de ligação a fator de transcrição, resultam em alterações significativas de sua força de efector. Presumivelmente, umas poucas proteínas de ativador e de repressor atuam sobre o promotor de

25 *AOX1* para resultar em sua regulação muito forte (quase nenhuma atividade sob glicose, e atividade muito elevada em metanol). Portanto, mutagênese aleatória do promotor de *AOX1* deveria resultar em várias variantes de promotor com atividades de sítio de ligação a repressor destruída ou reduzida. Foi realizado um conjunto de reações de PCR, com diferentes taxas de mu-

30 tação. As variantes de promotor resultantes foram transformadas em cepa GFP-Zeo Mut^s A9 de *P. pastoris*, em que o gene de *AOX1* foi substituído pela cepa de GFP-Zeo. A substituição do promotor de *AOX1* de tipo selva-

gem por variantes de promotor submetidos à mutagênese deve ocorrer a uma taxa particular. A seleção de variantes de promotor, com taxa de expressão mais elevada, quando glicose está presente no meio, foi feita em placas de agar com MD-Zeo.

5 O espalhamento de placas de agar com MD contendo 100 µg/ML de Zeocin® resultou em placas manchadas com células de *Pichia pastoris* e nenhuma colônia única foi evidente. Parece que a pressão de seleção não foi suficiente para reprimir o crescimento da cepa de tipo selvagem. Embora nenhuma fluorescência pudesse ser detectada na cepa de GFP-Zeo Mut^s A9
10 de *P. pastoris*, quando glicose está presente, umas poucas proteínas GFP-Zeo poderiam ser expressas na célula, conferindo resistência à Zeocin®. Para se testar concentrações de Zeocin® mais elevadas, para a inibição de crescimento da cepa de GFP-Zeo Mut^s A9, ensaios de gota foram realizados conforme descrito anteriormente.

15 Conforme se pode ver claramente na figura 6, aumento para 200 µg/mL não diminuiu a viabilidade celular (comparada a 100 µg/mL) de cepas de *P. pastoris* portando um gene de GFP-Zeo sob o controle do promotor de *AOX1*, mas, aumento para 500 µg/mL o fez. Esperava-se que a mutagênese do promotor deveria resultar em níveis de expressão somente
20 ligeiramente aumentados, portanto, uma pressão de seleção de 500 µg/mL de Zeocin® parece ser alta demais. Finalmente, 350 µg/mL foram escolhidos para todas as seleções adicionais de variantes de promotor de mutagênese.

Devido à regulação de transcrição muito complexa, com muitas regiões de promotor envolvidas, é vantajosa uma abordagem de mutagênese aleatória usando uma taxa de mutagênese elevada.
25

Exemplo 2: Geração de Eliminações de Promotor

Com base nos resultados do Exemplo 1, uma segunda geração de variantes de eliminação foi gerada. Ao contrário da primeira série, nesses novos construtos de eliminação, somente segmentos pequenos e específicos dos sítios de ligação a fator de transcrição (5 - 15 pb) foram eliminados
30 (Tabela 15).

Tabela 15: Efeitos de eliminação de sítios de ligação a fator de transcrição

específicos sobre o nível de expressão quando da desrepressão (privação de glicose) e indução por metanol. As mutações $\Delta 1$ - $\Delta 9$, assim como combinações de mutações simples são também citadas. Todos os números são atividades de promotor relativas comparadas à atividade de promotor de tipo selvagem, sob as mesmas condições.

5

Eliminação	Faixa de SEQ ID Nº 1	Região	Eliminação (marcada em negrito, sublinhada) e 5 nucleotídeos adjacentes (5' e 3')	Efeito positivo
Δ Hap1	-900 a -896	Inan A	GCCAT <u>CCGACAT</u> CCA	expressão aumentada sob condições de indução
Δ Hsf_1	-812 a -805	Inan A	GGACCT <u>CCACTC</u> <u>CTCTTC</u>	geração de cepas de multicópias, expressão aumentada sob condições de indução
$\Delta 1$	-784 a -719	Inan B	CCACT <u>TTTGCCA</u> <u>TCGAAAAACCA</u> <u>GCCCAGTTAT</u> <u>TGGGCTTGATTG</u> <u>GAGCTCGCTCA</u> <u>TTCCAATTC</u> <u>CTTCTATTAGG</u>	expressão aumentada sob condições de indução
Δ Hap2345_1	-758 a -754	Inan B, $\Delta 1$	CAGTT <u>TATTG</u> <u>GGCTTG</u>	geração de cepas de multicópias
Δ Hap2345_2	-748 a -744	Inan B, $\Delta 1$	GCTTG <u>GATT</u> <u>GGAGCTC</u>	geração de cepas de multicópias
Δ abaA	-735 a -730	Inan B, $\Delta 1$	TCGCT <u>CAT</u> <u>TCCAATTC</u>	geração de cepas de multicópias
Δ Stre	-673 a -669	Inan B	TGG <u>CCCCC</u> <u>CTGGCGA</u>	expressão aumentada sob condições de indução

Eliminação	Faixa de SEQ ID Nº 1	Região	Eliminação (marcada em negrito, sublinhada) e 5 nucleotídeos adjacentes (5' e 3')	Efeito positivo
Δ2	-650 a -604	Inan C	<u>TTTGT</u> <u>TTTAT</u> <u>TTCCGAATG</u> <u>CAACAAGCTC</u> <u>CGCATTACAC</u> <u>CCGAACAT</u> - <u>CACTCCAGATG</u>	expressão mais elevada sob condições de desrepressão
ΔRap1	-619 a -615	Inan C, Δ2	<u>ATTAC</u> <u>ACCC</u> <u>GAACAT</u>	geração de cepas de multicópias
Δ3	-590 a -561	Inan C	<u>GCTTT</u> <u>CTGAG</u> <u>TGTGCGGTC</u> <u>AAATAGTTT</u> <u>CATGTTCCC</u> CAA	
ΔAdr1	-583 a -577	Inan C, Δ3	<u>GAGTGTGG</u> <u>GGTCAAA</u> TA	geração de cepas de multicópias
Δ4	-445 a -403	Inan D	<u>AGTTGACAA</u> <u>GACAAACG</u> <u>GTATGCCGA</u> <u>CTTTTG</u> - <u>GAAGTTTC</u> <u>TTTTTTGAC</u> TTGGT	
ΔHsf_2	-437 a -430	Inan D, Δ4	<u>AAAAACA</u> <u>AACCTCC</u> AAAA	
Δ5	-329 a -271	Inan E	<u>GAACCCCGGT</u> <u>GCACCTGTGCC</u> <u>GAAACGCAA</u> <u>ATGGGGAAA</u> <u>CAC</u> - <u>CCGCTTTTTT</u> <u>GGATGATTA</u> <u>TGCATTGTC</u>	
ΔHap2345_3	-286 a -282	Inan E, Δ5	<u>CGCTTTT</u> <u>GGATGAT</u>	geração de cepas de multicópias
ΔMat1MC	-271 a -267	Inan E, Δ5°	<u>TATGCATT</u> <u>GTCTCCA</u>	

Eliminação	Faixa de SEQ ID Nº 1	Região	Eliminação (marcada em negrito, sublinhada) e 5 nucleotídeos adjacentes (5' e 3')	Efeito positivo
Δ6	-260 a -231	Inan E & F	<u>TCCACATTGT</u> <u>ATGCTTCCA</u> <u>AGATTCTGG</u> <u>TGGGAAT</u> ACTGC	
Δ6*	-260 A -231 -217 A -216	Inan E & F Inan F	<u>TCCACATTG</u> <u>TATGCTTC</u> <u>CAAGATTCT</u> <u>GGTGGGAA</u> <u>TACTGC</u> <u>TAGCCCTA</u> ACGTT	expressão mais elevada sob condições de desrepressão geração de superclones com elevada expressão sob condições de desrepressão
ΔGcr1	-252 a -248	Inan E, Δ6	<u>GTATGCTT</u> <u>CCAAGAT</u>	geração de cepas de multicópias
Δ7	-225 a -191	Inan F	<u>ACTGCTGAT</u> <u>AGCCTAACG</u> <u>TTCATGATC</u> <u>AAAATTTA</u> <u>ACTGTTT</u> TAA	
ΔQA-1F	-207 a -193	Inan F, Δ7	<u>TTCATGATC</u> <u>AAAATTTAA</u> <u>CTGTTCT</u>	geração de cepas de multicópias, atividade aumentada sob condições de indução
ΔQA-1Fzus	-218 a -213 -207 a -193	Inan F, Δ7	<u>ATAGCCTAA</u> <u>CGTTTCATGA</u> <u>TCAAAATT</u> <u>TAACTGT</u> TCT	atividade aumentada sob condições de indução
ΔHsf_2_ dHap2345_1	-758 a -754 -437 a -430	Inan B, Δ1 Inan D, Δ4	<u>CAGTTATT</u> <u>GGGCTTG</u> <u>AAAAAGAAA</u> <u>CTTCCAAAA</u>	geração de cepas de multicópias

