

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**O PAPEL DA PROTEÍNA QUINASE C NA REGULAÇÃO DE FUNÇÕES
CELULARES RELACIONADAS À PROTEÍNA GUP1 EM CÉLULAS DE**
Saccharomyces cerevisiae

AUTOR: THIAGO MARTINS PAIS

ORIENTADOR: PROF. Dr. ROGELIO LOPES BRANDÃO
CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. LUCIANO GOMES FIETTO

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. Rogelio Lopes Brandão (Botafoguense) pela oportunidade de ingressar ainda no início da graduação no laboratório. Obrigado pelo aprendizado durante esses anos de convívio.

Ao orientador Dr. Luciano Gomes Fietto pelo aprendizado proporcionado durante todo o período do mestrado e iniciação científica. Sou grato pelo convívio amistoso e pela paciência demonstrada para ensinar as tarefas do laboratório.

Ao Dr. Ieso de Miranda Castro, Dra. Juliana Fietto e Antonio Helvécio Totola pela discussão crítica do trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular.

Aos amigos da pós-graduação e professores do NUPEB.

Aos amigos da República Caverna pelos anos de convivência e amizade.

Aos meus pais, familiares e a Lívia pelo apoio e incentivo na caminhada.

RESUMO

A proteína quinase C (Pkc1p) de *Saccharomyces cerevisiae*, codificada pelo gene *PKC1*, participa de uma cascata de MAPKinase denominada via de integridade celular ou via PKC-MAPKinase cuja principal função é a biosíntese da parede celular. Além disso, diversos processos celulares tem sido descritos como tendo a participação de Pkc1 p: a síntese de ribossomos, a realocação de fatores transcricionais como Mig1 p, a regulação da atividade de N-glicosilação, a fusão de membranas celulares, o crescimento polarizado e o controle da polarização do citoesqueleto de actina. O mutante *pkc1Δ* não é capaz de crescer em meio de cultura contendo glicerol como única fonte de carbono. Buscando elucidar as bases moleculares que explicam tal fenótipo, demonstramos nesse trabalho que *pkc1Δ* apresenta baixa atividade da enzima glicerol quinase quando comparada à cepa selvagem em virtude da menor expressão do gene *GUT1* nesse mutante.

Similarmente ao observado para o mutante *pkc1Δ*, o mutante *gup1Δ* apresenta fraco crescimento em fontes de carbono alternativas como etanol, glicerol e rafinose, e sensibilidade aos estresses ácido e oxidativo. A fraca performance em rafinose não está associada a uma baixa atividade da enzima invertase, enquanto a sensibilidade ao estresse ácido não deve estar relacionada à baixa atividade da enzima H⁺-ATPase. Como Gup1 p tem atividade de remodelase da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e considerando que essa atividade é importante para produção de proteínas GPI-ancoradas ativas, os fenótipos observados para o mutante *gup1Δ* podem estar relacionados a falta da atividade de remodelase nesse mutante. Embora os fenótipos dos mutantes *pkc1Δ* e *gup1Δ* sejam similares, o mutante *pkc1Δ* apresenta níveis de expressão do gene *GUP1* comparáveis aos encontrados para a cepa selvagem.

ABSTRACT

The protein kinase C (Pkc1p) from *Saccharomyces cerevisiae*, encoded by the gene *PKC1*, participates in a MAPKinase cascade called cellular integrity pathway or PKC-MAPKinase pathway that is involved in the cell wall biosynthesis. Besides, Pkc1 p is involved in other cellular process: ribosome synthesis, reallocation of transcriptional factors like Mig1 p, regulation of N-glycosylation activity, polarized growth and in the assembly of the actin cytoskeleton. The *pkc1Δ* mutant is unable to grow in a medium that contains glycerol as the sole carbon source. In this work, we demonstrate that this incapacity is caused by a low level of glycerol kinase activity due to a decreased expression of the gene *GUP1* in the *pkc1Δ* mutant.

Similarly to the *pkc1Δ* mutant, the *gup1Δ* mutant presents poor growth on alternative carbon sources like ethanol, glycerol and raffinose. The *GUP1* deletion also causes sensitivity to low pH stress and oxidative stress. The poor growth on raffinose is not associated to an impaired invertase activity. On the other hand, the sensitivity to low pH is not associated to an affected H⁺-ATPase activity. Gup1 p is involved in the remodeling of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. Its activity is crucial for the production of mature GPI-anchored proteins. Therefore, some phenotypes of the *gup1Δ* mutant could be linked to an affected remodelase activity in that yeast strain. Eventhough the *pkc1Δ* and *gup1Δ* mutants present several phenotypes in common, the *GUP1* gene is equally expressed in the *pkc1Δ* mutant and the wild type strain.

ÍNDICE

	RESUMO	01
	ABSTRACT	02
	LISTA DE TABELAS	06
	LISTA DE FIGURAS	07
	INTRODUÇÃO	09
1	Introdução	10
1.1	O modelo de estudo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.2	Vias de Transdução de sinal	12
1.3	Nutrientes e vias de sinalização em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.3.1	Via Ras-AMPC	14
1.3.2	Via FGM	15
1.3.3	Via principal de repressão por glicose	16
1.4	Via PKC-MAPKinase	18
1.5	Pkc1 p e outras vias de sinalização	20
1.6	O metabolismo de glicerol em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.7	Metabolismo respiratório e estresse oxidativo	23
1.8	Função biológica de GUP1 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.9	A âncora de GPI em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
	OBJETIVOS	32
2	Objetivos	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3	Materiais e métodos	35
3.1	Microorganismos utilizados nos experimentos	35

3.1.1	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
3.1.2	Procedência das cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
3.2	Meios de cultura e condições de crescimento	35
3.2.1	Meio YP	35
3.2.2	Condições de crescimento	36
3.3	Determinação da atividade da enzima invertase	36
3.3.1	Inóculo e crescimento das células	36
3.3.2	Preparo de extratos celulares para a determinação da atividade invertásica	36
3.3.3	Dosagem de atividade da enzima invertase	37
3.4	Determinação da atividade da enzima glicerol quinase	37
3.4.1	Inóculo e crescimento das células	37
3.4.2	Preparo de extratos celulares para a determinação da atividade enzima glicerol quinase	37
3.4.3	Dosagem de atividade da enzima glicerol quinase	38
3.4.4	Dosagem de proteína	38
3.5	Curva de crescimento	38
3.5.1	Preparo do inoculo	38
3.5.2	Construção da curva de crescimento	39
3.6	Teste de crescimento em diferentes meios de cultura	39
3.7	Northen-blot.....	39
3.7.1	Extração de RNA total e Northen-blot	39
3.7.2	Purificação do produto de PCR.....	40
3.8	Acidificação extracelular	41
3.8.1	Pré-inóculo	41
3.8.2	Inóculo	41
3.8.3	Medida da acidificação extracelular induzida por glicose	41
3.8.4	Determinação do peso seco	42
3.8.5	Cálculo da taxa de acidificação extracelular	42
3.9	Ensaio de viabilidade celular	43
3.9.1	Pré-inóculo	43
3.9.2	Inóculo	43
3.9.3	Determinação da porcentagem de células viáveis	43

3.10	PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR)	44
3.11	Análise estatística.....	45
	RESULTADOS	46
4	Resultados	47
4.1	Envolvimento de Pkc1 p na captação e catabolismo de glicerol em <i>S. cerevisiae</i>	47
4.2	Papel de Gup1 p na utilização de fontes de carbono alternativas em <i>S. cerevisiae</i>	51
4.3	<i>GUPI</i> e a defesa contra o estresse oxidativo.....	56
4.4	Envolvimento de <i>GUPI</i> na resistência ao estresse ácido	60
4.5	<i>GUPI</i> e proteínas com âncora de GPI em <i>S. cerevisiae</i>	64
4.6	Regulação da atividade de Gup1 p.....	70
	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	75
5	Discussão e conclusão.....	76
	PERSPECTIVAS	84
6	Perspectivas	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
7	Referências Bibliográficas	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas nos experimentos	35
Tabela 2	Acidificação induzida por glicose ($\text{mmol H}^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g de células}^{-1}$). Cepas selvagem (WT) e mutante <i>gup1</i> Δ .	63
Tabela 3	Componente celular dos genes regulados por Rlm1 p segundo YEASTRACT.	66
Tabela 4	Genes que codificam proteínas ancoradas por GPI, regulados por Rlm1 p e Swi4 p, em <i>S. cerevisiae</i> segundo GPI-SOM.	67
Tabela 5	Lista dos 67 genes potencialmente ancorados por GPI dos quais 54 foram descritos por Caro <i>et al.</i> (1997) e os 13 restantes são candidatos identificados pelo programa GPI-SOM.	68
Tabela 6	Localização dos resíduos de aminoácidos de Gup1 p (http://www.predictprotein.org/).	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via PKC-MAPKinase.	19
Figura 2	Âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI).	28
Figura 3	Modelo investigado para regulação da atividade de Gup1 p.	31
Figura 4	Atividade da enzima glicerol quinase (Gut1 p). Células crescidas em meio YP glicerol 3% e sorbitol 1 M por 6 horas.	48
Figura 5	Northen-blot. As células foram crescidas em meio YP glicose 2% e sorbitol 1 M, estado reprimido (R), lavadas com sorbitol 1 M e logo em seguida incubadas em YP glicerol 3%, glicose 0,05% e sorbitol 1 M por 2 horas, estado desreprimido (D). A expressão de <i>ACT1</i> foi usada como controle positivo.	49
Figura 6	Acúmulo de glicerol radioativamente marcado. (□, cepa selvagem W303-1A; ■, <i>bck1Δ</i> ; ○, <i>pkc1Δ</i> ; ●, LBFM335 (mutante isolado a partir de <i>pkc1Δ</i> por mutação induzida por UV). Resultados são valores médios de três experimentos independentes (Gomes <i>et al.</i> , 2005).	50
Figura 7	Crescimento celular em meio sólido. (A) YP glicose 2% (B) YP glicerol 3% (C) YP rafinose 3% (D) YP etanol 3%. Diluições feitas a partir de D.O = 1,0 (W/D).	52
Figura 8	Curva de crescimento em meio YP glicose 2%. Cepas selvagem (WT) e mutante <i>gup1Δ</i> .	53
Figura 9	Curva de crescimento celular do mutante <i>gup1Δ</i> em meio YP glicose 2% sem e com antimicina.	54
Figura 10	Atividade Invertásica. Cepa selvagem (WT) e mutante <i>gup1Δ</i> .	55

Figura 11	Crescimento em meio YP glicose 2% (A), mais H ₂ O ₂ 5mM (B), H ₂ O ₂ 1mM (C) e H ₂ O ₂ 10mM (D). Cepas selvagem (WT) e mutante <i>gup1Δ</i> .	57
Figura 12	Viabilidade (a) e crescimento celular (b) em meio YP glicose 2% + H ₂ O ₂ (5 mM). Cepas selvagem (WT) e mutante <i>gup1Δ</i> .	58
Figura 13	Viabilidade (a) e crescimento celular (b) em meio YP glicose 2%. Cepas selvagem (WT) e mutante <i>gup1Δ</i> .	59
Figura 14	Viabilidade (a) e crescimento celular (b) em meio YP glicose 2% (pH 3,0). Cepas selvagem (WT) e mutante <i>gup1Δ</i> .	61
Figura 15	Viabilidade celular em meio YP glicose 2% (pH 1,0). Cepas selvagem (WT) e mutante <i>gup1Δ</i> .	62
Figura 16	PCR em tempo real quantitativa dos genes <i>GUP1</i> e <i>RCK1</i> . Cepas e condições de crescimento: WG- cepa selvagem crescida em glicose, WR- cepa selvagem crescida em rafinose, PG- mutante <i>pkc1Δ</i> crescido em glicose, PR- mutante <i>pkc1Δ</i> crescido em rafinose.	72
Figura 17	Topologia de Gup1 p de acordo com http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui_submit.html .	73

INTRODUÇÃO

1- Introdução

1.1- O modelo de estudo *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* é um fungo unicelular pertencente à ordem dos *Protoascomycetos*, de formato oval e tamanho que varia de 4-7 μm , dependendo da ploidia, da fase de crescimento e da cepa (Wheals *et al*, 1987). Células diplóides têm geralmente 5 x 6 μm enquanto células haplóides apresentam 4 μm de diâmetro. As cepas selvagens haplóides de laboratório apresentam um tempo de duplicação de aproximadamente 90 minutos em meio YPglicose 2% durante a fase exponencial de crescimento celular. Geralmente a densidade máxima atingida, em meio de cultura, é de 2×10^8 células/mL de meio. Densidades maiores podem ser atingidas quando se tem controle do pH do meio e aeração reforçada. Esta levedura se reproduz por brotamento, que é um processo assimétrico no qual a célula parenteral produz um broto que vai crescendo durante o ciclo celular até finalmente separar-se da célula original.

S. cerevisiae foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma seqüenciado (Goffeau *et al*, 1996). O genoma de *S. cerevisiae* é compacto, com 16 cromossomos de tamanhos que variam entre 200 e 2200 Kb. O tamanho total do genoma é de 12052 Kb (Goffeau *et al*, 1996). Acredita-se que existam 6183 ORF's que codificam para proteínas com tamanho superior a 100 aminoácidos. As ORF's representam 72 % do genoma, por isso diz-se que o genoma é compacto. O tamanho médio dos genes é de 1,45 Kb, sendo que um total de 3,8% dos genes apresenta introns. Os cromossomos contêm elementos móveis de DNA, retrotransposons, que variam de tamanho e posição nas diferentes cepas. O DNA mitocondrial codifica para aproximadamente 15 % das proteínas dessa organela. Quase todas as cepas de levedura possuem vírus de RNA dupla-fita (dsRNA) que constituem aproximadamente 0,1 % do ácido nucléico total.

