



Daniela Filipa Tavares Serrano

Licenciada em Química Aplicada

**Identificação de alterações no perfil proteómico
de uma estirpe industrial mutante,
Saccharomyces cerevisiae PYCC 5334, capaz de
consumo simultâneo de glucose e maltose**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientadora: Prof. Doutora Madalena Salema Oom, Investigadora,
UCIBIO-REQUIMTE – FCT/UNL
Professora Associada, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas
Moniz

Co-orientadora: Prof. Doutora Maria Gabriela Almeida, Investigadora,
UCIBIO-REQUIMTE – FCT/UNL
Professora Associada, Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas
Moniz

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares
Arguente: Prof. Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo Gonçalves
Vogal: Prof. Doutora Madalena Salema Oom



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

setembro 2017

Daniela Filipa Tavares Serrano

Licenciada em Química Aplicada

**Identificação de alterações no perfil proteómico de
uma estirpe industrial mutante, *Saccharomyces
cerevisiae* PYCC 5334, capaz de consumo simultâneo
de glucose e maltose**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientadora: Prof. Doutora Madalena Salema Oom,
Investigadora, UCIBIO-REQUIMTE – FCT/UNL
Professora Associada, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

Co-orientadora: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida,
Investigadora, UCIBIO-REQUIMTE – FCT/UNL
Professora Associada, Instituto Superior de Ciências de Saúde Egas Moniz

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares
Arguente: Prof. Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo Gonçalves
Vogal: Prof. Doutora Madalena Salema Oom

setembro 2017

Identificação de alterações no perfil proteómico de uma estirpe industrial mutante, *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 5334, capaz de consumo simultâneo de glucose e maltose

Copyright © Daniela Filipa Tavares Serrano, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero prestar os meus agradecimentos à minha orientadora, Professora Doutora Madalena Salema-Oom, pela oportunidade e confiança depositada em mim. Agradeço toda a disponibilidade e auxílio prestado ao longo deste trabalho, os valiosos conselhos e todo o conhecimento que me transmitiu e que permitiu a execução desta tese da melhor forma possível.

Agradeço igualmente à minha co-orientadora, Professora Doutora Maria Gabriela Almeida, pela oportunidade concebida e pela sua contribuição e apoio indispensáveis para a realização desta dissertação. Obrigada por toda a compreensão ao longo deste ano de trabalho, pelos conselhos e partilha de conhecimentos.

À Mestre Joana Sousa, um agradecimento especial, por ter sido incansável em tudo! Por me ter transmitido conhecimento fundamental sobre proteómica, pela sua orientação ao nível da bancada, pela profunda dedicação, disponibilidade e paciência, companheirismo e motivação e por toda a preocupação demonstrada ao longo do trabalho. Muito obrigada pelo teu apoio!

À Doutora Célia Silveira pela sabedoria transmitida, conselhos assertivos e ajuda prestada em diversas ocasiões e ao Mestre Tiago Monteiro pela sua disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Aos membros do laboratório 305 pela ajuda prestada em diversas tarefas do quotidiano, em especial à Cláudia Carvalho pela sua simpatia, auxílio laboratorial, pelo apoio prestado na área da microbiologia e por se demonstrar sempre disponível para algo que fosse preciso.

Gostaria de agradecer à Ana Fernandes pela sua preciosa ajuda na parte inicial do trabalho de bancada na área da proteómica e pelos conselhos que guardei até ao final desta dissertação.

À Oleksandra Zabolotnya agradeço todo o apoio e amizade ao longo destes dois últimos anos, em especial durante a realização desta tese. Obrigada pelas horas de almoço e pelos cafés, pelos desabafos, pelas conversas, pelas risadas e pelas distrações nas horas mais complicadas. Sem ti este ano teria sido muito mais difícil de superar. Tornaste-te uma grande amiga!

Não posso deixar de mencionar um grande amigo que o mestrado me deu, Telmo Pereira. Obrigada pela paciência, por me aturares e pela tua amizade. E pelas maravilhosas cerejas, claro! Acredita que foste das melhores pessoas que conheci nos últimos tempos.

Às minhas queridas amigas Inês Saraiva, Marina Bento, Marta Silva e Vanessa Almeida por tornarem estes últimos cinco anos tão marcantes e especiais. Obrigada pelos bons momentos e boa disposição que nos acompanham desde praticamente o primeiro dia de licenciatura, pela amizade verdadeira, por todo o apoio, paciência e compreensão nos momentos mais difíceis e por estarem sempre presentes. A vossa amizade foi sem dúvida das melhores coisas que a FCT me deu!

À minha amiga de sempre e para sempre, Catarina Silva, por me acompanhar ao longo de todas as etapas da minha vida. Obrigada pelo apoio e preocupação demonstrada desde sempre, mas sobretudo, muito obrigada pela amizade incondicional e por seres tão especial para mim.

Aos meus queridos pais, um obrigado do tamanho do mundo. Pelo amor, carinho e apoio incondicional, por estarem sempre presentes nos bons e principalmente nos maus momentos, por toda a paciência, compreensão e incentivo, por todos os valores que me transmitiram e por tornarem tudo isto possível! Obrigada por tudo!

Por fim agradeço aos meus avós, que infelizmente já não estão presentes para assistir ao terminar desta etapa, mas que certamente estariam orgulhosos pelas conquistas da neta e a quem dedico esta dissertação.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente para que a realização desta tese fosse possível e que me acompanharam ao longo destes últimos anos, o meu mais sincero obrigado!

RESUMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) é capaz de fermentar substratos industriais, tais como hidrolisados de amido, os quais são compostos por açúcares como a maltose e a glucose. No entanto, devido ao efeito repressivo pela glucose no metabolismo de fontes alternativas de carbono, todos os outros açúcares fermentáveis permanecem não utilizados pela levedura, até que a glucose no meio seja totalmente consumida. Para melhorar o desempenho fermentativo de *S. cerevisiae* em processos industriais, foi obtido anteriormente, por tratamento mutagénico aleatório por UV, um mutante designado PYCC 5334, capaz de co fermentar a glucose e a maltose. A caracterização do mutante mostrou que o fenótipo desreprimido desta estirpe resultou de uma falha nas vias de indução e repressão, cuja extensão apenas pode ser avaliada por abordagens de rastreio global, como é o caso da proteómica.

Assim, neste trabalho, pretendeu-se identificar proteínas diferencialmente expressas entre a estirpe selvagem PYCC 5297 e as estirpes mutantes diploide PYCC 5334 e haploide PYCC 5334-6 de *S. cerevisiae* através de uma análise proteómica baseada em eletroforese bidimensional (2DE) acoplada a técnicas de espetrometria de massa (MS). As estirpes estudadas foram crescidas em glucose e recolhidas em final da fase exponencial. Os extratos proteicos totais foram analisados por 2DE, num gradiente de pH 4-7. Os géis 2D das frações proteicas das estirpes PYCC 5297, PYCC 5334 e PYCC 5334-6 apresentaram um total de 697, 616 e 586 *spots* de proteína, respetivamente. Curiosamente, os perfis proteicos de PYCC 5297 e PYCC 5334 mostraram-se bastante distintos, identificando-se apenas 53 *spots* comuns. Por outro lado, os proteomas de PYCC 5297 e PYCC 5334-6 revelaram-se muito semelhantes e após a sua avaliação estatística foi possível quantificar 45 *spots* diferenciais. Foram identificadas 16 proteínas por MS. Destas, encontraram-se proteínas diferencialmente expressas com funções importantes na resposta ao *stress* e em processos do metabolismo energético, tanto na fermentação como na respiração.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Desrepressão; Eletroforese Bidimensional; Metabolómica.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) is able to ferment industrial substrates like starch hydrolysates, which are composed of sugars like maltose and glucose. However, due to the repressive effect by glucose in the metabolism of alternative carbon sources, all other fermentable sugars remain unused by the yeast until glucose has been depleted. In order to improve fermentation performance, a mutant was previously obtained by a random UV mutagenesis, designated PYCC 5334, with the ability to co-ferment glucose and maltose. Previous characterization of the mutant showed that the derepressed phenotype of this strain resulted from a failure in the induction and repression pathways, whose extension can only be assessed by global screening approaches such as proteomics.

In this context, we aim to identify proteins differentially expressed between *S. cerevisiae*'s wild type PYCC 5297 and mutant strains PYCC 5334 and PYCC 5334-6 by proteomic analysis based on two-dimensional electrophoresis (2DE) coupled to mass spectrometry techniques (MS). The wild type and the derepressed mutants were grown on glucose and collected at the end of the exponential phase. The soluble fractions were analysed by 2DE in the pH range 4-7. The 2D gels of the total protein fractions of PYCC 5297, PYCC 5334 and PYCC 5334-6 strains showed 697, 616 and 586 spots, respectively. Interestingly, protein profiles of PYCC 5297 and PYCC 5334 displayed significant differences, with only 53 common spots. On the other hand, the PYCC 5297 and PYCC 5334-6 proteomes showed many similarities and after protein matching and statistical validation, 45 differential spots were detected. Sixteen proteins were identified by MS. Between those proteins, we found differentially expressed proteins with important functions in the stress response and energy metabolism processes, both in fermentation and in respiration.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Derepression; 2D Electrophoresis; Metabolomics.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice de Figuras.....	xv
Índice de Tabelas.....	xvii
Lista de abreviaturas e acrónimos.....	xix
1. Introdução.....	1
1.1. Aplicações biotecnológicas de leveduras.....	1
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.2.1. Fermentação alcoólica	4
1.2.2. Metabolismo de <i>S. cerevisiae</i>	5
1.2.1.1. Metabolismo da glucose	6
1.2.1.1.1. Proteínas transportadoras de hexose (HXT)	6
1.2.1.2. Repressão por glucose em <i>S. cerevisiae</i>	7
1.2.1.3. Metabolismo da maltose.....	10
1.3. Estudos proteómicos.....	12
1.3.1. 2D-PAGE	13
1.3.2. Proteómica em <i>S. cerevisiae</i>	15
1.4. Contextualização do trabalho e objetivos.....	18
2. Materiais e Métodos.....	19
2.1. Reagentes	19
2.2. Equipamentos	19
2.3. Microrganismos.....	20
2.4. Meios de cultura e crescimentos.....	20
2.5. Análise do consumo de açúcares por HPLC.....	21
2.6. Análise proteómica das estirpes de <i>S. cerevisiae</i>	21
2.6.1. Preparação da amostra.....	21
2.6.2. Quantificação de proteína	21
2.6.3. Eletroforese bi-dimensional (2D).....	22
2.6.3.1. Reidratação das <i>strips</i>	22

2.6.3.2.	1ª Dimensão: Focagem isoelétrica (IEF)	22
2.6.3.3.	Equilíbrio das <i>strips</i> de IPG	22
2.6.3.4.	2ª Dimensão: SDS-PAGE.....	22
2.6.3.5.	Coloração do gel	23
2.6.3.6.	Análise dos géis 2D.....	23
2.6.3.7.	Análise dos <i>spots</i> de interesse – Análise por Espetrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF)	23
2.7.	Replicados realizados para a análise proteómica	24
3.	Resultados e Discussão	25
3.1.	Crescimento celular e consumos de açúcares	25
3.2.	Análise proteómica	29
3.2.1.	Quantificação de proteína	29
3.2.2.	Eletroforese 2D	30
3.3.	Identificação de proteínas por Espetrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF)	34
4.	Conclusões e Perspetivas futuras.....	43
5.	Referências Bibliográficas	45
6.	Apêndice.....	xxi
	Apêndice 1.....	xxi
	Apêndice 2.....	xxii

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Via de fermentação alcoólica (Adaptado de Glazer & Nikaido 2007).	5
Figura 1.2 - Via de repressão pela glucose mediada pela proteína cinase Snf1. Snf1 é ativado na forma fosforilada pelas proteínas Sak1, Tos3 e Elm1. Rgt1 é responsável pela sua desfosforilação. O mecanismo de detecção de glucose, onde Hxk2 parece desempenhar um papel importante, ativa a proteína fosfatase Glc7-Reg1 para desencadear a desfosforilação de Snf1. Na sua forma ativa, Snf1-Snf4 liga-se a cada uma das três subunidades β , adquirindo especificidade diferencial para localização e fosforilação alvo. Após o esgotamento de glucose, o complexo Snf1-Gal83 entra no núcleo para desencadear a desrepressão através da ativação dos fatores de transcrição Adr1, Sip4 e Cat8 e inativação de Mig1, desalojando a sua interação com Hxk2 e promovendo a sua localização citosólica por fosforilação. Estes acontecimentos levam à expressão de uma ampla gama de genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de carbono (Adaptado de Conrad <i>et al.</i> , 2014).	9
Figura 1.3 – Via de detecção da glucose Snf3-Rgt2. (a) A ligação da glucose aos sensores Snf3/Rgt2 recruta Mth1 e Std1 para a membrana plasmática onde são fosforilados por Yck1,2. Esta fosforilação visa a ubiquitinação por Grr1 e a degradação pelo proteossoma, permitindo que Rgt1 seja fosforilado por PKA. Uma vez fosforilado, Rgt1 transforma-se num ativador para a expressão de genes <i>HXT</i> . (b) Na ausência de glucose, Mth1 e Std1 não são fosforilados, o que faz com que não sejam degradados e entrem no núcleo para reprimir a expressão dos genes <i>HXT</i> (Adaptado de Conrad <i>et al.</i> , 2014).	10
Figura 1.4 – Esquema representativo do princípio de eletroforese 2D acoplada à espectrometria de massa. A primeira etapa compreende a preparação da amostra, na qual é realizada a extração do material proteico das amostras biológicas (A). De seguida, as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico – focagem isoelétrica (B), e em seguida de acordo com as suas massas moleculares numa eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) (C). Após a detecção das proteínas no gel e a sua análise quantitativa para a detecção dos <i>spots</i> de interesse, as proteínas correspondentes são excisadas, digeridas enzimaticamente (geralmente com tripsina) e os péptidos resultantes são eluídos e analisados por espectrometria de massa, de modo a identificar e caracterizar as proteínas em questão (D) (Adaptado de Rabilloud & Lelong 2011).	14
Figura 1.5 – Mapa do gel 2D que evidencia as proteínas identificadas a partir de células da estirpe S288C crescidas a baixa densidade em meio rico com glucose, resultado dos estudos de Garrels <i>et al.</i> , 1997 (Adaptado de Garrels <i>et al.</i> , 1997).	17
Figura 3.1 – Curvas de crescimento das células de <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5334 (●) e PYCC 5334-6 (◆) em meio YP. Em (A) foi realizado um pré-inóculo em 2% glucose, seguido de transferência para meio contendo 2% glucose e 2% maltose; em (B) foi realizado um pré-inóculo em 2% maltose, seguido de transferência para meio contendo 2% glucose e 2% maltose; em (C) foi realizado um pré-inóculo em 2% glucose, seguido de transferência para meio contendo 2%	

glucose e 2% galactose e em (D) foi realizado um pré-inóculo em 2% galactose, seguido de transferência para meio contendo 2% glucose e 2% galactose.26

Figura 3.2 – Consumos dos açúcares glucose (■), maltose (◆) e galactose (●) da estirpe PYCC 5334-6 em meio YP. Na primeira experiência a estirpe foi pré-inoculada em 2% de glucose (A) ou 2% de maltose (B) e em seguida transferida para um meio contendo a mistura contendo 2% de glucose e 2% de maltose; na segunda experiência a estirpe foi pré-inoculada em 2% de glucose (C) ou 2% de galactose (D) e em seguida transferida para um meio contendo uma mistura de 2% de glucose e 2% de galactose.....28

Figura 3.3 – Mapas de géis 2D dos extratos proteicos totais de células das estirpes (A) selvagem PYCC 5297, (B) mutante diploide PYCC 5334 e (C) mutante haploide PYCC 5334-6 de *S. cerevisiae*, onde MW significa massa molecular relativa. As proteínas (250 µg) foram separadas em *strips* de IPG de 13 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagens obtidas no *software* Melanie 7.0.].....31

Figura 3.4 – Mapas de géis 2D dos extratos proteicos totais de células (A) da estirpe selvagem PYCC 5297 e (B) da estirpe mutante diploide PYCC 5334 de *S. cerevisiae*, onde MW significa massa molecular relativa. As proteínas (250 µg) foram separadas em *strips* de IPG de 13 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os *spots* assinalados correspondem a *spots* comuns às duas estirpes. [imagens obtidas no *software* Melanie 7.0.].....32

Figura 3.5 – Mapas dos géis 2D dos extratos proteicos totais de células da estirpe selvagem PYCC 5297 de *S. cerevisiae*, evidenciando: (A) *spots* sobre expressos e (B) *spots* exclusivos nesta estirpe. Nas imagens, MW significa massa molecular relativa. As proteínas (250 µg) foram separadas em *strips* de IPG de 13 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagens obtidas no *software* Melanie 7.0.].....33

Figura 3.6 – Mapas dos géis 2D dos extratos proteicos totais de células da estirpe mutante haploide PYCC 5334-6 de *S. cerevisiae*, evidenciando: (A) *spots* sobre expressos e (B) *spots* exclusivos nesta estirpe. Nas imagens, MW significa massa molecular relativa. As proteínas (250 µg) foram separadas em *strips* de IPG de 13 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagens obtidas no *software* Melanie 7.0.].....34

Figura 6.1 – Curvas de calibração utilizadas para a quantificação de proteína total das amostras de *S. cerevisiae* pelo (A) método de Bradford ($y = 1,3826x - 0,0008$; $R^2 = 0,9909$) e (B) pelo método de *2D-Quant Kit* ($y = -0,0074x + 0,853$; $R^2 = 0,9949$). A proteína utilizada como padrão foi a BSA. Em ambos os gráficos os valores correspondem à média de dois ensaios. xxi

Figura 6.2 – Gel 2D que corresponde às proteínas solúveis sintetizadas pela estirpe S288C de *S. cerevisiae* crescida exponencialmente em glucose (Adaptado de (*2D Gel Map of Saccharomyces cerevisiae proteins*, 2009)..... xxii

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Exemplos de espécies de leveduras e suas aplicações biotecnológicas (Adaptado de Türker, 2014).....	2
Tabela 3.1 – Taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (Td) das células das estirpes PYCC 5334 e PYCC 5334-6 de <i>S. cerevisiae</i> crescidas em meio YP nas diferentes condições testadas.....	27
Tabela 3.2 – Valores de concentração de proteína total das amostras de <i>S. cerevisiae</i> . Foram realizados duplicados de cada amostra, que por sua vez correspondem a triplicados biológicos.	30
Tabela 3.3 – Proteínas identificadas correspondentes a <i>spots</i> proteicos nos géis obtidos através de eletroforese 2D, com identificação do respetivo gene, do <i>score</i> obtido após a análise e da respetiva massa molecular relativa (MW) e ponto isoelétrico (pI) existentes na literatura (teórico) e os valores obtidos diretamente do gel 2D (prático). A última coluna indica a variação da expressão das proteínas nas duas estirpes em estudo, onde as setas (\uparrow e \downarrow) indicam a sobre e sub expressão das proteínas e os valores numéricos correspondem à respetiva variação.....	35
Tabela 3.4 – Termos GO para os genes identificados com alteração na expressão (diferencialmente expressos ou exclusivos), com a respetiva frequência de amostra, frequência de <i>background</i> , <i>P-value</i> e os genes correspondentes.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

AMPK	Proteína cinase ativada por AMP (do inglês, <i>AMP-activated protein kinase</i>)
2D	Bidimensional
2DE	Eletroforese bi-dimensional (do inglês <i>two Dimensional gel Electrophoresis</i>)
Abs	Absorvância
BSA	Albumina do soro bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CBB	Azul brilhante de coomassie (do inglês <i>Coomassie Brilliant Blue</i>)
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (do inglês <i>3-[(3-holamidopropyl)dimethylammonio-1-propanesulfonate]</i>)
DMSO	DiMetilSulfÓxido
DNase I	Desoxirribonuclease I (do inglês <i>DeoxyrinoNuclease I</i>)
DO	Densidade Ótica
DOG	Meio 2-desoxiglucose
DTT	Ditiotreitol (do inglês <i>Dithitreitól</i>)
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> (<i>electrospray ionisation</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho (do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
HXT	Transportadores de hexose (do inglês <i>Hexose Transporter</i>)
IEF	Focagem isoelétrica (do inglês <i>Isoelectric Focusing</i>)
IPG	Gradientes de pH imobilizados (do inglês <i>Immobilized pH Gradient</i>)
μ	Taxa específica de crescimento
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
M_r	Massa molecular relativa
MS	Espetrometria de massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
MW	Massa molecular relativa (do inglês <i>Relative Molecular Weight</i>)
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pI	Ponto isoelétrico
PKA	Proteína cinase A (do inglês, <i>Protein Kinase A</i>)
PSA	PerSulfato de Amónia
PYCC	<i>Portuguese Yeast Culture Collection</i>
RNase I	RiboNuclease I
rpm	Rotação por minuto
SCP	Proteína de célula única (do inglês, <i>Single Cell Protein</i>)
SDS	N-dodecil-sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sodium - Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>)
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>

TCA	Ácido tricloroacético (do inglês <i>TriChloriacetic Acid</i>)
Td	Tempo de duplicação
TEMED	Tetrametietilediamina (do inglês <i>TEtraMethylEthyeneDiamine</i>)
TOF	Tempo de voo (do inglês <i>Time Of Flight</i>)
YNB	Meio base (do inglês <i>Yeast Nitrogen Base</i>)
YP	Meio rico de extrato de levedura e peptona (do inglês <i>Yeast extract-Peptone</i>)
YPD	Base de dados de proteína de leveduras (do inglês <i>Yeast Protein Database</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aplicações biotecnológicas de leveduras

As leveduras são definidas como um grupo de microrganismos eucariotas, pertencentes ao Reino Fungi, Domínio Eukarya, cujo crescimento vegetativo resulta predominantemente de gemulação ou fissão. São maioritariamente unicelulares, no entanto, algumas leveduras podem multiplicar-se formando cadeias de células unidas, pseudohifas, e tornar-se como seres multicelulares. Compreendem atualmente representantes dos filos Ascomycota e Basidiomycota (Pretorius, 2000; Kurtzman and Piškur, 2006; Kurtzman, Fell and Boekhout, 2011).