Eliminação	Faixa de SEQ ID Nº 1	Região	Eliminação (marcada em negrito, sublinhada) e 5 nucleotídeos adjacentes (5' e 3')	Efeito positivo
Δ Hsf_2_ dHap2345_1z us	-758 a -754 -437 a -430	Inan B, Δ 1	CAGTT <u>ATTGGGCT</u> TGAT <u>TGGAGCT</u> AAAA <u>AGAAAC</u> TTCC <u>AAAA</u>	
Δ Hsf_ 2_Mat1MC	-437 a -430 -271 a -267	Inan E, Δ 5°	AAAA <u>AGAAA</u> CTTC <u>CAAAA</u> TATGC <u>ATTG</u> TCT <u>CCA</u>	geração de cepas de multicópias
Δ 8	-170 a -154	Inan F	ACAGCA <u>ATATA</u> TAAAC <u>AGAA</u> GGA <u>AGCT</u>	
Δ 9	-131 a -93	Inan F	ACCT <u>TTTTTTT</u> ATCAT <u>CATTA</u> TTAG <u>CTTACT</u> TTCATA <u>AT-</u> TGG <u>ACTGG</u>	
Δ 2 Δ 6	-650 a -604 -260 a -231	Inan C Inan E & F	TTTGTT <u>TATTTC</u> CGAAT <u>GCAACA</u> AGCT <u>CCGCAT</u> TACAC <u>CCGAACAT-</u> CACT <u>CCAGATG</u> TCCAC <u>ATTGTA</u> TGCT <u>TCCAA</u> GATT <u>CTGGTG</u> GGA <u>ATACTGC</u>	geração de cepas de multicópias
Δ 736-41	-218 a -213	Inan F, Δ 7	ATAG <u>CCCTA</u> ACGT <u>TCAT</u>	
Δ 737-38	-217 a -216	Inan F, Δ 7	TAG <u>CCCTA</u> ACGT <u>T</u>	
Δ InD-d4m	-402 a -394	Inan D	CTTG <u>TITG</u> GT <u>ATTGA</u> TT <u>GTA</u>	

Eliminação	Faixa de SEQ ID Nº 1	Região	Eliminação (marcada em negrito, sublinhada) e 5 nucleotídeos adjacentes (5' e 3')	Efeito positivo
Δ D-d4	-520 a -446	Inan D	CTTGGA <u>ACC'</u> <u>TAATATGAC</u> <u>AAAAGCGTG</u> <u>ATCTCATC</u> <u>CAAGAT-</u> <u>GAACTAAG'</u> <u>TTTGGTTC</u> <u>GTTGAAAT</u> <u>GCTAACGGC</u> <u>CAGTTGCT</u> TGG	
Δ 1-1	-784 a -763	Inan B, Δ 1	CCACTTTT <u>G</u> <u>CCATCGAAA</u> <u>AAACCAGCCC</u> AGTTA	
Δ 1-2	-762 a -741	Inan B, Δ 1	AGCCCACT <u>T</u> <u>TATTGGGC</u> <u>TTGATTGG</u> <u>AGCTCGCT</u>	
Δ 1-3	-740 a -719	Inan B, Δ 1	GGAGCTCGC <u>C</u> <u>TCATTCCA</u> <u>ATTCCTTC</u> <u>TATTAGG</u>	
Δ 1-SacI	-762 a -744	Inan B, Δ 1	CCACTTTT <u>G</u> <u>CCATCGAA</u> <u>AAACCAGC</u> <u>CCAGTTATT</u> <u>GGGCTTGAT-</u> TGGAGCTC	
Ohi, et al, AOX2UAS	-228 a -199	Inan F, Δ 7	AATACT <u>GC</u> <u>TGATAGCCT</u> <u>AACGTTCA</u> <u>TGATCAAA</u> <u>ATAATAC</u>	
Ohi, et al, AOX2UAS	-369 a -337	Inan E	TAATCTCAT <u>T</u> <u>TAATGCTT</u> <u>AGCGCAGT</u> <u>CTCTCTA</u> <u>TCGCTTTAATC</u>	

Eliminação	Faixa de SEQ ID Nº 1	Região	Eliminação (marcada em negrito, sublinhada) e 5 nucleotídeos adjacentes (5' e 3')	Efeito positivo
Ohi, et al, AOX2URS2	-333 a -294	Inan E	TTCTGA<u>ACCC</u> CGGTGCACC TGTGCCGAA ACGCAAATG GGGAAACACC CGC	

Materiais e Métodos:

a) Mutagênese:

Todas as eliminações foram introduzidas usando-se o protocolo de mutagênese sítio-dirigida em dois estágios, de acordo com Wang et al. [34]. Em uma primeira etapa, duas reações separadas (uma para iniciador para frente e uma para iniciador reverso) foram avaliadas (100 ng de molde de pAOX, 15 pmols de iniciador, 200 µM de cada aATP, dTTP, dCTP e dGTP, 2,5 U de polimerase *PfuU1tra*[®] em um volume total de 50 µL em condições tampão apropriadas). 25 µL dessas 2 reações de PCR foram combinados e foi realizada uma segunda etapa de reação de PCR.

1 µL de enzima de restrição de *DpnI* (10 u/µL) foi adicionado a 30 µL da segunda etapa de reação de PCR e incubados durante 1 hora a 37°C. 1 - 5 µL de reação de PCR digerida com *DpnI* foram transformados em células de *E. coli* eletrocompetentes [16] e plaqueadas em placas de LB-Amp, depois de um tempo de regeneração, em meio de SOC.

Tabela 16: Iniciadores para mutagênese sítio-dirigida de eliminações de sítio de ligação de fator de transcrição

Eliminação	Nome	Seqüência (5' → 3')	SEQ ID Nº
Hap1	Hap1fw	GAATGAAACCTTTTTGCCATA-TCCACAGGTCCATTCTCAC	53
	Hap1rv	GAATGGACCTGTGGATATGGCAAAAAG-GTTTCATTCAACC	54
Hsf_1	Hsf_1fw	CCGTTGCAAACGCAG-GACCTCTTCTCCTCAACACCCAC	55

Elimi- nação	Nome	Sequência (5' → 3')	SEQ ID Nº
	Hsf 1rv	GTGTTGAGGAGAAGAGGTCCT- GCGTTTGCAACGGTCTG	56
Hap234 5_1	Hap2345 _1fw	CGAAAACCAGCCCAGTTGCTTGATTG- GAGCTCGCTCATTTCC	57
	Hap2345 _1rv	GAGCGAGCTCCAATCAAGCAACTGG- GCTGGTTTTTCGATG	58
Hap234 5_2	Hap2345 _2fw	CAGCCCAGTTATTGGGCT- TGAGCTCGCTCATTTCCAATTCC	59
	Hap2345 _2rv	GGAATTGGAATGAGCGAGCTCAAGC- CCAATAACTGGGCTG	60
ABAA	ABAAfw	GGCTTGATTG- GAGCTCGCTAATTCCTTCTATTAGGC- TAC	61
	ABAArv	GTAGCCTAATAGAAGGAATTAGC- GAGCTCCAATCAAGCC	62
Stre_1	Stre_1fw	GCCTGTCTATCCTGGCCGGCGAG- GTTTATGTTTGTATTTC	63
	Stre_1rv	CAAACATGAACCTCGCCGGCCAG- GATAGACAGGCTAATAAAG	64
Rap1	Rap1fw	GCAACAAGCTCCGCATTACAACAT- CACTCCAGATGAGG	65
	Rap1rv	CCTCATCTGGAGTGATGTTGTAATGCG- GAGCTTGTTGC	66
Adr1	Adr1fw	CCAGATGAGGGCTTTCTGAGT- GAAATAGTTTCATGTTCCC	67
	Adr1rv	GGGAACATGAACTATTTCACT- CAGAAAGCCCTCATCTGG	68
Hsf_2	Hsf_2fw	GCCAGTTGGTCAAAAACAAAAGTCG- GCATACCGTTTGTC	69
	Hsf_2rv	CGGTATGCCGACTTTTGTGTTTTGAC- CAACTGGCCGTTAGC	70
Hap234 5_3	Hap2345 _3fw	CAAATGGGGAAACACCCGCTTATGAT- TATGCATTGTCTCCAC	71
	Hap2345 _3rv	GAGACAATGCATAATCATAAGCGGGT- GTTTCCCCATTGCG	72

Elimi- nação	Nome	Seqüência (5' → 3')	SEQ ID Nº
Mat1M C	Mat1MCf w	GCTTTTGGATGATTATGCCTCCACAT- TGTATGCTTCCAAG	73
	Mat1MCr v	CTTGGAAGCATACAATGTGGAG- GCATAATCATCCAAAAGC	74
Gcr1	Gcr1fw	CATTGTCTCCACATTGTAT- GAAGATTCTGGTGGGAATACTGC	75
	Gcr1rv	GTATTCCCACCAGAATCTTCATACAAT- GTGGAGACAATGC	76
QA-1F	QA-1Ffw	GCTGATAGCCTAACGTTTCAT- GTTCTAACCCTACTTGACAGC	77
	QA-1Frv	GTCAAGTAGGGGTTAGAACATGAACGT- TAGGCTATCAGCAG	78
736- 741	d736- 41fw	GGAATACTGCTGATAGCTTCATGAT- CAAAATTTAACTGTTC	79
	d736- 41rv	GTAAATTTTGATCATGAAGCTAT- CAGCAGTATTCCCACC	80
737- 738	d737- 38fw	GGAATACTGCTGATAGCCACGTTTCATG- ATCAAAATTTAACTG	81
	d737- 38rv	GTAAATTTTGATCATGAACGTG- GCTATCAGCAGTATTCC	82

b) Transformação em *Pichia pastoris* e caracterização de clones:

Plasmídeos construídos conforme descritos acima foram preparados e transformados em *Pichia pastoris* conforme descrito no Exemplo 1.

Resultados e Discussão:

- 5 Um forte efeito sobre o nível de expressão é observado com as mutações curtas do Exemplo 2, conforme já descrito para as eliminações mais longas do Exemplo 1, em que todas as mutações têm um efeito positivo ou negativo significativo sobre a atividade de promotor. Eliminações curtas de sítios de ligação a fator de transcrição específicos têm fortes efeitos
- 10 sobre a atividade de promotor e dão uma informação mais precisa sobre as propriedades reguladoras de sítios reguladores individuais (por exemplo, sítios de ligação a fator de descrição). Gcr1 é de especial interesse, já que seu sítio de ligação está incluído na eliminação Δ6. O seqüenciamento da região

de promotor de um mutante de eliminação pAOX Δ 6 e uma colônia e uma colônia, produtos de PCR de DNA genômico de clones de *Pichia pastoris* revelaram uma eliminação adicional na região de promotor (eliminação dos nucleotídeos 737 a 738 (-217 a -216) de SEQ ID Nº 1). Devido ao fato de

5 que essa variante de promotor conduz a uma atividade de promotor aumentada resultando, conseqüentemente, em uma taxa de expressão mais elevada sob condições de desrepressão, a mutação adicional pode ser introduzida em um promotor adicional de acordo com a presente invenção, para aumentar a expressão de proteína sob essas condições.