A levedura *S. cerevisiae* tem importância chave nas pesquisas genômicas e proteômicas (Kumar e Snyder, 2001), incluindo amplo uso de microarranjos de DNA para estudo do transcriptoma (DeRisi *et al*, 1997), bem como análise da função gênica por meio de deleção gênica (Oliver *et al.*, 1996), análise da expressão global por SAGE (Serial Analysis of Global Expression) (Velculescu *et al.*, 1997), localização subcelular de

proteínas (Ross-Macdonald *et al.*, 1999), mapas bidimensionais (2D) de proteínas (Garrels *et al.*, 1997; Blomberg, 2002), determinação de atividade enzimática (Martzen *et al.*, 1999), estudos de interação proteína-proteína através de ensaio duplo-híbrido (Ito *et al.*, 2000), entre outros. Alguns genes humanos relacionados a patologias apresentam ortólogos em levedura e a relativa conservação evolutiva de mecanismos regulatórios e processos metabólicos fazem com que *S. cerevisiae* seja empregada em diversos estudos biológicos. A habilidade desse microrganismo em replicar cromossomos artificiais circulares ou lineares, permite o estudo detalhado de regiões centroméricas, teloméricas e origens de replicação (Kumar e Snyder, 2001). O DNA mitocondrial pode ser alterado por transformação, auxiliando nos estudos relacionados a essa organela (Bonnefoy e Fox, 2002). As leveduras denominadas selvagens empregadas em estudos nos laboratórios, não são de fato como as encontradas na natureza. As leveduras de laboratório sofreram algumas modificações para se chegar a um microrganismo geneticamente estável para as condições usuais de experimentação. Cepas de mutantes podem ser adquiridas por exemplo pela EUROSCARF (http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/col_index.html). Outras coleções de cepas podem ser encontradas em <http://www.ncyc.co.uk/Sacchgen.html>, <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/WebC.ASP> e <http://www.natur.cuni.cz/fccm/federacs.htm#dgub>.

A levedura *S. cerevisiae* é considerada um organismo eucarioto modelo por apresentar algumas características que permitem sua fácil manipulação em estudos biológicos tais como: rápido crescimento, células dispersas, não-patogênica (GRAS-Generally recognized as safety), facilidade na obtenção e isolamento de mutantes, sistema genético bem definido e versatilidade para transformação genética (Gietz e Woods, 2002). As cepas de *S. cerevisiae* podem apresentar diferentes ploidias. Em laboratório cepas haplóides ou diplóides estáveis podem ser utilizadas com a ajuda de um grande número de marcadores moleculares. As cepas diplóides podem ser usadas em testes de complementação. Técnicas de transformação de leveduras permitiram grandes avanços na área de engenharia genética. As leveduras podem ser transformadas com vetores ou mesmo oligonucleotídeos. Os vetores inseridos em levedura podem replicar-se independentemente do DNA genômico fúngico ou podem ser integrados ao genoma desse microrganismo. No segundo caso, a integração do DNA se dá por mecanismo de recombinação homóloga. Esse

procedimento é muito útil para experimentos de mutagênese sítio-dirigida e permitiu a construção de bibliotecas de mutantes de levedura. A análise do fenótipo de determinada cepa, que teve algum(s) gene(s) deletado(s), é valiosa na determinação da função biológica que determinada proteína exerce *in vivo*. Várias questões da biologia celular podem ser elucidadas utilizando-se esse microrganismo como modelo: análise da regulação da expressão gênica, estudo de estrutura-função de proteínas, estrutura cromossômica, entre outras.

As leveduras têm diversas aplicações e são utilizadas para a produção de pão, bebidas alcoólicas, álcool combustível e proteínas heterólogas. O interesse biotecnológico por esse microrganismo é crescente devido aos avanços das técnicas de engenharia genética, com a consequente obtenção de cepas de leveduras com qualidades específicas para determinada finalidade, otimizando assim, diversos processos industriais em que elas são empregadas.

1.2- Vias de Transdução de sinal

Sinais transmitidos da superfície da célula para seu interior, resultando em padrões de expressão gênica e atividade protéica alterados, a qual desencadeia uma resposta celular ao meio ambiente são comuns em todos os organismos, de bactérias e leveduras a células de mamíferos (Banuett *et al.*, 1998). O agente causador do estímulo pode inclusive estimular um receptor intracelular dependendo das características físico-químicas do mesmo.

Para desencadear uma resposta ao ambiente extracelular, alvos celulares específicos são afetados por mecanismos elaborados que envolvem receptores de membrana específicos, mensageiros secundários, sistemas de amplificação em cascata (normalmente proteínas quinases) e moduladores intracelulares específicos (Hohmann e Mager, 1997).

Células de *Saccharomyces cerevisiae* respondem a diferentes tipos de sinais externos, dentre os quais podemos citar os nutrientes, a variação de osmolaridade, as oscilações de temperatura, a presença de agentes oxidantes ou a ação de hormônios. A adaptação a estes diferentes sinais externos é feita através de vias de transdução de sinais. Por exemplo, as vias Ras-AMPC e a via principal de repressão por glicose estão

relacionadas a disponibilidade de nutrientes. Por outro lado, a via PKC-MAPKinase, pertencente à família de vias ativadas por mitógenos (MAP-mitogen activated protein), é acionada, por exemplo, diante de mudanças na osmolaridade do meio.

1.3- Nutrientes e vias de sinalização em *Saccharomyces cerevisiae*

A adição de glicose ou de outros açúcares rapidamente fermentáveis, como frutose ou manose, as células de leveduras previamente cultivadas em fontes de carbono não fermentáveis, como glicerol ou etanol, ou a células na fase estacionária, desencadeia uma ampla variedade de processos regulatórios com o objetivo de otimizar a utilização da fonte de carbono. A glicólise é ativada e a glicose é convertida em etanol e dióxido de carbono mesmo em condições aeróbicas. Enquanto a captação de glicose e sua metabolização através da glicólise são estimuladas, a gliconeogênese e a respiração são inibidas. A adição de glicose promove um drástico aumento na taxa de crescimento, o qual é precedido por um aumento na síntese de RNA ribossomal e de síntese protéica. Genes que codificam enzimas envolvidas na captação e metabolização de fontes alternativas de carbono são reprimidos. O principal papel dos diversos efeitos regulatórios induzidos por glicose parece ser a mudança do metabolismo de sua fase gliconeogênica/respiratória para um modo fermentativo (Thevelein, 1994; Rolland *et al.*, 2002).

Os efeitos regulatórios induzidos pela presença de glicose podem ocorrer tanto a nível transcricional (repressão ou indução de genes), como a nível pós-transcricional (ativação ou inativação de enzimas e de proteínas de transporte) (Thevelein, 1994; Rolland *et al.*, 2002).

Em organismos de vida livre, a disponibilidade de nutrientes é o principal fator capaz de controlar o crescimento e o desenvolvimento. Para leveduras e muitos outros microrganismos, a glicose é a fonte de carbono e energia mais abundante. Deste modo não é surpreendente que a glicose atue como um importante mensageiro primário nessas células. Entre as vias de sinalização envolvidas na geração dos fenômenos regulatórios induzidos por glicose, as mais estudadas são a via Ras-AMPC e a via principal de repressão por glicose (Thevelein, 1994).

1.3.1- Via Ras-AMPC

O principal mecanismo de sinalização desencadeado por glicose, e que está envolvido na regulação pós-traducional é a via Ras-AMPC (Rolland *et al.*, 2002). A adição de glicose ou de outros açúcares facilmente fermentáveis as células de levedura crescendo em fontes de carbono não fermentáveis desencadeia um rápido e transitório aumento na concentração intracelular de AMPC, denominado sinal de AMPC (Thevelein *et al.*, 1987; Beullens *et al.*, 1988; Mbonyi *et al.*, 1988; Mbonyi *et al.*, 1990). Por isso, o AMPC tem sido apontado como um importante mensageiro secundário na resposta a nutrientes, realizando a adaptação metabólica para as condições de crescimento fermentativo. A concentração de AMPC em células de levedura é controlada pela via Ras-AMPC. A enzima adenilato ciclase promove a síntese de AMPC a partir de ATP. O AMPC então causa a ativação da proteína quinase A (Thevelein e de Winde, 1999).

Essa via é ativada em duas condições: pela adição de glicose as células na fase estacionária ou crescendo em fontes de carbono não fermentáveis e pela acidificação intracelular. A adenilato ciclase codificada pelo gene *CYRI/CDC35* (Matsumoto *et al.*, 1984; Kataoka *et al.*, 1985), é estimulada pelas proteínas G Ras1 e Ras2. Estas proteínas G estão ativas quando ligadas a GTP e inativas quando ligadas a GDP (Broek *et al.*, 1985; Toda *et al.*, 1985). A troca do GDP por GTP é estimulada pela proteína Cdc25 (Camonis *et al.*, 1986; Broek *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1991) e possivelmente pela Sdc25 p. As proteínas Ras possuem uma atividade GTPásica intrínseca que causa sua própria inativação. Essa atividade GTPásica é estimulada pelo produto dos genes *IRA1* e *IRA2*. Tem sido demonstrado que a acidificação intracelular pode ativar a via Ras-AMPC inibindo ambas GTPases (Colombo *et al.*, 1998). Para a glicose, existem evidências de que um aumentado nível de Ras-GTP poderia, no mínimo parcialmente, estar envolvido na ativação induzida por glicose da via (Rundoni *et al.*, 2001).

Há dois sistemas de sensibilização que detectam a presença do açúcar (Rolland *et al.*, 2000). No primeiro processo de sensibilização, um sistema receptor acoplado a proteína G (GPCR) detecta especificamente glicose e sacarose (Rolland *et al.*, 2000). Este sistema consiste de um receptor Gpr1 e sua proteína-G Gpa2 (Kubler *et al.*, 1997; Colombo *et al.*,

1998; Xue *et al.*, 1998; Kraakman *et al.*, 1999; Lorenz *et al.*, 2000). O segundo processo é um mecanismo que requer a captação do açúcar e sua fosforilação por uma quinase específica de hexose (Rolland *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2001). Como em outros eucariotos, o AMPc ativa PKA se ligando as suas subunidades regulatórias (codificada pelo gene *BCY1*) (Toda *et al.*, 1987a), causando assim a dissociação do complexo protéico. Desta forma, as subunidades catalíticas (codificadas por *TPK1*, *TPK2* e *TPK3*) são liberadas e ativadas (Toda *et al.* 1987b). A subunidade catalítica de Pka p ativada fosforila enzimas e fatores transcricionais. Alguns alvos de Pka p estão envolvidos em diferentes processos regulatórios necessários para a mudança do metabolismo gliconeogênico para o fermentativo. Outros alvos de Pka p estão envolvidos na desrepressão dos estoques de glicogênio, no controle do crescimento e na resistência ao estresse (Thevelein, 1994; Thevelein e de Winde, 1999).

1.3.2- Via FGM

A via de sinalização denominada FGM (Fermentable Growth Medium-induced pathway) (Thevelein e de Winde, 1999) controla a atividade de Pka p. A ativação da via FGM não é apenas dependente da disponibilidade de glicose ou frutose, mas também de outros nutrientes essenciais para o crescimento. Em contraste com a via RAS-AMPc, apenas a presença do açúcar e não sua posterior fosforilação é necessária para a ativação da via FGM. A via FGM tem demonstrado ser independente dos níveis de AMPc. Portanto, esta via possivelmente atua diretamente na subunidade catalítica livre de Pka p (Hirimburegama *et al.*, 1992; Durnez *et al.*, 1994).

Desta forma na presença de glicose, outros nutrientes essenciais (N, S, P) são capazes de desencadear efeitos semelhantes em alvos de PKA quando adicionados a células em jejum para um dos nutrientes acima. Para desencadear e sustentar os processos da ativação requer-se a presença de ambos, a fonte de carbono fermentável e um meio de crescimento completo. A via FGM controla alvos de PKA durante crescimento em glicose através da proteína quinase Sch9 (Rolland *et al.*, 2002).

A via FGM desencadeia a ativação da enzima trealase levando a uma rápida mobilização da trealose (Hirimburegama *et al.*, 1992), além de mudanças na atividade de

outras enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio e na glicólise (François *et al.*, 1988; François *et al.*, 1991; Crauwels *et al.*, 1997; Moskvina *et al.*, 1998; François e Parrou 2001). Estas mudanças na atividade das enzimas são independentes da síntese protéica e, portanto, ocorrem no nível pós-traducional.

1.3.3- Via principal de repressão por glicose

A via principal de repressão por glicose tem como principal função reprimir a respiração durante o crescimento celular em altos níveis de glicose. Trata-se de uma das vias regulatórias melhor conhecida e estudada em células de levedura. Os principais genes reprimidos são os envolvidos no ciclo de Krebs, na cadeia transportadora de elétrons, na gliconeogênese, no ciclo do glioxalato, no transporte e catabolismo de fontes de carbono alternativas, como galactose, maltose e sacarose (Thevelein, 1994). A fosforilação da glicose, e não seu posterior metabolismo, parece ser o sinal necessário para a ativação da via principal de repressão por glicose (Rolland *et al.*, 2001). Células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam três enzimas capazes de fosforilar glicose: a glicoquinase, a hexoquinase PI e a hexoquinase PII codificadas respectivamente pelos genes *GLK1*, *HXK1* e *HXK2* (Rolland *et al.*, 2001). Hxk2 p parece ser a única das três quinases a ter uma importância central para a repressão de alguns genes regulados por glicose em leveduras e plantas (Rolland *et al.*, 2001), entretanto ainda não está claro como é o mecanismo pelo qual a Hxk2 p está envolvida neste processo. De acordo com Ahuatzí *et al.* (2004), a Hxk2 p interage com Mig1 p para formar um complexo repressor localizado no núcleo de *S. cerevisiae* durante o crescimento em glicose. Este complexo repressor reprime a transcrição de vários genes regulados por glicose pela ligação direta em seus promotores.

O fator transcricional Mig1 p é o responsável por regular negativamente a expressão de genes como *SUC2*, *GAL* e *MAL* (Nehlin e Ronne, 1990). Essa proteína tem domínios do tipo dedos de zinco que se ligam ao motivo WWWWN(G/C)(C/T)GGGG na região promotora de muitos genes (Lundin *et al.*, 1994), reprimindo a transcrição destes através do recrutamento do complexo repressor Ssn6/Tup1 (Treitel *et al.*, 1995). A atividade de Mig1 p é regulada por fosforilação e localização subcelular. Em altas concentrações de glicose, Mig1 p é defosforilada pela proteína fosfatase Reg1-Glc7 (o gene *GLC7* codifica a

subunidade catalítica da proteína, enquanto o gene *REG1* a subunidade regulatória) (Alms *et al.*, 1999). Mig1 p estando defosforilada tem localização nuclear, onde ela reprime a transcrição gênica. Por outro lado, na ausência de glicose, Mig1 p é rapidamente fosforilada pela proteína quinase Snf1 (Treitel *et al.*, 1998; DeVit e Johnston, 1999). Esta fosforilação promove uma interação entre Mig1 p e a exportina Msn5 p favorecendo sua translocação para o citoplasma (DeVit e Johnston, 1999), e assim promovendo a desrepressão gênica. A proteína Snf1 é uma serina/treonina quinase altamente conservada desde as leveduras até as plantas e mamíferos. Ela encontra-se associada a uma subunidade regulatória (Snf4) e a uma das três subunidades β (Sip1, Sip2, Gal83) em um complexo com alta massa molecular (Hardie *et al.*, 1998). A proteína quinase Snf1 possui dois domínios: um domínio catalítico amino-terminal e um domínio regulatório carboxi-terminal (Gancedo, 1998). A transcrição de genes passíveis de repressão por glicose é dependente do complexo Snf1. A fosforilação e a defosforilação de Snf1 p são importantes para a regulação de sua atividade em resposta ao sinal da glicose (Wilson *et al.*, 1996; Ludin *et al.*, 1998). Em células crescidas em glicose, o complexo quinase Snf1 se mantém em uma conformação auto-inibitória em que o domínio regulatório da quinase Snf1 está ligado ao seu domínio catalítico. Baixos níveis de glicose favorecem a fosforilação da quinase Snf1. De acordo com Nath *et al.* (2003), a quinase Pak1 é a reponsável pela fosforização de Snf1 no resíduo treonina 210. Hong *et al.* (2003), sugerem que além da Pak1 p, as proteínas Tos3p e Elm1 p também estão envolvidas na fosforilação de Snf1 p. A fosforilação de Snf1p leva a uma conformação aberta e ativa do complexo protéico (Jiang e Carlson, 1996). Nessa conformação, Snf1 p pode fosforilar seus substratos, tal como o repressor Mig1 p.