São organismos quimio-organo-heterotróficos capazes de utilizar diferentes fontes de carbono e energia como D-glucose, D-galactose, D-xilose, glicerol, sorbitol, etanol, ácidos orgânicos, entre outras. Podem usar substratos de origem vegetal, como flores, frutos e exsudados de plantas, sendo que as populações mais densas estão associadas a substratos que contêm açúcares e outras fontes de carbono rapidamente assimiláveis (Barriga *et al.*, 2011). Podem ser classificados como aeróbios obrigatórios ou, nalguns casos, anaeróbios facultativos, sendo que os parâmetros que permitem o seu crescimento e sobrevivência incluem valores de pH entre os 3 e os 8 e temperatura ótima entre 25-38°C (Phaff, Miller and Mraak, 1978).

Por fim, possuem uma ampla distribuição na natureza, podendo ser isoladas de ambientes muito diversos: terrestres, aquáticos e aéreos, sendo a seleção de um dado nutriente ou condição, por exemplo, temperatura, responsáveis por determinar a diversidade de espécies em diferentes nichos. Até agora são conhecidas cerca de 1500 espécies de leveduras que estão depositadas em coleções de cultura. No entanto, estima-se que 99% da biodiversidade deste grupo de microrganismos eucarióticos seja ainda desconhecida (Barriga *et al.*, 2011).

As leveduras são, dos microrganismos eucarióticos conhecidos, os mais importantes a nível económico e científico, com uma vasta utilização em processos biotecnológicos. A utilização destes organismos no processamento de alimentos e fermentação de bebidas alcoólicas remonta a vários milénios. Os géneros de leveduras associados à produção de alimentos, como bebidas alcoólicas, produtos de panificação, queijos, salsichas, produtos láteos, entre outros, são principalmente: *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Hyphopichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrowia* e *Zygosaccharomyces* (Türker, 2014).

Para além disso, estes microrganismos têm sido utilizados como fontes ricas em proteínas, minerais, vitaminas (particularmente vitamina B) e outros nutrientes para humanos e animais. Muitas espécies têm sido utilizadas para a produção de biomassa, tais como *Candida utilis*, *Candida* spp. não-metilotróficas, *Saccharomycopsis (Endomycopsis) fibuligera*, *Kluyveromyces* spp. e *Saccharomyces cerevisiae*. Outras espécies, em particular, *Saccharomyces boulardii* têm sido utilizadas como agentes probióticos para prevenir ou tratar vários distúrbios intestinais,

nutricionais e toxicológicos. Já as espécies *Candida pintolopesii*, *Candida saitoana* e *S. cerevisiae* são usadas como aditivos probióticos em alimentos para animais. As leveduras possuem um papel fundamental na área da agricultura, uma vez que agem como agentes de biocontrole, biorremediação e como indicadores de qualidade ambiental (Johnson, 2013a, 2013b; Türker, 2014).

A nível biotecnológico, as leveduras alcançaram um enorme interesse nas últimas décadas, permitindo a produção de inúmeros produtos valiosos de metabolismo primário e secundário, enzimas e proteínas com interesse farmacêutico. Atualmente, os três grandes campos de aplicação na biotecnologia moderna são a produção de metabolitos, produção de proteínas recombinantes e biotransformação *in vivo* (Buzzini and Vaughan-Martini, 2006; Mattanovich, Sauer and Gasser, 2014). Embora a espécie de levedura mais conhecida e mais utilizada seja *S. cerevisiae*, têm sido introduzidas outras espécies de importância biotecnológica para produzir produtos industriais além dos alimentos tradicionais (Tabela 1.1) (Türker, 2014).

Nas últimas décadas, estudos de diversidade metabólica de leveduras não-convencionais revelaram inúmeras propriedades promissoras. Espécies como *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*), *Hansenula polymorpha* (*Ogataea parapolyomorpha*), *Yarrowia lipolytica*, *Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*), e *Kluyveromyces marxianus* foram desenvolvidas para a produção heteróloga de enzimas e proteínas, incluindo proteínas farmacêuticas (Buzzini and Vaughan-Martini, 2006).

Tabela 1.1 – Exemplos de espécies de leveduras e suas aplicações biotecnológicas (Adaptado de Türker, 2014).

Espécies	Aplicação
<i>Candida shehatae</i>	Bioetanol
<i>C. sake</i>	Bioetanol
<i>C. oleophila</i>	Bioetanol
<i>C. maltosa</i>	Proteína de célula única (SCP) em hidrocarbonetos
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Queijo, amadurecimento da salsicha, protease
<i>D. (Schwanniomycetes) occidentalis</i>	Amilase
<i>Eremothecium ashbyi</i>	Riboflavina
<i>Geotrichum candidum</i>	Amadurecimento do queijo
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Fermentação alcoólica
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Fermentação do leite, SCP de soro de leite
<i>K. lactis</i>	Fermentação do leite, SCP de soro de leite
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Bioetanol
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina
<i>Pichia angusta</i> (<i>Hansenula polymorpha</i>)	Bioetanol
<i>P. anomala</i>	Bioetanol
<i>P. jadinii</i> (<i>C. utilis</i>)	Matéria-prima
<i>P. pastoris</i>	Proteína heteróloga

<i>P. stipitis</i>	Bioetanol
<i>Pseudozyma flocculosa</i>	Bioetanol
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Caroteno
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Fermentação da cidra
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermento de cerveja, padeiro e vinho, bioetanol, invertase, proteína heteróloga
<i>S. boulardii</i> (<i>S. cerevisiae</i>)	Probióticos
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	Amilase
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Molho de soja

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (*S.cerevisiae*) é um dos microrganismos eucariotas mais estudados, sendo considerado como modelo para variados estudos. O nome *Saccharomyces* deriva do latim: *saccharo*~ que significa açúcar (*saccharum*) e *~myces* que significa fungo. Por sua vez, *cerevisiae* deriva do termo para cerveja em latim (Kurtzman, Fell and Boekhout, 2011).

Tal como as restantes leveduras, *S. cerevisiae*, está equipada com uma parede celular espessa que mantém a forma e integridade celular e confere proteção osmótica e física à célula. A parede celular de *S. cerevisiae* é composta por uma camada interna que é constituída por uma rede flexível de moléculas de β -glucanos (formados por ligações de β -1,3 e β -1,6) e quitina ligados covalentemente, sendo responsável pela resistência mecânica, proporcionando também os locais de ligação para as proteínas que formam a camada externa da parede. Esta camada externa fibrilar de manoproteínas limita a permeabilidade da parede celular e protege a membrana plasmática de enzimas e compostos estranhos (Pardo *et al.*, 2000; Klis *et al.*, 2002; Klis, Boorsma and De Groot, 2006; Braconi *et al.*, 2011). A membrana plasmática, constituída por uma bicamada lipídica, contém uma mistura de lípidos polares e proteínas que, pelas suas interações, sustentam a estrutura da membrana (van der Rest *et al.*, 1995)

S. cerevisiae é uma levedura ascomiceta e pode existir de forma estável em estados haploides ou diploides. Em condições de escassez de nutrientes, as células haploides podem fundir-se produzindo uma célula diploide, que pode sofrer meiose dando origem a quatro esporos haploides (Bergman, 2001; Bisson, 2004). As suas células contêm 16 cromossomas lineares com um tamanho variando de aproximadamente 200 a 2200 kb (Bergman, 2001). A sequência do genoma indica a existência de aproximadamente 6000 genes funcionais presentes (Bisson, 2004).

Durante décadas este organismo eucariótico foi o mais bem caracterizado do ponto de vista genético e filogenético. Como tal, é atualmente um dos principais organismos utilizados para estudos de genómica comparativa, devido às diversas vantagens que apresenta i) é eucariota (tendo semelhanças com células animais); ii) é unicelular (tornando-se “simples” de estudar); iii) é de fácil manipulação genética; iv) foi o primeiro organismo com o genoma totalmente

sequenciado; v) é fácil e económico de cultivar e manter e vi) não é patogénico (Williams, 1996; Kurtzman and Piškur, 2006).

Esta levedura é bastante utilizada em biotecnologia, devido à sua fisiologia única e por possuir um papel histórico importante em fermentações de alimentos e outros processos industriais. Esta espécie, também conhecida como a “levedura do vinho”, ou “levedura de padeiro” tem sido utilizada durante vários séculos na produção de alimentos, como o pão e também de bebidas alcoólicas, nomeadamente cerveja, uísque e rum, devido à sua alta capacidade de fermentação e alta tolerância a condições ambientais adversas deste processo. Hoje em dia, para além de ser utilizado de forma caseira, sob a forma de “fermento de padeiro”, para a confeção de bolos, massas e diversos tipos de pão, este organismo é também utilizado como hospedeiro para a produção comercial de proteínas farmacêuticas, tais como a insulina e vacinas contra a hepatite B, como hospedeiro para expressão de biocatalisadores de proteínas e vias multi-enzimáticas para a síntese de produtos químicos finos e compostos de pequeno peso molecular de importância medicinal e nutricional (Kurtzman, Fell and Boekhout, 2011; Türker, 2014). Assim, os estudos em leveduras, em particular em *S. cerevisiae*, são considerados o ponto de partida para a descoberta de novas estruturas e processos em células eucarióticas, que possam depois ser utilizados como base para o estudo de sistemas eucariotas mais complexos, como células animais e vegetais (Bauer and Pretorius, 2000; Johnson, 2013b).

1.2.1. Fermentação alcoólica

As leveduras, como é o caso de *S. cerevisiae*, utilizam açúcares com o objetivo de obter energia e material biossintético usados na realização das suas atividades fisiológicas, no seu crescimento e reprodução. A fermentação compreende um conjunto de reações enzimaticamente controladas, através das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples, libertando energia. É um processo realizado desde há muitos séculos como um recurso eficaz e de baixo custo para preservar a qualidade e a segurança dos alimentos. Existem vários tipos de fermentação, sendo a fermentação alcoólica a mais antiga forma de aplicação biotecnológica de um microrganismo (Bauer and Pretorius, 2000).

Bioquimicamente a fermentação alcoólica consiste na transformação de hidratos de carbono em etanol e dióxido de carbono (CO₂) para regeneração do NAD⁺, necessário na glicólise. Inicia-se com um processo denominado glicólise, que resulta na produção de duas moléculas de ácido pirúvico por cada molécula de glucose. Cada uma destas moléculas origina uma de acetaldeído e uma de CO₂. Após a redução do acetaldeído formam-se duas moléculas de etanol, e consequentemente o NADH é oxidado a NAD⁺ necessário à continuação do processo (Glazer and Nikaido, 2007; de Alencar *et al.*, 2009) (Figura 1.1).

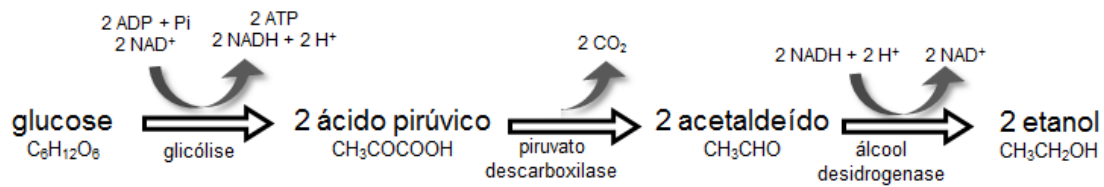
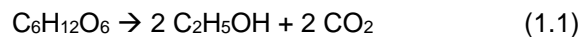


Figura 1.1 – Via de fermentação alcoólica (Adaptado de Glazer & Nikaido 2007).

Antoine Lavoisier, em 1789, foi pioneiro nos estudos científicos sobre fermentação alcoólica, e descobriu que 100 partes em peso de açúcar são convertidas em 60,17 partes de álcool, 36,81 de dióxido de carbono e 2,61 de ácido acético, descrevendo a equação como “mosto da uva = dióxido de carbono + álcool”. Mais tarde, em 1815, Joseph Gay-Lussac estimou que 100 partes de açúcar são convertidas em 51,34 partes de álcool e 48,66 partes de dióxido de carbono. A equação geral da fermentação alcoólica é a seguinte:



Segundo esta equação, 100 partes de açúcar são convertidos em 51,19 partes de álcool e 48,90 partes de dióxido de carbono, confirmando os estudos anteriores (Barnett, 1998, 2003). Na realidade, para além do etanol e CO_2 outras substâncias são produzidas em menores quantidades pela levedura, tais como glicerol, álcool isoamílico ou 3-metil-1-butanol, n-propanol, 2-feniletanol, aldeídos, ésteres e acetatos. Estes metabolitos podem desempenhar um papel importante, uma vez que alguns são compostos químicos responsáveis pelo aroma podendo influenciar, por exemplo, as propriedades organolépticas das bebidas alcoólicas produzidas por processos fermentativos (Ward, 1991).

No geral, os microrganismos utilizados no processo de fermentação alcoólica devem ter características específicas, tais como elevada velocidade de fermentação, osmotolerância, tolerância ao etanol, capacidade para produção de elevadas quantidades de etanol, tolerância ao meio ácido, elevada viabilidade celular e resistência a altas temperaturas (de Alencar *et al.*, 2009).

1.2.2. Metabolismo de *S. cerevisiae*

A adaptação às mudanças no ambiente é um processo chave para a sobrevivência bem-sucedida dos organismos e a resposta das suas células a estas alterações é mediada por uma grande variedade de vias de sinalização. As células podem detetar vários estímulos intra- e extracelulares e a informação recebida será posteriormente propagada através de uma cascata de sinais físico-químicos. Os recetores finais destes sinais determinarão a resposta celular, atuando em diferentes níveis regulatórios (transcrição, tradução, pós-tradução, etc.). A maioria

das células de leveduras, como as de *S. cerevisiae*, são sensíveis à disponibilidade de fontes de carbono em seu redor e, na presença do seu açúcar favorito (glucose), desencadeiam uma cascata de sinalização que reprime a utilização de outras fontes de açúcar, bem como a função de diferentes vias catabólicas (Gancedo, 2008; Christensen, Oliveira and Nielsen, 2009a).

1.2.1.1. Metabolismo da glucose

As leveduras são capazes que crescer em variadas fontes de carbono, incluindo hidratos de carbono, álcoois, ácidos orgânicos, aminoácidos, *n*-alcanos e lípidos. Os hidratos de carbono (monossacáridos, oligossacáridos e polissacáridos) são a fonte de carbono mais comum e também a mais importante em termos de aplicações biotecnológicas de leveduras. Entre os monossacáridos, destacam-se as hexoses (glucose, frutose, manose), cujo metabolismo é realizado em grande parte pela via glicolítica (Dickinson J.R and Kruckeberg, 2006). A glicólise ou via Embden-Meyerhof-Parnas é a via catabólica principal e comum a todos os fungos, resultando na oxidação de uma molécula de glucose e sua conversão em duas moléculas de ácido pirúvico. O metabolismo dos açúcares em levedura distingue-se pelo destino do piruvato. Este pode ser carboxilado, com produção de oxaloacetato que, por sua vez, entra no ciclo de Krebs; transportado para a mitocôndria e ser oxidado a acetil-CoA que segue para o ciclo de Krebs ou descarboxilado pela piruvato-descarboxilase e convertido em acetaldeído. Assim, na via fermentativa (fermentação alcoólica), o piruvato é convertido em etanol e CO₂ e na via respiratória o piruvato é metabolizado através do ciclo de Krebs (Broek, Uden and Uden, 1989; Gancedo and Serrano, 1989).

A resposta da levedura *S. cerevisiae* à presença de glucose é um exemplo interessante da resposta de uma célula a uma mudança no ambiente. A glucose, para além de ser uma fonte de carbono para este organismo, é também uma molécula que afeta a sua fisiologia regulando vários aspetos do crescimento celular, metabolismo e desenvolvimento. A presença de glucose leva a alterações na concentração de metabolitos intracelulares, modificações e degradação de algumas enzimas, alterações na estabilidade de mRNAs e indução ou repressão da transcrição de diferentes genes (Gancedo, 2008).

1.2.1.1.1. Proteínas transportadoras de hexose (HXT)

De modo a enfrentar as diferenças na concentração de glucose que ocorrem no meio ambiente, *S. cerevisiae* desenvolveu uma complexa e regulada família de transportadores de hexose com características e cinéticas específicas que permitem às células ajustar o transporte de hexose de forma a otimizar o seu crescimento e metabolismo (Horák, 2013). Os transportadores de hexose (HXT) são proteínas que abrangem a membrana e medeiam o transporte de hexoses através da membrana plasmática pelo mecanismo de difusão facilitada.

O genoma de levedura contém 20 genes pertencentes à família de transportadores de hexose, seis dos quais (*HXT1-HXT4*, *HXT6*, *HXT7*) codificam as principais proteínas responsáveis pelo transporte da glucose. Estes transportadores exibem diferentes afinidades para a glucose e os genes são induzidos e/ou reprimidos por diferentes níveis de glucose. Dois outros genes desta família, *SNF3* e *RGT2*, codificam proteínas que atuam como sensores de glucose e geram um sinal para a indução da expressão dos genes *HXT*. A proteína Rgt2p reage com elevados níveis de glucose e ativa os transportadores Hxt1p, Hxt3p e Hxt4p; a proteína Snf3p deteta baixos níveis de glucose e ativa a transcrição dos genes *HXT2*, *HXT4* e *HXT6/7*. Na ausência de glucose apenas são expressos os genes *HXT5* e *HXT6/7* (Carlson, 1998; Polish, Kim and Johnston, 2005; Horák, 2013).

Os genes *HXT1* e *HXT3* codificam transportadores de baixa afinidade para a glucose com valores de *K_m* de aproximadamente 100 mM e 30-60 mM respetivamente, enquanto que os genes *HXT6* e *HXT7* codificam transportadores de alta afinidade (*K_m* de 1-2 mM) para a glucose. Já os genes *HXT2* e *HXT4* são classificados como genes que codificam transportadores com moderada afinidade (valores de *K_m* de aproximadamente 10 mM) para a glucose. Os transportadores de baixa afinidade são expressos em concentrações elevadas de glucose, já os de alta afinidade são expressos em concentrações baixas de glucose. Em contraste com os genes referidos anteriormente, o gene *HXT5*, que codifica o transportador de hexose Hxt5 com afinidade moderada (com *K_m* de aproximadamente 10 mM) para a glucose, é regulado por taxas de crescimento e não por níveis de glucose extracelular (Maier *et al.*, 2002; Horák, 2013).

1.2.1.2. Repressão por glucose em *S. cerevisiae*

Como muitos outros microrganismos, a levedura *S. cerevisiae* usa preferencialmente a glucose como fonte de carbono fermentável em detrimento de outros açúcares e ácidos orgânicos. Assim, num meio de cultura complexo que contenha glucose em conjunto com outros açúcares, como a galactose ou a maltose, a glucose é utilizada em primeiro lugar e a transcrição de genes necessários para a utilização de fontes alternativas de carbono é reprimida – repressão pela glucose. Este efeito repressivo pela glucose é transmitido à maquinaria celular através de interações regulatórias interligadas e vias de sinalização (Gancedo, 1998; Kayikci and Nielsen, 2015).

A repressão pela glucose é o principal sistema regulatório na levedura e é um dos mais bem estudados neste eucariota modelo, tendo suscitado grande interesse devido ao seu envolvimento no controlo da fermentação alcoólica. Este sistema regulador afeta a expressão de um grande número de enzimas envolvidas no metabolismo dos hidratos de carbono, incluindo o transporte de açúcares, a hidrólise de dissacáridos como a maltose e sacarose, a neoglucogénese, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa (Rose, Albig and Entian, 1991; Salema-Oom *et al.*, 2011).

Foram identificadas duas principais vias de sinalização responsáveis pela utilização/repressão da glucose em *S. cerevisiae*: uma via de repressão mediada pelo complexo Snf1 e pelo fator de transcrição Mig1 e uma via de indução da glucose mediada pelos recetores

de membrana Snf3 e Rgt2 e o fator de transcrição Rgt1 (Christensen, Oliveira and Nielsen, 2009b). A sinalização pelo complexo Snf1 é fundamental para a funcionalidade da repressão pela glucose e para ajustar o metabolismo à disponibilidade de glucose. A proteína Snf1 é uma cinase serina/treonina altamente conservada em células eucarióticas que possui um homólogo em mamífero, a subunidade catalítica α da proteína cinase ativada por AMP (AMPK, do inglês *AMP-activated protein kinase*). O complexo cinase Snf1 em *S. cerevisiae* tem uma estrutura heterotrimérica com uma subunidade α catalítica (Snf1), uma subunidade regulatória γ (Snf4) e uma das três subunidades β (Sip1, Sip2 e Gal83). Snf1 é ativada por fosforilação realizada pelas proteínas cinases Sak1, Tos3 e Elm1 a montante, enquanto que a fosfatase Glc7 em conjunto com a sua subunidade regulatória Reg1 é responsável pela sua desfosforilação e consequente ativação. Quando os níveis de glucose são elevados, o complexo Snf1 cinase é inativado por auto inibição, como resultado da interação entre o seu domínio catalítico N-terminal e os seus domínios reguladores C-terminais. A inativação da cinase Snf1 previne a fosforilação do seu substrato, o fator de transcrição Mig1, que não fosforilado migra para o núcleo onde, juntamente com a hexocinase Hxk2 e o complexo Ssn6/Tup1 impede a transcrição de genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de carbono. Por outro lado, quando a concentração de glucose é baixa, o complexo Snf1 é ativado e, na sua forma ativa, liga-se a cada uma das três subunidades β e o complexo Snf1-Gal83 assim formado entra no núcleo impedindo a repressão. Tal é conseguido através da fosforilação e consequente inativação de Mig1 que promove a sua realocização para o citosol, permitindo assim a expressão de genes ligados ao metabolismo respiratório, a neoglicogénese e o metabolismo de ácidos gordos dependendo da fonte de carbono disponível (Figura 1.2) (Gancedo, 1998; Conrad *et al.*, 2014; Kayikci and Nielsen, 2015).