10 A atividade de promotor de clones de QA-1F com uma eliminação adicional (eliminação de nucleotídeos 736 a 741 (-218 a -213) de SEQ ID Nº 1) é significativamente diferente, comparada ao promotor Δ QA-1F sem essa eliminação adicional: A atividade se modifica de ~30% (desrepressão) e ~100% (indução) de atividade de tipo selvagem (AOX1 Δ QA-1F, vide a Ta-

15 belá 15) para ~140% e ~70%, respectivamente (AOX1 Δ QA-1F_{zus}, vide tabela 15). A eliminação adicional desses 6 nucleotídeos parece ter uma influência dramática sobre a atividade de promotor. Portanto, uma nova variante de promotor portanto essa mutação (Δ 736 - 741) foi introduzido pelo protocolo de mutagênese sítio-dirigida. Ambas as mutações, que surgiram duas vezes

20 acidentalmente e independentemente nessa região, resultaram em um aumento da atividade de promotor sob condições de desrepressão. É notável que haja um aumento de atividade de promotor, embora haja uma segunda mutação, que influencia muitíssimo provavelmente de maneira negativa, em ambos os construtos.

25 Uma combinação de Δ 2 e Δ 6 (Δ 2 Δ 6) foi gerada similar a eliminações únicas por PCR com extensão de superposição. É mostrado de maneira clara, na Tabela 17, que uma eliminação de ambos os fragmentos resulta em uma diminuição muito forte de atividade de promotor sob condições de desrepressão, assim como condições de indução. Uma vez que não há eliminação de TA adicional nesse construto, comparado ao construto de Δ 6*,

30 conforme anteriormente mencionado, também este resultado fundamenta a especulação de que mutação adicional ocorrida adicionalmente (Δ 737 - 38) é



responsável pelo aumento de atividade de promotor quando da privação de carbono.

Várias eliminações resultam em uma diminuição dramática de atividade de promotor (por exemplo, Hsf, mas, também, Hap1 e Hap2345_1). Esses sítios de ligação putativos são alvos brilhantes para uma duplicação de sequência, o que deve resultar em um aumento de atividade de promotor.

De maneira interessante, em 2 de 4 clones da variante $\Delta 736 - 741$ gerada por mutagênese sítio-dirigida, foi encontrada uma nova eliminação de 9 nucleotídeos (TTGGTATTG), na posição 552 a 560 (-402 a -394). O efeito de que aquelas eliminações foram encontradas em uma região distinta foi também encontrado em construtos Δ Hsf_2. Espera-se que um tal efeito seja devido à homologia de sequência local. Portanto, tais regiões adicionalmente eliminadas ($\Delta 552 - 560$, $\Delta 737 - 38$ e $\Delta 736 - 41$) e as sequências em íntima proximidade (5 pb a montante e a jusante) são também sítios de ligação a fator de transcrição putativos e, portanto, alvos altamente interessantes para eliminações e duplicações. A variante de eliminação de $\Delta 736 - 41$ resulta em uma redução intensificada do nível de expressão, sob condições de indução por metanol.

Cepas de Multicópias:

Na maioria dos casos, a geração de cepas de multicópias resulta em cepas super-expressantes de GFP-Zeo. Em muitos casos, essas cepas têm níveis de expressão mais elevados do que as cepas d6*F10, principalmente sob condições de indução por metanol. A geração de cepas de multicópias foi alcançável com vários construtos, especialmente com o construto de $\Delta 6^*$, a eliminação dupla de d2d6, construtos incluindo eliminações de $\Delta 1$, $\Delta 2$ e $\Delta 6^*$, assim como, por exemplo, Gcr1, Rap1, abaA, hap235_1, mas, também, por exemplo, QA-1F, Adr1, Hsf_2_Mat1MC e Hsf_2_Hap2345_1 (vide a figura 7). Nessas cepas, é encontrada uma taxa de expressão mais elevada, sob condições de indução, comparadas à cepa d6*F10. Ao contrário, a cepa d6*F10 foi capaz de produzir mais GFP-Zeo do que qualquer outra cepa gerada até agora, sob condições de desrepressão. A transformação



repetida de construto de $\Delta 6^*$ em *Pichia pastoris* resulta em um número elevado de cepas de multicópias com atividade comparável à cepa $\Delta 6^*F10$, especialmente sob condições de desrepressão (figura 8).

Usando-se construtos de promotor de tipo selvagem, foi observada uma frequência muito mais baixa de cepas de multicópias (por exemplo, cepa E2), do que usando-se variantes de promotor. Embora 2 - 4 vezes mais transformantes foram analisados, o nível de expressão do melhor transformante de E2 é somente duas vezes tão elevado que transformantes de cópia única. Em conclusão, a transformação de variantes de promotor resulta em uma frequência mais elevada de cepas de multicópias e estas cepas são muitas vezes mais produtivas do que cepas de promotor de tipo selvagem de multicópias.

Exemplo 3: Proteínas de repórter alternativas

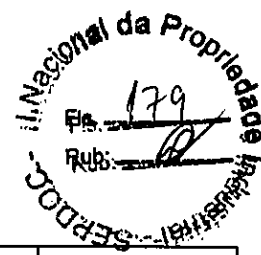
Para se testar a praticabilidade de todos os resultados de GFP-Zeo para outras, basicamente bem expressos e industrialmente relevantes, proteínas (por exemplo, enzimas) algumas variantes de promotor foram clonadas em frente de tais enzimas de repórter (por exemplo, *PaHNL5 α* e HRP).

Clonagem:

Variantes de promotor foram clonados em vetores pPICZ α B-HRP-WT [35] e pGAPZ A-*PaHNL5 α* . Para a troca de promotor em pPICZ α B-HRP-WT, foi inserido um sítio de restrição de *NdeI*, na extremidade 5' do promotor, por mutagênese sítio-dirigida (100 ng de vetor como molde, iniciador Nde1PICZfor e Nde1PICZrev - vide a Tabela 18). O vetor resultante foi chamado de pPICZ α B-*NdeI*-HRP-WT.

Tabela 18: Iniciador para mutagênese sítio-dirigida para introdução de um sítio de restrição de *NdeI* em pPICZ α B-HRP-WT e para troca de promotor

Nome	Seqüência (5' $\rightarrow$ 3')	SEQ ID Nº
Nde1PICZfor	GAGATCAGATCTAACATATGCCAAAGACGAAAG-GTTG	83
Nde1PICZrev	CAACCTTTTCGTCTTTGGCATATGTTAGATCTG-ATCTC	84



AOX1NDE1	AAACATATGAGATCTAACATCCAAAGACGAAAGG	85
AOX1rev	TGGTTGAATTCTTTCAATAATTAGTTG	86

Para o clone de expressão pGAPZ A-*PaHNL5α*, o gene *PaHNL5α* foi primeiramente clonado a partir de um vetor pHIL-D2 (Glieder, A., et al. Angew. Chemie Int. Ed. 2003) em um vetor pGAPZ A, resultando no plasmídeo pGAPZA-*PaHNL5α*. A clonagem de variantes de promotor em pGAPZA-*PaHNL5α* poderia ser feita diretamente depois de digestão com *EcoRI/BglIII* de plasmídeos pGAPZ A-*PaHNL5α* e pAOXΔ. Para uma troca em pPICZαB-*NdeI*-HRP-WT, as variantes de promotor foram amplificadas por PCR usando-se iniciadores AOX1NDE1 e AOX1rev (vide a Tabela 8, 10 ng de pAOXΔ, 10 pmols de iniciador AOX1NDE1 e AOX1rev, 200 μM de cada dNTP, 0,6 u de polimerase Phusion®, em condições tampão apropriadas e um volume total de 50 μL). Os produtos de PCR e o plasmídeo pPICZαB-*NdeI*-HRP-WT foram clonados empregando-se sítio de restrição de *NdeI/HindIII*.

Transformação, crescimento e ensaios com enzima:

Para transformação em *Pichia pastoris*, todos os vetores de HRP foram linearizados por plasmídeos de *NdeI* e todos de *PaHNLα5* por *BglIII*. A transformação foi realizada conforme descrito no Exemplo 1. O crescimento de cepas de *P. pastoris* foi também feito conforme descrito no Exemplo 1, com somente umas poucas exceções. A quantidade de BMD(%) inicial foi aumentada para 350 μL e, depois de 60 horas, 100 μL de cultura foram tomados para centrifugação (4,000 rpm, 4°C, 10 min). A indução por metanol foi feita exatamente conforme descrito no Exemplo 1.

50 μL (a desrepressão ou 10 μL (indução) de sobrenadante a partir de centrifugação foram tomados para ensaio com HNL e 15 μL, em ambas as condições, para o ensaio com HRP.

Ensaio com HRP (de acordo com [35]):

15 μL de sobrenadante foram adicionados a 150 μL de ABTS 1 mM/H₂O₂ 2,9 mM em tampão de NaOAc 50 mM de pH 4,5, em placas de microtitulação de PS. A absorção foi seguida durante 5 minutos, a 405 nm em uma leitora de placa Spectramax Plus384 (Molecular Devices, Sunnyva-



le, CA, EUA).