Por outro lado, na presença de altas concentrações de glicose, a quinase Snf1 forma um complexo com a proteína Reg1, a qual recruta a proteína fosfatase Glc7. Assim, em resposta ao sinal de glicose, o complexo Reg1-Glc7 facilita a transição do complexo quinase Snf1 para o estado auto-inibitório (Sanz *et al.*, 2000) por defosforilação da treonina 210 de Snf1 p (McCartney e Schmidt, 2001).

O gene *SUC2* que codifica a enzima invertase é responsável pela hidrólise da sacarose em glicose e frutose. Muitos dados existentes na literatura sobre os efeitos fisiológicos da repressão por glicose são apresentados em termos da expressão do gene *SUC2*. Portanto, esse gene funciona como um gene repórter para determinação do estado

reprimido ou desreprimido das leveduras. A expressão de *SUC2* é regulada exclusivamente por glicose (Wu e Trumbly, 1998). A região promotora do gene *SUC2* contém dois motivos de ligação para as proteínas Mig1 p e Mig2 p, necessárias para o processo de repressão por glicose.

1.4- Via PKC-MAPKinase

A proteína quinase C (Pkc1p) de *S. cerevisiae*, codificada pelo gene *PKC1*, participa de uma cascata de MAPKinase, também denominada via de integridade celular ou via PKC-MAPKinase (Figura 1). Essa via de transdução de sinal está envolvida na resposta a uma série de estresses, incluindo o estresse térmico (Kamada *et al.*, 1995) e o choque hiposmótico (Davenport *et al.*, 1995). Os estímulos são captados por sensores presentes na membrana plasmática: Mid2 p (Rajavel *et al.*, 1999), membros da família Wsc (Verna *et al.*, 1997) e Mtl1 p (Rajavel *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999). Esses sensores por sua vez transmitem os sinais para Rom2 p que é responsável pela ligação de GTP à proteína Rho1 p. Uma vez ativada, Rho1 p promove a ativação de Pkc1 p. Em seguida, Pkc1p fosforila Bck1p que então ativa as quinases Mkk1 p e Mkk2 p. Essas duas vão terminar por ativar o último componente da via, Slt2/Mpk1 p, ao fosforilar os resíduos Thr190 e Tyr192 (Heinisch *et al.*, 1999; Hohman, 2002). Mpk1 p controla a atividade de dois fatores transcricionais, Rlm1 p e SBF (Swi4/Swi6), responsáveis pela regulação da expressão de genes relacionados à biosíntese da parede celular e controle do ciclo celular, respectivamente (Martin-Yken *et al.*, 2003). A via PKC-MAPKinase também participa da formação de um dos dois complexos existentes da RNA polimerase II (Chang *et al.*, 1999). Como a via PKC-MAPKinase regula a expressão de genes envolvidos na biogênese e manutenção da parede celular, os mutantes dessa via necessitam de estabilizador osmótico, como sorbitol, para crescimento em meio de cultura líquido ou sólido.

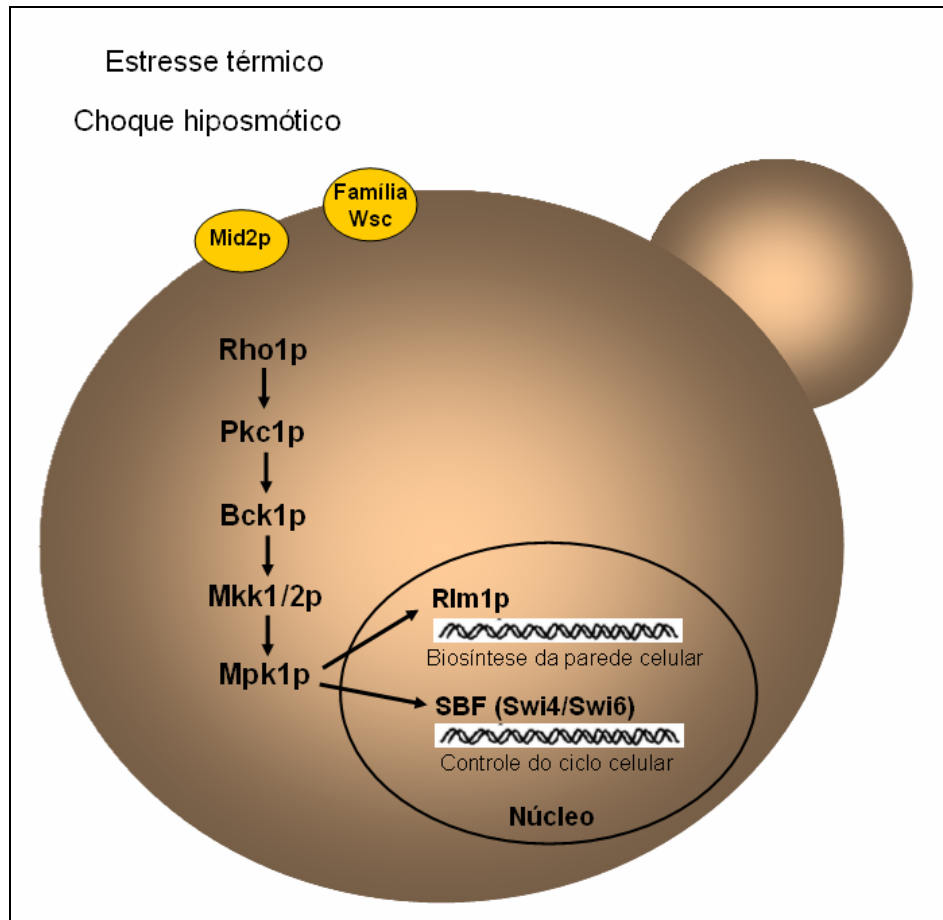


Figura 1- Via PKC-MAPKinase. A via PKC-MAPKinase ou via de integridade celular é ativada por condições como estresse térmico e choque hiposmótico, dentre outras. Esses estímulos são captados pelos sensores Mid2 p e Wsc p que estão localizados na membrana citoplasmática. A ativação dessa via que tem os componentes Rho1 p, Pkc1 p, Bck1 p, Mkk1/2 p e Mpkk1 p altera a expressão de genes regulados pelos fatores transcricionais Rlm1 p e SBF (Swi4/Swi6), implicados na regulação da expressão de genes envolvidos na biosíntese da parede celular e controle do ciclo celular, respectivamente.

1.5- Pkc1 p e outras vias de sinalização

O fato de a deleção do gene *PKC1* provocar um maior número de fenótipos em comparação aos demais mutantes da via PKC-MAPKinase, sugere que Pkc1 p participa de outras vias de sinalização além da via de integridade celular (Levin *et al.*, 1994). Na realidade, diversos processos celulares tem sido descritos como tendo a participação de Pkc1 p: a síntese de ribossomos (Nierras *et al.*, 1999), a realocação de fatores transcricionais como Mig1 p (Salgado *et al.*, 2002), a regulação da atividade de N-glicosilação (Park *et al.*, 2000), a fusão de membranas celulares (Philips *et al.*, 1997), o crescimento polarizado (Andrews *et al.*, 2000), a regulação da polarização do citoesqueleto de actina (Mazzoni *et al.*, 1993; Delley *et al.*, 1999), a viabilidade celular de células quiescentes (Krause *et al.*, 2002) e o controle do checkpoint de morfogênese durante o ciclo celular (Harrison *et al.*, 2001). No contexto de metabolismo de fontes de carbono, sugere-se que Pkc1 p participe do processo de desrepressão de genes que são reprimidos por glicose (Salgado *et al.*, 2002). O mutante *pkc1Δ* não é capaz de crescer em meio contendo glicerol como única fonte de carbono mesmo quando se adiciona o estabilizador osmótico sorbitol (Salgado *et al.*, 2002).

O mutante *pkc1Δ* apresenta problemas relacionados ao metabolismo de fontes de carbono, observando-se crescimento lento em glicose com retardo no início do processo fermentativo e incapacidade de executar a desrepressão de genes reprimidos por glicose após a exaustão da mesma (Salgado *et al.*, 2002). O atraso para o início da fermentação no mutante *pkc1Δ* é explicado pela constatação de que a velocidade máxima de transporte de glicose e a indução dos transportadores de glicose (Hxt1, Hxt2 e Hxt4) estão fortemente reduzidas nesse mutante (Salgado *et al.*, 2002). Este efeito não é observado nos demais mutantes componentes da via PKC-MAPKinase.

O mutante *pkc1Δ* apresenta deficiência no consumo de fontes de carbono alternativas como etanol, glicerol e rafinose. O crescimento em meio contendo rafinose é deficiente devido à baixa expressão do gene *SUC2* e conseqüentemente a baixos níveis de atividade da enzima invertase após a transferência das células de glicose para rafinose (Salgado *et al.*, 2002).

Salgado *et al.* (2002), demonstraram que Pkc1 p estaria atuando através da via principal de repressão por glicose, já que cepas apresentando duplas deleções nos genes *PKC1* e *HXK2* ou *MIG1* não apresentam o típico fenótipo repressivo da cepa *pkc1Δ*. Além disso, evidências apontam para a participação de Pkc1 p no controle da localização subcelular do repressor Mig1 p (Gomes *et al.*, 2005).

1.6- O metabolismo de glicerol em *Saccharomyces cerevisiae*

O glicerol é um soluto acumulado durante estresse osmótico ou salino, ou seja, em condições de choque hipertônico. Além disso, trata-se de um metabólito chave ao atuar em processos como o balanço redox e a síntese de lipídeos. O glicerol pode ser utilizado como única fonte de carbono, sendo transportado passivamente pelo canal constitutivamente expresso Fps1 p (Tamas *et al.*, 1999; Bill *et al.*, 2001) e por um sistema simporte de próton (Slt1 p) que é reprimido por glicose e induzido por fontes de carbono não-fermentável (Ferreira *et al.*, 2005). Fps1 p regula a retenção de glicerol, ao fechar o canal em condições de choque hipertônico e abri-lo em condições de baixa osmolaridade.

Uma vez internalizado o glicerol sofre catabolismo da seguinte forma: a enzima glicerol quinase (Gut1 p), codificada pelo gene *GUT1*, promove sua fosforilação a glicerol 3-fosfato (3-P) (Sprague *et al.*, 1977; Pavlik *et al.*, 1993). Num segundo momento, o glicerol 3-P é convertido a dihidroxiacetona fosfato pela enzima glicerol 3-P desidrogenase FAD-dependente (Gut2 p), codificada pelo gene *GUT2* (Ronnow *et al.*, 1993). Gut2 p está localizada na membrana mitocondrial externa (Larsson *et al.*, 1998). Os genes *GUT1* e *GUT2* são sabidamente reprimidos por glicose (Ronnow *et al.*, 1993; Grauslund *et al.*, 1999) e a deleção desses inviabilizam o crescimento em meio contendo glicerol como única fonte de carbono, sugerindo que essa é a única via existente para o catabolismo do glicerol (Sprague *et al.*, 1977). O fator transcricional Opi1 p é responsável pela repressão de *GUT1*, enquanto Adr1 p e Ino2/4 p são responsáveis por mais de 90% da expressão desse gene em condições de desrepressão (Grauslund *et al.*, 1999). A atividade de Opi1 p é regulada por um mecanismo Pkc1 p-dependente (Sreenivas *et al.*, 2001).

A síntese do glicerol ocorre no citoplasma das leveduras a partir de um intermediário da via glicolítica, a dihidroxiacetona fosfato, que é transformada em glicerol através de duas etapas catalizadas pelas enzimas glicerol 3-fosfato desidrogenase (Gpd) e Glicerol 3-fosfatase (Gpp), respectivamente. Cada enzima citada anteriormente apresenta duas isoenzimas, as induzidas por choque hiperosmótico Gpd1 p e Gpp2 p, e as de expressão constitutiva Gpd2 p e Gpp1 p (Norbeek *et al.*, 1996; Ansell *et al.*, 1997).

Como estratégia para esclarecermos a participação de Pkc1 p no metabolismo do glicerol, o mutante *pkc1Δ* foi mutado por radiação ultra violeta (UV) (Gomes *et al.*, 2005). O novo mutante denominado LBFM335 que é capaz de crescer em meio contendo glicerol foi transformado com uma biblioteca multi-cópia (YEP13) de DNA genômico. A estratégia era inserir uma cópia normal do(s) gene(s) que fora(m) mutado(s) no ensaio com UV. Os transformantes selecionados, foram aqueles que apresentaram a reversão do fenótipo de LBFM335, voltando a não crescer em meio contendo glicerol (Gomes *et al.*, 2005). Dois desses transformantes, denominados 342 e 345, tiveram o fragmento genômico, oriundo da biblioteca, extraído e seqüenciado. O transformante 345 tinha um fragmento de 2300 pb, contendo a seqüência completa do gene *HOS2*, que codifica para uma histona deacetilase. Por outro lado, o transformante 342, continha um fragmento de 4600 pb, sendo que o gene *MSN5* estava presente, codificando uma exportina (Gomes *et al.*, 2005).