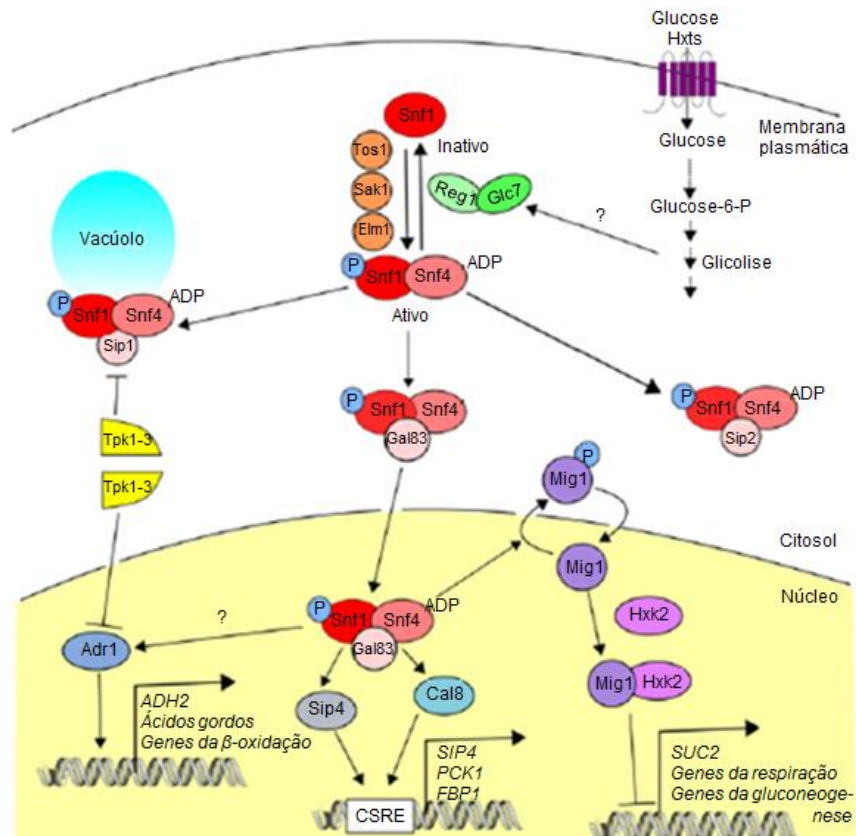


Figura 1.2 - Via de repressão pela glucose mediada pela proteína cinase Snf1. Snf1 é ativado na forma fosforilada pelas proteínas Sak1, Tos3 e Elm1. Rgt1 é responsável pela sua desfosforilação. O mecanismo de detecção de glucose, onde Hxk2 parece desempenhar um papel importante, ativa a proteína fosfatase Glc7-Reg1 para desencadear a desfosforilação de Snf1. Na sua forma ativa, Snf1-Snf4 liga-se a cada uma das três subunidades β , adquirindo especificidade diferencial para localização e fosforilação alvo. Após o esgotamento de glucose, o complexo Snf1-Gal83 entra no núcleo para desencadear a desrepressão através da ativação dos fatores de transcrição Adr1, Sip4 e Cat8 e inativação de Mig1, desalojando a sua interação com Hxk2 e promovendo a sua localização citosólica por fosforilação. Estes acontecimentos levam à expressão de uma ampla gama de genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de carbono (Adaptado de Conrad *et al.*, 2014).

A via de sinalização Snf3/Rgt2 é uma cascata sensorial que deteta níveis extracelulares de glucose e ajusta a entrada de glucose na célula. Os sensores Snf3 e Rgt2 pertencem à família dos genes *HXT* em conjunto com as proteínas Hxt1-17 e Gal2, em que todas, exceto a proteína Hxt12, podem transportar glucose (e outras hexoses) cada uma com uma afinidade diferente. Snf3 e Rgt2 são proteínas membranares que, embora sejam estruturalmente semelhantes aos transportadores de hexose, não têm capacidade de transportar glucose atuando apenas como recetores que detetam a glucose externa. Snf3 deteta níveis baixos de glucose extracelular, enquanto que Rgt2 deteta níveis altos deste açúcar. Quando existem elevados níveis de glucose extracelular, esta é detetada pelas proteínas transmembranares Snf3 e Rgt2, ativando as cinases Yck1 e Yck2 do tipo I que se encontram ligadas à membrana. Este acontecimento recruta duas

proteínas parálogas reguladoras, Mth1 e Std1, para a membrana plasmática onde são fosforiladas, seguidamente marcadas por ubiquitinação por Grr1 e, por último, degradadas pelo proteossoma. Libertado destas proteínas, o ativador Rgt1 é fosforilado por PKA (proteína cinase A) e é assim transformado num ativador transcrricional para a expressão de genes *HXT*. Por outro lado, na ausência de glucose, Yck1 e Yck2 não conseguem fosforilar Mth1 e Std1, ou seja, não são degradadas, entram no núcleo e associam-se a Rgt1 para reprimir a expressão dos genes *HXT1-4* (Figura 1.3) (Gancedo, 2008; Conrad *et al.*, 2014; Kayikci and Nielsen, 2015).

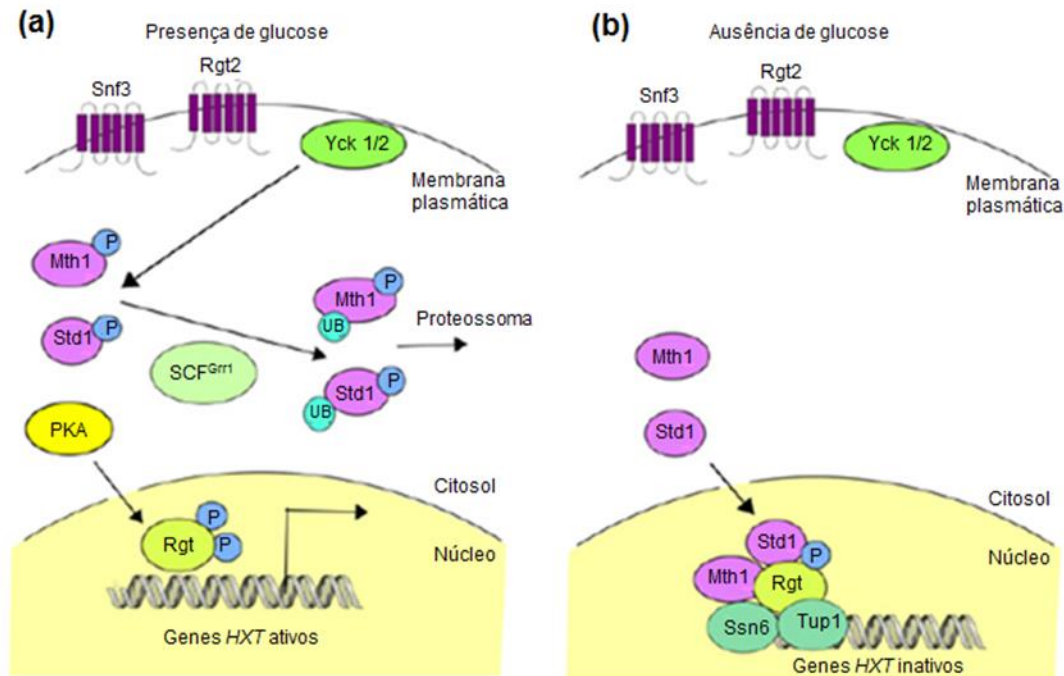


Figura 1.3 – Via de deteção da glucose Snf3-Rgt2. (a) A ligação da glucose aos sensores Snf3/Rgt2 recruta Mth1 e Std1 para a membrana plasmática onde são fosforilados por Yck1,2. Esta fosforilação visa a ubiquitinação por Grr1 e a degradação pelo proteossoma, permitindo que Rgt1 seja fosforilado por PKA. Uma vez fosforilado, Rgt1 transforma-se num ativador para a expressão de genes *HXT*. (b) Na ausência de glucose, Mth1 e Std1 não são fosforilados, o que faz com que não sejam degradados e entrem no núcleo para reprimir a expressão dos genes *HXT* (Adaptado de Conrad *et al.*, 2014).

1.2.1.3. Metabolismo da maltose

A maltose é um produto da hidrólise do amido em consequência da ação de amilases. Produz cerca de 55% dos açúcares fermentáveis em misturas tradicionais de malte da indústria da cerveja e destilação, sendo o conhecimento do seu metabolismo de grande importância para melhorias em processos industriais. A maltose é transportada para o interior da célula por transporte ativo, com o auxílio de um transportador transmembranar específico, a permease de maltose, sendo de seguida hidrolisada pela enzima intracelular alfa-glucosidade (maltase) em

duas unidades de glicose, que são depois conduzidas através da via glicolítica (Fraenke, 1982; Lagunas, 1993; Novak, Zechner-krpan and Mari, 2004).

O metabolismo da maltose em *S. cerevisiae* está sob o controle de três mecanismos de regulação geral: indução, e repressão e inativação pela glicose. É necessária a presença de maltose no ambiente celular para ocorrer indução da síntese de enzimas maltase e de transportadores de maltose. Por outro lado, com a adição de glicose a um meio de maltose, ocorre inativação total do sistema de transporte da maltose. No entanto, quando as células são repostas num meio com apenas maltose, observa-se uma rápida regeneração do sistema de transporte da maltose, ocorrendo indução de novas proteínas (Novak, Zechner-krpan and Mari, 2004).

Para além do gene do transportador, *MALx1* (*MAL21*, *MAL31*, *MAL61*), *AGT1*, *MPH2*, ou *MPH3* a utilização de maltose requer os produtos de outros dois genes, maltase (*MALx2*) e um ativador de transcrição (proteína Malx3). Estes três genes podem ser encontrados em loci diferentes denominados *MAL1*, *MAL2*, *MAL3*, *MAL4* ou *MAL6*. O metabolismo da maltose requer a presença de pelo menos um destes loci. As estirpes que carregam um ou mais locus *MAL* são capazes de crescer em maltose como a única fonte de carbono. As estirpes haploides de levedura capazes de crescer em maltose contêm apenas uma única cópia de um dos genes *MAL* (frequentemente referida como a cópia dominante) (Needleman *et al.*, 1984; Lagunas, 1993). A clonagem de *MAL6* permitiu identificar três genes no locus: *MAL61*, *MAL62* e *MAL63*. O gene *MAL61* codifica a permease de maltose; o gene *MAL62* codifica a maltase e *MAL63* codifica uma proteína reguladora, Mal63, que induz a transcrição dos genes *MAL61* e *MAL62*. Uma mutação no gene *MAL63* impossibilita a indução da expressão dos genes *MAL61* e *MAL62* e estes mutantes não podem utilizar a maltose como fonte de carbono. Supressores do mutante mal63 possuem expressão constitutiva dos genes *MAL61* e *MAL62*, mas são sensíveis à repressão pela glicose (Change *et al.*, 1988; Gancedo, 1998).

Apesar de não haver informação suficiente sobre o mecanismo pelo qual *MAL63* é ativado na presença de maltose, pensa-se que a esta se liga a *MAL63* produzindo uma conformação com atividade funcional. Os alelos constitutivos de *MAL63* ou o alelo selvagem de *MAL43* (um gene equivalente no locus *MAL4*) possuem múltiplas substituições de aminoácidos na região C-terminal podendo adotar a conformação ativa, mesmo na ausência de maltose (Wang and Needleman, 1996).

A interação entre o complexo Mig1 (repressor transcricional de ligação ao DNA dos genes *SUC2*, *GAL* e *MAL*) e as proteínas ativadoras de *MAL*, como Mal63, parece ser o principal passo na repressão pela glicose do metabolismo da maltose. A presença da glicose afeta tanto a transcrição de *MAL63* como a sua conformação ativa. A interrupção de Mig1 ou a remoção de um local de ligação do mesmo no promotor *MAL63* aumenta a expressão deste gene na presença de glicose (Gancedo, 1998). Para além de atuar ao nível da transcrição, a glicose também aumenta os níveis de degradação das proteínas e do mRNA. Estudos têm demonstrado que a presença de glicose degrada consideravelmente o mRNA de *MAL62* (e provavelmente o mRNA de *MAL61*) (Novak, Zechner-krpan and Mari, 2004).

A fermentação de hidrolisados de amido é a base de muitos processos biotecnológicos de leveduras, sendo o açúcar predominante nestes processos a maltose. No entanto, na maioria das estirpes de levedura envolvidas em processos biotecnológicos, a maltose apenas pode ser fermentada após o esgotamento da glucose. Uma rápida co fermentação da glucose e da maltose pela levedura poderá aumentar a eficiência dos processos biotecnológicos à base de amido. O desenvolvimento de mutantes capazes de co fermentar os dois açúcares torna-se assim importante de forma a superar a limitação na produtividade das fermentações industriais. Uma abordagem frequentemente utilizada é a aplicação de tratamentos mutagénicos convencionais, seguidos pelo isolamento seletivo de mutantes desreprimidos em meio de cultura, incorporando análogos de glucose repressivos, mas não metabolizáveis, como 2-desoxiglucose ou 5-tioglucose. As mutações aleatórias podem levar a uma redução das taxas de absorção de glucose que dão origem a fenótipos de desrepressão aparente. Outra abordagem mais direta é a mutagénese direcionada ao local de genes conhecidos para desempenhar um papel fundamental na principal via de repressão pela glucose em *S. cerevisiae*, como *HXK2*, *SNF1* ou *MIG1* (Gamo, Lafuente and Gancedo, 1994; Salema-Oom *et al.*, 2011).

1.3. Estudos proteómicos

Apesar dos avanços da genómica e de existir bastante informação genética em resultado da sequenciação do genoma de diversos organismos, somente a análise da sequência do DNA não é suficiente para esclarecer a função biológica das proteínas por ele codificadas, bem como o nível de expressão e as modificações co- e pós-tradução. Assim, de forma a compreender os aspetos funcionais da célula, tem sido importante o desenvolvimento de métodos que visam a análise descritiva em larga escala do proteoma, o qual contempla as proteínas codificadas pelo genoma de determinados organismos, tecidos, células ou fluídos biológicos. A análise do proteoma é, no entanto, uma tarefa difícil, uma vez que este é mais complexo que o genoma, devido a processos como o *splicing*, eventos pós-tradução, degradação de proteínas, entre outros. Para além disso, o proteoma é bastante dinâmico e pode sofrer alterações em resposta a fatores ambientais (Almeida, Rodrigues and Lampreia, 2001; Gilmore and Washburn, 2010).

Os estudos proteómicos fundamentam-se na caracterização metódica de amostras complexas de proteínas, empregando diversas técnicas de separação, identificação e quantificação sistemática e simultânea de várias proteínas originárias de uma única amostra (Almeida, Rodrigues and Lampreia, 2001). Apesar de terem surgido várias tecnologias alternativas no início do milénio, a eletroforese bidimensional (*two dimensional gel eletrophoresis* – 2DE) continua a ser uma das metodologias mais utilizadas para o estudo do proteoma, permitindo a separação e quantificação de misturas complexas de proteínas, extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Com uma elevada resolução e sensibilidade, esta poderosa técnica possibilita a separação de milhares de proteínas num único gel. A eletroforese 2D tem sido fundamental para a evolução da proteómica e tem a capacidade de detetar

modificações co- e pós-tradução que não podem ser previstas a partir da sequência do genoma. As aplicações da eletroforese 2D são vastas: análise do proteoma, diferenciação celular, detecção de biomarcadores e marcadores de doença, purificação de proteínas em microescala, verificações de pureza, patogênese bacteriana e caracterização de produto (O'Farrell, 1975; Görg, 2004; Magdeldin *et al.*, 2014).

1.3.1. 2D-PAGE

A separação de proteínas por 2DE remota à década de 1950, sendo que a primeira técnica desenvolvida por Smithies e Poulik em 1956 combinava a utilização de papel de filtro, para separar as proteínas na primeira dimensão em tampão de eletroforese e gel de amido, para separação na segunda dimensão. No entanto, exceto a utilização desta técnica para separar proteínas séricas, antes de 1975 a separação de proteínas por 2DE não era muito comum. A possibilidade de aplicação clínica tornou este método atraente e após 1975 expandiu-se consideravelmente. O interesse crescente na separação de proteínas por esta técnica prendeu-se na possibilidade de separação de proteínas complexas ou mesmo de extratos celulares totais (Klose, 2009).

No começo da década de 70 estavam disponíveis duas separações eletroforéticas de alto desempenho: i) eletroforese em condições desnaturantes, descrita por Laemmli e ii) focagem isoelétrica, descrita por Gronow e Griffith (Rabilloud and Lelong, 2011).

Foi em 1975 que O'Farrell desenvolveu o método de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Este método separa as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico por focagem isoelétrica na primeira dimensão, e de acordo com o seu peso molecular por eletroforese na segunda dimensão (Figura 1.4). A introdução, no final dos anos 80, de tiras de gel de poliacrilamida com gradientes de pH imobilizados (*strips* de IPG – *Immobilized pH gradient*) melhorou drasticamente o alcance e a reprodutibilidade das separações. O desenvolvimento de técnicas de espectrometria de massa (MS) permitiu a identificação dos *spots* de proteína, sendo possível a sequenciação das mesmas por técnicas de MS-MS (O'Farrell, 1975; Klose, 2009; Rabilloud and Lelong, 2011).

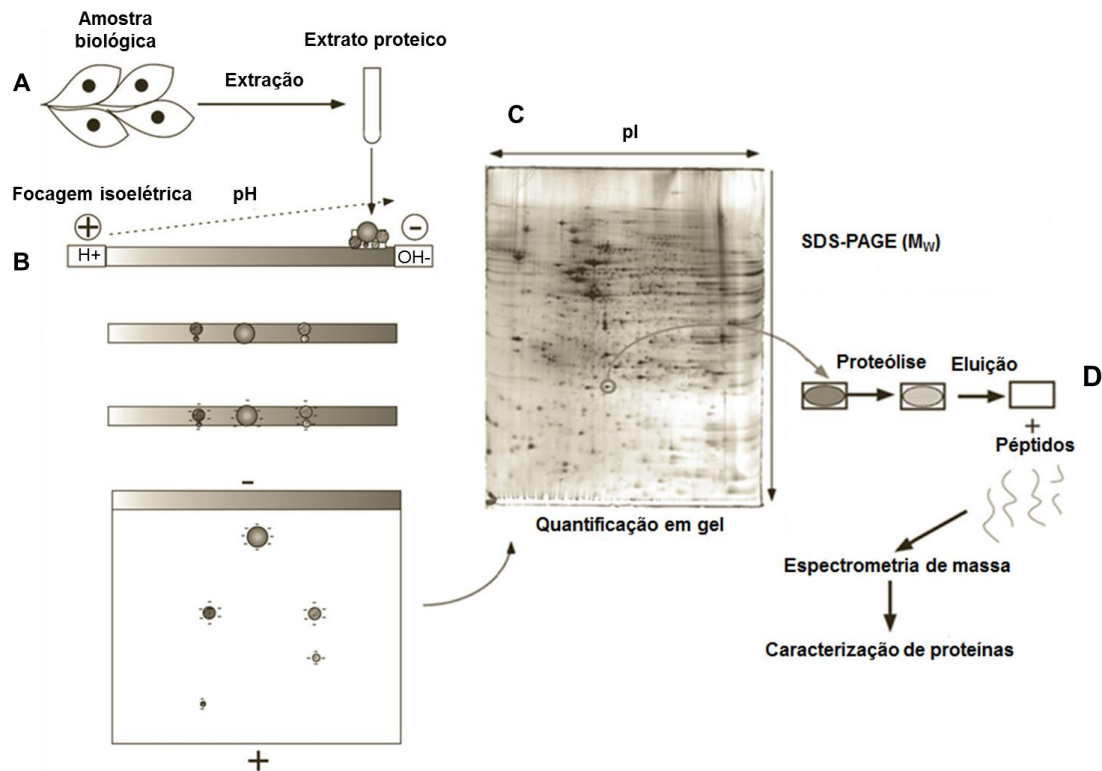


Figura 1.4 – Esquema representativo do princípio de eletroforese 2D acoplada à espectrometria de massa. A primeira etapa compreende a preparação da amostra, na qual é realizada a extração do material proteico das amostras biológicas (A). De seguida, as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico – focagem isoeletrica (B), e em seguida de acordo com as suas massas moleculares numa eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) (C). Após a deteção das proteínas no gel e a sua análise quantitativa para a deteção dos *spots* de interesse, as proteínas correspondentes são excisadas, digeridas enzimaticamente (geralmente com tripsina) e os péptidos resultantes são eluídos e analisados por espectrometria de massa, de modo a identificar e caracterizar as proteínas em questão (D) (Adaptado de Rabilloud & Lelong 2011).