Ensaio com HNL (de acordo com [36]):

- 50 μ L ou 10 μ L de sobrenadante foram adicionados a 100 ou 400 μ L de tampão de fosfato-citrato 0,05 M de pH 5,0, em uma placa de microtitulação UV-Star. A reação foi iniciada por adição de 50 μ L de solução de mandelonitrila 0,06 M (em tampão de fosfato-citrato 0,003 M de pH 3,5), e seguido durante 5 minutos a 280 nm em uma leitora de placa Spectramax Plus384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Resultados e Discussão:

- Os resultados, usando as proteínas de repórter alternativas PaHNL5 α e HRP, mostram claramente a capacidade de transferência de atividade de promotor detectada usando-se GFP-Zeo (Tabela 17).

- Devido à sensibilidade mais baixa do ensaio com HRP, o nível de expressão em condições de desrepressão estava abaixo do limite de detecção. Portanto, a expressão de HRP não poderia ser determinada sob condições de desrepressão.

- Tabela 17:** Atividade de promotor de várias variantes de promotor de AOX1 com enzimas de repórter alternativas (entre parênteses, é citada a atividade relativa comparada a do promotor de tipo selvagem, sob as mesmas condições (desrepressão e indução, respectivamente))

Promotor	GFP-Zeo		PaHNL5 α		HRP	
	Desrepr.	Metanol	Desrepr. [mU/min]	Metanol [mU/min]	Desrepr. [mU/min]	Metanol [mU/min]
P(AOX1)	27,3 (100%)	987 (100%)	2,58 (100%)	69,5 (100%)	n.d.	20,3 (100%)
P(AOX1) Δ 1	29,5 (108%)	1188 (120%)	2,37 (92%)	100 (144%)	n.d.	26,9 (132%)
P(AOX1) Δ 2	43,0 (157%)	399 (40%)	n.d.	91,7 (132%)	n.d.	9,6 (47%)
P(AOX1) Δ 6*	89,9 (329%)	422 (42%)	8,65 (335%)	51,7 (74%)	n.d.	17,5 (86%)
P(AOX1) Δ 2 Δ 6	9,9 (36%)	336 (34%)	1,29 (50%)	37,5 (54%)	n.d.	9,9 (49%)

n.d. não detectável

Para transferir a seleção de multicópias para os sistemas de repórter alternativos, variantes de promotor de *AOX1* foram clonadas nos plasmídeos HRP e *PaHNLα5* apropriados em frente do gene de resistência à zeocina, substituindo, assim, o promotor de *TEF1*.

5 Exemplo 4: Proteína de GFP repórter alternativa

Para testar as variantes de promotor com GFP, variantes de promotor descritas nos Exemplos 1 e 2, foram clonadas em frente de um gene de ciclo-3-GFP.

Clonagem:

10 Sítios de restrição de *BamHI* e *XhoI* internos na ciclo-3-GFP, no vetor pAOX, foram eliminados por mutagênese sítio-dirigida empregando-se iniciadores Bam-del-f e Xho-del-f (Tabela 19) e 100 ng de vetor como molde. O fragmento de GFP foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo resultante (10 ng), empregando-se iniciadores GFP-ZeoForw (SE ID Nº 4, Tabela 7, 15 10 pmols) e wtGFP-XhoI-r (Tabela 19, 10 pmols) e polimerase Phusion®, sob condições apropriadas. O produto de PCR resultante poderia ser clonado para o vetor pPICZ B empregando-se corte de restrição com *EcoRI/XhoI* e ligação usando-se DNA ligase de T4. O plasmídeo resultante foi denominado pPICZ-GFP.

20 A clonagem de todas as variantes de promotor para pPICZ-GFP poderia ser feita diretamente, depois de digestão *BglIII/EcoRI* de plasmídeos pPICZ-GFP e pAOX.

Tabela 19: Iniciador para mutagênese sítio-dirigida da ciclo-3-GFP no vetor pAOX e amplificação do seu fragmento de GFP

Nome	Seqüência (5' → 3')	SEQ ID Nº
Bam-del-f	cgccacaacattgaagatggttccggttcaactagcagac-cattatc	87
Xho-del-f	ggaaacattctcggacacaaact-tgagtacaactataactcacacaatg	88
wtGFP-XhoI-r	atctcgagttacttgtacaattcatccatgccatgt-qtatccc	89

25 *Transformação, crescimento e detecção de GFP:*

Para transformação de *Pichia pastoris*, todos os plasmídeos forma linearizados por *Bgl*III. A transformação foi realizada conforme descrito no Exemplo 1. Depois de transformação e de uma fase de regeneração de 2 horas, as células foram plaqueadas em placas de agar de YPD-Zeo, contendo 100 µg/mL de zeocina.

O crescimento de *Pichia pastoris*, indução por metanol e medição de fluorescência de GFP foi feita exatamente conforme descrito no Exemplo 1.

Resultados e Discussão:

Novamente, os resultados, usando-se GFP como sistema de repórter, mostram a capacidade de transferência de atividade de promotor detectada usando-se GFP-Zeo (Tabela 20).

Cepas de multicópias:

Conforme descrito no Exemplo 1 e 2, a ocorrência de cepas de multicópias, usando-se zeocina como marcador de seleção, é muito comum. A frequência de cepas de multicópias poderia ser enormemente por aumento da concentração de zeocina sobre as placas de seleção para 500 e 1,000 µg/mL, respectivamente.

Tabela 20: Atividade de promotor relativa de várias variantes de promotor de AOX1 com GFP e GFP-Zeo como gene de repórter, comparada àquela do promotor de tipo selvagem sob as mesmas condições (desrepressão e indução, respectivamente)

Variante de promotor	GFP		GFP-Zeo	
	Cepa Nº	Metanol RFU	Cepa Nº	Metanol RFU
WT	E1	100 %	D2	100 %
ΔHap1	C9	89 %	A2	84 %
Δ1	4E6	79 %	A9	134 %
Δ1-3	8-F12	75 %	D5	67 %
Δ2	G12	37 %	F2	40 %
ΔRap1	D6	27 %	B9	34 %
Δ3	H3	26 %	H2	70 %

GFP			GFP-200	
Variante de promotor	Cepa Nº	Metanol RFU	Cepa Nº	Metanol RFU
Δ Adr1	A9	50 %	A2	56 %
Δ 4	C7	66 %	H9	71 %
Δ 5	38E6	28 %	D4	31 %
Δ Mat1MC	6C2	31 %	F6	32 %
Δ 6	37F5	79 %	H3	91 %
Δ 6*	E11	23 %	A5	40 %
Δ Gcr1	A9	60 %	A2	55 %
Δ 7	D12	38 %	A7	25 %
Δ QA-1F	7A3	61 %	E2	61 %
Δ QA-1Fzus	7A6	15 %	H7	25 %
Δ 8	E1	11 %	H1	17 %
Δ 9	3E5	23 %	A12	61 %
Δ 2 Δ 6	4B10	22 %	F3	21 %
Δ 736-41	5A7	8,8 %	C6	6 %
Δ 737-38	1G11	5,0 %	A3	8 %
Cepas de multicópias				
Δ 1-3	8B10	400 %		
Δ 6	37A3	650%		

Exemplo 5: Série de suficiência usando GFP

Para testar partes pequenas do promotor de *AOX1* em um sistema livre de quase todos os sítios de ligação a fator de transcrição, o promotor de *AOX1* foi cortado em uns poucos pares de bases em frente da caixa TATA, nas posições -176 e -194, o que resulta em elementos de promotor basais *AOX176* e *AOX194* (Tabela 21). Para permitir a clonagem subsequente de elementos de promotor em frente dos fragmentos de promotor basal, assim como a clonagem do promotor basal, um sítio de restrição de *Bsp*TI e um sítio de restrição de *Eco*RI foram inseridos na extremidade 5' e na extremidade 3', respectivamente.

Tabela 21: Sequência de elementos de promotor de *AOX1* basal *AXO176* e *AOX194* e de fragmentos de promotor 737 e 201 - 214, que serão adiciona-

dos em frente de variantes de promotor basal. Os sítios de restrição de *Bsp*-*TI* e de *EcoRI* estão sublinhados.

Nome	Seqüência (5' → 3')	SEQ ID Nº
AOX176	<u>CTTAAGGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCT-</u> GTCTTAAACCTTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCT- TACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAAT- TGACAAGCTTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACGACAAC- TGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTGAAAGAATTC	90
AOX194	<u>CTTAAGTGTTCTAACCCTACTTGACAGCAATATA-</u> TAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCT- TAAACCTTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCT- TACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAAT- TGACAAGCTTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACGACAAC- TGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTGAAAGAATTC	91
737	TAGCCTAACGTT	92
201-214	CATGATCAAAATTT	93

Clonagem:

Elementos de *AOX1* basais foram amplificados a partir de pAOX
5 (10 ng) usando-se iniciadores AOX1basalrv (Tabela 21, 10 pmols) e A-
OX1basalfwn (10 pmols, AOX194), respectivamente. PCR foi realizada u-
sando-se polimerase Phusion® (0,6 u) em condições apropriadas, em um
volume total de 50 µL.

A variante de promotor AOX176 - 737 foi amplificada por PCR
10 usando-se iniciadores AOX1basalrv e 737 - 38AOX176, conforme descrito
acima. A variante de promotor AOX176 - 201 - 214 foi amplificada por PCR,
usando-se iniciadores AOX1basalrv e 201 - 214AOX176, conforme descrito
acima.

Os produtos de PCR resultantes poderiam ser clonados para o
15 vetor pPICZ-GFP, empregando-se corte de restrição com *BglIII*/*EcoRI*, e liga-
ção usando-se DNA ligase de T4, por meio do que substituindo-se o promo-
tor de *AOX1* de tipo selvagem.