O gene *HOS2* faz parte de uma classe de histona deacetilases de classe I, responsáveis pela regulação de vários genes ao afetar a organização da cromatina. Por exemplo, a deacetilação de resíduos de lisina de histonas H3 e H4, é necessário para interação com Tup1/Ssn6 p, um complexo de atividade repressora envolvido na regulação de genes reprimidos por glicose (Smith *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 2000; Davie *et al.*, 2003; Boukaba *et al.*, 2004). Por outro lado, o gene *MSN5* que codifica uma exportina envolvida em diferentes processos celulares como a utilização de fontes de carbono (Alepuz *et al.*, 1999). Os genes *HOS2* e *MSN5* foram então amplificados por PCR a partir da cepa LBFM335 e seqüenciados. O seqüenciamento revelou que esses não estavam mutados em LBFM335 (Gomes *et al.*, 2005). Portanto, o efeito observado de reversão do fenótipo de LBFM335, deve ser atribuído ao fato de que esses dois genes provavelmente atuam como supressores extragênicos do fenótipo desreprimido. A(s) mutação(s) presente(s) em LBFM335, não está(ão) relacionada(s) aos componentes da via de MAPKinase, uma vez

que esse mutante necessita de estabilizador osmótico para crescimento assim como *pkc1Δ*. Esses resultados compuseram a dissertação de mestrado de Kátia das Neves Gomes e estão diretamente relacionados a essa dissertação de mestrado. Atualmente, estudamos o mutante LBFM335 de maneira a determinar se a mutação ocorreu em um ou mais genes, e ainda procurando esclarecer se a mutação(s) gerada é dominante ou recessiva. Esses experimentos estão sendo conduzidos por um grupo português na Universidade do Minho, na cidade de Braga. No caso de se tratar de uma mutação dominante, a transformação de *pkc1Δ* com uma biblioteca genômica preparada a partir do DNA de LBFM335, poderia levar a obtenção de melhores resultados. Uma outra abordagem, já testada é a transformação de LBFM335 com uma biblioteca de cópia única, para se evitar o efeito da superexpressão de um gene. Nesse caso, o problema tem sido a recuperação desses vetores, justamente por estarem presentes em cópia única.

No presente trabalho investigamos as bases moleculares que explicam o fraco crescimento de *pkc1Δ* em meio contendo glicerol como única fonte de carbono. Com esse objetivo, avaliamos os níveis de atividade da enzima glicerol quinase (Gut1 p) bem como os níveis de expressão do gene *GUT1* para sabermos se o fraco crescimento de *pkc1Δ* em meio contendo glicerol se deve a problemas no catabolismo desse substrato ou ao estresse oxidativo gerado pela utilização de uma fonte de carbono não-fermentável como o glicerol. O mutante *pkc1Δ* é sensível ao estresse oxidativo e a causa dessa sensibilidade permanece desconhecida (Vilella *et al.*, 2005).

1.7- Metabolismo respiratório e estresse oxidativo

A utilização do oxigênio (O_2) no metabolismo respiratório tem como consequência inevitável à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS-Reactive Oxigen Species). Os radicais livres se formam quando o O_2 reage com elétrons que eventualmente escapam dos transportadores de elétrons na cadeia respiratória. Os assim denominados ROS podem ser o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (HO^\bullet), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou o simpleto de oxigênio (1O_2) (Halliwell *et al.*, 1991; Cadenas *et al.*, 1995). Para contrabalancear a ação tóxica desses compostos, a célula possui mecanismos de defesa anti-

oxidativos. Quando os mecanismos de defesa não conseguem suplantar a ação dos ROS, o resultado é a ocorrência do estresse oxidativo (Sies, 1991).

O estresse oxidativo causa danos aos lipídeos, proteínas e DNA. No primeiro caso, as espécies reativas de oxigênio causam oxidação de ácidos graxos da membrana plasmática e de organelas. No caso das proteínas, o dano que ocorre em resíduos de aminoácidos pode levar a quebra do peptídeo, a agregação das proteínas modificadas, a mudança da carga elétrica, a alteração da susceptibilidade a proteólise, entre outros efeitos deletérios. Os danos ao DNA incluem a ocorrência de deleções, mutações, translocações, degradação de bases, quebra da fita de DNA e agregações aberrantes entre DNA e proteínas (Scandalios, 2005).

Os mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo são classificados em enzimáticos e não-enzimáticos (químicos). No primeiro caso, temos enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalases e glutathione transferases. Além dessas, enzimas que têm a capacidade de ligação a íons metálicos, como a ferritina, transferrina, ceruloplasmina e metalotioneínas, auxiliam na defesa contra os radicais livres (Ahmad, 1995). Por outro lado, o mecanismo não-enzimático conta com moléculas com propriedades anti-oxidantes como a glutathione (GSH), ascorbato, tocoferóis, coenzima Q reduzida (CoQH2), ácido úrico (Buettner, 1993), entre outras.

Portanto, embora o oxigênio seja uma molécula vital, ao mesmo tempo ela pode provocar estresse oxidativo as células, ocasionando danos a várias macromoléculas (Ames *et al.*, 1993). As leveduras constituem um bom modelo para o estudo do estresse oxidativo celular (Jamieson, 1993; Toledano *et al.*, 2003). A literatura contém ampla documentação a respeito dos fatores transcricionais, Yap1, Skn7 e Msn2/4, que estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo em levedura (Toledano *et al.*, 2003). Entretanto, a(s) via(s) de sinalização envolvida na sensibilização e transmissão de estímulos relacionados ao estresse oxidativo é pouco conhecida. Vilella *et al.* (2005), descrevem a via PKC-MAPKinase como sendo a responsável pela sinalização de estresse oxidativo. O mutante *pkc1Δ* é sensível a dois agentes oxidantes: peróxido de hidrogênio e diamida (Vilella *et al.*, 2005). Mtl1 p foi identificado como sendo o sensor para o estresse oxidativo (Vilella *et al.*, 2005). A via de integridade celular tem um papel importante no reparo da parede celular que é gerado pelo

estresse oxidativo (Gash *et al.*, 2000), mas Pkc1 p parece ter maior importância em relação aos componentes abaixo na via de MAPKinase (Vilella *et al.*, 2005).

Sabendo que o mutante *gup1Δ* apresenta baixa performance de crescimento em meios de cultura que contenham as fontes de carbono não-fermentáveis lactato e glicerol (Holst *et al.*, 2000), sendo que a atividade da enzima glicerol quinase (Gut1 p) não se encontra diminuída no mutante *gup1Δ* em relação a cepa selvagem (Holst *et al.*, 2000). Somando-se o fato do mutante *gup1Δ* apresentar sensibilidade ao estresse oxidativo (<http://prophecy.lundberg.gu.se/>) investigamos a hipótese de Pkc1 p e Gup1 p atuarem na defesa contra o estresse oxidativo de forma conjunta.

1.8 – Função biológica de *GUP1* em *Saccharomyces cerevisiae*

A proteína descrita como sendo a responsável pelo sistema simporte glicerol/H⁺, a princípio, foi identificada como sendo a codificada pelo gene *GUP1* (Glycerol Uptake Protein) (Holst *et al.*, 2000). A partir de uma busca no banco de dados de *Saccharomyces cerevisiae* por genes homólogos a *GUP1* identificou-se uma ORF com considerável similaridade que foi então denominada *GUP2* (Holst *et al.*, 2000). No triplo mutante *gup1Δgup2Δgut1Δ* não se observa transporte ativo de glicerol quando se cresce as células em meio YP etanol (Holst *et al.*, 2000). Embora haja alta similaridade entre *GUP1* e *GUP2*, a deleção de *GUP1* não é complementada por *GUP2* (Neves *et al.*, 2004). Em estudos posteriores com o mutante *gup1Δ* sugeriu-se a existência de outras funções para esse gene. A análise da expressão de *GUP1* e *GUP2* mostrou que esses dois genes têm expressão baixa e constitutiva, quando as células são crescidas em glicose e sal, não havendo correlação entre os níveis intracelulares de glicerol e a detecção de transporte ativo do mesmo (Neves *et al.*, 2004). *GUP1* apresenta alta similaridade com outros genes de outras espécies de fungos, sendo que nenhum desses genes parece estar envolvidos com o transporte de glicerol nessas espécies (Lages *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 2004). Neves *et al.* (2004), sugerem a existência de um papel biológico diferente do estabelecido originalmente, o de captação de glicerol, para Gup1 p e Gup2 p uma vez que no triplo mutante *gup1Δgup2Δgut1Δ*, quando as células são crescidas sob estresse salino, principalmente na diauxia, observou-se a existência de transporte ativo de glicerol

(simporte glicerol/H⁺). Gup1 p foi incluído na superfamília MBOAT (Membrane bound O-acyl transferase) por apresentar o domínio acil-transferase (Hofmann, 2000; Neves *et al.*, 2004).

O gene *GUP1* é altamente conservado entre os fungos e protozoários, sendo que o fenótipo de *gup1Δ* é parcialmente recuperado pela expressão dos homólogos de *GUP1* de *Aspergillus fumigatus* e *Trypanosoma cruzi* (Bosson *et al.*, 2006).

Ferreira *et al.* (2005), descreveram a proteína Slt1 p, como sendo a responsável pelo simporte glicerol/H⁺. A deleção de *SLT1* causa diminuição do crescimento celular em meio que contem glicerol como única fonte de carbono. Slt1 p é essencial para o transporte ativo de glicerol uma vez que, em todas as condições de crescimento em que sabidamente ocorre a captação de glicerol, a deleção de *SLT1* aboli a capacidade de captação desse composto. A atividade do sistema simporte glicerol/H⁺ é induzida no choque hiperosmótico, existindo correlação direta entre os níveis de Slt1 p e o aumento da captação de glicerol. Slt1 p está localizada na membrana plasmática e está sujeita a inativação por glicose. Na presença de glicose, Slt1 p é internalizada em um vacúolo por endocitose, de maneira *END3*-dependente, sendo posteriormente degradada. A levedura de fissão *S. pombe* que não é capaz de captar glicerol por transporte ativo (Lages *et al.*, 1999), passa a fazê-lo quando o gene *SLT1* de *S. cerevisiae* é expresso naquela levedura, promovendo dessa forma a captação de glicerol de forma ativa em *S. pombe*. Todas essas evidências apontam para Slt1p como a proteína responsável pelo simporte glicerol/H⁺ (Ferreira *et al.*, 2005).

Em ensaio duplo-híbrido, Gup1 p mostrou ter interação com Cda2 p, uma quitina deacetilase que é ativa durante a formação de esporos. Além disso, o gene *GUP1* parece ter interação genética com uma série de genes envolvidos na síntese de quitina e β-1,6 glucano, incluindo *SKT5*, *RSVI61* e *RSVI67*. Esses dois últimos envolvidos na polarização do citoesqueleto de actina.

O mutante *gup1Δ* apresenta sensibilidade a uma série de compostos que perturbam a parede celular como Zymolase, Calcofluor-white, lyticase e SDS. Essas últimas observações apontam para um envolvimento de Gup1 p na formação e estabilidade da parede celular. A análise quantitativa dos componentes da parede celular se mostra alterada em *gup1Δ*: conteúdo aumentado de quitina e β-1,3 glucanos e menor quantidade de manoproteínas. A superfície das células se mostra irregular quando analisadas por

microscopia eletrônica de varredura, mas o tamanho das células são iguais as da cepa selvagem (Bosson *et al.*, 2006). Apesar de Gup1 p estar envolvida na formação e estabilidade da parede celular, a deleção de *GUP1* não provoca osmosensibilidade como ocorre com o mutante *pkc1Δ*. Além disso, *gup1Δ* apresenta deficiência de crescimento em meio contendo glicerol como única fonte de carbono como já foi descrito para o mutante *pkc1Δ*, entretanto, a atividade da enzima glicerol quinase (Gut1 p) não se encontra diminuída em *gup1Δ* (Holst *et al.*, 2000).

Bosson *et al.* (2006), descreveram Gup1 p como possuindo atividade de remodelase da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 2). As proteínas que contem âncora de GPI em *S. cerevisiae* possuem ceramida (Cer) ou diacilglicerol (DAG) com um ácido graxo C26:0 na posição sn2. As proteínas recém-sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) possuem âncora de GPI com DAG e ácidos graxos C18 e C16 convencionais. Bosson *et al.* (2006), demonstraram que Gup1 p é essencial para a síntese de âncoras de GPI contendo DAG e ácidos graxos C26:0 em sn2. A âncora de GPI permite grande mobilidade da proteína sobre a superfície da membrana a qual está ligada e as proteínas ancoradas podem ser destacadas da membrana por perda da âncora realizada por enzimas como a fosfolipase C (PLC).

No presente trabalho investigamos se a fraca performance de crescimento do mutante *gup1Δ* em lactato e glicerol também se aplica a outras fontes de carbono alternativas como etanol e rafinose. Além disso, testamos a sensibilidade de *gup1Δ* ao estresse oxidativo gerado por peróxido de hidrogênio e ao estresse ácido em meios de cultura com pH's 1,0 ou 3,0 (corrigidos com ácido clorídrico-HCl), buscando elucidar se esses fenótipos podem estar relacionados a atividade de remodelase da âncora de GPI que Gup1 p possui.