A eletroforese 2D é um processo que ocorre em cinco etapas: i) preparação da amostra; ii) primeira dimensão – focagem isoeletrica (*Isoelectric Focusing* – IEF); iii) passo de equilíbrio - interface com a segunda dimensão; iv) segunda dimensão – eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (*Sodium Dodecyl Sodium - Polyacrilamide Gel Eletrophoresis* – SDS-PAGE) e v) deteção de proteínas (Rabilloud and Lelong, 2011).

A preparação apropriada da amostra é um passo crucial para a obtenção de bons resultados. Idealmente, a preparação da amostra desnatura, desagrega, reduz e solubiliza quantitativamente todas as proteínas na amostra, sem qualquer alteração adicionada durante todo o processo, de modo a assegurar que cada *spot* representa um polipéptido individual. Para além disso, elimina também todos os outros compostos que possam interferir com a focagem isoeletrica. Em primeiro lugar, as células devem ser lisadas de forma a poderem ser analisadas todas as proteínas intracelulares. Para tal, utilizam-se métodos físicos e/ou químicos, dependendo do tipo de amostra e do objetivo da análise (se é direcionada a todas as proteínas ou a uma fração

subcelular, em particular). Em seguida, a amostra deve ser homogeneizada na presença de um inibidor de proteases, a fim de evitar a hidrólise de proteínas causada pelas proteases libertadas durante a lise celular. Se a amostra contiver íões salinos, estes podem interferir com a separação eletroforética e devem ser removidos se a sua concentração for muito alta (100 mM). A sua remoção pode ser conseguida por diálise, por centrifugação ou por precipitação das proteínas com TCA (do inglês, *trichloroacetic acid*) ou solventes orgânicos (por exemplo, acetona). Os polissacáridos e os ácidos nucleicos também devem ser removidos, estes últimos utilizando endonucleases (DNase e RNase), uma vez que podem aumentar a viscosidade, obstruir os poros do gel e ligar-se às proteínas através de interações eletrostáticas e assim, impedir a focagem. Para finalizar, as proteínas devem ser desnaturadas e solubilizadas, sem sofrerem alteração de carga. Agentes caotrópicos, tais como a ureia e tiourea e detergentes neutros como o CHAPS são usados em combinação para tal (Görg, 2004; Görg, Weiss and Dunn, 2004; Schneider and Riedel, 2010; Rabilloud and Lelong, 2011).

Tal como foi referido anteriormente, a focagem isoelétrica (primeira dimensão) é uma técnica eletroforética que separa as proteínas de acordo com os seus pontos isoelétricos (pI). Esta técnica é realizada em *strips* de IPG onde, sob influência de um campo elétrico, as proteínas se deslocam para a posição onde a sua carga elétrica é zero, ou seja, quando o pH corresponde ao seu pI (Görg, 2004).

Antes da segunda dimensão é essencial preparar as *strips*, o chamado “passo de equilíbrio”. Para tal, as proteínas são reduzidas pelo ditionito (DTT) e, em seguida, alquiladas com iodocetamida de forma a impedir a sua reoxidação durante a eletroforese. A iodocetamida também remove o excesso de DTT. Em seguida, é realizada a eletroforese (SDS-PAGE) que separa os polipéptidos de acordo com as suas massas moleculares relativas (M_r). Esta técnica é realizada em géis de poli(acrilamida) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) (Görg, 2004).

Para finalizar, após a eletroforese 2D, as proteínas separadas têm de ser visualizadas no gel, o que é conseguido através de métodos de coloração. Existe uma grande variedade de métodos de coloração, sendo os mais comuns nitrato de prata, azul de coomassie coloidal e marcação com sondas fluorescentes. O resultado final após a coloração dos géis é um perfil proteico onde cada *spot* corresponde, idealmente, a uma proteína. A análise dos géis é realizada com o auxílio de *softwares* de imagem em gel 2D, tal como o ImageMaster™ 2D Platinum, que permite a contagem do número de *spots*, a determinação do pI e da massa molecular correspondente e a análise dos diferentes níveis de expressão da proteína entre dois ou mais géis (Görg, 2004; Görg, Weiss and Dunn, 2004). Por último, as proteínas analisadas podem ser identificadas recorrendo a técnicas de MS.

1.3.2. Proteómica em *S. cerevisiae*

S. cerevisiae é considerado um organismo modelo para estudos de proteómica, uma vez que se encontra bem caracterizado a nível fisiológico e genómico (tendo sido o primeiro organismo eucariota a ter todo o seu genoma sequenciado). Possui ainda um grande número de estirpes

mutantes, nas quais os genes são inativados ou amplificados (Kim *et al.*, 2006; Pham and Wright, 2007).

Na década de 1990 foram realizados vários estudos usando técnicas de 2DE com a finalidade de “construir” o proteoma de *S. cerevisiae*. Em 1995, Boucherie *et al.* relacionaram proteínas resolvidas em mapas 2D desta levedura com os seus genes correspondentes, marcando assim o início da construção de um mapa gene-proteína. Neste estudo foi utilizado como referência a estirpe S288C e a experiência permitiu detetar 200 *spots* de polipéptidos. Os autores identificaram 36 proteínas correspondentes aos produtos de 26 genes com funções relacionadas com quatro áreas principais da fisiologia celular da levedura: metabolismo de carbono, choque térmico, biossíntese de aminoácidos e biossíntese de purinas (Boucherie *et al.*, 1995). Em 1996, Shevchenko *et al.* num estudo que combinava 2DE, MALDI e nano-ESI-MS/MS e utilizando a mesma estirpe (S288C) detetaram um total de 150 *spots* de proteína no gel, identificando mais de 32 novas proteínas (Shevchenko *et al.*, 1996). No mesmo ano, e com o objetivo de elucidar a função fisiológica e bioquímica dos novos *Open Reading Frame* (ORF) de levedura, foi descrita a base de dados de duas estirpes de *S. cerevisiae* (X2180-1A e X2180-2B). Através de comparação de géis e análise de composição de aminoácidos e/ou microsequenciação foram identificadas mais de 100 proteínas (Sanchez *et al.*, 1996). Um ano mais tarde, Garrels e seus colaboradores conduziram estudos proteómicos em *S. cerevisiae* e conseguiram estender o mapa 2D de proteínas de levedura para 169 *spots* identificados com base na sequência do genoma de levedura, e mostraram que os métodos de identificação de *spots* com base no ponto isoelétrico e massa molecular previstos e na determinação da composição parcial de aminoácidos de géis marcados com radioisótopos eram suficientes para a identificação de pelo menos 80% dos *spots* que representam proteínas abundantes (Figura 1.5). Utilizando os mapas 2D e a informação disponível na Base de Dados de Levedura (YPD – *Yeast Protein Database*), os autores também realizaram experiências com o objetivo de caracterizar proteínas associadas a: i) alteração ambiental (choque térmico), ii) mutação sensível à temperatura, iii) mutação que afeta a modificação pós-tradução e iv) fração subcelular purificada (Garrels *et al.*, 1997). Em 2002 foi criado um mapa 2D de referência para proteínas alcalinas de células de leveduras usando diferentes gradientes de pH até 12 (pH 6-12, pH 9-12 e pH 10-12). Os autores identificaram 106 proteínas com pontos isoelétricos teóricos entre pH 11 e 15 e massas moleculares entre 7,5 e 115 kDa (Wildgruber *et al.*, 2002).

Vários outros estudos proteómicos em *S. cerevisiae* têm sido reportados até à data com o intuito de estudar a resposta da levedura face a diferentes condições ambientais. Estudos de crescimento de leveduras em culturas quimiostáticas limitadas por glucose e etanol (Kolkman, 2005), identificação de proteínas que alteram os seus níveis de expressão em células transferidas de um meio deficiente em glucose para um meio rico em glucose (Giardina, Stanley and Chiang, 2012), resposta a nível proteómico de *S. cerevisiae* em condições de elevada glucose com suplementação de aminoácidos (Trong Khoa Pham and Wright, 2008), alterações no proteoma em função da concentração de cádmio (Vido *et al.*, 2001), de lítio (Bro *et al.*, 2003),

1.4. Contextualização do trabalho e objetivos

A manipulação de estirpes industriais de levedura de modo a que o seu metabolismo permaneça principalmente fermentativo, mas ao mesmo tempo, serem capazes de fermentar outros açúcares simultaneamente com a glucose, é um procedimento útil de forma a minimizar atrasos de tempo relacionados com a utilização sequencial de açúcares em misturas contendo glucose e maltose.

Em 2010 foi publicado um artigo que descreve o desenvolvimento de um mutante de *S. cerevisiae*, PYCC 5334, que foi desregulado de forma a utilizar a maltose na presença de altas concentrações de glucose (Salema-Oom *et al.*, 2011). Este mutante desreprimido foi isolado por mutagénese aleatória a partir de uma estirpe industrial, adquirindo a capacidade de utilizar a glucose simultaneamente com maltose e possivelmente também sacarose e galactose. Ao contrário do que foi verificado por outros autores, os resultados descritos neste artigo mostram que o fenótipo de desrepressão de PYCC 5334 não é causado pela diminuição do transporte e da taxa de consumo de glucose. A caracterização deste mutante mostrou a existência duma falha nas vias de indução e repressão que modulam a expressão de genes *HXT*. No entanto, a desrepressão não é justificada por um fluxo insuficiente dos transportadores de glucose, uma vez que, quando um transportador de alta capacidade (*HXT1p*) é sobre expresso no mutante, a capacidade de transporte de glucose é recuperada, mas mantém-se o fenótipo desreprimido.

Neste contexto, com o objetivo de identificar proteínas diferencialmente expressas consequentes da mutação que permitam elucidar quais as vias de sinalização afetadas, utilizou-se uma abordagem proteómica comparativa baseada em eletroforese bidimensional acoplada a técnicas de espectrometria de massa para a estirpe do tipo selvagem (PYCC 5297) e estirpes mutantes: diploide (PYCC 5334) e um haploide derivado do anterior (PYCC 5334-6). Para o efeito foram realizados crescimentos das estirpes em meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*) contendo glucose e os seus extratos proteicos totais foram analisados num gradiente de pH 4-7.

Adicionalmente pretendeu-se comparar o desempenho da estirpe PYCC 5334-6 em culturas contendo glucose e outras fontes alternativas de açúcar, como a maltose e a galactose. Para tal, a estirpe foi inoculada em meios contendo uma mistura de açúcares (2% glucose + 2% maltose e 2% glucose + 2% galactose) e os seus consumos foram monitorizados por HPLC durante o seu crescimento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Para a realização dos crescimentos celulares utilizou-se um meio base (*Yeast Nitrogen Base*, YNB) da marca Difco e glucose da Fagron. Para a preparação do meio 2DOG (2-desoxiglucose) utilizou-se igualmente YNB, 2-desoxiglucose da Sigma, maltose da Merck e agar adquirido à LabChem. Para a realização da análise dos consumos de açúcares por HPLC utilizou-se igualmente YNB, glucose, maltose e galactose da marca Sigma e peptona e extrato de levedura da Bacto.

Para a preparação dos extratos proteicos analisados por electroforese bi-dimensional (2DE), recorreu-se a um *cocktail* inibidor de proteases (*complete EDTA free*) e desoxirribonuclease I (*DeoxyriboNuclease I*, DNaseI) ambos provenientes da Roche e ribonuclease I (RNaseI) adquirido à Sigma. Para a quantificação de proteína foi utilizada albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA) da GE Healthcare.

Na realização da eletroforese 2D foram utilizados os seguintes reagentes: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato(3-[(3cholamidopopyl)dimethyl -ammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS, 99%), ureia (99,5%), *N*-dodecil-sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*, SDS, $\geq 99\%$), tris-base (*tris-base(hydroxymethyl)aminomethane*), 40%:3% acrilamida:bis (razão 37.2:1 ideal para eletroforese) e agarose (com grau de pureza ideal para separação de ácidos nucleicos) da Sigma, ditiotreitól (DTT, 99%), tampão de gradientes de pH imobilizado (*immobilized pH gradient*, *IPG buffer*), persulfato de amónia (PSA, 98%) e tetrametietilediamina (*tetramethylethylenediamine*, TEMED, 99%) adquiridos à GE Healthcare, tioureia (99%), azul de bromofenol e 2-iodocetamida (grau de pureza ideal para síntese) da Merck, glicerol (87%) da Panreac, HCl (*hydrochloric acid*, 37%) da Pronalab e isopropanol da Riedel. Para a coloração e descoloração dos géis foram utilizados ácido ortofosfórico (*orthophosphoric acid*, 85%) e azul brilhante de *coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue G250*, CBB G25, com grau de pureza para eletroforese) adquiridos à Merck, etanol (96%) da Scarlab e sulfato de alumínio hexadecahidratado (*aluminum sulfate hexadecahydrate*, $\geq 95,0\%$) da Sigma.

Todas as soluções foram preparadas com água de pureza A, proveniente de sistemas Millipore MilliQ (resistividade $> 18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$, a 25°C).

2.2. Equipamentos

Os meios de cultura foram esterilizados por filtração a vácuo, sendo que o agar foi esterilizado na autoclave *Uniclave 88*. As células foram crescidas numa incubadora com agitação orbital da marca *Gallenkamp*. Todos os processos de inoculação foram realizados em condições de assepsia, à chama de um bico de *Bunsen*. As células foram recolhidas usando a centrífuga *Sorvall RC-5C Plus* (rotor SLA1500) e as densidades óticas medidas no espectrofotómetro da

marca *Amersham Biosciences*, modelo *Ultrospec 3300 pro*. As células foram homogeneizadas no homogeneizador *Potter-Elvehjem* da Multifix, partidas numa prensa francesa (*French Press*, *Thermo-FA-080A*) e centrifugadas na centrífuga *Eppendorf 5810R* (rotor F-34-6-38). As medições das absorvâncias para quantificação de proteína foram realizadas no espectrofotômetro *Shimadzu*, modelo *UV 160A*. As *strips* foram reidratadas no tabuleiro de reidratação *Immobile Dry strip Reswelling Tray* da *Amersham Biosciences* e a focagem isoeletrica foi realizada no sistema *Ettan IPGphor 3* da *GE Healthcare*. As *strips* foram equilibradas num agitador basculante (*Rocking Platform*) da *VWR*. Os géis 2D foram polimerizados no *caster Hoefer 600* da *GE Healthcare* e os processos de coloração e descoloração dos mesmos ocorreram sob agitação basculante no *Rocking Platform* da *VWR*.

2.3. Microrganismos

Neste trabalho foram usadas três estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*): a estirpe PYCC 5297 (estirpe selvagem, DGI 342), proveniente de Danisco (Copenhaga, Dinamarca), a estirpe diploide PYCC 5334, que resulta de uma mutação da estirpe PYCC 5297, adquirida por exposição à radiação UV (Salema-Oom *et al.*, 2011) e a estirpe haploide PYCC 5334-6 obtida a partir da estirpe diploide PYCC 5334 após esporulação. Estas estirpes pertencem à *Portuguese Yeast Culture Collection* (PYCC) localizada no Departamento de Ciências da Vida (DCV) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL, Caparica).

2.4. Meios de cultura e crescimentos

As leveduras foram cultivadas em meio mínimo YNB (*Yeast Nitrogen Base*) com 2% de glucose, a 30° C com agitação orbital a uma velocidade de 180 rpm. O meio de repressão seletivo 2DOG incluiu 0,67% de YNB, 0,03% de 2-desoxiglucose, 1% de maltose e 2% de agar. As leveduras foram pré-inoculadas em meio mínimo e após 24 h inoculadas em 500 mL do mesmo meio e deixadas crescer até uma densidade ótica (DO) de, aproximadamente 1,6. O crescimento foi seguido pela medição da DO a 640 nm. A recolha das células foi realizada por centrifugação do meio de cultura a 13000 rpm (20° C, 10 min). O sedimento assim obtido foi lavado e centrifugado por duas vezes, em primeiro lugar com água destilada e em seguida com tampão fosfato 10 mM pH 7. Após as centrifugações o sedimento foi armazenado a -20° C para posterior utilização. Após crescimento, as culturas foram controladas em meio seletivo para confirmação do fenótipo de repressão e foi determinado o peso seco.

2.5. Análise do consumo de açúcares por HPLC

Os açúcares consumidos ao longo do crescimento pela estirpe mutante haploide PYCC 5334-6 foram quantificados por HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High performance liquid chromatography*). A estirpe foi pré-inoculada em meio YP (*Yeast extract-Peptone*, meio rico de extrato de levedura e peptona) contendo: 1) 2% glucose; 2) 2% maltose ou 3) 2% galactose. Os pré-inóculos em maltose e glucose foram transferidos para um meio YP contendo uma mistura de 2% glucose e 2% maltose e os pré-inóculos de glucose e galactose foram transferidos para um meio YP contendo uma mistura 2% glucose e 2% galactose. O seu crescimento foi monitorizado durante 12 horas.

A análise por HPLC foi realizada no Laboratório de Análises REQUIMTE - Rede de Química e Tecnologia, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade NOVA de Lisboa. Foi utilizado um equipamento DIONEX ICS3000 equipado com uma coluna CarboPac PA10 250x40 mm + Aminotrap e um detetor PAD.

2.6. Análise proteómica das estirpes de *S. cerevisiae*

2.6.1. Preparação da amostra

As células foram homogeneizadas na presença de um *cocktail* inibidor de proteases numa concentração final de 0,02 mg/mL e de uma mistura de endonucleases, DNase I e RNase I numa concentração final de 0,005 mg/mL. Em seguida, as células foram lisadas numa prensa francesa a 1250 *psi* e centrifugadas a 8000 rpm, durante 15 min a 4 °C. Os extratos proteicos resultantes foram armazenados a -80° C para posterior utilização.

2.6.2. Quantificação de proteína

A quantificação da proteína total de *S. cerevisiae* foi realizada utilizando dois *kits* comerciais, o *BioRad Protein Assay* (BioRad) e o *2-D Quant Kit* (GE Healthcare).

O *kit BioRad Protein Assay* é baseado no método de Bradford e fundamenta-se na alteração de cor do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, em resposta a várias concentrações de proteína, ligando-se aos resíduos aromáticos e básicos (principalmente arginina) dos aminoácidos, e alterando o máximo de absorção de 465 nm para 595 nm ('Bio-Rad protein assay', 2010), valor ao qual foi medida absorvância.

O *2-D Quant Kit* baseia-se na ligação específica dos iões cobre à proteína. O procedimento utiliza a combinação de um precipitante e de um co-precipitante, de forma a precipitar quantitativamente as proteínas em solução deixando os contaminantes interferentes em solução. A proteína é sedimentada por centrifugação e ressuspenso numa solução alcalina de iões cobre. O cobre livre é medido com um agente colorimétrico, a 480 nm. A absorvância medida é inversamente proporcional à concentração de proteína ('2-D Quant Kit', 2009).

Nos dois métodos foi utilizada, como solução padrão, albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA).

2.6.3. Eletroforese bi-dimENSIONAL (2D)

2.6.3.1. Reidratação das *strips*

As *strips* de IPG (*Immobiline Dry Strips*), *strips* de géis de poliacrilamida de 13 cm com um gradiente de pH imobilizado, entre 4 a 7, foram re-hidratadas durante 16 h, numa solução contendo 7 M de ureia, 2 M de tioureia, 4% (m/v) de CHAPS, 1,5% (v/v) de tampão de IPG, 0,002% (m/v) de azul de bromofenol e 0,28% (m/v) de DTT e 250 µg de proteína.

2.6.3.2. 1ª Dimensão: Focagem isoelétrica (IEF)

Após a reidratação das *strips* de IPG foi realizada a focagem isoelétrica a 20 °C, com o programa abaixo, perfazendo um total de 24200 Vh, durante 6 h:

Passo 1: voltagem constante de 300 V (300 Vh, 1 h);

Passo 2: gradiente de voltagem de 300 V até 1000 V (650 Vh, 1 h);

Passo 3: gradiente de voltagem de 1000 V até 8000 V (11250 Vh, 2h30);

Passo 4: voltagem constante de 8000 V (12000 Vh, 1h30).

2.6.3.3. Equilíbrio das *strips* de IPG

Após a focagem isoelétrica, o equilíbrio das *strips* de IPG foi realizado em dois passos. No primeiro passo, as *strips* foram incubadas numa solução de tampão de equilíbrio (6 M de ureia, 50 mM de Tris-base-HCl a pH 8,8, 30% (v/v) de glicerol, 2% (m/v) de SDS e 0,002% de azul de bromofenol) com 10 mg/mL de DTT, durante 10 min num agitador basculante. No segundo passo, as *strips* foram novamente incubadas durante 10 min. sob agitação, na mesma solução tampão de equilíbrio, mas com 25 mg/mL de 2-iodoacetamida.

2.6.3.4. 2ª Dimensão: SDS-PAGE

Após o equilíbrio das *strips* de IPG, estas foram colocadas no topo do gel de poliacrilamida de 16x16 cm num *caster* da Hoefer, numa unidade vertical preparado com 0,375 M tampão Tris-HCl, pH 8,8, 12,5% de acrilamida:bis, 0,2% SDS, 0,05% de TEMED e 0,04% de PSA. Os vidros foram selados com 1% de solução de agarose em tampão de corrida (0,025 M de Tris-base, 0,192 M de glicina e 0,2% de SDS). A eletroforese foi realizada aplicando-se em primeiro lugar

uma voltagem de 80 V durante 30 min, de modo a ocorrer migração da amostra da *strip* de IPG para o gel de 2ª dimensão e, por fim, uma voltagem constante de 250 V durante 3h.