BglIII BspTI

EcoRI

AGATCTGAC TTAGCAGC GTCTTCTTT CTAACCTTC TTACCTTCA CATTCGCA ATATATAAT ATATTTCAG GATATACCA ATTC
TCTAGACCG AATTCTTAG CAGATGAAA GATTGAAAG AATGGAAT GTAACTGGT TATATATATA TTTAAGTTC CTATAGGCT TAG

Os 4 nucleotídeos Leu2basal1f, Leu2basal2f, Leu2basal1r e



Leu2basal2r (25 pmols de cada) foram misturados em um volume total de 20 μ L, aquecidos para 95°C durante 2 minutos e resfriados para a temperatura ambiente lentamente. 3 μ L da mistura foram ligados com 159 ng de um fragmento de *BglIII/EcoRI* de pPICZ-GFP, durante 6 horas, a 16°C. Depois de transformação em *E. coli*, o vetor resultante foi chamado de pLeu2basal-GFP.

A variante de promotor Leu2-737 foi amplificado por PCR usando-se iniciadores LEU2basalrv e 737-38Leu2 e pLeu2basal-GFP, como molde, conforme descrito acima. O produto de PCR resultante poderia ser clonado para o vetor pPICZ-GFP empregando-se corte de restrição com *BglIII/EcoRI* e ligação usando-se DNA ligase T4, por meio do que substituindo-se o promotor de *AOX1* de tipo selvagem. O plasmídeo resultante foi chamado de pLeu2-GFP-737.

Tabela 22: Iniciador para geração de elementos de promotor basal e construtos de suficiência

Nome	Seqüência (5'→3')	Seq ID No.
AOX1basalrv	TTTGAATTCTTTCAATAATTAGTTGTTTTTTG	94
AOX176fw	TTAGATCTCGACTTAAGGACAGCAATATATAAACAGAAG--GAAG	95
AOX1basalfwn	TTAGATCTCGACTTAAGTGTCTAACCCCTACTTGACAG	96
737-38AOX176	AAAGATCTTAGCCTAACGTTCTTAAGGACAGCAATATA-TAAACAGAAGGAAG	97
201-214AOX176	AAAGATCTCATGATCAAAATTTCTTAAGGACAGCAATA-TATAAACAGAAGGAAG	98
LEU2basal1f	GATCTCGACTTAAGCAATCGTCT-TACTTTCTAACTTTTCTTACCTTTTACATTTTCAG	99
LEU2basal2f	CAATATATATATATATTTCAAGGATATACCG	100
LEU2basal1r	AATTCGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCT-GAAATGTAAAG	101
LEU2basal2r	GTAAGAAAAGTTAGAAAGTAAGACGATTGCTTAAGTCGA	102
LEU2basalrv	GGTTGAATTCGGTATATCCTTG	103
737-38Leu2	AAAGATCTTAGCCTAACGTTCTTAAGCAATCGTCT-TACTTTCTAAC	104

Transformação, crescimento e detecção de GFP:

Para transformação de *Pichia pastoris*, todos os plasmídeos

forma linearizados por *Bam*HI. A transformação foi realizada conforme descrito no Exemplo 1. Depois de transformação e de uma fase de regeneração de 2 horas, as células foram plaqueadas em placas de agar de YPD-Zeo, contendo 100 µg/mL de zeocina.

- 5 O crescimento de *Pichia pastoris*, indução por metanol e medição de fluorescência de GFP foi feita exatamente conforme descrito no Exemplo 1.

Resultados e Discussão:

- 10 Esse experimento mostra que a adição de elementos pequenos identificados nos Exemplo 1 e 2, poderiam ser usados para aumentar a força de promotor de elementos de promotor basal derivados a partir do promotor de *AOX1* ou a partir do promotor de *LEU2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

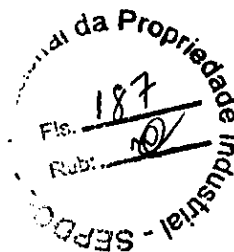
Cepas de multicópias:

- 15 A ocorrência e a frequência de cepas de multicópias, encontradas depois de transformação, são exatamente as mesmas que as descritas no Exemplo 4. O sítio de linearização diferente dentro do plasmídeo não teve qualquer influência sobre a geração de cepas de multicópias.

- 20 Tabela 23: Atividade de promotor de elementos de promotor basal sem e depois de adição de pequenos fragmento de promotor de *AOX1* que se supõe ajam como sítios de ligação a regulador. GFP fora usado como proteína de repórter. São mostradas cepas de cópia única, assim como cepas de multicópias.

	Cópia única		Multicópias	
	Desrepr. RFU	Metanol RFU	Desrepr. RFU	Metanol RFU
pAOX176-GFP	n.d.	22,1 ± 0,2	-	-
pAOX194-GFP	n.d.	16,9 ± 2,9	-	-
pAOX176-GFP-737	n.d.	21,2 ± 1,1	59 ± 6	265 ± 38
pAOX176-GFP-201-214	69,6 ± 6,0	44,9 ± 4,8	-	-
pLeu2basal-GFP	n.d.	11,3 ± 3,6	-	-
pLeu2-GFP-737	n.d.	19,2 ± 1,9	55 ± 5	138 ± 11

Referências:



- [1] Nakagawa, T., et al. (1999) *Yeast* 15(12), 1223-30.
- [2] Koutz, P., et al. (1989) *Yeast* 5(3), 167-77.
- [3] Ohi, H., et al. (1994) *Mol. Gen. Genet.* 243(5), 489-99.
- [4] Cregg, J. M., et al. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9(3), 1316-23.
- 5 [5] Nakagawa, T., et al. (2002) *Yeast* 19(12), 1067-73.
- [6] Sakai, Y., et al. (1998) *J. Bacteriol.* 180(22), 5885-5890.
- [7] Genu, V., et al. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270(11), 2467-2475.
- [8] Goedecke, S., et al. (1994) *Gene* 139(1), 35-42.
- [9] Tschopp, J. F., et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15(9), 3859-76.
- 10 [10] Parpinello, G., et al. (1998) *J. Bacteriol.* 180(11), 2958-67.
- [11] Alamae, T. et al. (1994) *Yeast* 10(11), 1459-66.
- [12] Inan, M. et al. (2001) *J. Biosci. Bioeng.* 92(6), 585-589.
- [13] Sreekrishna, K., et al. (1997) *Gene* 190(1), 55-62. [14] Romanos, M., et al. (1998) *Methods Mol. Biol.* 103(55-72).
- 15 [15] Quandt, K., et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23(23), 4878-84.
- [16] Ausubel, F. M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, 2003.
- [17] Corpet, F. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16(22), 10881-90.
- [18] Chenna, R. et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(13), 3497-500.
- 20 [19] Bennett, R P., et al. (1998) *BioTechniques* 24(3), 478-82.
- [20] Farinas, E T., et al. (2001) *Adv. Synth. Catal.* 343(6), 601-606.
- [21] Huie, M. A et al. (1996) *Yeast* 12(4), 307-17.
- [22] Lopez, M. C, et al. (1998) *PNAS U.S.A.* 95(24), 14112-7.
- [23] Zeng, X., et al. (1997) *Genetics* 147(2), 493-505.
- 25 [24] Del Vescovo, V., et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 338(5), 877-93.
- [25] Simon, M., et al. (1992) *Yeast* 8(4), 303-9.
- [26] Raschke, W. C, et al. (1996) *Gene* 177(1-2), 163-7.
- [27] Andrianopoulos, A. et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14(4), 2503-15.
- [28] Kwast, K. E., et al. (1998) *J. Exp. Biol.* 201 (Pt 8) (1177-95).
- 30 [29] Bourgarel, D., et al. (1999) *Mol. Microbiol.* 31(4), 1205-5.
- [30] Dang, V. D., et al. (1996) *J. Bacteriol.* 178(7), 1842-9.
- [31] Hahn, J. S. et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279(7), 5169-76.



[32] WO 02/081650

[33] Patente norte-americana de número 6.699.691

[34] Wang, W. et al. (1999) Biotechniques 26(4), 680-2.

[35] Morawski, B., et al. (2000) Protein Eng 13(5), 377-84.

5 [36] Weis, R., et al. (2004) FEMS Yeast Res. 5, 179-189.

crito no Exemplo 1. Depois de transformação e de uma fase de regeneração de 2 horas, as células foram plaqueadas em placas de agar de YPD-Zeo, contendo 100 µg/mL de zeocina.

O crescimento de *Pichia pastoris*, indução por metanol e medição de fluorescência de GFP foi feita exatamente conforme descrito no Exemplo 1.

Resultados e Discussão:

Esse experimento mostra que a adição de elementos pequenos identificados nos Exemplo 1 e 2, poderiam ser usados para aumentar a força de promotor de elementos de promotor basal derivados a partir do promotor de *AOX1* ou a partir do promotor de *LEU2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cepas de multicópias:

A ocorrência e a frequência de cepas de multicópias, encontradas depois de transformação, são exatamente as mesmas que as descritas no Exemplo 4. O sítio de linearização diferente dentro do plasmídeo não teve qualquer influência sobre a geração de cepas de multicópias.

Tabela 23: Atividade de promotor de elementos de promotor basal sem e depois de adição de pequenos fragmento de promotor de *AOX1* que se supõe ajam como sítios de ligação a regulador. GFP fora usado como proteína de repórter. São mostradas cepas de cópia única, assim como cepas de multicópias.

	Cópia única		Multicópias	
	Desrepr. RFU	Metanol RFU	Desrepr. RFU	Metanol RFU
pAOX176-GFP	n.d.	22,1 ± 0,2	-	-
pAOX194-GFP	n.d.	16,9 ± 2,9	-	-
pAOX176-GFP-737	n.d.	21,2 ± 1,1	59 ± 6	265 ± 38
pAOX176-GFP-201-214	69,6 ± 6,0	44,9 ± 4,8	-	-
pLeu2basal-GFP	n.d.	11,3 ± 3,6	-	-
pLeu2-GFP-737	n.d.	19,2 ± 1,9	55 ± 5	138 ± 11

Referências:

[I] Nakagawa, T., et al. (1999) Yeast 15(12), 1223-30.

