


Protogenética



CITOGENÉTICA GENÉTICA MOLECULAR E MICROBIOLÓGICA
GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS
GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL
GENÉTICA HUMANA E MEDICINA
EVOLUÇÃO E GENÉTICA DAS POPULAÇÕES
DIFERENCIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO

SISTEMA DE RESPOSTA AO ÁCIDO OLEICO EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

ALTINO CHOUPINA

Escola Superior Agrária de Bragança, Departamento de Biologia,
Apartado 172, 5501-855 Bragança
E-mail: albracho@ipb.pt

1. INTRODUÇÃO

Os peroxissomas são organitos com membrana simples, que nos seres eucariotas intervêm em numerosas vias metabólicas (Lazarow e Fujiki, 1985). Nos peroxissomas encontram-se enzimas necessárias para a β -oxidação dos ácidos gordos, destacando-se também a presença de catalases que decompõem o H_2O_2 produzido neste processo. Estes organitos desempenham outras funções dependendo do organismo e do estado de diferenciação celular; dentro destas funções inclui-se a contribuição para a biogénese do colesterol e ácidos biliares em eucariotas superiores ou o crescimento dos organismos metanotróficos em metanol ou metil-aminas (Lazarow e Fujiki, 1985). Como reflexo desta flexibilidade metabólica está a capacidade de compartimentalização segundo as exigências das células.

Nos eucariotas superiores, os peroxissomas são induzidos por uma série de factores fisiológicos, como a aclimação ao frio, e pela dieta, como por exemplo, pela composição de ácidos gordos da mesma (Needergart *et al.*, 1990; Ishii *et al.*, 1990). Além disso, a administração de determinados medicamentos, plásticos, herbicidas e pesticidas produzem um aumento do tamanho e do número de peroxissomas e induzem a expressão de genes (Lock *et al.*, 1989; Green, 1992).

Os peroxissomas são essenciais para a sobrevivência do ser humano pois uma desordem genética chamada síndrome de Zellweger que se traduz numa falta de funcionalidade dos peroxissomas, é mortal (Goldfischer *et al.*, 1973; Lazarow e Mozer, 1989).

2. MECANISMOS DE REGULAÇÃO

Na levedura *S. cerevisiae*, os níveis de enzimas peroxissomais, assim como o número e o tamanho dos peroxissomas, são incrementados quando a levedura cresce num meio com ácidos gordos como única fonte de carbono (Veenhuis *et al.*, 1987). Recentemente foram caracterizadas duas proteínas, Oaf1 e Oaf2p, que actuam como reguladoras positivas de genes que codificam para proteínas peroxissomais (Karpichev *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1996). Oaf1 é um factor transcricional activado por oleato que foi purificado porque se une a UAS (Upstream Activating Sequences) em POX1, o gene que codifica para a enzima peroxissomal acil coenzima A oxidase nesta levedura (Luo *et al.*, 1996). Da união a estas sequências de DNA resulta uma activação do gene.

Uma segunda proteína, Oaf2p, foi caracterizada tendo-se comprovado que se trata de outro factor transcricional necessário para a resposta ao ácido oleico (Karpichev *et al.*, 1997). O gene OAF1 foi identificado por Rottensteiner *et al.* sendo designado PIP2 (Rottensteiner *et al.*, 1996).

A interrupção destes dois genes inibe a indução da proliferação de peroxissomas por oleato e a capacidade da levedura para crescer num meio com oleato como única fonte de carbono. Oaf1 e Pip2 apresentam uma identidade de 40%, com a máxima identidade no extremo amino, onde se encontra o motivo de união a DNA: Zn₂Cys₆ (Karpichev *et al.*, 1997).

As duas proteínas formam um complexo e unem-se aos UAS na forma de heterodímero (Karpichev *et al.*, 1997; Rottensteiner *et al.*, 1997). A sequência à qual se une o heterodímero contém dois tripletos **CGG** separados por 15-18 nucleótidos. A seguir a este «primer» **CGG**, as posições 1 e 2 são variadas, a 3 é **A/T**, a posição 4 é **T**, a 5 é **A/T** e a 6 é **A**. Estas sequências (Figura 1) encontram-se na região promotora de vários genes sendo denominadas ORE (Oleato Response Element) (Einerhand *et al.*, 1993; Filipits *et al.*, 1993).