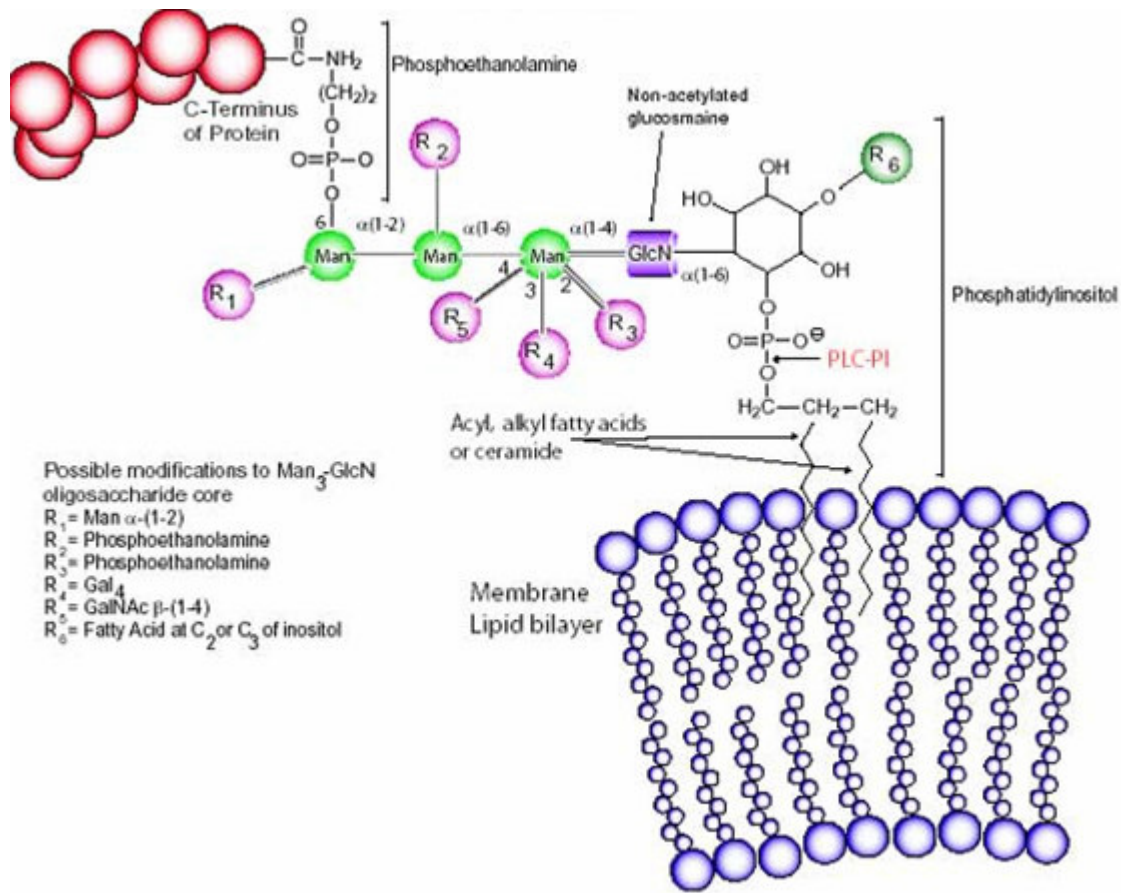


Figura 2- Âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). A âncora de GPI possui uma porção lípídica a qual está inserida na membrana celular e uma porção composta de carboidratos. A âncora é adicionada à porção carboxi-terminal da proteína.

1.9- A âncora de GPI em *Saccharomyces cerevisiae*

As GPI-proteínas nos diferentes organismos vivos podem ser enzimas, receptores, reguladoras do complemento, moléculas de adesão, etc. A âncora de GPI tem papel fundamental para as atividades celulares uma vez que mutações em genes que participam da biosíntese da âncora em *S. cerevisiae* são letais (Hamburger *et al.*, 1995; Sutterlin *et al.*, 1998). As proteínas com GPI podem ser encontradas em membrana plasmática, parede celular ou membranas de organelas. Aquelas que estão presentes na parede celular são integradas à esta pela ação das enzimas Dfg5 p e/ou Dcw1 p. As proteínas são transferidas da Glicosilamina-PI para β -1,6 glucanos (Lu *et al.*, 1995; Kollar *et al.*, 1997; Kitagaki *et al.*, 2002).

A biosíntese de proteínas que contem âncora de GPI segue as mesmas regras básicas em todos eucariotos e toda âncora é constituída de uma porção conservada de carboidrato que está ligada a uma porção protéica de um lado e a uma porção lipídica de outro (Figura 2). A porção lipídica varia de acordo com o ser vivo considerado (Kinoshita e Inoue, 2000). A biosíntese se inicia com a adição de N-acetilglicosamina ao fosfatidilinositol (PI) pela enzima PIG-A/GPI3 (Miyata *et al.*, 1993). Em *S. cerevisiae* dois padrões de porção lipídica podem ser encontrados: contendo ceramida (Cer) ou diacilglicerol (DAG). A Cer é encontrada na maioria das âncoras, sendo constituída principalmente de fitosfingosina (PHS) e ácido graxo C 26:0 (Fankhauser *et al.*, 1993). Nos dois tipos de porção lipídica, o ácido graxo C26:0 deve ser hidroxilado em C2. A porção lipídica sofre reações de remodelamento assim que a âncora de GPI primária é adicionada à proteína nascente no retículo endoplasmático (RE). Durante o remodelamento, o DAG contendo os ácidos graxos C16 e C18 são modificados ou substituídos. Gup1 p atua como a remodelase que adiciona ácidos graxos C26 à posição sn2 de âncoras que possuem liso-fosfatidilinositol (liso-PI), uma vez que no mutante *gup1* Δ , a porção lipídica encontrada é sempre a primária (Bosson *et al.*, 2006). O mutante *gup1* Δ produz quantidades normais de GPI-proteínas, entretanto essas contêm liso-PI e outras ainda possuem fosfatidilinositol (PI) com ácidos graxos C-16 e C-18 convencionais (Bosson *et al.*, 2006). Além disso, a incorporação de ceramida está prejudicada. Como consequência, Gas1p, que é uma β -1,3 glucanosiltransferase envolvida na formação da parede celular e que

sabidamente é ancorada por GPI, apresenta problemas no transporte do RE para o Complexo de Golgi (Bosson *et al.*, 2006). No mutante *gup1Δ*, formas imaturas de Gas1 p são encontradas no RE quando deveriam estar no Complexo de Golgi e já modificadas. Além disso, Gas1 p maduras são perdidas para o meio extracelular. O mutante *gup2Δ* não apresenta problemas com a remodelagem da âncora de GPI (Bosson *et al.*, 2006).

Os mutantes *gup1Δ* e *pkc1Δ* compartilham alguns fenótipos dentre os quais: o mutante *gup1Δ* apresenta fraco crescimento em fontes de carbono alternativas como lactato e glicerol (Holst *et al.*, 2000) enquanto o mutante *pkc1Δ* apresenta fraco crescimento nas fontes de carbono alternativas rafinose, glicerol e etanol (Salgado *et al.*, 2002; Brandão *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2005); ambos mutantes apresentam sensibilidade a cafeína na concentração de 12 mM (Martin *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006), ao estresse térmico e a vários agentes que perturbam a parede celular (Kamada *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2006); o mutante *gup1Δ* é sensível ao estresse oxidativo gerado por diamida, 1,4-ditiotreitól (DTT) e paraquat (<http://prophecy.lundberg.gu.se/>) enquanto *pkc1Δ* é sensível ao estresse oxidativo gerado por diamida e peróxido de hidrogênio (Vilella *et al.*, 2005); por último, *gup1Δ* é sensível ao estresse ácido gerado por ácidos orgânicos fracos enquanto *pkc1Δ* é sensível ao estresse ácido (pH 3,0) (Claret *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006). A similaridade dos fenótipos apresentados por *gup1Δ* e *pkc1Δ*, aponta para uma possível relação entre as proteínas Pkc1 p e Gup1 p. Essa suspeita foi reforçada com a observação de que o gene *GUP1* está menos expresso no mutante *pkc1Δ* quando as células são crescidas em rafinose quando comparado a cepa selvagem (resultados não publicados). Dessa forma, na presente dissertação de mestrado investigamos o possível envolvimento de Pkc1 p na regulação da atividade de Gup1 p, a nível transcricional ou pós-traducional (Figura 3). Desse modo, Pkc1 p afetaria as funções celulares relacionadas a Gup1 p em células de *S. cerevisiae*.

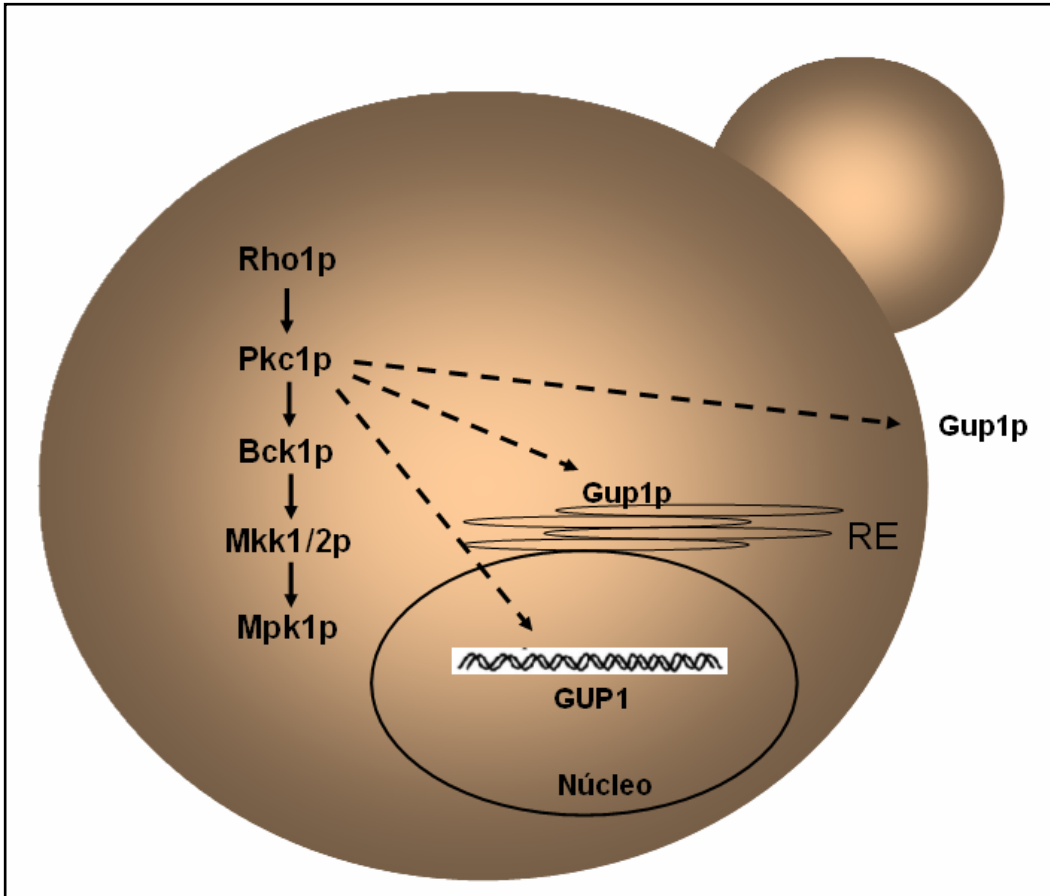


Figura 3- Modelo investigado para regulação da atividade de Gup1 p. Nesse modelo, Pkc1 p poderia estar afetando a atividade de Gup1 p, presente no retículo endoplasmático e membrana citoplasmática, de maneira direta ou indireta, a nível transcricional ou pós-traducional.

OBJETIVOS

2- Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Estudar o papel de Pkc1 p no metabolismo de glicerol e na regulação de funções celulares relacionadas à proteína Gup1 p em *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2- Objetivos Específicos

- a) Avaliar o catabolismo de glicerol nas cepas selvagem, *pkc1Δ*, *bck1Δ* e LBF335, analisando os níveis de expressão do gene *GUT1* bem como a atividade da enzima glicerol quinase
- b) Avaliar o fenótipo do mutante *gup1Δ* em meios de cultura contendo fontes de carbono alternativas (etanol, glicerol e rafinose), e em condições de estresse oxidativo e estresse ácido.
- c) Buscar proteínas com âncora de GPI que estejam relacionadas aos fenótipos do mutante *gup1Δ*.
- d) Avaliar a regulação da proteína Gup1 por Pkc1p a nível transcricional.

MATERIAIS E MÉTODOS

3- Materiais e Métodos

3.1- Microorganismos utilizados nos experimentos

3.1.1- Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas nos experimentos

*Nome	Genótipo
^a W303	Mat a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 GAL mal SUC2
^b YSH850	Mat a <i>pkcΔ::HIS3</i> (W303-1A)
^c LBFM335	Mat a <i>pkcΔ::HIS3</i> (W303-1A) <i>lbfm335</i>
^d _{gup1}	BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YGL084c::kanMX4
^d _{gup2}	BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YPL189w::kanMX4
^d BY4741	MATa; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0
YSH813	W303-1A + <i>bck1Δ::LEU2</i>

3.1.2- Procedência das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*:

- a- Johan Thevelein, Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
- b- Stefan Hohmann, CMB/Microbiology, Göteborg University, Sweden.
- c- Cepas obtidas por UV no LBCM, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil.
- d- Coleção EUROSCARF

3.2-Meios de cultura e condições de crescimento

3.2.1.-Meio YP

O meio YP é constituído por extrato de levedura 1% (pv), bacto-peptona 2% (p/v). O meio sólido recebe o acréscimo de ágar 1,5% (p/v). Para os mutantes osmossensíveis adicionou-se sorbitol na concentração final de 1 molar (1M) ao meio de crescimento. As

fontes de carbono utilizadas foram as seguintes: glicose 2%, glicerol 3%, rafinose 3% e etanol 3%. As fontes de carbono foram autoclavadas separadamente e acrescentadas ao meio no fluxo laminar.

3.2.2- Condições de crescimento

As células de *Saccharomyces cerevisiae* foram cultivadas a 30°C sob agitação de 200 rpm (agitador New Brunswick Model G25) em meio YP suplementado com a fonte de carbono adequada e acrescido de sorbitol 1 M para os mutantes osmossensíveis.

3.3-Determinação da atividade da enzima invertase

3.3.1- Inóculo e crescimento das células

As células de *Saccharomyces cerevisiae* foram cultivadas em 40 mL de meio YP glicose 2%, a 30°C, sob agitação a 200 rpm em agitador New Brunswick Model G25, até que a densidade ótica atingisse o valor de 0,5. As células foram então lavadas duas vezes com YP e logo em seguida ressuspensas em meio YP rafinose 3%.

3.3.2-Preparo de extratos celulares para a determinação da atividade invertásica

Nos tempos 0, 30min., 1, 2 e 24 horas amostras de 4,0 mL da cultura foram coletadas por centrifugação a 1000 g, 4°C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular lavado três vezes com 3 ml de tampão imidazol 200 mM (imidazol 200 mM, MgCl₂ 40 mM, KCl 400 mM, sorbitol 1 M, pH 7,0). Após este procedimento, adicionou-se em cada tubo, 0,5 g de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro), 500 µl de tampão imidazol 50 mM (imidazol 50 mM, MgCl₂ 40 mM, KCl 400 mM, pH 7,0) e 2,5 µl de uma solução de PMSF 100 mM (Phenylmethyl Sulphonyl Fluoride). As células foram lisadas por agitação em vórtex (seis vezes, 30 segundos) com repouso em gelo nos intervalos de agitação. Posteriormente, adicionou-se 500 µl de tampão imidazol 50 mM. A mistura foi transferida para um tubo de microcentrifuga tipo eppendorf de 1,8 ml e centrifugada a 3500 rpm (Heraeus Sepatech, Biofure 13), durante 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos de amostra do aparelho COBAS. O

extrato livre de células foi estocado a temperatura de -20°C até o momento da dosagem (Salgado *et al.*, 2002).