- [2] Koutz, P., et al. (1989) *Yeast* 5(3), 167-77.
- [3] Ohi, H., et al. (1994) *Mol. Gen. Genet.* 243(5), 489-99.
- [4] Cregg, J. M., et al. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9(3), 1316-23.
- [5] Nakagawa, T., et al. (2002) *Yeast* 19(12), 1067-73.
- 5 [6] Sakai, Y., et al. (1998) *J. Bacteriol.* 180(22), 5885-5890.
- [7] Genu, V., et al. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270(11), 2467-2475.
- [8] Goedecke, S., et al. (1994) *Gene* 139(1), 35-42.
- [9] Tschopp, J. F., et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15(9), 3859-76.
- [10] Parpinello, G., et al. (1998) *J. Bacteriol.* 180(11), 2958-67.
- 10 [11] Alamae, T. et al. (1994) *Yeast* 10(11), 1459-66.
- [12] Inan, M. et al. (2001) *J. Biosci. Bioeng.* 92(6), 585-589.
- [13] Sreekrishna, K., et al. (1997) *Gene* 190(1), 55-62. [14] Romanos, M., et al. (1998) *Methods Mol. Biol.* 103(55-72).
- [15] Quandt, K., et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23(23), 4878-84.
- 15 [16] Ausubel, F. M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, 2003.
- [17] Corpet, F. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16(22), 10881-90.
- [18] Chenna, R. et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(13), 3497-500.
- [19] Bennett, R P., et al. (1998) *BioTechniques* 24(3), 478-82.
- 20 [20] Farinas, E T., et al. (2001) *Adv. Synth. Catal.* 343(6), 601-606.
- [21] Huie, M. A et al. (1996) *Yeast* 12(4), 307-17.
- [22] Lopez, M. C, et al. (1998) *PNAS U.S.A.* 95(24), 14112-7.
- [23] Zeng, X., et al. (1997) *Genetics* 147(2), 493-505.
- [24] Del Vescovo, V., et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 338(5), 877-93.
- 25 [25] Simon, M., et al. (1992) *Yeast* 8(4), 303-9.
- [26] Raschke, W. C, et al. (1996) *Gene* 177(1-2), 163-7.
- [27] Andrianopoulos, A. et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14(4), 2503-15.
- [28] Kwast, K. E., et al. (1998) *J. Exp. Biol.* 201 (Pt 8) (1177-95).
- [29] Bourgarel, D., et al. (1999) *Mol. Microbiol.* 31(4), 1205-5.
- 30 [30] Dang, V. D., et al. (1996) *J. Bacteriol.* 178(7), 1842-9.
- [31] Hahn, J. S. et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279(7), 5169-76.
- [32] WO 02/081650

- [33] Patente norteamericana de número 6.699.691
- [34] Wang, W. et al. (1999) *Biotechniques* 26(4), 680-2.
- [35] Morawski, B., et al. (2000) *Protein Eng* 13(5), 377-84.
- [36] Weis, R., et al. (2004) *FEMS Yeast Res.* 5, 179-189.

REIVINDICAÇÕES

1. Promotor isolado de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris*, caracterizado pelo fato de que consiste na sequência do promotor de AOX1 de *Pichia pastoris* do tipo selvagem como apresentada em SEQ ID NO: 1, em que os nucleotídeos 170 a 235 estão deletados; em que a deleção causa aumento da atividade de expressão comparada à do promotor tipo selvagem, sob condições de indução por metanol.

2. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada pelo fato de que consiste em:

10 pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante, como definido na reivindicação 1; e
pelo menos um ácido nucléico que codifica uma proteína, um peptídeo ou um ácido nucléico funcional, em que pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante e o pelo menos um ácido nucléico
15 estão ligados em conjunto de maneira operável, formando um cassete de expressão de cópia única ou de multicópias.

3. Vetor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante isolado, caracterizado pelo fato de que compreende
pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mu-
20 tante, como definido na reivindicação 1.

4. Célula de microrganismo transgênico, caracterizada pelo fato de que compreende
pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mu-
tante, como definido na reivindicação 1; ou
25 pelo menos uma molécula de ácido nucléico compreendendo pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante, como definido a reivindicação 1, e pelo menos um ácido nucleico que codifica uma proteína, um peptídeo ou um ácido nucleico funcional, em que o pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante e o pelo
30 menos um ácido nucleico estão ligados em conjunto de maneira operável, formando um cassete de expressão de cópia única ou de multicópias,
em que a célula de micro-organismo transgênico é uma célula

selecionado dentre o grupo consistindo em *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Toruplosis*.

5. Célula de micro-organismo transgênico, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que é uma célula de *Pichia pastoris*.

5 6. Kit para a expressão de uma proteína selecionada, caracterizado pelo fato de que compreende

um vetor compreendendo pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante como definido na reivindicação 1; ou

10 uma molécula de ácido nucleico compreendendo pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante como definido na reivindicação 1 e pelo menos um ácido nucleico que codifica uma proteína, um peptídeo ou um ácido nucleico funcional, em que o pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante e o pelo
15 menos um ácido nucleico estão ligados em conjunto de maneira operável, formando um cassete de expressão de cópia única ou de multicópias; e

uma célula capaz de expressar a referida proteína sob o controle do promotor,

em que a célula é uma célula selecionado dentre o grupo consistindo em *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Toruplosis*.

20 7. Kit, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula de *Pichia pastoris*.

8. Método para a expressão de uma proteína recombinante, peptídeo ou ácido nucléico funcional, em uma célula, caracterizado pelo fato de
25 que compreende as seguintes etapas:

- fornecimento de uma molécula de ácido nucléico compreendendo pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante como definido na reivindicação 1 e pelo menos um ácido nucleico que codifica uma proteína, um peptídeo ou um ácido nucleico funcional, em que o pelo
30 menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante e o pelo menos um ácido nucleico estão ligados em conjunto de maneira operável, formando um cassete de expressão de cópia única ou de multicó-

pias;

- transformação da referida célula com a referida molécula de ácido nucléico, e

- cultivo da célula transformada em um meio de cultura adequado,

5 em que a proteína recombinante é expressa,

em que a célula é uma célula selecionado dentre o grupo consistindo em *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Toruplosis*.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula de *Pichia pastoris*.

10 10. Método para a expressão de uma molécula de ácido nucleico para a expressão de uma proteína, peptídeo ou ácido nucléico funcional, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

- transformação de uma célula isolada com uma molécula de ácido nucléico compreendendo pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de

15 *Pichia pastoris* mutante como definido na reivindicação 1 e pelo menos um ácido nucleico que codifica uma proteína, um peptídeo ou um ácido nucleico funcional, em que o pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante e o pelo menos um ácido nucleico estão ligados em conjunto de maneira operável, formando um cassete de expressão de cópia

20 única ou de multicópias; ou

- fornecimento de uma célula isolada compreendendo pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante como definido

na reivindicação 1; e pelo menos uma molécula de ácido nucleico compreendendo pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia*

25 *pastoris* mutante como definido na reivindicação 1 e pelo menos um ácido nucleico que codifica uma proteína, um peptídeo ou um ácido nucleico funci-

onal, em que o pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pi-*

chia pastoris mutante e o pelo menos um ácido nucleico estão ligados em conjunto de maneira operável, formando um cassete de expressão de cópia

30 única ou de multicópias;

- cultivo da célula transformada em um meio de cultura adequado; e

- indução da expressão da referida proteína, peptídeo ou ácido nucleico fun-

cional,

em que a célula de micro-organismo transgênico é uma célula selecionado dentre o grupo consistindo em *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Toruplosis*.

11. Método para o isolamento de clones de superexpressão, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) introdução de uma molécula de ácido nucléico compreendendo um promotor induzível por metanol mutado como definido na reivindicação 1 ligado de maneira operável a um ácido nucléico e a um gene de marcação seletiva para formar um vetor de expressão de cópia única ou de multicópias compreendendo a referida molécula de ácido nucleico em uma célula;

b) transferência da célula para um meio compreendendo um marcador seletivo apropriado, uma fonte de carbono não repressora e metanol, para o crescimento seletivo de clones de superexpressão sob condições de indução;

c) incubação da célula no referido meio,

d) isolamento de uma colônia da célula; e

e) detecção de clones de superexpressão por determinação da taxa de expressão da referida célula,

em que a célula de micro-organismo transgênico é uma célula selecionado dentre o grupo consistindo em *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Toruplosis*.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o marcador seletivo compreende um antibiótico.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula de *Pichia pastoris*.