2.6.3.5. Coloração do gel

Após a eletroforese desnaturante (2ª dimensão), os géis foram corados numa solução contendo 0,02% (m/v) de azul *coomassie* coloidal CBB G250, 5% (m/v) de sulfato de alumínio hexadecahidratado, 10% (v/v) de etanol e 2% (v/v) de ácido ortofosfórico. Para tal, após retirar os géis dos vidros estes foram lavados com água destilada três vezes durante 10 min, sob agitação basculante. Em seguida, os géis foram incubados em 200 mL de uma solução de azul *coomassie* coloidal durante 16 h, sob agitação. Seguidamente os géis foram lavados com água destilada duas vezes durante 2m30s e incubados em 200 mL de uma solução de descoloração (10% (v/v) de etanol e 2% (v/v) de ácido ortofosfórico) durante 2 h, sob agitação basculante. Por fim, os géis foram lavados novamente duas vezes em água destilada durante 2m30s.

2.6.3.6. Análise dos géis 2D

A análise de imagem dos géis 2D, bem como a validação estatísticas das abundâncias estatísticas de proteínas nos géis, foram realizadas através do *software Melanie 7.0* da GeneBio. A intensidade dos *spots* foi determinada a partir do volume relativo do *spot* de cada proteína em comparação com o volume normalizado das proteínas. Em seguida foi realizado o emparelhamento (*matching*) entre os géis, onde as imagens dos géis são comparadas de modo a encontrar correspondência entre *spots*. Por fim, foi determinado um valor de razão de variação (*fold change*) entre a média dos volumes relativos dos *spots* em cada classe. Consideraram-se proteínas diferencialmente expressas aquelas que apresentaram uma razão de variação superior a 2 e *p-value* (ANOVA) inferior a 0,05.

2.6.3.7. Análise dos *spots* de interesse – Análise por Espetrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF)

Foram selecionados 16 *spots* que foram excisados a partir dos géis 2D e analisados pela Unidade de Espetrometria de Massa ITQB/iBET (UniMS). Os dados foram adquiridos por MS/MS em modo refletor positivo num aparelho MALDI-TOF/TOF 4800 Plus (AB Sciex). As identificações foram realizadas por comparação dos resultados obtidos por MS com a base de dados de seqüências da UniProt com restrição taxonómica para *Saccharomyces cerevisiae*.

2.7. Replicados realizados para a análise proteômica

Para cada estirpe em estudo (PYCC 5297, PYCC 5334 e PYCC 5334-6) foram realizados três replicados biológicos que correspondem a três crescimentos distintos. Para o caso das estirpes PYCC 5297 e PYCC 5334 para cada replicados biológico foram realizados três replicados técnicos (que correspondem a três géis 2D para cada estirpe). No caso da estirpe PYCC 5334-6 para cada replicado biológico foram realizados dois replicados técnicos (que correspondem a dois géis 2D). Assim, para a análise dos géis no *software Melanie 7.0* foram obtidos no total nove géis 2D de PYCC 5297 e PYCC 5334 e seis géis 2D de PYCC 5334-6.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como foi referido anteriormente, *S. cerevisiae* é um microrganismo bastante utilizado em processos industriais, sendo o desenvolvimento de estirpes capazes de co fermentar dois açúcares em simultâneo, como a glucose e a maltose, uma vantagem em termos biotecnológicos abrindo a possibilidade de aumentar a velocidade nestes processos. Com este objetivo, foi anteriormente desenvolvida uma estirpe mutante de *S. cerevisiae*, PYCC 5334 e um seu derivado haploide, PYCC 5334-6 ambos com a capacidade de metabolizar em simultâneo glucose e maltose. Assim, esta dissertação divide-se em duas partes. A primeira parte centra-se no estudo fisiológico das estirpes mutantes, PYCC 5334 e PYCC 5334-6, mais concretamente, são estudados os seus crescimentos celulares e os consumos de açúcares do haploide durante o crescimento. Na segunda parte deste trabalho pretende-se identificar proteínas diferencialmente expressas entre a estirpe do tipo selvagem e as estirpes mutantes em estudo, através de uma análise proteómica baseada na técnica de eletroforese bidimensional, com posterior análise por técnicas de espectrometria de massa.

3.1. Crescimento celular e consumos de açúcares

As curvas de crescimento obtidas para as estirpes mutantes diploide PYCC 5334 e haploide PYCC 5334-6 de *S. cerevisiae* estão representadas na Figuras 3.1. As células de cada estirpe foram crescidas em meio YP e testadas em quatro condições: i) pré-inóculo em 2% glucose e transferência para meio contendo 2% glucose e 2% maltose (Figuras 3.1 (A)); ii) pré-inóculo em 2% maltose e transferência para meio contendo 2% glucose e 2% maltose (Figura 3.1(B)); iii) pré-inóculo em 2% glucose e transferência para meio contendo 2% glucose e 2% galactose (Figura 3.1 (C)) e iv) pré-inóculo em 2% galactose e transferência para meio contendo 2% glucose e 2% galactose (Figura 3.1 (D)).

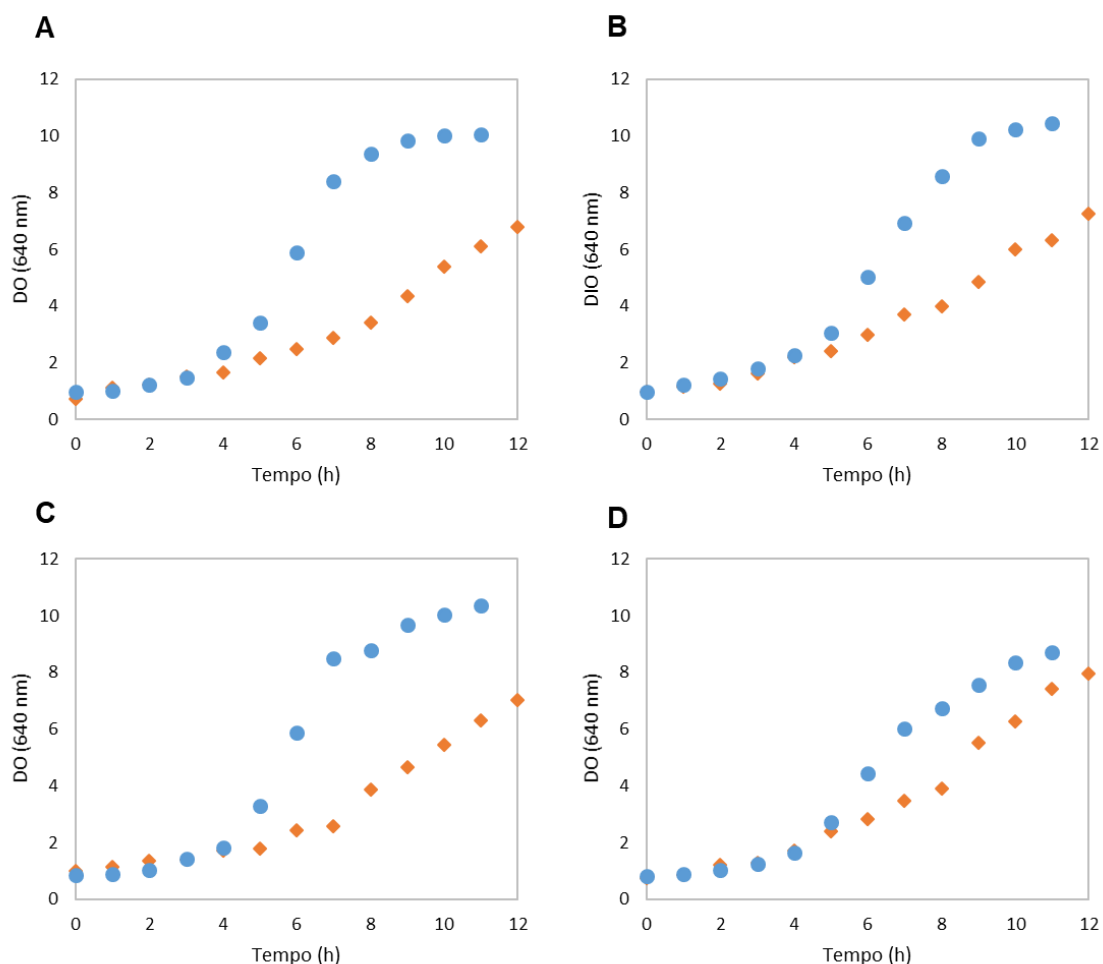


Figura 3.1 – Curvas de crescimento das células de *S. cerevisiae* PYCC 5334 (●) e PYCC 5334-6 (◆) em meio YP. Em (A) foi realizado um pré-inóculo em 2% glucose, seguido de transferência para meio contendo 2% glucose e 2% maltose; em (B) foi realizado um pré-inóculo em 2% maltose, seguido de transferência para meio contendo 2% glucose e 2% maltose; em (C) foi realizado um pré-inóculo em 2% glucose, seguido de transferência para meio contendo 2% glucose e 2% galactose e em (D) foi realizado um pré-inóculo em 2% galactose, seguido de transferência para meio contendo 2% glucose e 2% galactose.

Pela análise da Figura 3.1 pode-se verificar que, das quatro fases características do crescimento (fase *lag*, exponencial, estacionária e morte celular), duas delas são evidentes em todos os ensaios realizados – fase *lag* e fase exponencial. Para além disso é possível constatar que as curvas de crescimento apresentam uma fase de crescimento lento (fase *lag*) (cerca de 3 h), após a qual as células começam a crescer exponencialmente até aproximadamente as 9 h/10 h para o caso da estirpe PYCC 5334 e 12 h para o caso da estirpe PYCC 5334-6. Após o crescimento exponencial segue-se uma fase estacionária, na qual existe um esgotamento dos nutrientes no meio e as células param de crescer. Este efeito é mais claro nas curvas de crescimento das células da estirpe PYCC 5334. É de salientar que a fase de declínio ou morte celular não foi observada em qualquer um dos crescimentos efetuados.

Destaca-se que, apesar de terem sido realizados pré-inóculos em meios contendo diferentes açúcares, a adaptação das células ao meio de crescimento foi idêntica para as duas estirpes.

Os parâmetros de crescimento celular, tais como a taxa específica de crescimento (μ) e o tempo de duplicação (Td) para as várias curvas de crescimento foram calculados a partir do traçado semi-logaritmico da fase exponencial e encontram-se representados na Tabela 3.1. Como esperado, os valores de μ são superiores e, por sua vez os valores de Td são inferiores para a estirpe PYCC 5334, exibindo uma variação de três a cinco vezes, concordante com as curvas de crescimento obtidas.

Tabela 3.1 – Taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (Td) das células das estirpes PYCC 5334 e PYCC 5334-6 de *S. cerevisiae* crescidas em meio YP nas diferentes condições testadas.

		Crescimento em glucose + maltose		Crescimento em glucose + galactose	
		Pré-inóculo em glucose	Pré-inóculo em maltose	Pré-inóculo em glucose	Pré-inóculo em galactose
PYCC 5334	μ (h^{-1})	2,050	1,858	2,254	1,486
PYCC 5334-6	Td (h)	0,338	0,373	0,308	0,466
PYCC 5334-6	μ (h^{-1})	0,427	0,619	0,774	0,545
PYCC 5334-6	Td (h)	1,623	1,121	0,895	1,272

Em trabalhos realizados anteriormente no nosso laboratório, foi analisado o comportamento desrepressivo da estirpe mutante PYCC 5334 e da estirpe selvagem PYCC 5297 de *S. cerevisiae* num meio contendo fontes alternativas de açúcar. Nesse estudo, o crescimento celular foi realizado em culturas contendo uma mistura de glucose e maltose em concentrações relativas similares às utilizadas industrialmente na confeção da cerveja (1,5% de glucose e 7% de maltose) em meio YP. Estes estudos concluíram que quando o mutante PYCC 5334 foi pré-inoculado em glucose e depois transferido para um meio contendo a mistura de açúcares, a maltose e a glucose foram consumidas simultaneamente, embora o tempo total de fermentação se tenha mantido aproximadamente em comparação com o tipo selvagem, indicando que as taxas globais de consumo de glucose e maltose pelo mutante são semelhantes às da estirpe selvagem. No entanto, quando as células do mutante foram pré-inoculadas em maltose antes da transferência para o meio contendo maltose e glucose, verificou-se que a maltose foi preferencialmente consumida, e apenas depois de esgotada esta fonte de açúcar é que se iniciou a absorção de glucose (Salema-Oom *et al.*, 2011).

De forma a confirmar estes resultados e a perceber se a estirpe mutante haploide PYCC 5334-6 apresenta o mesmo comportamento que o mutante diploide foi realizado um estudo nas mesmas condições, mas utilizando misturas de 2% de glucose + 2% maltose e 2% de glucose + 2% de galactose como meios de crescimento (Figura 3.2).

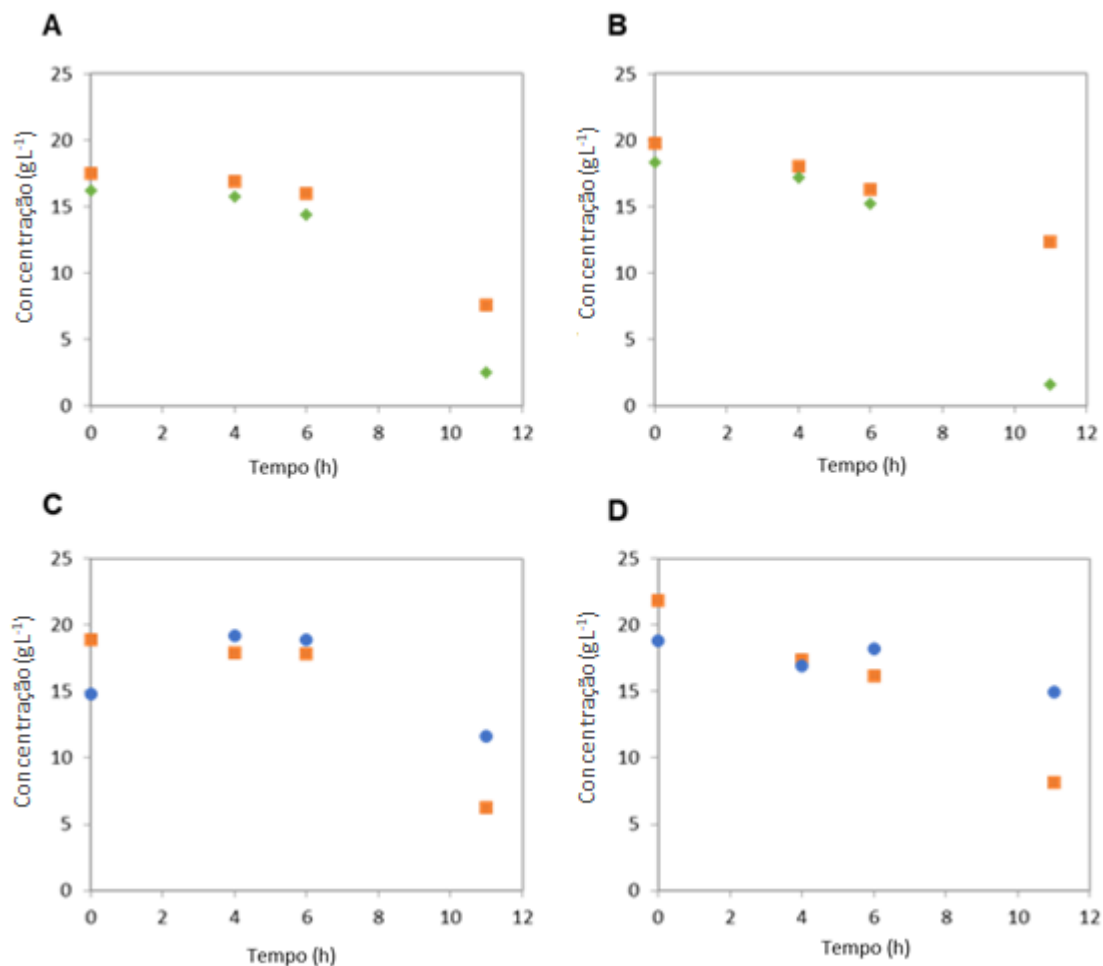


Figura 3.2 – Consumos dos açúcares glucose (■), maltose (◆) e galactose (●) da estirpe PYCC 5334-6 em meio YP. Na primeira experiência a estirpe foi pré-inoculada em 2% de glucose (A) ou 2% de maltose (B) e em seguida transferida para um meio contendo a mistura contendo 2% de glucose e 2% de maltose; na segunda experiência a estirpe foi pré-inoculada em 2% de glucose (C) ou 2% de galactose (D) e em seguida transferida para um meio contendo uma mistura de 2% de glucose e 2% de galactose.

Pela Figura 3.2 A e B pode-se observar que em ambos os casos a glucose e a maltose estão a ser consumidas em simultâneo, embora se note que quando as células de PYCC 5334-6 foram pré-inoculadas em maltose, a glucose esteja a ser consumida a um ritmo mais lento. Assim, a estirpe mutante haploide parece apresentar um comportamento semelhante ao diploide, cujos estudos foram relatados anteriormente, indicando que num meio com maltose esta é preferencialmente consumida pela levedura. Estes resultados sugerem que as proteínas necessárias para o metabolismo da maltose não foram inativadas pela glucose, confirmando assim o fenótipo desreprimido desta estirpe.

As estirpes de *S. cerevisiae* apresentam também um fenótipo desreprimido em relação a outros açúcares, como é o caso da galactose (Figura 3.2 C e D). Neste caso foi também possível constatar que os dois açúcares estão a ser consumidos em simultâneo pela levedura em ambas as condições testadas (pré-inoculo em glucose e pré-inoculo em galactose). Pode-se observar

um pequeno atraso no uso da galactose quando o mutante foi pré-inoculado em glucose, que poderá estar relacionado com a indução dos genes necessários para o metabolismo da galactose.

3.2. Análise proteômica

3.2.1. Quantificação de proteína

Na técnica de eletroforese bidimensional a quantificação precisa da amostra a ser analisada é um procedimento fundamental, uma vez que é necessário garantir que seja aplicada a mesma quantidade de proteína total nas *strips* em todos os ensaios. No entanto, esta quantificação pode tornar um processo difícil, uma vez que no passo da preparação da amostra são comumente utilizados agentes redutores, detergentes, agentes caotrópicos e anfólitos que são incompatíveis com ensaios de quantificação de proteína comuns (Görg, 2004). Deste modo, a quantificação das amostras de *S. cerevisiae* PYCC 5297, PYCC 5334 e PYCC 5334-6 foi realizada utilizando dois métodos: o *kit BioRad Protein Assay* (método de Bradford) e *2D-Quant Kit*, este último especificamente adequado para eletroforese 2D, sendo, contudo, a sua utilização mais complexa e dispendiosa. As curvas de calibração obtidas pelos dois métodos estão representadas na Figura 6.1 no Apêndice 1.

Pela análise da Figura 6.1 (A) em apêndice, que representa a curva de calibração obtida utilizando o *kit BioRad Protein Assay*, pode-se constatar que existe uma proporcionalidade direta entre a absorvância medida e a concentração de proteína. Por este motivo, a curva apresenta um declive positivo. Este ensaio fundamenta-se na alteração de cor do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, em resposta a várias concentrações de proteína, já que se liga aos resíduos aromáticos e básicos dos aminoácidos, principalmente arginina. A Figura 6.1 (B) em apêndice representa a curva de calibração obtida pelo *2D Quant kit*. Neste método, baseado na ligação específica dos íons cobre à proteína, utiliza-se duas soluções: precipitante e co-precipitante que permitem obter um sedimento proteico que é de seguida dissolvido numa solução alcalina dos íons cobre. Posteriormente, o cobre livre é monitorizado a 480 nm pela adição de um agente colorimétrico. Ao contrário do método de *Bradford*, à medida que a concentração de proteína aumenta, a intensidade da cor diminui havendo uma proporcionalidade inversa entre a absorvância medida e a concentração de proteína, obtendo-se assim uma curva com um declive negativo.

Através da equação da reta de ajuste às curvas de calibração, foi possível obter as concentrações de proteína total das amostras de *S. cerevisiae*, cujos valores se encontram apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Valores de concentração de proteína total das amostras de *S. cerevisiae*. Foram realizados duplicados de cada amostra, que por sua vez correspondem a triplicados biológicos.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
	<i>BioRad Protein Assay</i>	<i>2D-Quant Kit</i>
PYCC 5297	$7,40 \pm 0,1$	$10,64 \pm 0,02$
	$9,10 \pm 0,1$	$13,00 \pm 0,03$
	$7,70 \pm 0,1$	$10,10 \pm 0,02$
PYCC 5334	$5,10 \pm 0,3$	$7,73 \pm 0,03$
	$3,20 \pm 0,3$	$5,60 \pm 0,1$
	$5,37 \pm 0,01$	$8,72 \pm 0,01$
PYCC 5334-6	$4,10 \pm 0,1$	$5,41 \pm 0,02$
	$3,60 \pm 0,2$	$9,84 \pm 0,02$
	$5,80 \pm 0,1$	$9,24 \pm 0,01$

Através da análise da Tabela 3.2 é possível verificar que os valores de concentração de proteína total das diferentes amostras variam um pouco de método para método, encontrando-se um pouco mais elevados quando é utilizado o método de *2D-Quant Kit*. Para além disso, os valores obtidos pelo método de *Bradford* apresentam erros mais elevados do que os obtidos pelo segundo método. Isto poderá ser devido a erros associados ao próprio método. Por este motivo, e embora seja um método mais dispendioso e envolva uma maior manipulação da amostra, o método *2D-Quant Kit* foi selecionado como o preferencial para quantificar a proteína total ao longo do trabalho.