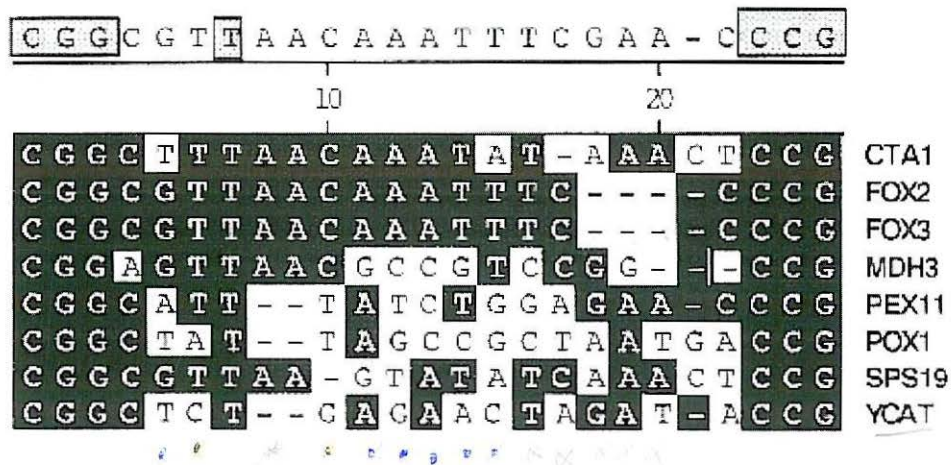


Figura 1 – Clustal dos ORE de diversos genes de *S.cerevisiae*.

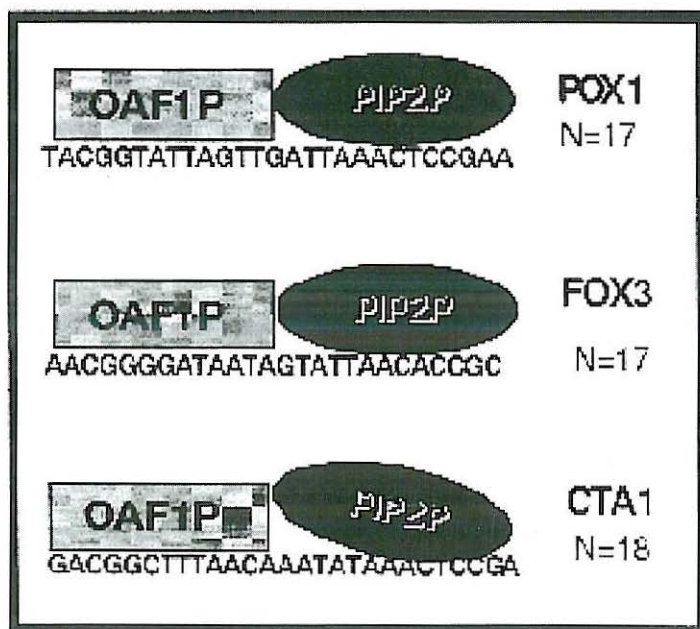


Figura 2 – Modelo da interação do heterodímero Oaf1-Pip2 com o DNA. No caso do gene CTA1, a separação (N) entre os tripletos CGG ao ser maior deve afectar a interacção.

Possivelmente as regiões flanqueantes dos ORE exercem influência na selectividade ou força de união de Oaf1 e Pip2. Assim por exemplo no caso de PPRE (sítio de união para o heterodímero PPAR-RXR, que actua na proliferação dos peroxissomas em mamíferos), as regiões flanqueantes jogam um papel importante na força de união e deste modo nos níveis de activação dos genes regulados por PPAR (Juge-Aubry *et al.*, 1997).

Várias proteínas peroxissomais são induzidas pelo oleato mas não apresentam ORE claros, como acontece com PXA1 (também chamado PAL1) que codifica para Pat2p, uma proteína transportadora de ATP, admitindo-se que possuam um processo de regulação diferente (Shani *et al.*, 1995; Swartzman *et al.*, 1996). A expressão de XA1 nas células crescidas com oleato é aproximadamente duas vezes mais alta que aquelas que são crescidas em glicerol. Resultados semelhantes foram obtidos com genes que apresentam ORE claros, tais como MDH3 que codifica para uma melato-desidrogenase peroxissomal.