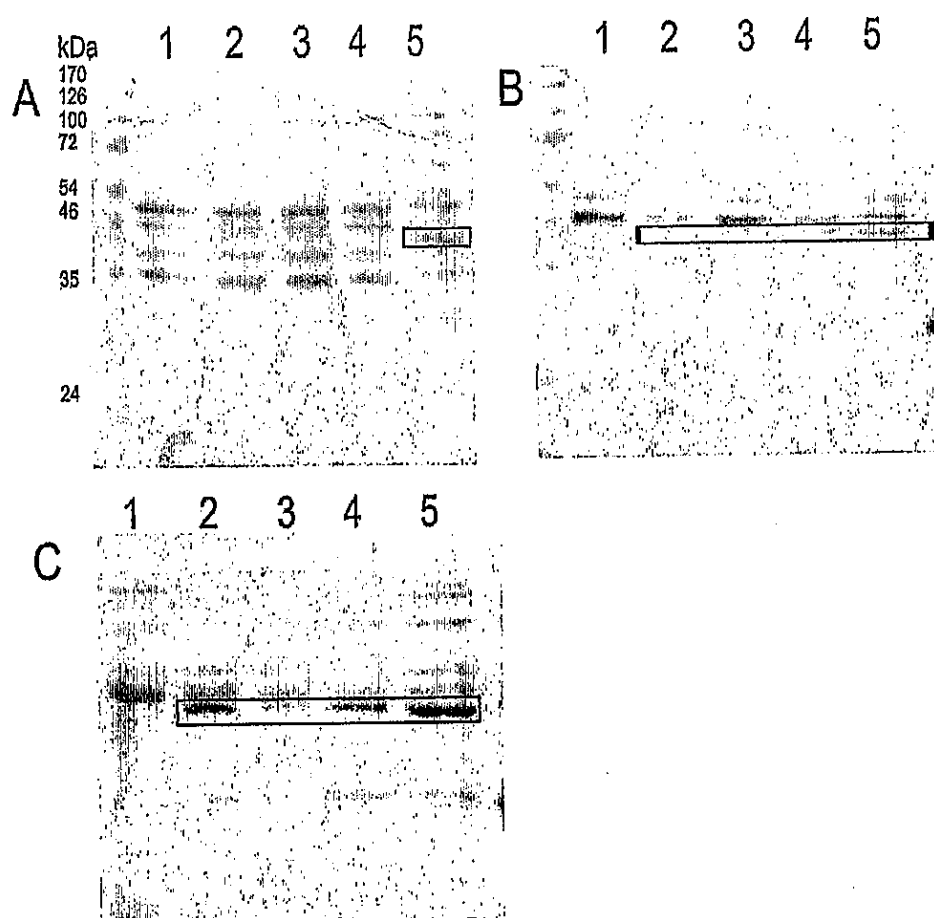
14. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a fonte de carbono não repressora é selecionada a partir do grupo consistindo em alanina, manitol, sorbitol, trealose e lactose.

15. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucléico é introduzida na célula por transformação, eletroporação, transformação química, fusão de protoplastos, ou bombardeamento com partículas.

16. Vetor de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente pelo menos um ácido nucleico que codifica uma proteína, um peptídeo ou um ácido nucleico funcional, em que o pelo menos um promotor de álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* mutante e o pelo menos um ácido nucleico estão ligados em conjunto de maneira operável, formando um cassete de expressão de cópia única ou de multicópias.

17. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a indução da expressão da referida proteína, peptídeo ou ácido nucleico funcional; e o isolamento da referida proteína expressa, peptídeo ou ácido nucleico funcional.

1/8

**Fig. 1**

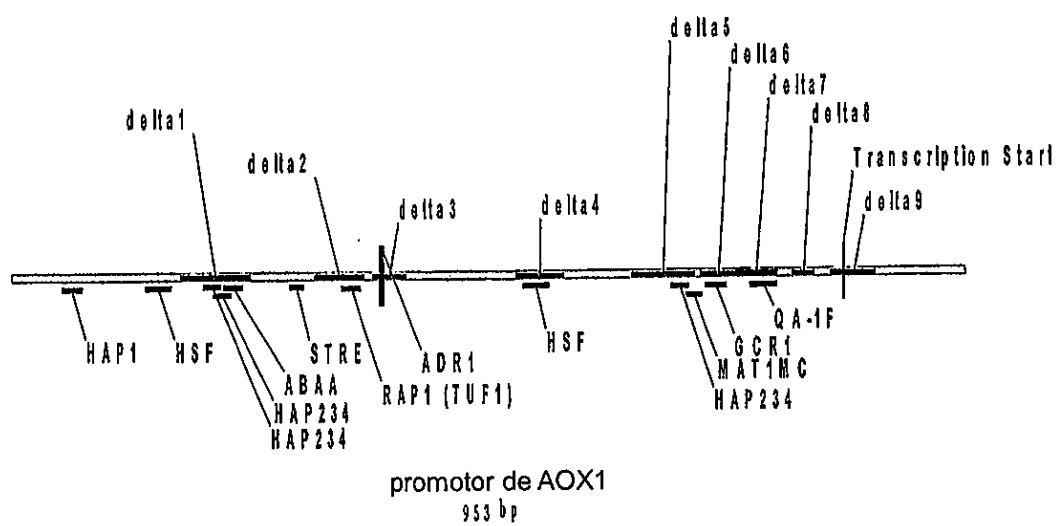
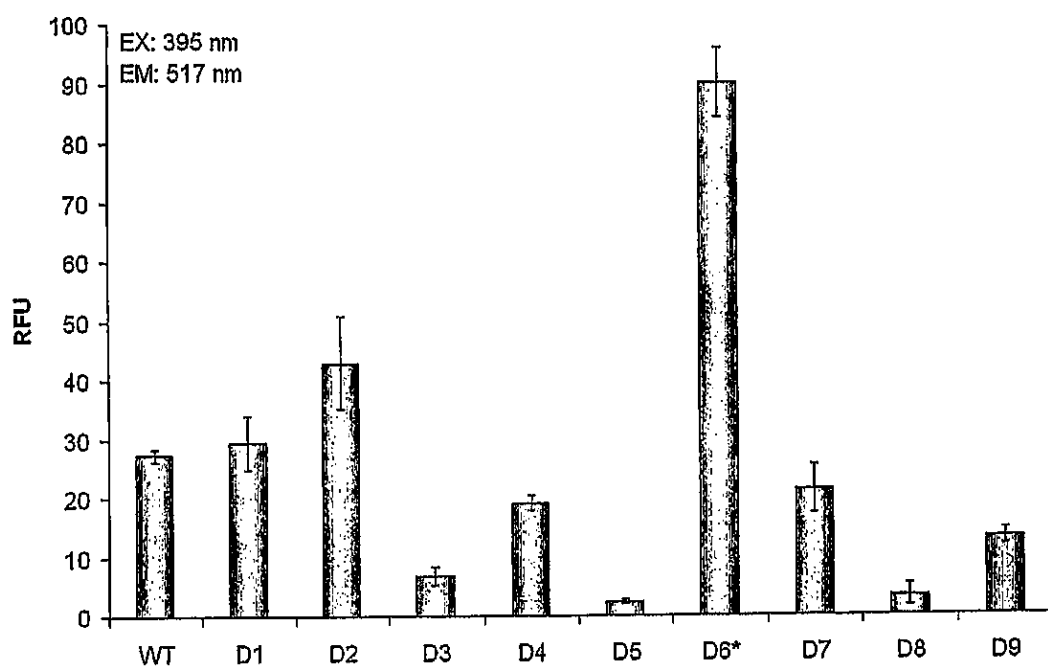
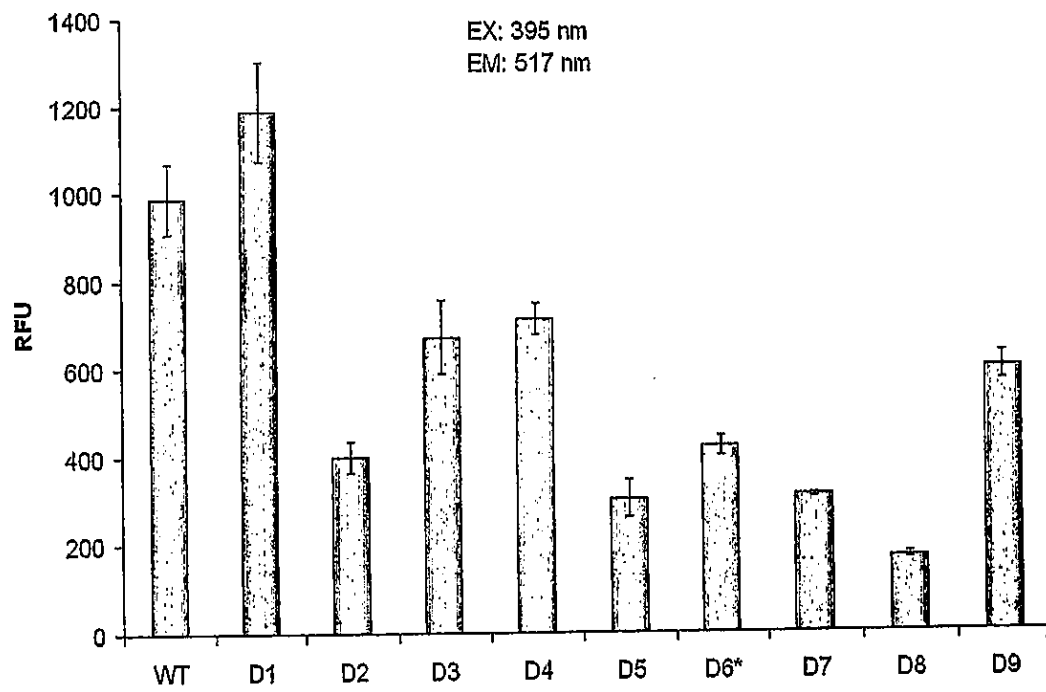