3.3.3-Dosagem de atividade da enzima invertase

A dosagem da atividade da enzima invertase foi realizada no aparelho de dosagem bioquímica COBAS-FARA (Roche), tendo sido utilizado como substrato para a reação uma solução de sacarose 0,3 M em acetato de potássio 100 mM pH 5,1. Após 5 minutos de incubação, a 30°C, a reação foi interrompida pela adição de 10 µl NaOH 1 M. Em seguida um volume de 10 µl HCl 1M foi adicionado para neutralizar o pH da reação. A glicose liberada foi determinada pela reação clássica de glicose-oxidase/peroxidase, tendo a ortodianisidina como reativo de cor. A leitura da absorbância foi feita a 435 nm. A atividade da enzima invertase foi expressa em nmoles de glicose/min/mg proteína (Goldstein e Lampen, 1975; Celenza e Carlson, 1989).

3.4-Determinação da atividade da enzima glicerol quinase

3.4.1- Inóculo e crescimento das células

As células de *Saccharomyces cerevisiae* foram crescidas em 40 mL de meio YP glicose 2% suplementado com sorbitol 1M para as cepas osmosensíveis, a 30°C, sob agitação a 200 rpm em agitador New Brunswick Model G25, até que a densidade ótica atingisse o valor entre 0,5 e 1,0. As células foram então lavadas duas vezes com YP, logo em seguida foram ressuspensas em meio YP glicerol 3% e crescidas por 6 horas.

3.4.2-Preparo de extratos celulares para a determinação da atividade da enzima glicerol quinase

Nos tempos 0 e 6 horas, 4,0 mL do meio de cultura foram coletados por centrifugação a 1000 g, 4°C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular lavado três vezes com 3 ml de tampão imidazol 200 mM (imidazol 200 mM, MgCl₂ 40 mM, KCl 400 mM, sorbitol 1 M, pH 7,0). Após este procedimento,

adicionou-se, em cada tubo 0,5 g de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro), 500 µl de tampão imidazol 50 mM (imidazol 50 mM, MgCl₂ 40 mM, KCl 400 mM, pH 7,0) e 2,5 µl de uma solução de PMSF 100 mM (Phenylmethyl Sulphonyl Fluoride). As células foram lisadas por agitação em vórtex (seis vezes, 30 segundos) com repouso em gelo nos intervalos de agitação. Posteriormente, adicionou-se 500 µl de tampão imidazol 50 mM. A mistura foi transferida para um tubo de microcentrifuga tipo eppendorf de 1,8 ml e centrifugada a 3500 rpm (Heraeus Sepatech, Biofure 13) por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos de amostra do aparelho COBAS. O extrato livre de células foi estocado a temperatura de -20°C até o momento da dosagem (Salgado *et al.*, 2002).

3.4.3-Dosagem de atividade da enzima glicerol quinase

A dosagem de atividade da enzima glicerol quinase foi realizada no aparelho de dosagem bioquímica COBAS-FARA (Roche). As medidas da atividade específica dessa enzima foram feitas de acordo com Castro e Loureiro-Dias (1991). Esse método enzimático utiliza as enzimas piruvato quinase e lactato desidrogenase. A reação é iniciada pela adição de 0,1 mM de glicerol. O coeficiente de extinção de 6,22 (l.mmol⁻¹.cm⁻¹) para o NADH foi utilizado nos cálculos. As medidas de atividade foram expressas em mmol NADH. min⁻¹.mg⁻¹ proteína.

3.4.4- Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi realizada segundo o método de Lowry *et al.*, 1951, utilizando a soro albumina bovina como padrão.

3.5-Curva de crescimento

3.5.1-Preparo do inóculo

As leveduras foram inoculadas em 3 ml de meio YP glicose 2% e incubadas por 24 horas, a 30°C, sob agitação a 200 rpm em agitador New Brunswick Model G25. Após esse

período mediu-se a densidade ótica das células a 600 nm (DU-68 Spectrophotometer-Beckman). Calculou-se o volume necessário do pré-inóculo para que a densidade ótica atingisse um valor final de 0,1 em um erlenmeyer contendo 30 ml de meio de cultura.

3.5.2-Construção da curva de crescimento

Por um período de até 80 horas, coletou-se alíquotas de 0,8 mL das amostras em estudo para efetuar a medida da DO_{600nm} em espectrofotômetro Beckman modelo DU-68. As leituras de densidade ótica foram usadas na construção da curva representando o perfil de crescimento das células.

3.6-Teste de crescimento em diferentes meios de cultura

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram crescidas em tubos de ensaio contendo 4,0 ml de meio YP glicose 2%, durante 24 horas, a 30°C, sob agitação de 200 rpm em agitador New Brunswick Model G25. Após este período, mediu-se a densidade ótica das culturas a 600 nm (DU-68 Spectrophotometer-Beckman). A partir dos valores obtidos calculou-se o volume de meio a ser adicionado a solução de sorbitol 1M, em tubo eppendorf estéril, de modo que se atingisse a densidade ótica de 1,0. Desse tubo procedeu-se a diluição seriada, nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Um volume de 3 μ l da suspensão de células foram utilizadas para inocular cada meio de cultura sólido. As placas foram incubadas a 30°C por até 120 horas.

3.7- Northern-blot

3.7.1- Extração de RNA total e Northern-blot

As células foram crescidas em 20,0 mL de meio YP glicose 4% até atingirem a densidade ótica entre 0,8 e 1,2. Nesse momento as células foram divididas em duas amostras e lavadas com sorbitol 1M, seguido de centrifugação 1000g, 4°C, 4 minutos. Uma amostra foi utilizada para extração de RNA, correspondendo ao estado de repressão catabólica. A outra amostra foi ressuspensa em meio YP glicerol 3% e glicose 0,05% e assim

permaneceram incubadas por 2 horas. Logo em seguida foram lavadas como a primeira amostra e o pellet celular foi utilizado para extração do RNA total (células em estado desreprimido). A extração do RNA total foi realizada pelo método do fenol ácido quente (Sambrook *et al.*, 1989). Um total de 15 µg de RNA foi separado em gel de agarose (1% p/V), ácido bórico 50 mM, citrato de sódio 1 mM, NaOH 5 mM, pH 7.5, formaldeído (1% p/V). Em seguida, o RNA foi transferido para membranas Hybond-N em solução 10X SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M citrato de sódio, pH 7.0). O RNA foi então hibridizado com sondas gene-específica. As sondas para o gene *GUT1* e *ACT1* foram obtidas por PCR utilizando-se os seguintes primers:

GUT1

Direto: 5'-AATAGTTATATGTTTCCC-3'

Reverso: 5'-GCTATTTATGTTGTTATTGG-3'

ACT1

Direto: 5'-GCTATTTATGTTGTTATTGG-3'

Reverso: 5'-GATAGTGGACCACTTTCGTCG-3'

Os produtos de PCR foram purificados como descrito em 3.7.2. O gene *ACT1*, que codifica para actina, é um controle positivo para o experimento de Northern-blot. Os produtos de PCR foram marcados radioativamente através do RediprimeTM II labelling kit (Pharmacia). Os níveis de RNA foram visualizados expondo a membrana ao filme CL-X PosureTM.

3.7.2- Purificação do produto de PCR

Ao produto de PCR adicionou-se 300 µL de NaCl 1,2 M e 700 µL de etanol 100%. Incubou-se a mistura por 30 minutos a -20°C e procedeu-se a centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos. O pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70% (centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos), seco e ressuspensão em 20 µL de água Milli-Q estéril.

3.8- Acidificação extracelular

3.8.1- Pré-inóculo

As cepas de *S. cerevisiae* foram crescidas em 5,0 mL de meio YP glicose 2% durante 24 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm em agitador New Brunswick Model G25. Logo em seguida, elas foram transferidas para 50 mL de meio YP glicose 2% e procedeu-se o crescimento celular nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.8.2- Inóculo

Os 50 mL provenientes do pré-inóculo foram utilizados para inocular 500,0 mL de meio YP glicose 2%. O crescimento se deu a 30°C, sob agitação de 200 rpm em agitador New Brunswick Model G25, até que a densidade ótica atingisse o valor de 1,0 (fase exponencial de crescimento).

3.8.3- Medida da acidificação extracelular induzida por glicose

As células foram coletadas por centrifugação a 1000 g por 5 minutos, a 4 °C (centrífuga Beckman GS-6R). Em seguida, foram lavadas 2 vezes com 25 mL de tampão Tris HCl 100 mM / KCl 100 mM pH 4,5 centrifugando-as a 1000 g por 5 minutos, a 4 °C. Pesou-se 4,0 g de células e estas foram resuspensas em 4,0 mL de água Milli-Q (peso úmido 1,0 g/mL). Após a homogeneização dessa suspensão de células, coletou-se 0,2 mL para determinação do peso seco como descrito em 3.8.4. Aos 3,8 mL restantes foi adicionado solução tampão de Tris HCl 100 mM / KCl 100 mM pH 4,5 em quantidade suficiente para 38,0 mL. A medida do efluxo de prótons (H^+) induzido por glicose foi realizada de acordo com Cocetti *et al.* (1998). Cerca de 4,5 mL da suspensão de células (peso úmido 100 mg/mL) foram transferidas para um béquer de 5,0 mL. Após a estabilização do pH foi dado um pulso de glicose adicionando-se 500 μ L de glicose 1,0 M (concentração final de 100 mM). As medidas de pH foram então feitas através do potenciômetro ORION durante um intervalo de 5 minutos, antes e após a adição de glicose. O HCl foi utilizado como padrão para quantificarmos a extrusão de H^+ . Para tanto, 4,5 mL da suspensão de células foram colocadas em um béquer e foi dado um pulso de HCl adicionando-se 10 μ L de HCl 100 mM

(1 μmol de H^+) mais 490 μL de água Milli-Q. A variação de pH foi avaliada durante 3 minutos antes e após a adição de HCl.

3.8.4- Determinação do peso seco

Um volume de 0,1 mL de suspensão de células (peso úmido 1 g/mL) sofreu filtração a vácuo em membranas Millipore (0,75 μm de porosidade) previamente pesadas. Após a filtração as membranas foram incubadas em estufa a 80°C por 48 horas para secagem. Decorrido esse período de secagem as membranas foram novamente pesadas. A determinação de peso seco foi feita em duplicata para cada experimento de acidificação.

3.8.5- Cálculo da taxa de acidificação extracelular

Gráficos pH versus T foram obtidos a partir dos resultados de acidificação induzida por glicose. A taxa de acidificação foi calculada em termos de $\text{mmoles H}^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot (\text{g de células})^{-1}$, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{mmoles H}^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot (\text{g de células})^{-1} = \frac{\Delta \text{pH1 (cm)} \times 60}{\Delta \text{pH2 (cm)} \times \Delta \text{T1 (min)} \times \text{PS} \times 45 \times 1000}$$

Onde:

- a) $\Delta \text{pH1 (cm)}$: Variação de pH em centímetros após um pulso de glicose (100 mM)
- b) $\Delta \text{pH2 (cm)}$: Variação de pH em centímetros após um pulso de H^+ (1 μmol)
- c) $\Delta \text{T1 (min)}$: Intervalo de tempo em minutos
- d) PS: Peso seco em gramas correspondente a 0,1 mL da suspensão de células
- e) 45: Fator de correção para o peso seco (nos experimentos utilizou-se 4,5 mL de suspensão de células)
- f) 1000: Transformação do resultado para mmoles de H^+ (10 $\mu\text{L HCl 100 mM} = 1 \mu\text{mol de H}^+$)

Os experimentos foram feitos com 3 culturas independentes e em duplicata.

3.9- Ensaio de viabilidade celular

3.9.1- Pré-inóculo

As cepas de *S. cerevisiae* foram cultivadas em 5,0 mL de meio YP glicose 2% durante 24 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm em agitador New Brunswick Model G25.

3.9.2- Inóculo

Logo em seguida, procedeu-se à leitura da densidade ótica e então as células foram transferidas para 20 mL de meio YP glicose 2% (controle), YP glicose 2% (mais H₂O₂ 5 mM) e YP glicose 2% (pH 3,0 ou 1,0) de modo que a densidade ótica inicial fosse de 0,5. Procedeu-se o crescimento celular a 30°C, sob agitação a 200 rpm em agitador New Brunswick Model G25.

3.9.3- Determinação da porcentagem de células viáveis

A contagem de células vivas ou mortas foi feita utilizando-se a câmara de Neubauer. Realizou-se a contagem de cinco quadrantes e a média de células viáveis foi então determinada. Um volume de 50 µL de meio de cultura foi coletado, lavado duas vezes com YP com centrifugação de 3 minutos a 3000 rpm. Logo em seguida, as células eram ressuspensas em azul de metileno pH 5,1 e procedeu-se a contagem das células em microscópio. As células mortas ficaram coradas em azul. O número de células de cada quadrante não ultrapassou o número de 50. Desse modo, diluiu-se a amostra ou coletou-se uma alíquota menor de meio de cultura quando necessário. Paralelamente a contagem de células viáveis fez-se à curva de crescimento celular medindo-se a densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro (DU-68 Spectrophotometer-Beckman).

3.10- PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR)

As células foram crescidas em meio YP glicose 2% mais sorbitol 1M a 30°C, sob agitação de 200 rpm em agitador New Brunswick Model G25, até que a densidade ótica atingisse 1,0. Em seguida, as células foram lavadas com sorbitol 1M por duas vezes e ressuspensas em meio YP glicose 4% e YP rafinose 2%, incubando-as por duas horas. Procedeu-se à extração do RNA total pelo método do fenol ácido a quente (Sambrook *et al.*, 1989). Aproximadamente 3µg do RNA total foram utilizados para obtenção do cDNA, empregando-se primers oligodT. A qRT-PCR foi feita em aparelho Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Systems (fonte de excitação lâmpada de tungstênio, possuindo cinco filtros de excitação e cinco de emissão, Rampa de +/- 1,6°C/séc). Para a corrida da placa e análise dos dados foi utilizado o Software ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System da Applied Biosystems. Os primers para *GUPI* e *RCK1*, mostrados abaixo, foram desenhados com o programa Primer Express® Software v2.0 da Applied Biosystems.

GUPI

Direto 5' CTCCACGTTGTGGCAATCT 3'

Reverso 5' AAAGCCCACAGCCTAACAG 3'

RCK1

Direto 5' CCCATCTTTTGGAGGTTGAC 3'

Reverso 5' GCACGCTGGCATAAGAATT 3'

Na PCR foi utilizado 2,5 µL de primer 1,6 µM (concentração final de 400nM), 1 µL de cDNA diluído 1/10, 1,5 µL de água Milli-Q estéril e 5,0 µL do Master mix 2X da Invitrogen, onde foi adicionado ROX (fluoróforo do Kit diluído 250 vezes). Após a corrida foi feita a curva de dissociação. Os resultados foram avaliados segundo especificações do fabricante utilizando a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) na qual o gene *ACT1* é usado como controle da reação.