É possível observar uma concentração mais elevada para as amostras correspondentes aos replicados biológicos da estirpe selvagem PYCC 5297. É de salientar que depois do processo de lise celular, a amostra correspondente à estirpe PYCC 5297 apresentou sempre uma maior turbidez comparativamente à das mutantes. Contudo, não houve qualquer diferença na constituição do meio de cultura para os crescimentos nem na preparação dos extratos proteicos para a realização de eletroforese 2D. Por sua vez, os extratos celulares foram ressuspensos num volume proporcional à sua quantidade, de forma a aproximar o mais possível as concentrações totais. Assim, as diferenças de concentrações entre as estirpes em estudo poderão estar relacionadas com fatores intrínsecos às próprias frações celulares.

3.2.2. Eletroforese 2D

Os extratos proteicos totais das células da estirpe selvagem - PYCC 5297 - e das estirpes mutante diploide - PYCC 5334 – e mutante haploide – PYCC 5334-6 – de *S. cerevisiae* foram analisados através de eletroforese bi-dimensional de modo a identificar proteínas

diferencialmente expressas que contribuem para o fenótipo desreprimido. Os proteomas estão representados na Figura 3.3.

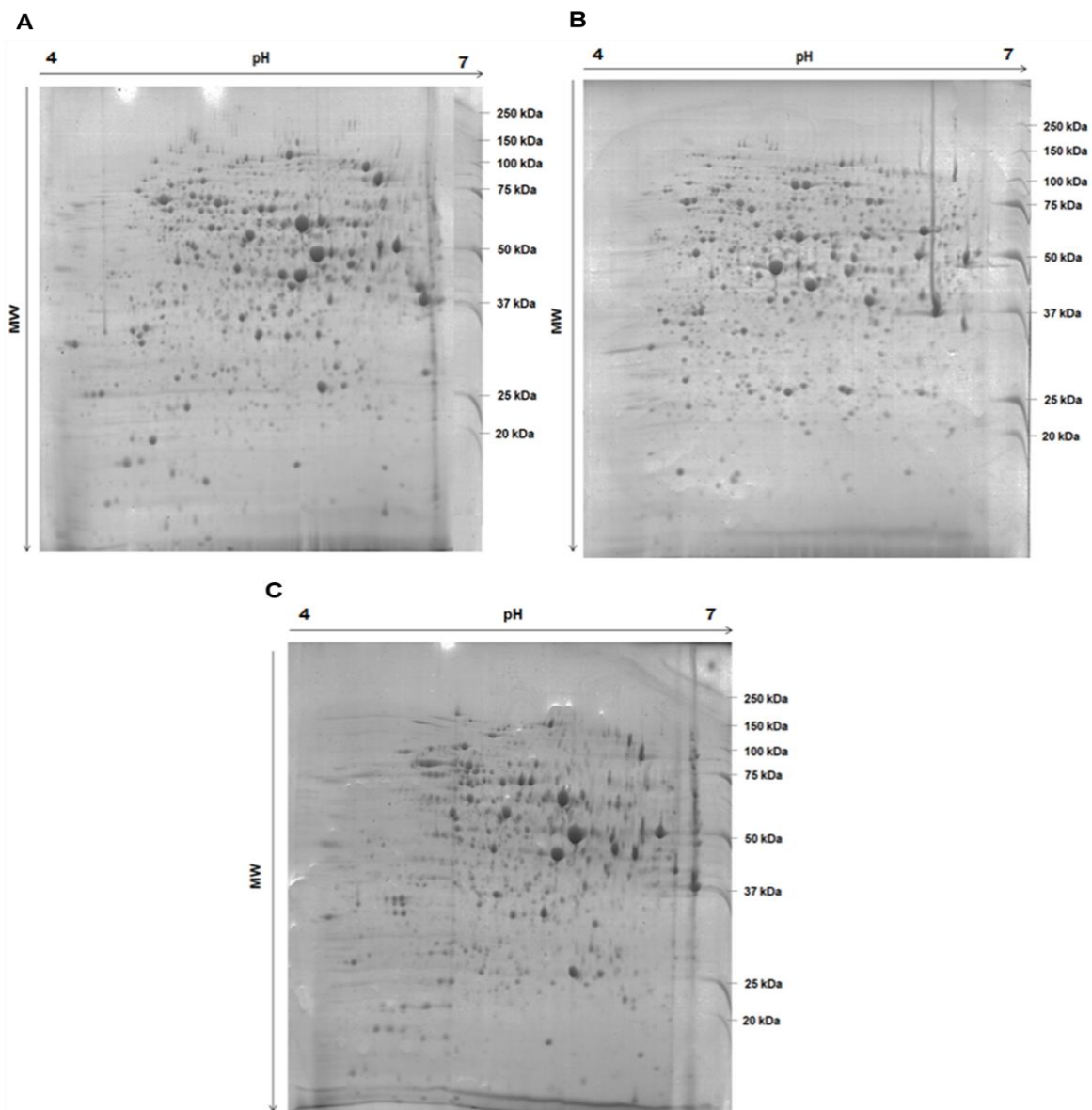


Figura 3.3 – Mapas de géis 2D dos extratos proteicos totais de células das estirpes (A) selvagem PYCC 5297, (B) mutante diploide PYCC 5334 e (C) mutante haploide PYCC 5334-6 de *S. cerevisiae*, onde MW significa massa molecular relativa. As proteínas (250 µg) foram separadas em *strips* de IPG de 13 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagens obtidas no *software* Melanie 7.0].

As imagens dos géis 2D foram processadas pelo *software* Melanie 7.0 e uma análise preliminar detetou 697 *spots* no gel da estirpe PYCC 5297 e 616 *spots* no gel da estirpe PYCC 5334. Estes valores correspondem à média de nove géis de três replicados biológicos para cada estirpe em estudo. Curiosamente, os proteomas da estirpe PYCC 5297 e da estirpe PYCC 5334 exibem perfis bastante diferentes. Uma possível explicação para tantas mudanças será o

tratamento mutagénico aleatório com radiação UV utilizado. O gel da estirpe PYCC 5297 mostrou-se bastante idêntico a géis de estirpes selvagens de *S. cerevisiae* existentes na literatura e ao da Figura 6.2 presente no Apêndice 2. Contudo, em ambos os casos foi possível constatar a existência de uma grande quantidade de *spots* com massa molecular elevada (37 – 150 kDa) e na gama de pH 4,5 – 6,5. Uma vez que se verificou uma diferença bastante acentuada no perfil dos géis, não foi possível realizar a correspondência estatisticamente válida. Neste caso, optou-se por uma análise individual dos géis de cada amostra. Como resultado identificaram-se 53 *spots* de proteína com massas moleculares e pontos isoeletricos bastante semelhantes entre as duas estirpes (Figura 3.4).

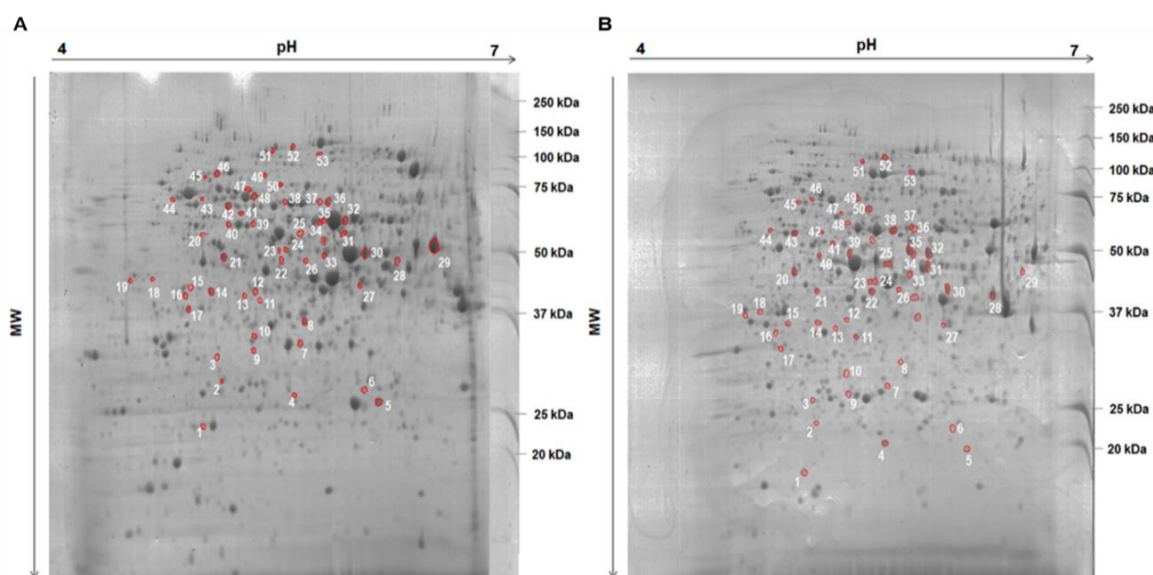


Figura 3.4 – Mapas de géis 2D dos extratos proteicos totais de células (A) da estirpe selvagem PYCC 5297 e (B) da estirpe mutante diploide PYCC 5334 de *S. cerevisiae*, onde MW significa massa molecular relativa. As proteínas (250 µg) foram separadas em *strips* de IPG de 13 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. Os *spots* assinalados correspondem a *spots* comuns às duas estirpes. [imagens obtidas no *software* Melanie 7.0.]

Devido ao elevado número de diferenças encontradas entre estes perfis proteicos resolveu-se analisar, nas mesmas condições, o perfil proteómico das células da estirpe mutante haploide PYCC 5334-6, que foi obtida a partir da PYCC 5334 após esporulação, na qual o fenótipo desreprimido também se encontra presente (Figura 3.3 (C)).

Como referido anteriormente, as imagens dos géis 2D (dois replicados técnicos para três replicados biológicos para o caso da estirpe PYCC 5334-6) foram analisadas pelo *software* Melanie 7.0 tendo-se detetado 586 *spots* numa gama de pH 4 – 7. Foi possível verificar uma maior quantidade de *spots* de proteína entre a gama de pH 4,5 – 6,5 e com massas moleculares elevadas (37 – 150 kDa).

Visto que os perfis proteicos da estirpe PYCC 5297 e desta estirpe mutante PYCC 5334-6 apresentaram grande semelhança, foi realizada uma análise estatística na qual se consideraram

como proteínas diferencialmente expressas as que apresentaram uma razão de variação do volume relativo do *spot* superior a 2 e o *p-value* (ANOVA) menor que 0,05. Assim, foram encontrados 45 *spots* diferencialmente expressos dos quais 18 encontravam-se sobre expressos na estirpe PYCC 5297 e os restantes 27 na estirpe PYCC 5334-6 (Figuras 3.5 (A) e 3.6 (A)). Para além disso, 280 *spots* foram detetados exclusivamente na estirpe PYCC 5297 e 196 *spots* na estirpe PYCC 5334-6 (Figuras 3.5 (B) e 3.6 (B)). Note-se que por *spots* exclusivos, entende-se todo o *spot* que numa condição ou noutra estavam fora do limite de deteção proporcionado pelo tipo de coloração usado. Acrescenta-se também que a análise apresentada neste trabalho se refere apenas à gama de pH 4-7, faltando obter outros intervalos de pH, e como tal, de ponto isoelétrico.

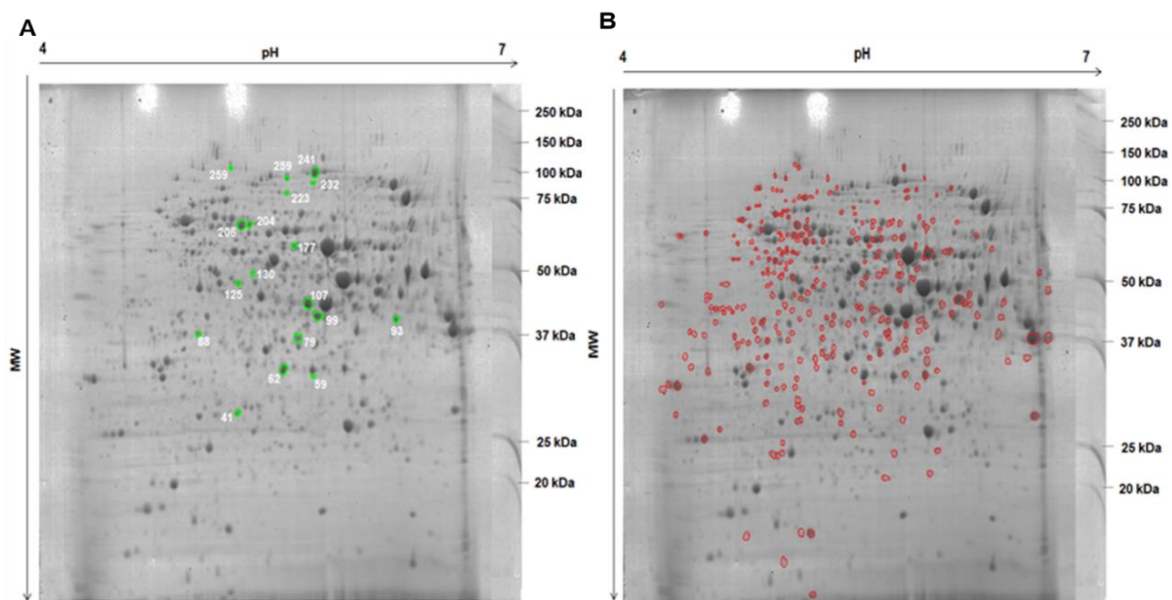


Figura 3.5 – Mapas dos géis 2D dos extratos proteicos totais de células da estirpe selvagem PYCC 5297 de *S. cerevisiae*, evidenciando: (A) *spots* sobre expressos e (B) *spots* exclusivos nesta estirpe. Nas imagens, MW significa massa molecular relativa. As proteínas (250 µg) foram separadas em *strips* de IPG de 13 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagens obtidas no *software Melanie 7.0*.]

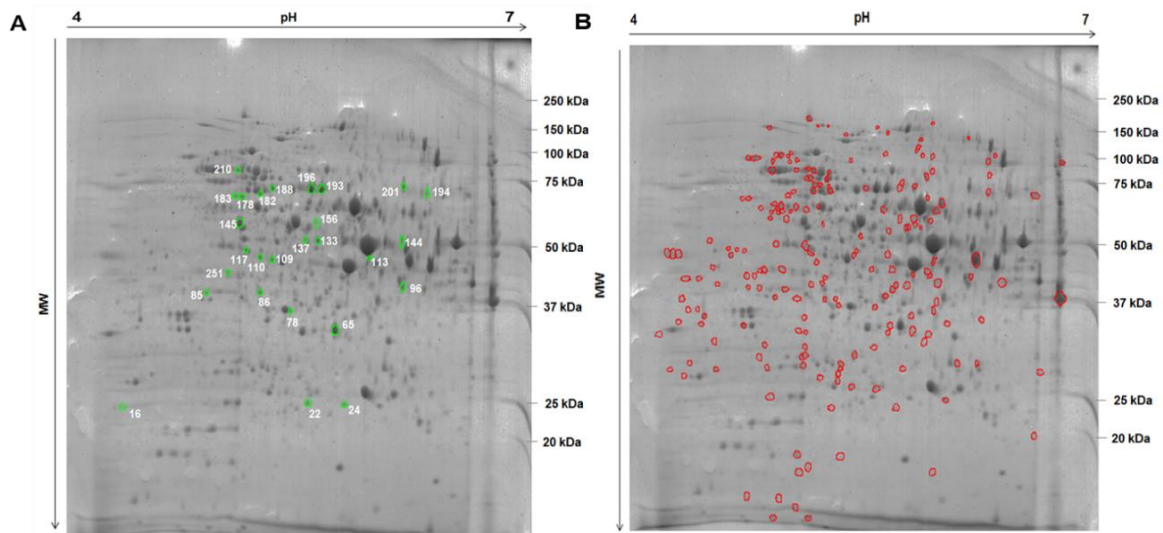


Figura 3.6 – Mapas dos géis 2D dos extratos proteicos totais de células da estirpe mutante haploide PYCC 5334-6 de *S. cerevisiae*, evidenciando: (A) *spots* sobre expressos e (B) *spots* exclusivos nesta estirpe. Nas imagens, MW significa massa molecular relativa. As proteínas (250 µg) foram separadas em *strips* de IPG de 13 cm de pH 4 - 7, seguido por eletroforese SDS-PAGE em géis de 12,5% de acrilamida. Os géis foram corados com azul coomassie coloidal. [imagens obtidas no *software Melanie 7.0.*]

Dado o objetivo do trabalho, assume-se que a identificação dos *spots* que se encontram sobre expressos na estirpe PYCC 5334-6, assim como alguns *spots* “exclusivos” detetados na mesma estirpe, poderá ser mais esclarecedora. Torna-se, portanto, de extrema relevância a identificação dos mesmos por técnicas de espectrometria de massa.

3.3. Identificação de proteínas por Espectrometria de Massa (MALDI-TOF/TOF)

Inicialmente foram selecionados 16 *spots* proteicos para identificação por espectrometria de massa, incluindo *spots* exclusivos da estirpe PYCC 5297 e da estirpe PYCC 5334-6, *spots* sobre expressos na estirpe PYCC 5297 e na estirpe PYCC 5334-6 e *spots* comuns a ambas as estirpes. É importante salientar que esta seleção foi realizada após a análise, com o recurso ao *software Melanie 7.0*, de apenas um gel de cada estirpe, ou seja, ainda não tinha sido realizada a análise estatística. Por este motivo, algumas das proteínas selecionadas não são diferencialmente expressas. As proteínas identificadas, assim como o *spot* proteico correspondente no gel de eletroforese bidimensional podem ser visualizados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Proteínas identificadas correspondentes a *spots* proteicos nos géis obtidos através de eletroforese 2D, com identificação do respetivo gene, do *score* obtido após a análise e da respetiva massa molecular relativa (MW) e ponto isoelétrico (pI) existentes na literatura (teórico) e os valores obtidos diretamente do gel 2D (prático). A última coluna indica a variação da expressão das proteínas nas duas estirpes em estudo, onde as setas (↑ e ↓) indicam a sobre e sub expressão das proteínas e os valores numéricos correspondem à respetiva variação.

Spot	Identificação da proteína	Score*	Gene	MW (Da) Teórico	pI Teórico	MW (Da) Prático	pI Prático	Expressão	
								PYCC 5334-6	PYCC 5297
908	Peroxirredoxina tipo 2	66	<i>AHP1</i>	19103	5,01	22000	4,9	Exclusivo	
909	Peroxirredoxina TSA1	167	<i>TSA1</i>	21576	5,03	25000	5,1	Exclusivo	
750	Piruvato descarboxilase isoforma 1	467	<i>PDC1</i>	61472	5,8	60000	5,9	Exclusivo	
700	Subunidade a da ATPase de membrana vacuolar	458	<i>VMA1</i>	64774	5,17	67000	5,1	Exclusivo	
592	Fator de alongamento 1-beta	110	<i>EFB1</i>	22613	4,3	27000	4,3	Exclusivo	
110	Proteína de choque térmico 70	529	<i>SSA1</i>	63398	5,2	47000	5,2	↑ 4,03	
145	Subunidade beta da ATP sintase mitocondrial	851	<i>ATP2</i>	54760	5,52	55000	5,1	↑ 2,43	
96	Proteína nuclear 2 ubiquinol citocromo-c redutase de 40 kDa	379	<i>QCR2</i>	40379	7,67	42000	6,2	↑ 9,35	
99	Álcool desidrogenase 4	82	<i>ADH4</i>	41116	5,76	42000	5,7	↓ - 4,87	
107	Frutose-bifosfato aldolase	277	<i>FBA1</i>	39596	5,51	43000	5,6	↓ - 3,48	
255	Cetol-ácido redutoisomerase mitocondrial	1120	<i>ILV5</i>	44341	9,1	42000	6,6	Comum	
255	Cetol-Ácido redutoisomerase mitocondrial	399	<i>ILV5</i>	44341	9,1	42000	6,6	Comum	
71	Proteína ribossomal acídica P0 60S	161	<i>RPP0</i>	33696	4,75	36000	4,7	Comum	
186	Proteína de ligação YNL209Wp	1300	<i>SSB2</i>	64731	5,43	72000	5,2	Comum	
57	Yra1p	10	<i>SUB2</i>	11932		32000	4,3	Comum	

*Apenas os *scores* de proteínas superiores a 61 são significativos ($p < 0,05$), sendo o *score* calculado a partir da fórmula $-10 \cdot \log(P)$ onde P é a probabilidade de que o evento observado seja um evento aleatório.

Em primeiro lugar, é importante referir que a proteína Yra1p apresenta um score inferior a 61, pelo que esta será descartada da análise efetuada a seguir.

Pela observação da tabela 3.3 pode-se verificar que foram analisadas duas amostras que correspondem ao mesmo *spot* (255), cuja proteína identificada foi a Cetol-Ácido redutoisomerase mitocondrial. As duas amostras foram excisadas cada uma de um gel 2D de cada estirpe, servindo esta proteína de controlo, tendo-se confirmado o mesmo ponto isoelétrico e o mesmo peso molecular.

A próxima análise será com vista a comparar o peso molecular e o ponto isoelétrico teóricos, ou seja, os valores presentes em bases de dados com os mesmos determinados a partir do gel 2D. Relativamente ao *spot* 96, cuja proteína identificada foi a Proteína nuclear 2 ubiquinol citocromo-c redutase de 40 kDa, é possível verificar que o pI teórico (7,67) se encontra fora do intervalo de valores estudados (4-7) e que o mesmo determinado a partir do gel 2D foi de 6,2. Este *spot* corresponde a uma proteína que se encontra sobre expressa na estirpe PYCC 5334-6, que poderá ter sofrido uma mutação que alterou a carga do aminoácido e, conseqüentemente, o seu ponto isoelétrico. O mesmo acontece com o *spot* 255, cujo pI é de 9,1 e o determinado a partir do gel 2D foi de 6,6. Relativamente ao *spot* 145, cuja proteína identificada foi a Subunidade beta da ATP sintase mitocondrial, o pI teórico (5,52) é superior ao determinado a partir do gel 2D (5,1), o que pode indicar igualmente uma mutação.