Fig. 2

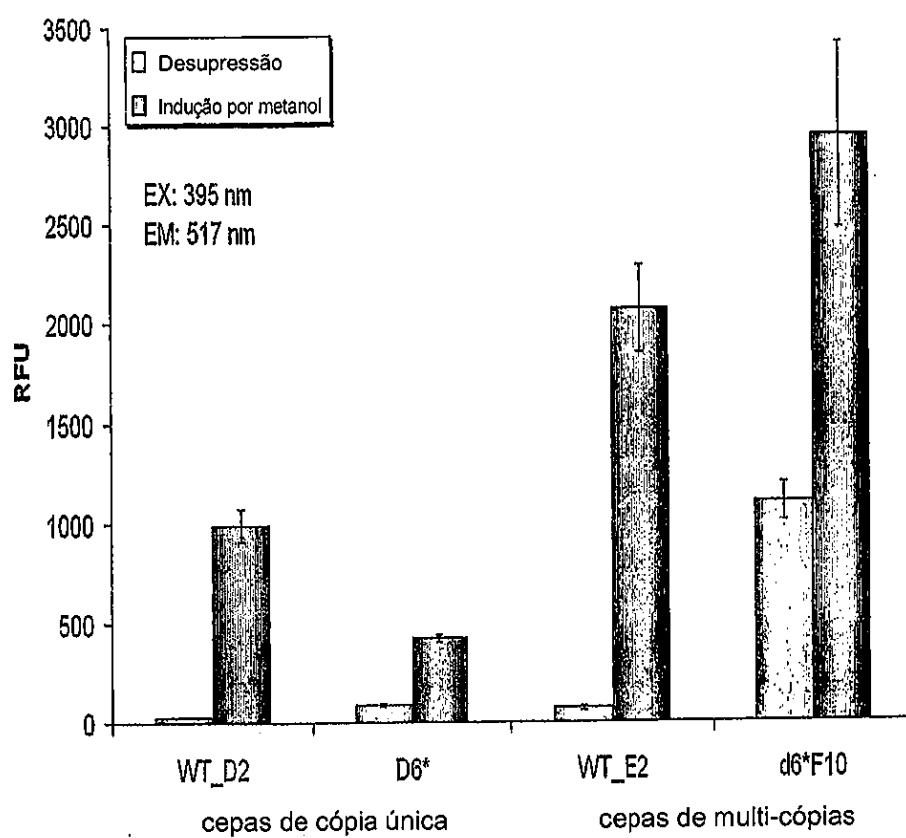
3/8

**Fig. 3**

4/8

**Fig. 4**

5/8

**Fig. 5**

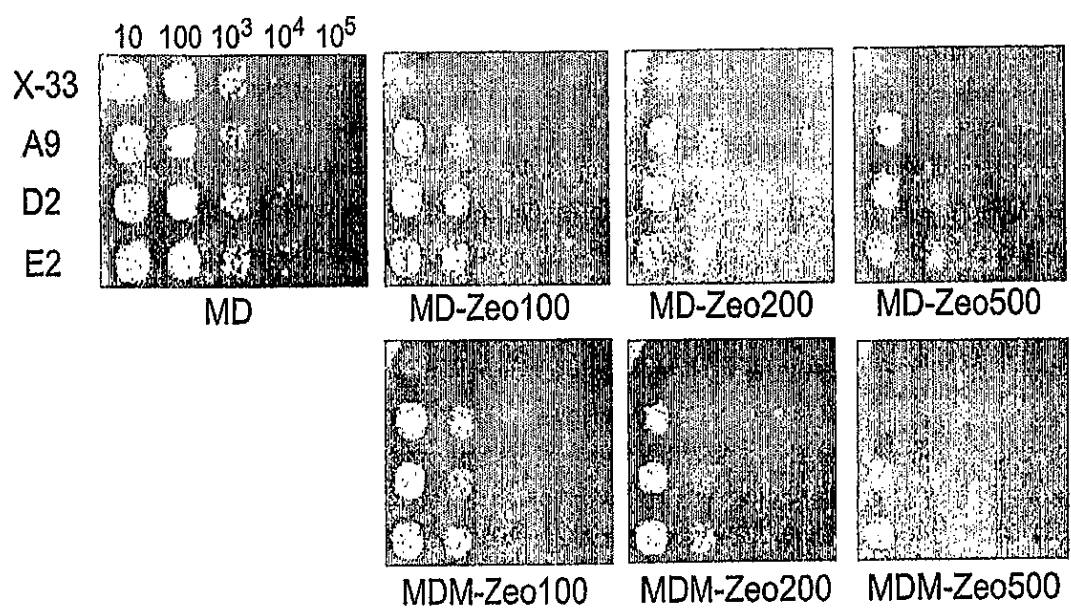
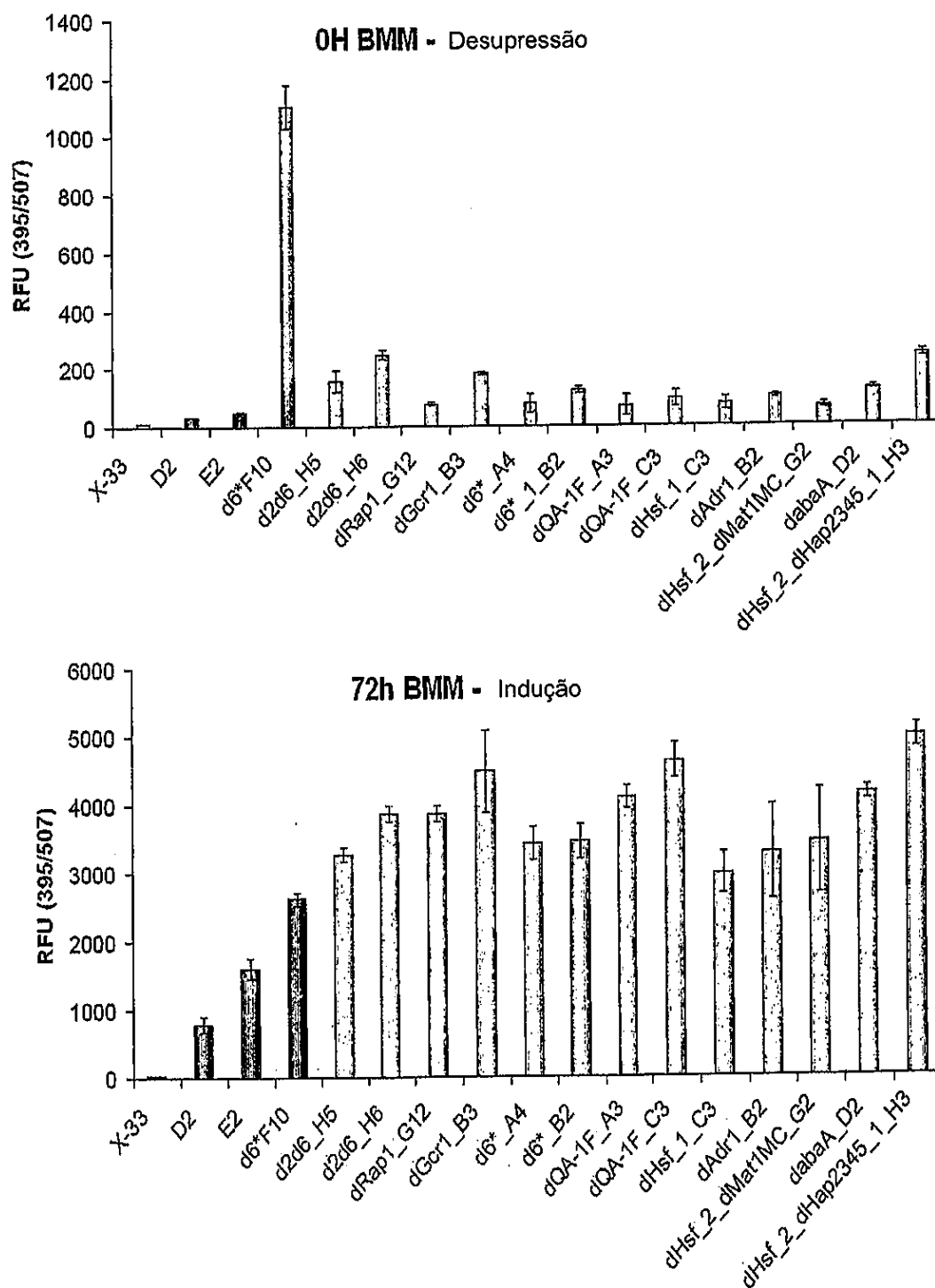
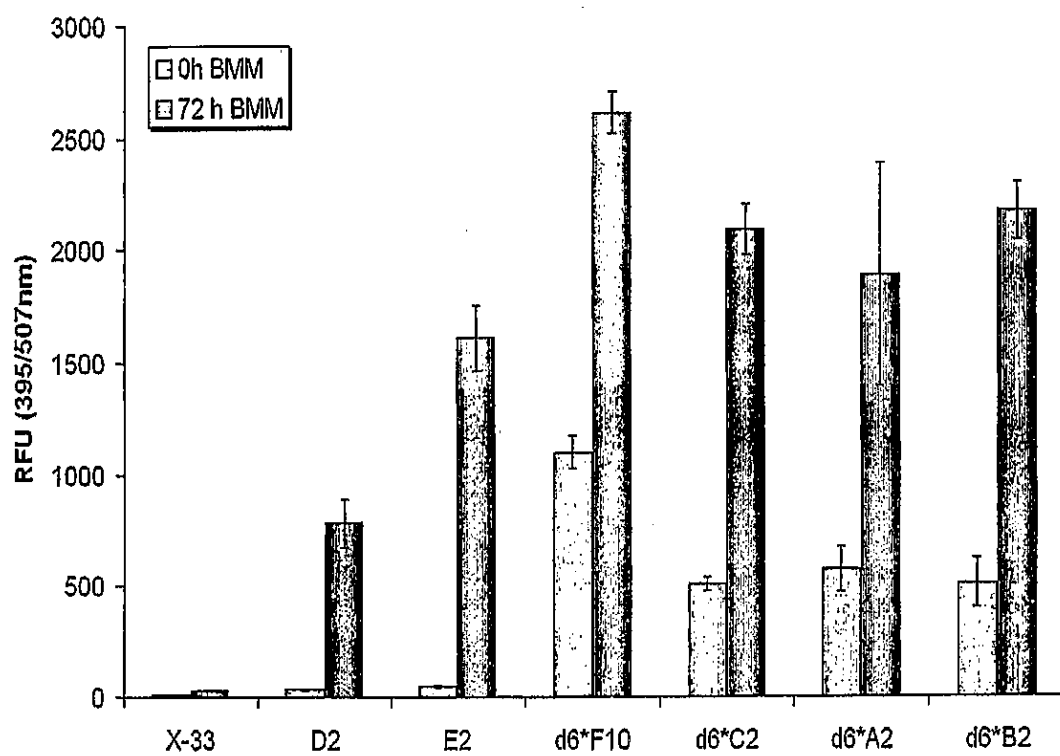


Fig. 6

7/8

**Fig. 7**

8/8

**Fig. 8**