3.11- Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo método T de Student. O desvio padrão está indicado em cada figura. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

RESULTADOS

4- Resultados

4.1 – Envolvimento de Pkc1 p na captação e catabolismo de glicerol em *Saccharomyces cerevisiae*

Buscando elucidar a razão pela qual o mutante *pkc1Δ* não é capaz de utilizar o glicerol como única fonte de carbono, estudamos as bases moleculares do catabolismo desse substrato. O gene *GUT1*, que codifica a enzima glicerol quinase (Gut1p), está envolvido na primeira etapa da via de catabolismo do glicerol, estando sujeito à repressão por glicose (Holst *et al.*, 2000). Dessa forma, iniciamos dosando a atividade de Gut1p, nas cepas selvagem (W303), *bck1Δ*, *pkc1Δ* e LBFM335. De acordo com a dosagem de atividade da enzima Gut1p (Figura 4), o mutante *pkc1Δ* apresenta níveis de atividade menores que os encontrados para as cepas selvagem e *bck1Δ*, quando as células foram transferidas de um meio contendo glicose para outro contendo glicerol. Corroborando o resultado anterior, a análise da expressão do gene *GUT1* através de Northern-blot (Figura 5), mostra que esse gene tem expressão menor em *pkc1Δ* em comparação com as cepas selvagem e *bck1Δ*, quando as células foram incubadas em meio contendo glicerol. O mutante LBFM335, obtido por mutagênese da cepa *pkc1Δ* por meio de radiação ultravioleta (UV) (Gomes *et al.*, 2005) apresenta atividade glicerol quinase elevada, independentemente da fonte de carbono: glicose ou glicerol (Figura 4) e o gene *GUT1* apresenta elevada expressão nessas duas fontes de carbono (Figura 5).

O fato do mutante *pkc1Δ* não apresentar crescimento em meio contendo glicerol poderia estar relacionado à deficiência na captação desse composto a partir do meio externo. Para avaliarmos a hipótese da captação deficiente, ensaios de transporte do glicerol foram realizados com as cepas descritas anteriormente (Figura 6). Os estudos foram feitos com a colaboração de um grupo português da Universidade do Minho, na cidade de Braga. Os pesquisadores envolvidos foram Antônio Martins, Cândida Lucas, Dorit Schüller e Margarida Casal. Os ensaios mostraram que *pkc1Δ* apresenta deficiência no transporte de glicerol, uma vez que essa cepa alcançou apenas metade da acumulação máxima de glicerol comparada à cepa selvagem. Além disso, nos ensaios de transporte do glicerol, LBFM335 apresentou captação superior à cepa selvagem. Portanto, a captação de glicerol não está abolida no mutante *pkc1Δ*, mas encontra-se prejudicada.

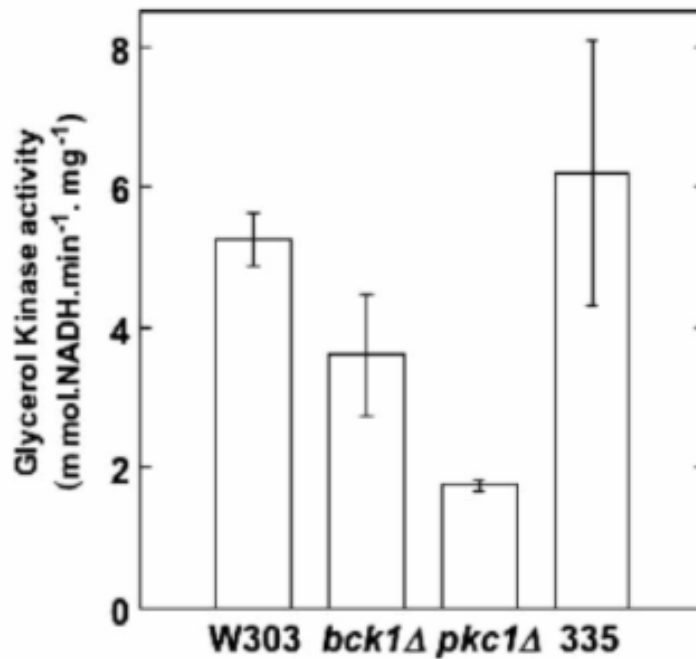


Figura 4- Atividade da enzima glicerol quinase (Gut1p). Células crescidas em meio YP glicerol 3% e sorbitol 1 M por 6 horas. Cepas selvagem (W303), mutantes *bck1*Δ, *pkc1*Δ e LBFM335.

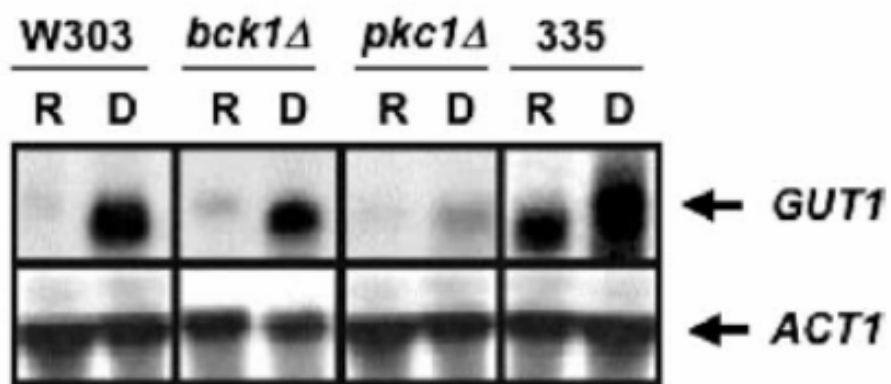


Figura 5- Northern-blot. As células foram crescidas em meio YP glicose 2% e sorbitol 1 M, estado reprimido (R), lavadas com sorbitol 1 M e logo em seguida incubadas em YP glicerosol 3%, glicose 0,05% e sorbitol 1 M por 2 horas, estado desreprimido (D). Cepas selvagem (W303), mutantes *bck1Δ*, *pkc1Δ* e LBFM335. A expressão de *ACT1* foi usada como controle positivo.

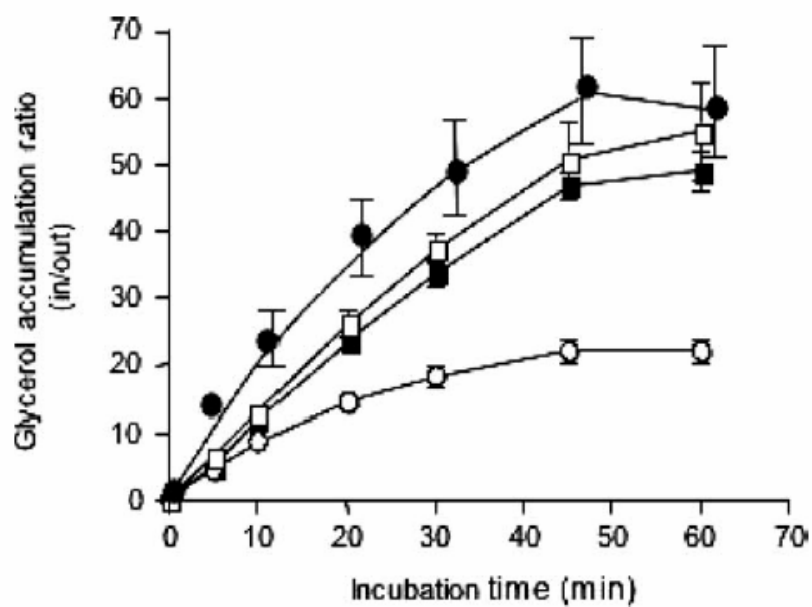


Figura 6- Acúmulo de glicerol radioativamente marcado. (□, cepa selvagem W303-1A; ■, *bck1Δ*; ○, *pkc1Δ*; ●, LBFM335 (mutante isolado a partir de *pkc1Δ* por mutação induzida por UV). Resultados são valores médios de três experimentos independentes (Gomes *et al.*, 2005).

4.2 – Papel de Gup1 p na utilização de fontes de carbono alternativas em *Saccharomyces cerevisiae*

Tendo em vista a participação de Pkc1 p na regulação de processos relacionados a utilização de glicerol em *S. cerevisiae*, e ainda considerando os fatos de que o mutante *gup1Δ* apresenta fraco crescimento em meio contendo glicerol e que Gup1 p foi inicialmente descrito como sendo o provável transportador a realizar o simporte de glicerol, decidimos investigar os fenótipos associados à deleção do gene *GUP1* e compará-los com aqueles exibidos pelo mutante *pkc1Δ*.

O mutante *gup1Δ* apresenta fenótipo de crescimento lento em fontes de carbono alternativas como glicerol, etanol e rafinose (Figura 7), similarmente ao que fora observado para o mutante *pkc1Δ* (Salgado *et al.*, 2002). Por outro lado, o crescimento em glicose do mutante *gup1Δ* é comparável ao observado para a cepa selvagem (Figura 7). A curva de crescimento celular em meio YP glicose 2% (Figura 8) demonstra que o mutante *gup1Δ* apresenta uma fase de adaptação maior (fase lag) e deficiência no crescimento, atingindo um patamar de crescimento inferior ao observado para a cepa selvagem. Enquanto a cepa selvagem apresenta uma nítida segunda fase de crescimento, o mutante *gup1Δ* apresenta menor performance no crescimento (Figura 8). A segunda fase de crescimento celular é menor que a observada para a cepa selvagem mas ela de fato ocorre já que quando incubamos o mutante *gup1Δ* com antimicina e acompanhamos o crescimento observamos uma nítida diferença em relação ao meio sem antimicina (Figura 9).

Uma vez que *gup1Δ* tem crescimento lento em meio contendo rafinose como única fonte de carbono (Figura 7), efetuamos a medida de atividade da enzima invertase (Suc2 p). Essa enzima é codificada pelo gene *SUC2*, estando sua expressão sujeita a regulação negativa por glicose. Nossos resultados mostram que não há diferença nos níveis de atividade da enzima invertase nas cepas selvagem e *gup1Δ* quando incubamos as células em rafinose (Figura 10), apesar do fraco crescimento de *gup1Δ* em meio sólido contendo rafinose.

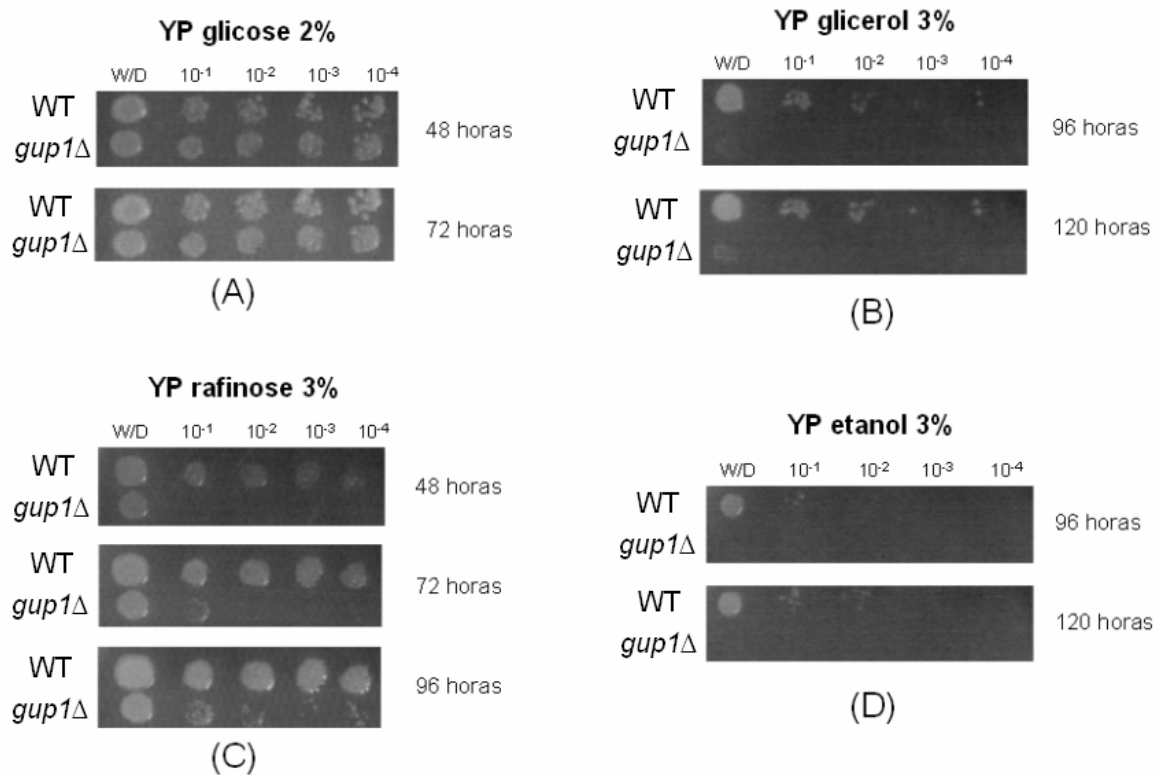


Figura 7- Crescimento celular em meio sólido. (A) YP glicose 2% (B) YP glicerol 3% (C) YP rafinose 3% (D) YP etanol 3%. Diluições feitas a partir de densidade ótica igual a 1,0 (W/D = sem diluir).