Pode-se observar também que o *spot* 110, que corresponde à Proteína de choque térmico 70, apresenta um MW determinado a partir do gel 2D (47000 Da) muito inferior àquele que foi identificado (63398 Da). O mesmo acontece com o *spot* 186 (Proteína de ligação YNL209Wp) cujo MW determinado a partir do gel 2D (72000 Da) é superior ao previsto (64731 Da).

Em seguida, para tentar descobrir possíveis relações funcionais entre as proteínas identificadas, foi realizada uma análise GO (*GO Term Finder*) na plataforma SGD (*Saccharomyces Genome Database*), onde os genes estudados são agrupados por processo biológico, função e localização celular. Para esta análise foram selecionados 10 genes da lista de genes identificados por MS que têm a sua expressão alterada (ou se encontram diferencialmente expressos ou são exclusivos de uma das duas estirpes em estudo). Esta informação encontra-se presente na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Termos GO para os genes identificados com alteração na expressão (diferencialmente expressos ou exclusivos), com a respetiva frequência de amostra, frequência de *background*, *P-value* e os genes correspondentes.

Termos GO	Frequência de amostra	Frequência de <i>background</i>	<i>P-value</i>	Genes
<u>Processo Biológico</u>				
Metabolismo de ATP	4/10; 40,0%	73/7165; 1,0%	0,00131	<i>ATP2, FBA1, PDC1, QCR2</i>
Regulação negativa do envelhecimento celular	3/10; 30,0%	5/7165; 0,1%	0,00269	<i>SSA1, TSA1, AHP1</i>
Produção de metabolitos precursores e energia	4/10; 40,0%	155/7165; 2,2%	0,00616	<i>ADH4, FBA1, PDC1, QCR2</i>
Processo celular de organismo único	10/10; 100 %	2626/7165; 36,7%	0,00666	<i>EFB1, SSA1, VMA1, ADH4, ATP2, FBA1, PDC1, AHP1, TSA1, QCR2</i>
Metabolismo da glucose	3/10; 30,0%	60/7165; 0,8%	0,00990	<i>FBA1, PDC1, TSA1</i>
<u>Componente celular</u>				
Polissoma	2/10; 20,0%	33/7165; 0,5%	0,00286	<i>SSA1, TSA1</i>
Componente do citoplasma	10/10; 100%	3398/7165; 47,4%	0,00321	<i>EFB1, SSA1, VMA1, ADH4, ATP2, FBA1, PDC1, AHP1, TSA1, QCR2</i>
<u>Função molecular</u>				
Atividade de peroxirredoxina	2/10; 20,0%	7/7165; 0,1%	0,00161	<i>AHP1, TSA1</i>
Atividade de peroxidase tiorredoxina	2/10; 20,0%	7/7165; 0,1%	0,00161	<i>AHP1, TSA1</i>
Transportador transmembranar de iões de hidrogénio	3/10; 30,0%	61/7165; 0,9%	0,00297	<i>VMA1, ATP2, QCR2</i>
Atividade de ATPase transportadora de protões	2/10; 20,0%	16/7165; 0,2%	0,00916	<i>VMA1, ATP2</i>
Atividade de transportador transmembranar de catiões inorgânicos monovalentes	3/10; 30,0%	71/7165; 1,0%	0,00468	<i>VMA1, ATP2, QCR2</i>

Relativamente aos seus processos biológicos e funções moleculares, as proteínas analisadas dividem-se em três grupos: metabolismo energético (incluindo metabolismo da glucose), regulação negativa do envelhecimento celular e outros processos celulares (biossíntese de proteínas).

Metabolismo energético

Das proteínas identificadas cerca de metade apresentou funções relacionadas ao metabolismo energético de *S. cerevisiae*, em que quatro foram identificadas na estirpe mutante: duas com sub expressão (Álcool desidrogenase 4 e Frutose-bifosfato aldolase) e outras duas com sobre expressão (Proteína nuclear 2 ubiquinol citocromo-c redutase de 40 kDa e Subunidade beta da ATP sintase mitocondrial). Para além disso, outras duas foram encontradas

como exclusivas na estirpe selvagem (Piruvato descarboxilase isoforma 1 e Subunidade a da ATPase de membrana vacuolar).

A Álcool desidrogenase 4 (ADH4) é uma proteína responsável por reduzir o acetaldeído a etanol durante a fermentação da glucose e é altamente expresso em estirpes utilizadas no fabrico de cerveja (Drewke and Ciriacy, 1988; Dickinson, Salgado and Hewlins, 2003). Evidências experimentais demonstram que a atividade desta proteína em *S. cerevisiae* é ativada pelo zinco e a sua expressão é regulada positivamente pelo lítio e negativamente pelo DMSO (Dimeltisulfóxido) (Williamson and Paquin, 1987; Yuan, 2000). A Frutose-bifosfato aldolase (FBA1) codifica uma enzima citoplasmática que catalisa a conversão de 1,6 bifosfato de frutose em dois produtos de 3 carbonos: gliceraldeído-3-fosfato e fosfato de dihidroxiacetona. Para além disso, é capaz de catalisar a reação inversa, ou seja, a síntese de frutose 1,6 bifosfato a partir do gliceraldeído-3-fosfato e da dihidroxiacetona fosfato. Em *S. cerevisiae* Fba1p consiste em duas subunidades idênticas de 40 kDa, cada uma contendo um átomo de zinco fortemente ligado, essencial para a função catalítica (Lobo, 1984; Schwelberger, Kohlwein and Paltauf, 1989; Compagno, Ranzi and Martegani, 1991). Como referido anteriormente, ambas as proteínas encontram-se sub expressas na estirpe PYCC 5334-6, o que pode ser justificado pelo facto de nesta estirpe a capacidade de fermentação ser ligeiramente inferior à estirpe selvagem (Salema-Oom *et al.*, 2011).

A Piruvato descarboxilase isoforma 1 (PDC1) é a maior das três isoenzimas de piruvato descarboxilase (PDC1, PDC5 e PDC6) e catalisa a descarboxilação do piruvato em acetaldeído, em que a maior parte é reduzido a etanol pela álcool desidrogenase, sendo por vezes necessário para a produção de acetil-CoA citosólico para vias biossintéticas (Eberhardt *et al.*, 1999). É uma enzima chave na fermentação alcoólica, comprometendo o produto final da glicólise, o piruvato e a produção de etanol. Para além disso, é capaz de descarboxilar alfa-cetoácidos mais complexos do que o piruvato, que parecem principalmente envolvidos no catabolismo de aminoácidos (Eberhardt *et al.*, 1999). A piruvato descarboxilase é conservada entre leveduras, bactérias e plantas e tem sido bem caracterizada ao nível estrutural e enzimático. É regulada por glucose e etanol sendo ativada por fosforilação em resposta aos níveis de glucose (Eberhardt *et al.*, 1999). Sendo uma enzima importante na fermentação, seria esperado que estivesse igualmente presente no proteoma da estirpe PYCC 5334-6. No entanto, estudos indicam que as estirpes haploides de levedura (como é o caso de PYCC 5334-6) possuem três isoformas homólogas de Pdc codificadas pelos genes PDC1, PDC5 e PDC6 e que a expressão de apenas um destes três genes é suficiente para conferir atividade Pdc (Karlsson *et al.*, 1999).

A Subunidade a da ATPase de membrana vacuolar (VMA1) codifica a subunidade A do domínio V-ATPase V1 de levedura. As (H)-ATPases vacuolares (V-ATPases) são bombas de prótons dependentes de ATP que acidificam os compartimentos vacuolares intracelulares em células eucarióticas. A acidificação vacuolar é importante para vários processos celulares, incluindo endocitose, segmentação de enzimas lisossómicas recentemente sintetizadas e outros processos de segmentação molecular (Hirata *et al.*, 1990; Kane *et al.*, 1990). Na levedura *S. cerevisiae*, a membrana vacuolar H⁺-ATPase vacuolar pode também participar na manutenção

da homeostasia do cálcio citoplasmático (Hirata *et al.*, 1990). Os mutantes de *S. cerevisiae* que possuem um fenótipo Vma- são incapazes de crescer a pH 7,5, apresentam sensibilidade a Ca²⁺, sensibilidade a Zn²⁺ e incapacidade de utilizar fontes de carbono não fermentáveis (Oluwatosin and Kane, 1998; Sambade *et al.*, 2005). As V-ATPases são grandes complexos constituídos por várias subunidades estruturalmente organizados em dois domínios principais, V1 e V0. Estudos sugerem que a oxidação da glucose pode fornecer energia química necessária para a montagem adequada da subunidade C em V1V0. Para além da glucose, este processo pode ser desencadeado por outros açúcares rapidamente fermentáveis, como a frutose (Parra, Chan and Chen, 2014). Esta proteína encontra-se ausente na estirpe mutante PYCC 5334-6.

ATP2 codifica a subunidade beta da ATPase mitocondrial (F1F0 ATPase ou complexo V), um grande complexo de enzimas, evolutivamente conservado e necessário para a síntese de ATP. O ATP é produzido a partir de ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana, que é gerado por complexos de transporte de elétrons da cadeia respiratória. A região 3' não traduzida do mRNA de *ATP2* contém um elemento de sequência que medeia a localização do mRNA na mitocôndria. A mutação deste elemento também resulta num defeito de crescimento em fontes de carbono não fermentáveis (Saltzgaber-muller, Kunapuli and Douglas, 1983; Takeda, Vassarotti and Douglas, 1985; Liu and Liu, 2007). Por fim, a Proteína nuclear 2 redutase de citocromo-c ubiquinol de 40 kDa (QCR2) é uma proteína localizada na mitocôndria e faz parte do complexo ubiquinol-citocromo-redutase (também conhecido como complexo III). Este complexo constitui uma parte da cadeia respiratória mitocondrial, sendo esta proteína necessária para a montagem do complexo (Oudshoorn *et al.*, 1987). Estudos anteriores estimaram a taxa de respiração em células PYCC 5334 e PYCC 5297 crescidas em glucose e concluíram que a capacidade respiratória aumentou três vezes em PYCC 5334 comparativamente com a estirpe selvagem. Este aumento revela que a via oxidativa do consumo de glucose também se encontra relativamente desreprimida na estirpe mutante (Salema-Oom *et al.*, 2011). Estes resultados estão em concordância com as observações de que as proteínas ATP sintase e a redutase de citocromo-c encontram-se sobre expressa na estirpe PYCC 5334-6.

Regulação negativa do envelhecimento celular: Atividade de peroxidase e resposta ao stress

Proteínas envolvidas na regulação do envelhecimento celular apresentam funções relacionadas com a destoxificação celular e resposta ao *stress*. Estas apresentam diferentes expressões nas duas estirpes estudadas. Por exemplo, as peroxirredoxinas do tipo 2 (Ahp1) e Tsa1 foram identificadas como estando presentes apenas no proteoma da estirpe mutante PYCC 5334-6. São duas das peroxiderrroxinas mais abundantes em *S.cerevisiae* sendo ambas proteínas envolvidas em processos antioxidantes. Mais especificamente, a Ahp1p é uma proteína citosólica específica para grupos tiol com atividade hidroperoxidase de alquilo (Lee *et al.*, 1999). Está envolvida na resistência ao *stress* osmótico e na destoxificação da célula,

reduzindo os hidroperóxidos de forma a proteger a célula de danos oxidativos (Trivelli *et al.*, 2003). Por sua vez, a Tsa1p é uma proteína de resposta ao *stress* de importância fisiológica, constituindo uma defesa enzimática contra radicais contendo enxofre (Ho Zoon Chae *et al.*, 1993). Durante condições de crescimento normais (não stressantes), Tsa1 possui atividades duplas como peroxidase e como chaperone. A sua atividade de chaperone é essencial também para o crescimento em condições de deficiência de zinco (Yuan, 2000). Os mutantes de levedura que não possuem esta proteína acumulam agregados de proteínas ribossômicas, indicando que Tsa1 está envolvida na manutenção e integridade do aparelho de tradução, onde protege as proteínas ribossômicas contra danos oxidativos e agregação de proteínas inespecíficas (Trotter *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2013). Para além de desempenhar funções como antioxidante e chaperone, estudos recentes demonstram que Tsa1 tem um papel crucial na obtenção de uma transição eficiente da glicólise para a neoglucogénese (Irokawa *et al.*, 2016). Tal é conseguido através da interação com Pyk1 (piruvato cinase), que catalisa a reação irreversível que gera ATP e piruvato a partir do fosfoenolpiruvato e ADP no passo final da glicólise, sendo essencial quando uma fonte de carbono fermentável, como a glucose é utilizada. Resumindo, Ahp1 e Tsa1 são as duas peroxirredoxinas mais abundantes da levedura *S. cerevisiae*, pelo que se esperava encontrar também no proteoma da estirpe PYCC 5297. É importante voltar a referir que por *spots* exclusivos entende-se aqueles que se encontram fora do limite de deteção proporcionado pelo tipo de coloração usado. Assim, embora não sejam detetáveis no gel 2D nas condições estudadas, estas proteínas podem também estar expressas na estirpe PYCC 5297.

Relativamente às proteínas associadas à resposta ao *stress*, Hsp70 (Ssa1), foi identificada com sobre expressão na estirpe mutante. As proteínas de choque térmico (HSP) são essenciais para o *fold*ing de proteínas intracelulares durante o *stress* e protegem as células de eventos de desnaturação e agregação que podem levar à morte celular. Ssap e Ssbp são as subfamílias de Hsp70s mais abundantes em *S. cerevisiae*. SSA1 é induzido quando a temperatura é aumentada e leveduras que não possuem este gene exibem um fenótipo sensível à temperatura. Pelo contrário, a transcrição de SSB2 diminui a temperaturas elevadas. Há evidências que mostram que Ssb interage com o fator de transcrição HSF1, reduzindo a sua atividade. Foi descrito também que Ssbp é crucial para uma regulação eficiente da via de sinalização envolvendo Snf1, permitindo assim uma resposta apropriada à mudança nos níveis de glucose no meio (Von Plehwe *et al.*, 2009). O choque térmico causa uma modulação profunda nas vias de sinalização celular que conduzem à ativação de um grande número de proteínas cinase (Pi-3K, ERK, P38MK, PKA e j-junK), que podem influenciar positiva ou negativamente a resposta ao choque térmico (S. K. Calderwood *et al.*, 2010). Assim, a sobre expressão da proteína de choque térmico na estirpe PYCC 5334-6 pode indicar a ativação de proteínas cinase nesta estirpe.

Outros processos celulares: biossíntese de proteínas

Por último, o fator de alongamento 1-beta trata-se de uma proteína ausente da estirpe PYCC 5334-6. O fator de alongamento 1-beta (EFB1) é um membro da família de fatores de troca de

nucleótidos de guanina, cujas atividades são importantes para a regulação de proteínas G, críticas para muitos processos celulares (Hiraga *et al.*, 1993). EFB1 é uma proteína altamente conservada que catalisa a troca de GDP por GTP no fator de alongamento EF-1alfa, um passo necessário para assegurar a continuidade da síntese proteica. Esta proteína está envolvida na via de alongamento da cadeia polipeptídica, que por sua vez, faz parte da biossíntese de proteínas (Kinzy and Woolford, 1995; Carr-Schmid *et al.*, 1999).

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Ao contrário da estirpe selvagem PYCC 5297 de *S. cerevisiae*, os mutantes PYCC 5334 e PYCC 5334-6 têm a capacidade de fermentar simultaneamente glucose e um outro açúcar alternativo, como a maltose, proporcionando uma vantagem em processos biotecnológicos e industriais. O objetivo principal desta dissertação passou então pela identificação das proteínas que têm a sua expressão alterada como resultado da mutação, através da análise dos proteomas das estirpes em estudo por eletroforese bidimensional e posterior identificação por técnicas de espectrometria de massa.

Em primeiro lugar, o crescimento da estirpe PYCC 5334-6 em meio YP contendo uma mistura de açúcares (glucose + maltose e glucose + galactose) permitiu concluir que esta estirpe apresenta fenótipo desreprimido em relação à maltose e à galactose, uma vez que estes açúcares são consumidos em simultâneo com a glucose. Concluiu-se também que quando as células são pré-inoculadas em meio com maltose o consumo da glucose é realizado a um ritmo mais lento.

Após uma análise proteómica, os perfis proteicos das estirpes PYCC 5297 e PYCC 5334 concluiu-se que estes mostraram-se bastante diferentes. Pelo contrário, os géis das estirpes PYCC 5297 e PYCC 5334-6 encontram-se bastante similares, tendo-se identificado 45 *spots* diferencialmente expressos.

A análise MS a 16 *spots* permitiu concluir que as proteínas sobre expressas na estirpe PYCC 5334-6 apresentam funções relacionadas com a respiração celular e resposta ao *stress*. Por outro lado, as proteínas sub expressas na mesma estirpe desempenham funções importantes na fermentação e na glicólise. Concluiu-se também que as proteínas presentes exclusivamente na estirpe PYCC 5334-6 estão envolvidas em processos de destoxificação celular e as proteínas presentes apenas na estirpe selvagem estão envolvidas em processos do metabolismo energético e na biossíntese de proteínas.

Neste trabalho não foi possível identificar um número significativo de proteínas diferencialmente expressas, no entanto os resultados obtidos comprovam a viabilidade do projeto. Assim, as tarefas futuras para completar a análise realizada neste trabalho deverão incluir:

- Análise por eletroforese 2D das estirpes PYCC 5297, PYCC 5334 e PYCC 5334-6 utilizando outras gamas de pH, nomeadamente 3-5 e 6-11, uma vez que muitas proteínas das estirpes PYCC 5334 e PYCC 5334-6 poderão ter o seu ponto isoelétrico alterado como resultado da mutação;
- Repetir a análise por MS de alguns *spots* analisados neste trabalho de forma a confirmar as identificações realizadas;
- Análise por MS de outros *spots* de interesse, nomeadamente os *spots* de proteínas expressas diferencialmente nas estirpes PYCC 5334-6 e PYCC 5297, de forma a

compreender mais detalhadamente as vias de sinalização que se encontram alteradas como resultado da mutação;

- Validação dos resultados obtidos por eletroforese 2D utilizando técnicas de transcriptômica, de forma a estudar as alterações a nível da expressão genética nas células das estirpes mutantes de *S. cerevisiae* em comparação com a estirpe selvagem.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- '2-D Quant Kit' (2009) *GE Healthcare*.
- 2D Gel Map of *Saccharomyces cerevisiae* proteins (2009) *Yeast 2D Map*.
- de Alencar, E. M. B. *et al.* (2009) 'Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* cultures', *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4), pp. 819–824. doi: 10.1590/S1516-89132009000400004.
- Almeida, G., Rodrigues, C. and Lampreia, J. (2001) 'Proteomas: a interface entre a biologia molecular e a bioquímica das proteínas', *Boletim de Bioecologia*, pp. 49–56.
- Barnett, J. A. (1998) 'A history of research on yeasts 1: Work by chemists and biologists 1789–1850', *Yeast*, 14(16), pp. 1439–1451. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1439::AID-YEA339>3.0.CO;2-Z.
- Barnett, J. A. (2003) 'Beginnings of microbiology and biochemistry: The contribution of yeast research', *Microbiology*, 149(3), pp. 557–567. doi: 10.1099/mic.0.26089-0.
- Barriga, E. J. C. *et al.* (2011) 'Yeasts Biodiversity Significance: Case Studies in Natural and Human-Related Environments, Ex Situ Preservation, Applications and Challenges', *Changing Diversity in Changing Environment*, pp. 55–8.
- Bauer, E. F. and Pretorius, L. S. (2000) 'Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine - A Review', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(Special Issue), pp. 27–51.
- Bergman, L. W. (2001) 'Growth and maintenance of yeast.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 177, pp. 9–14. doi: 10.1385/1-59259-210-4:009.
- 'Bio-Rad protein assay' (2010) *Bio-rad*, pp. 1–24.
- Bisson, L. F. (2004) 'The Biotechnology of Wine Yeast', *Food Biotechnology*, 18(1), pp. 63–96. doi: 10.1081/FBT-120030385.
- Boucherie, H. *et al.* (1995) 'Two-Dimensional protein map of *Saccharomyces cerevisiae*: Construction of a gene-protein index', *Yeast*, 11(7), pp. 601–613.
- Braconi, D. *et al.* (2011) 'Surfome analysis of a wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* strain', *Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 28(6), pp. 1220–1230. doi: 10.1016/j.fm.2011.04.009.
- Bro, C. *et al.* (2003) 'Transcriptional, proteomic, and metabolic responses to lithium in galactose-grown yeast cells', *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), pp. 32141–32149. doi: 10.1074/jbc.M304478200.
- Broek, V. Den, Uden, V. and Uden, V. (1989) 'Glucose Transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts', *Journal of General Microbiology*, (135), pp. 2399–2406. doi: 10.1099/00221287-135-9-2399.
- Buzzini, P. and Vaughan-Martini, A. (2006) 'Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts', in *The yeast handbook*, pp. 533–559. doi: 10.1007/3-540-30985-3.
- Carlson, M. (1998) 'Regulation of glucose utilization in yeast', *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(5), pp. 560–564. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.048.Coupling.
- Carr-Schmid, a *et al.* (1999) 'Mutations in elongation factor 1beta, a guanine nucleotide exchange factor, enhance translational fidelity.', *Molecular and cellular biology*, 19(8), pp. 5257–66.
Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84369&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Change, Y. S. *et al.* (1988) 'MAL63 codes for a positive regulator of maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*', *Current Genetics*, 14, pp. 201–209. doi: 10.1007/BF00376740.
- Christensen, T. S., Oliveira, A. P. and Nielsen, J. (2009a) 'Reconstruction and logical modeling of glucose repression signaling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*.' , *BMC systems biology*, 3, p. 7. doi: 10.1186/1752-0509-3-7.
- Christensen, T. S., Oliveira, A. P. and Nielsen, J. (2009b) 'Reconstruction and logical modeling of glucose repression signaling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*.' , *BMC systems biology*,

3, p. 7. doi: 10.1186/1752-0509-3-7.