Parece que os consensos ORE só são críticos para os genes mais fortemente induzidos por oleato (mais de 10 vezes) e que requerem tanto Oaf1 como Pip2, de forma que uma pequena indução não é regulada de forma tão clara. Nestes genes, a presença de Oaf1 ou Pip2 é suficiente para levar a cabo a indução por oleato, enquanto que na ausência de ambos esta indução parece ser desnecessária.

No caso do gene CAT1, que codifica para uma catalase peroxissomal, a regulação difere do explicado anteriormente. Para que se produza indução deste gene é necessário Oaf1 mas não Pip2, tendo-se verificado que a expressão de CAT1 é mais elevada na estirpe pip2 Δ que na estirpe oaf1 Δ ou na que possui as duas interrupções 3 (Figura 3). Isto sugere que Oaf1p por si só é capaz de mediar a activação transcripcional de CAT1, talvez pela formação de um complexo com outras proteínas não identificadas.

Por último, foram identificados alguns genes que não são de peroxissomas, como uma citrato-sintetase da mitocôndria, que são estimulados na presença de oleato, intervindo no processo Oaf1 e Pip2. Este é um exemplo de factores que são necessários para a proliferação dos peroxissomas que regulam a expressão de proteínas heterólogas (Rodríguez *et al.*, 1994).

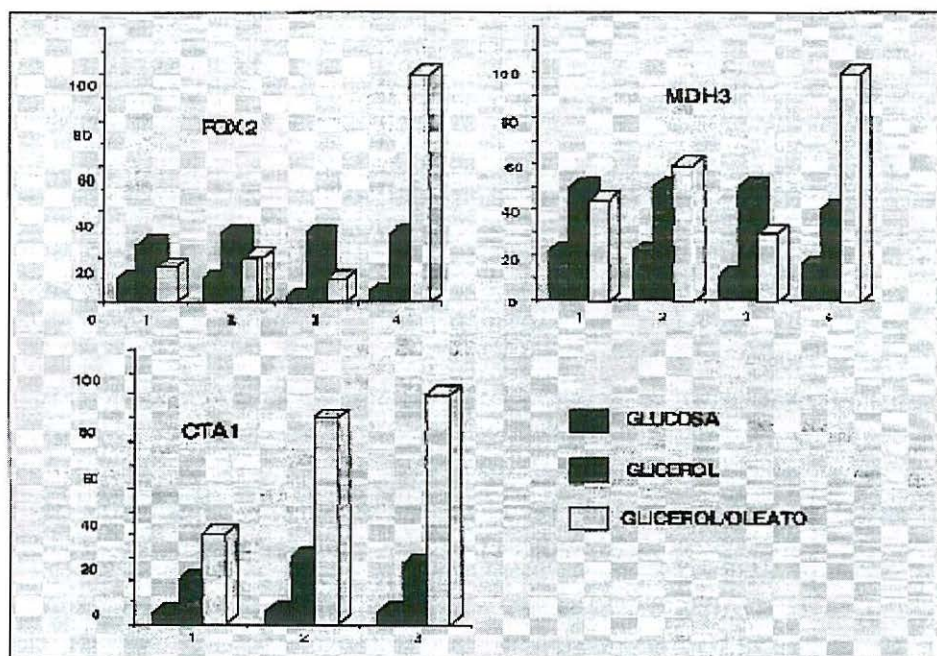


Figura 3 – Análise da expressão, por determinação da quantidade de RNA, de três genes de *S.cerevisiae* crescidas em diferentes meios (com glucose, com glicerol e com glicerol e oleato). 1 - estirpe Oaf1Δ, 2 - PipΔ, 3 - estirpe com dupla interrupção e 4 - estirpe selvagem.

BIBLIOGRAFIA

- CHOUPIA, A., F. GONZÁLEZ, M. MORIN, F. BURGUILLO, E. FERMINAN e A. DOMINGUEZ (1999). The lipase system of *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genet.* 35: 297.
- DOMINGUEZ A., FERMINÁN E., SÁNCHEZ M., GONZÁLEZ FRANCISCO J., PÉREZ-CAMPO M. F., GARCÍA S., HERRERO A. B., SAN VICENTE A., CABELLO J., PRADO M., IGLESIAS F. J., CHOUPIA A., BURGUILLO F. J., FERNANDEZ-LAGO I., LÓPEZ M. C. (1998). Non-conventional yeast as host for heterologous protein production. *Internati. Microbiol.* 1: 131-142.
- EINERHAND A. W. C., W. T. KOS, B. DISTEL e H. F. TABAK (1993). Characterization of a transcriptional control element involved in proliferation of peroxisomes in yeast in response to oleate. *Eur. J. Biochem.* 214: 323-331.
- FILIPITS M., SIMON M. M., RAPATZ W., HAMILTON B., RUIS H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequences mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene* 132: 49-55.
- GOLDFISCHER S., MORE C. L., JOHNSON A. B., SPIRO A. J., VALSAMIS M. P., WISNIEWSKI H. K., RITCH R. H., NORTON W. T., RAPIN I., GARTNER L. M. (1973). Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science* 182: 62-64.
- GREEN (1992). Receptor-mediated of peroxisome proliferation. *Biochem. Pharmacol.* 43: 393-401.
- ISHII H., FUJIMORI N., HORIE S., SUGA T. (1990). Effect of fat content in the diet on hepatic peroxisomes of rat. *lochim. Biophys. Acta* 617: 1-11.
- JUGE-AUBRY C., PERNIM A., FAVEZ T., BURGER A. G., WAHLI W., MEIER C. A., DESVERGNE B. (1997). DNA binding properties of peroxisome proliferation activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferation response elements. *J. Biol. Chem.* 272: 25252-25259.
- KARPICHEV I. V., LUO Y., MARIANS R. C., SMALL G. M. (1997). A complex containing two transcription factor regulates peroxisomes proliferation and coordinate induction β -oxidation enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17: 69-80.
- LAZAROW P. B., FUJIKI H. W. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1: 489-530.
- LAZAROW P. B., MOSER H. W. (1989). Disorders of peroxisomal biogenesis pp. 1479-1509 in C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle (ed) the metabolic basis of inherited. Macgraw-hill Co New York.
- LOCK E. A., MITCHELL A. M., ELCOMBE C. R. (1989). Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxime proliferation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 145-163.
- LUO Y., KARPICHEV I. V., KOHANSKI R. A., SMALL G. M. (1996). Purification, identification and properties of *Saccharomyces cerevisiae* oleate activated upstream activating sequence-binding protein that is involved in the activation of POX2. *J. Biol. Chem.* 271: 12068-12075.
- NEEDERGARD J., ALEXSON S., CANNON B. (1990). Cold adaptation in the rat: increased brown fat peroxisomal β -oxidation relative to maximal mitochondrial oxidation capacity. *Am. J. Physiol.* 239: 208-216.
- RODRÍGUEZ J. C., GIL-GÓMEZ G., HEGARDT F. G., HARO D. (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J. Biol. Chem.* 269: 1867-1877.

- ROTTENSTEINER, H., A. J. KAL, M. FILIPITS, M. BINDER, B. HAMILTON, H. F. TABAK, and H. RUTS (1996). Pip2p: a transcriptional regulator of peroxisome proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo. J.* 15: 2924-34.
- ROTTENSTEINER, H., A. J. KAL, B. HAMILTON, H. F. TABAK (1997). A heterodimer of the Zn₂Cys₆ transcription factor Pip2 and Oaf1 controls induction of genes encoding peroxisomal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 247: 776-783.
- SHANI N., P. A. WALKINS, D. VALLE (1995). PXA12-6016, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of human adrenoleukodystrophy gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6012-6016.
- SWARTZMAN E. E., M. N. VISWANATHAN, J. THORNER (1996). The PAL1 gene product is a peroximal ATP-cassette transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 132: 549-563.
- VAN DER WALT, J. P. e J. A. VON ARX (1980). The yeast genus *Yarrowia* gen.nov. *Antonie van Leeuwenboek* 46: 517-521.
- VEENHAM M., METEBLOWSKI M., KUNAV W. H., HARDER W. (1987). Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yaest* 3: 77-84.