Compagno, C., Ranzi, B. M. and Martegani, E. (1991) 'The promoter of *Saccharomyces cerevisiae* FBA1 gene contains a single positive upstream regulatory element', *FEBS Letters*, 293(1–2), pp. 97–100. doi: 10.1016/0014-5793(91)81160-A.

Conrad, M. *et al.* (2014) 'Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), pp. 254–299. doi: 10.1111/1574-6976.12065.

Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J. and Hewlins, M. J. E. (2003) 'The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), pp. 8028–8034. doi: 10.1074/jbc.M211914200.

Dickinson J.R and Kruckeberg, A. (2006) 'Chapter 8 - Carbohydrate Metabolism', in *Yeasts in Food and Beverages*, pp. 215–242.

Drewke, C. and Ciriacy, M. (1988) 'Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*.', *Biochimica et biophysica acta*, 950(1), pp. 54–60. doi: 10.1016/0167-4781(88)90072-3.

Eberhardt, I. *et al.* (1999) 'Autoregulation of yeast pyruvate decarboxylase gene expression requires the enzyme but not its catalytic activity', *European Journal of Biochemistry*, 262(1), pp. 191–201. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00370.x.

Fraenke, D. G. (1982) 'Carbohydrate metabolism', in Strathern, J. N., Jones, E. W., and Broach, J. R. (eds) *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: The Metabolism and Gene Expression*. , Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 1–37. doi: 10.1016/j.mpsur.2008.12.002.

Gamo, F. J., Lafuente, M. J. and Gancedo, C. (1994) 'The mutation DGT1-1 decreases glucose transport and alleviates carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Bacteriology*, 176(24), pp. 7423–7429.

Gancedo, C. and Serrano, R. (1989) 'Energy yielding metabolism', in Rose, A. H. and Harrison, J. S. (eds) *Yeasts*. London: Academic Press, pp. 205–259.

Gancedo, J. M. (1998) 'Yeast Carbon Catabolite Repression', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), pp. 334–361.

Gancedo, J. M. (2008) 'The early steps of glucose signalling in yeast', *FEMS Microbiology Reviews*, 32, pp. 673–704. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00117.x.

Garrels, J. I. *et al.* (1997) 'Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: Identification and characterization of abundant proteins', *Electrophoresis*, 18, pp. 1347–1360.

Giardina, B. J., Stanley, B. a and Chiang, H.-L. (2012) 'Comparative Proteomic Analysis of Transition of *Saccharomyces cerevisiae* from Glucose-Deficient Medium to Glucose-Rich Medium', *Proteome Science*, 10, p. 40. doi: 10.1186/1477-5956-10-40.

Gilmore, J. M. and Washburn, M. P. (2010) 'Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes', *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V., 73(11), pp. 2078–2091. doi: 10.1016/j.jprot.2010.08.005.

Glazer, A. N. and Nikaido, H. (2007) *Microbial Biotechnol.* 2nd edn. Cambridge University Press, New York.

Görg, A. (2004) *2-D Electrophoresis - Principles and Methods*.

Görg, A., Weiss, W. and Dunn, M. J. (2004) 'Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics', *Proteomics*, 4, pp. 3665–3685. doi: 10.1002/pmic.200401031.

Hiraga, K. *et al.* (1993) 'Cloning and characterization of the elongation factor EF-1 beta homologue of *Saccharomyces cerevisiae*. EF-1 beta is essential for growth.', *FEBS letters*, 316(2), pp. 165–169. doi: 0014-5793(93)81208-H [pii].

Hirata, R. *et al.* (1990) 'Molecular Structure of a Gene, VMA1, Encoding the Catalytic Subunit of H⁺ -Translocating Adenosine Triphosphatase from Vacuolar Membranes of *Saccharomyces cerevisiae* ', *J.Biol.Chem.*, 265(12), pp. 6726–6733.

Ho Zoon Chae *et al.* (1993) 'Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 268(22), pp. 16815–16821.

- Horák, J. (2013) 'Regulations of sugar transporters: insights from yeast', *Current Genetics*, 59, pp. 1–31. doi: 10.1007/s00294-013-0388-8.
- Irokawa, H. *et al.* (2016) 'Redox-dependent Regulation of Gluconeogenesis by a Novel Mechanism Mediated by a Peroxidatic Cysteine of Peroxiredoxin', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 33536. doi: 10.1038/srep33536.
- Johnson, E. a. (2013a) 'Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts-the basidiomycetes', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, pp. 7563–7577. doi: 10.1007/s00253-013-5046-z.
- Johnson, E. a. (2013b) 'Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts - The ascomycetes', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, pp. 503–517. doi: 10.1007/s00253-012-4497-y.
- Kane, P. M. *et al.* (1990) 'Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase.', *Science (New York, N. Y.)*, 250(4981), pp. 651–7. doi: 10.1126/science.2146742.
- Karlsson, K. *et al.* (1999) 'Thiamine repression and pyruvate decarboxylase autoregulation independently control the expression of the *Saccharomyces cerevisiae*', 449, pp. 245–250.
- Kayikci, Ö. and Nielsen, J. (2015) 'Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*', *FEMS Yeast Research*, 15(July), pp. 1–8. doi: 10.1093/femsyr/fov068.
- Kim, H. *et al.* (2006) 'A global topology map of the *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteome.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, pp. 11142–11147. doi: 10.1073/pnas.0604075103.
- Kinzy, T. G. and Woolford, J. L. (1995) 'Increased expression of *Saccharomyces cerevisiae* translation elongation factor 1 alpha bypasses the lethality of a TEF5 null allele encoding elongation factor 1 beta.', *Genetics*, 141(2), pp. 481–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1206749&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Klis, F. M. *et al.* (2002) 'Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*', *FEMS Microbiol.Rev.*, 26(0168–6445; 3), pp. 239–256. doi: S0168644502000876 [pii].
- Klis, F. M., Boorsma, A. and De Groot, P. W. J. (2006) 'Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 23(3), pp. 185–202. doi: 10.1002/yea.1349.
- Klose, J. (2009) 'From 2-D electrophoresis to proteomics', *Electrophoresis*, 30(SUPPL. 1), pp. 142–149. doi: 10.1002/elps.200900118.
- Kolkman, A. (2005) 'Comparative Proteome Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Grown in Chemostat Cultures Limited for Glucose or Ethanol', *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, pp. 1–11. doi: 10.1074/mcp.M400087-MCP200.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. and Boekhout, T. (2011) *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Fifth Edit.
- Kurtzman, C. P. and Piškur, J. (2006) 'Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts', *Topics in Current Genetics*, 15(January), pp. 29–46. doi: 10.1007/b106654.
- Lagunas, R. (1993) 'Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*.', *FEMS microbiology reviews*, 10, pp. 229–242. doi: 10.1016/0378-1097(93)90598-V.
- Lee, J. *et al.* (1999) 'A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast', *Journal of Biological Chemistry*, 274(8), pp. 4537–4544. doi: 10.1074/jbc.274.8.4537.
- Liu, J. M. and Liu, D. R. (2007) 'Discovery of a mRNA mitochondrial localization element in *Saccharomyces cerevisiae* by nonhomologous random recombination and in vivo selection', *Nucleic Acids Research*, 35(20), pp. 6750–6761. doi: 10.1093/nar/gkm777.
- Lobo, Z. (1984) '*Saccharomyces cerevisiae* aldolase mutants', *Journal of Bacteriology*, 160(1), pp. 222–226.
- Lu, J. *et al.* (2013) 'Deletion of the major peroxiredoxin Tsa1 alters telomere length homeostasis', *Aging Cell*, 12(4), pp. 635–644. doi: 10.1111/accel.12085.
- Magdeldin, S. *et al.* (2014) 'Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis.', *Clinical proteomics*, 11(1), p. 16. doi: 10.1186/1559-0275-11-16.
- Maier, A. *et al.* (2002) 'Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with

plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters', *FEMS Yeast Research*, 2(4), pp. 539–550. doi: 10.1016/S1567-1356(02)00140-X.

Mattanovich, D., Sauer, M. and Gasser, B. (2014) 'Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks.', *Microbial cell factories*, 13, pp. 1–5. doi: 10.1186/1475-2859-13-34.

Needleman, R. B. *et al.* (1984) 'MAL6 of *Saccharomyces*: a complex genetic locus containing three genes required for maltose fermentation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(May), pp. 2811–2815. doi: 10.1073/pnas.81.9.2811.

De Nobel, H. *et al.* (2001) 'Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*', *Yeast*, 18, pp. 1413–1428. doi: 10.1002/yea.793.

Novak, S., Zechner-krpan, V. and Mari, V. (2004) 'Regulation of Maltose Transport and Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*', *Food Technology and Biotechnology*, 42(3), pp. 213–218.

O'Farrell, P. H. (1975) 'High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.', *The Journal of biological chemistry*, 250(10), pp. 4007–21. doi: 10.1016/j.bb.2008.05.010.

Oluwatosin, Y. E. and Kane, P. M. (1998) 'Mutations in the yeast KEX2 gene cause a Vma(-)-like phenotype: a possible role for the Kex2 endoprotease in vacuolar acidification.', *Molecular and cellular biology*, 18(3), pp. 1534–1543.

Oudshoorn, P. *et al.* (1987) 'Subunit II of yeast QH2: cytochrome-c oxidoreductase: Nucleotide sequence of the gene and features of the protein', *European Journal of Biochemistry*, 163(1), pp. 97–103. doi: 10.1111/j.1432-1033.1987.tb10741.x.

Pardo, M. *et al.* (2000) 'A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis', *Electrophoresis*, 21(16), pp. 3396–3410. doi: 10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3396::AID-ELPS3396>3.0.CO;2-J.

Parra, K. J., Chan, C. Y. and Chen, J. (2014) '*Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H⁺-ATPase regulation by disassembly and reassembly: One structure and multiple signals', *Eukaryotic Cell*, 13(6), pp. 706–714. doi: 10.1128/EC.00050-14.

Pedroso, N. *et al.* (2012) 'The plasma membrane-enriched fraction proteome response during adaptation to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*', *Free Radical Research*, 46(10), pp. 1–12.

Phaff, H. J., Miller, M. W. and Mrak, E. M. (1978) *The Life of Yeasts*. 2nd editio. Harvard University Press, Cambridge (USA) and London.

Pham, T. K. and Wright, P. C. (2007) 'Proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae*.', *Expert review of proteomics*, 4, pp. 793–813. doi: 10.1586/14789450.4.6.793.

Von Plehwe, U. *et al.* (2009) 'The Hsp70 homolog Ssb is essential for glucose sensing via the SNF1 kinase network', *Genes and Development*, 23(17), pp. 2102–2115. doi: 10.1101/gad.529409.

Polish, J. A., Kim, J. H. and Johnston, M. (2005) 'How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose', *Genetics*, 169(2), pp. 583–594. doi: 10.1534/genetics.104.034512.

Pretorius, I. S. (2000) 'Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking', *Yeast*, 16(8), pp. 675–729. doi: 10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B.

Rabilloud, T. and Lelong, C. (2011) 'Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial', *Journal of Proteomics*, 74(lptp 2), pp. 1829–1841. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.040.

van der Rest, M. E. *et al.* (1995) 'The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis.', *Microbiological reviews*, 59(2), pp. 304–322. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7603412&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/B1AB296F-7120-4364-AC69-11AFCAA90326>.

Rose, M., Albig, W. and Entian, K.-D. (1991) 'Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII', *European Journal of Biochemistry*, 199, pp. 511–518. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16149.x.

- S. K. Calderwood *et al.* (2010) 'Signal Transduction Pathways Leading to Heat Shock Transcription', *Signal Transduction Insights*, 2, pp. 13–24. doi: 10.4137/STI.S3994.
- Salema-Oom, M. *et al.* (2011) 'Derepression of a baker's yeast strain for maltose utilization is associated with severe deregulation of HXT gene expression', *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), pp. 364–374. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04895.x.
- Saltzgaber-muller, J., Kunapuli, S. P. and Douglas, M. G. (1983) 'Nuclear Genes Coding the Yeast Mitochondrial Adenosine Triphosphatase Complex', *The Journal of Biological Chemistry*, 258(19), pp. 11465–11470.
- Sambade, M. *et al.* (2005) 'A genomic screen for yeast vacuolar membrane ATPase mutants', *Genetics*, 170(4), pp. 1539–1551. doi: 10.1534/genetics.105.042812.
- Sanchez, J.-C. *et al.* (1996) 'The yeast SWISS-2DPAGE database', *Electrophoresis*, 17(3), pp. 556–565.
- Schneider, T. and Riedel, K. (2010) 'Environmental proteomics: Analysis of structure and function of microbial communities', *Proteomics*, 10(4), pp. 785–798. doi: 10.1002/pmic.200900450.
- Schwelberger, H. G., Kohlwein, S. D. and Paltauf, F. (1989) 'Molecular cloning, primary structure and disruption of the structural gene of aldolase from *Saccharomyces cerevisiae*', *European Journal of Biochemistry*, 180(2), pp. 301–308. doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14648.x.
- Shevchenko, A. *et al.* (1996) 'Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(December), pp. 14440–5. doi: 10.1073/pnas.93.25.14440.
- Takeda, M., Vassarotti, A. and Douglas, M. G. (1985) 'Nuclear genes coding the yeast mitochondrial adenosine triphosphatase complex. Primary sequence analysis of ATP2 encoding the F1-ATPase ??-subunit precursor', *Journal of Biological Chemistry*, 260(29), pp. 15458–15465.
- Trivelli, X. *et al.* (2003) 'Characterization of the Yeast Peroxiredoxin Ahp1 in Its Reduced Active and Overoxidized Inactive Forms Using NMR', *Biochemistry*, 42(48), pp. 14139–14149. doi: 10.1021/bi035551r.
- Trong Khoa Pham and Wright, P. C. (2008) 'The Proteomic Response of *Saccharomyces cerevisiae* in Very High Glucose Conditions with Amino Acid Supplementation', *Journal of Proteome Research*, 7, pp. 4766–4774.
- Trotter, E. W. *et al.* (2008) 'The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant.', *The Biochemical journal*, 412(1), pp. 73–80. doi: 10.1042/BJ20071634.
- Türker, M. (2014) *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*.
- Vido, K. *et al.* (2001) 'A Proteome Analysis of the Cadmium Response in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), pp. 8469–8474. doi: 10.1074/jbc.M008708200.
- Wang, J. and Needelman, R. B. (1996) *Genetics*.
- Ward, O. P. (1991) *Biología de la fermentación: principios, procesos y productos*. Edited by Acribia. Zaragoza (España).
- Wildgruber, R. *et al.* (2002) 'Web-based two-dimensional database of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using immobilized pH gradients from pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry', *Proteomics*, 2, pp. 727–732. doi: 10.1002/1615-9861(200206)2:6<727::AID-PROT727>3.0.CO;2-2.
- Williams, N. (1996) 'Yeast Genome Sequence Ferments New Research', *Science*. doi: 10.1126/science.272.5261.481.
- Williamson, V. M. and Paquin, C. E. (1987) 'Homology of *Saccharomyces cerevisiae* ADH4 to an iron-activated alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*', *MGG Molecular & General Genetics*, 209(2), pp. 374–381. doi: 10.1007/BF00329668.
- Yuan, D. S. (2000) 'Zinc-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by

transposon tagging', *Genetics*, 156(1), pp. 45–58.

6. APÊNDICE

Apêndice 1 – Curvas de calibração utilizadas na quantificação de proteína.

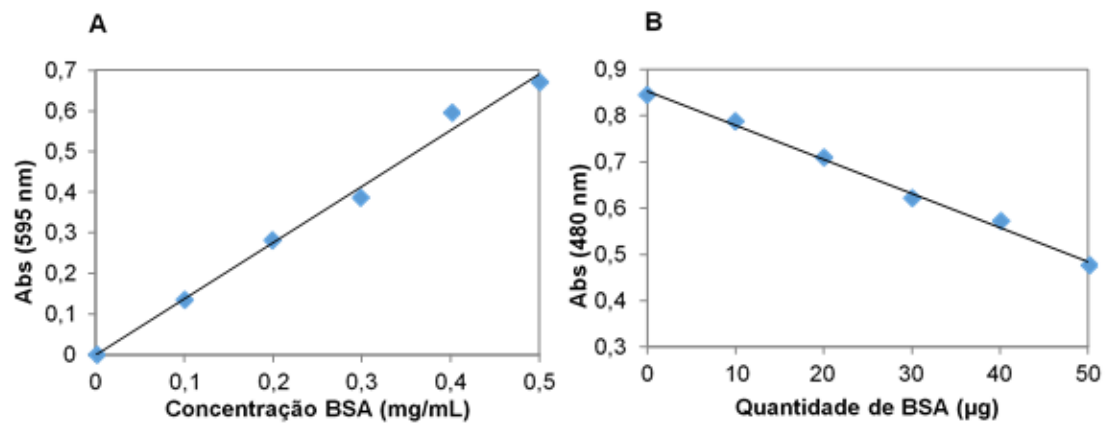


Figura 6.1 – Curvas de calibração utilizadas para a quantificação de proteína total das amostras de *S. cerevisiae* pelo (A) método de Bradford ($y = 1,3826x - 0,0008$; $R^2 = 0,9909$) e (B) pelo método de *2D-Quant Kit* ($y = -0,0074x + 0,853$; $R^2 = 0,9949$). A proteína utilizada como padrão foi a BSA. Em ambos os gráficos os valores correspondem à média de dois ensaios.

Apêndice 2 – Gel 2D da estirpe S288C de *S. cerevisiae* crescida exponencialmente em glicose.

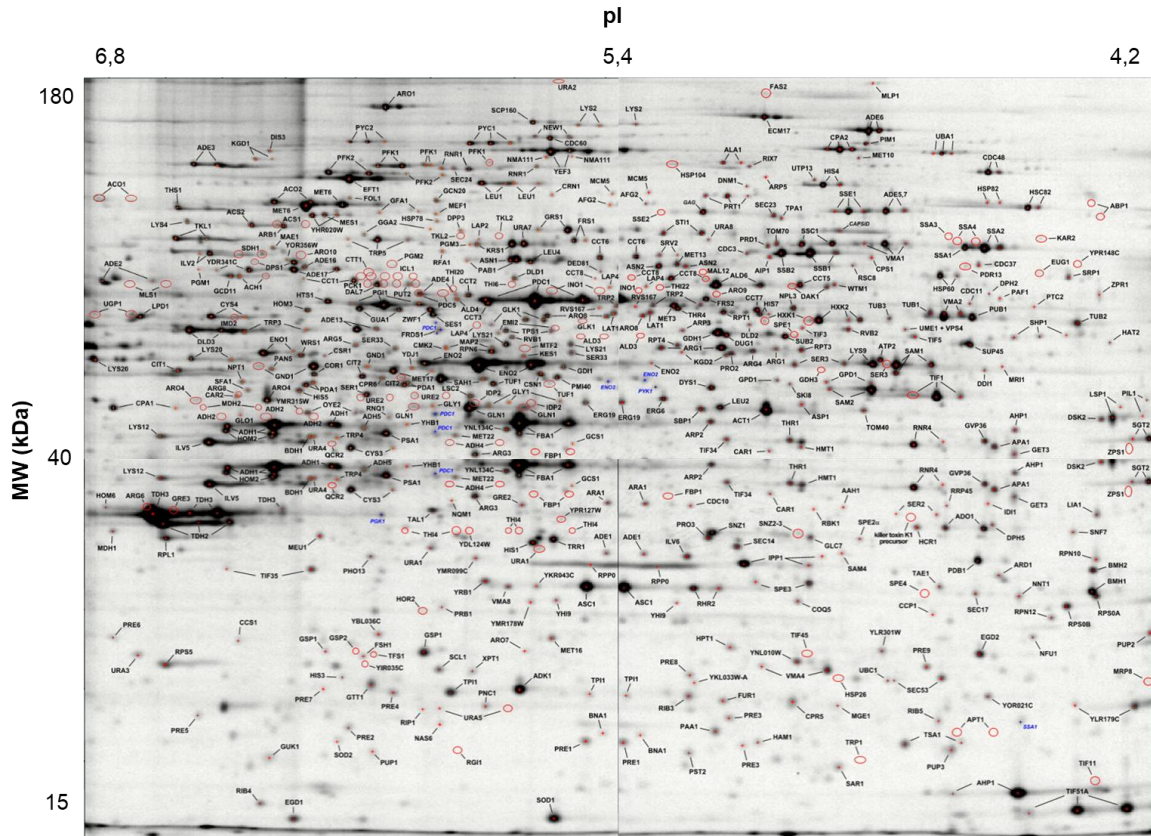


Figura 6.2 – Gel 2D que corresponde às proteínas solúveis sintetizadas pela estirpe S288C de *S. cerevisiae* crescida exponencialmente em glicose (Adaptado de *2D Gel Map of Saccharomyces cerevisiae proteins*, 2009)