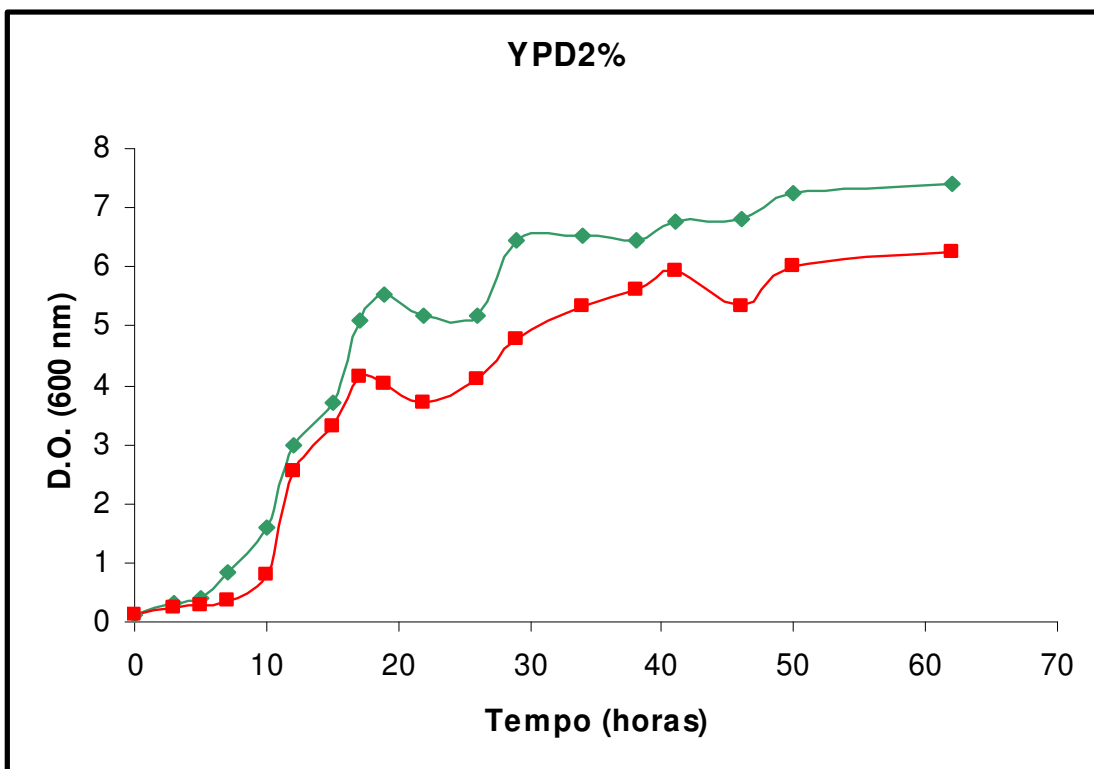


Figura 8- Curva de crescimento em meio YP glicose 2%. Cepas selvagem (WT, ■) e mutante *gup1Δ* (■).

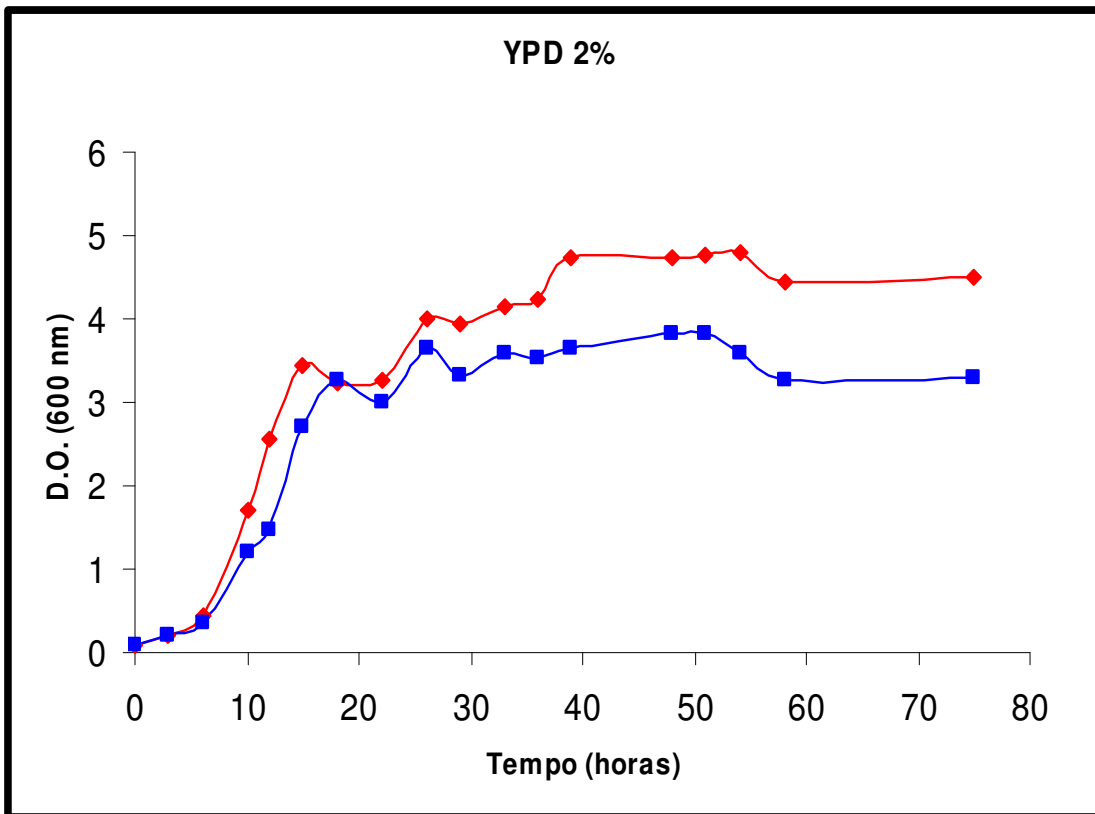
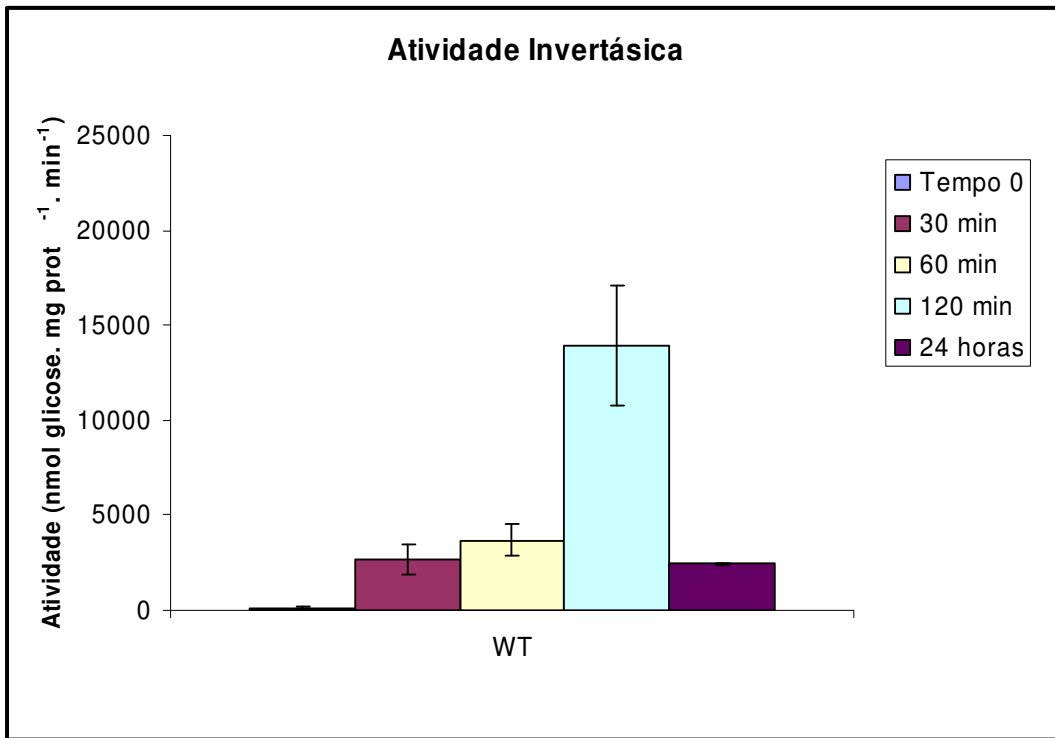
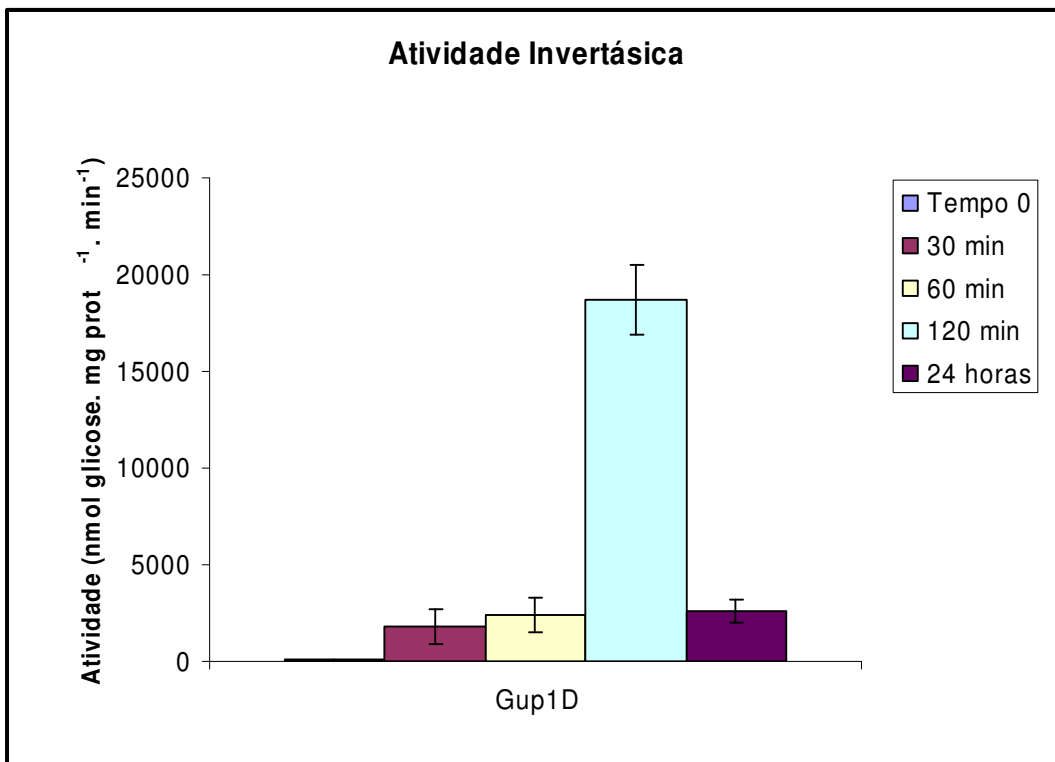


Figura 9- Curva de crescimento celular do mutante *gup1Δ* em meio YP glicose 2% sem (■) e com antimicina (■). A antimicina é um composto que inibe o metabolismo respiratório em células de *S. cerevisiae*.



(A)



(B)

Figura 10- Atividade Invertásica. Cepas selvagem WT (A) e mutante *gup1Δ* (B).

4.3 – *GUPI* e a defesa contra o estresse oxidativo

Com o objetivo de verificarmos uma possível relação de *GUPI* e a defesa contra o estresse oxidativo, testamos o efeito desse estresse induzido por agente oxidante no mutante *gup1Δ*, incubando-o com o composto peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 11). De acordo com os nossos resultados, *gup1Δ* é sensível ao H_2O_2 na concentração final de 5 mM. O H_2O_2 na concentração de 1 mM não tem efeito tóxico para o mutante *gup1Δ* enquanto que na concentração de 10 mM, o efeito tóxico é observado inclusive para a cepa selvagem (Figura 11). Isso se torna mais claro quando incubamos as células em meio YP glicose 2 % e H_2O_2 (5 mM) e acompanhamos a viabilidade e crescimento celulares (Figura 12). De acordo com o ensaio de viabilidade celular a sensibilidade é observada apenas por um período de tempo, já que no tempo 24 horas, *gup1Δ* apresenta viabilidade celular comparável a cepa selvagem. A análise do crescimento e viabilidade celular em meio YP glicose 2% (Figura 13) é o controle positivo para certificarmos que a perda da viabilidade se deve a presença de H_2O_2 e não a um outro fator qualquer.

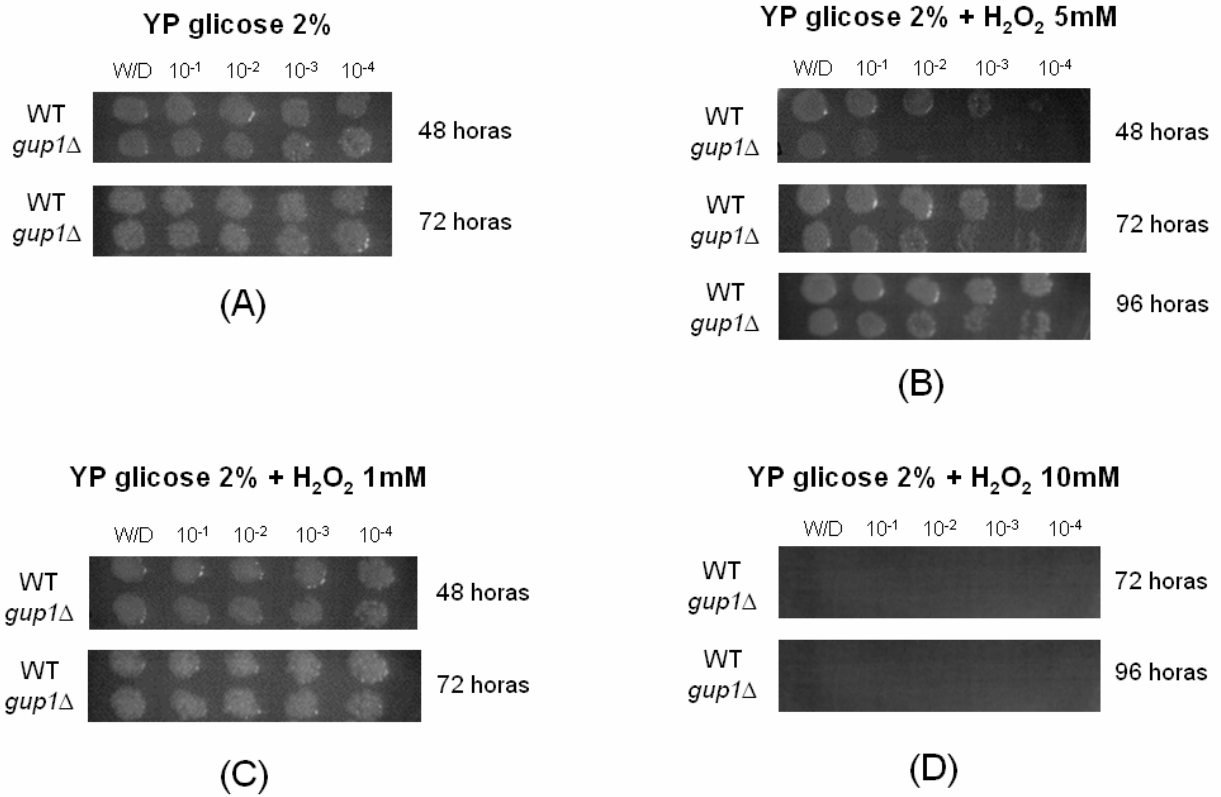
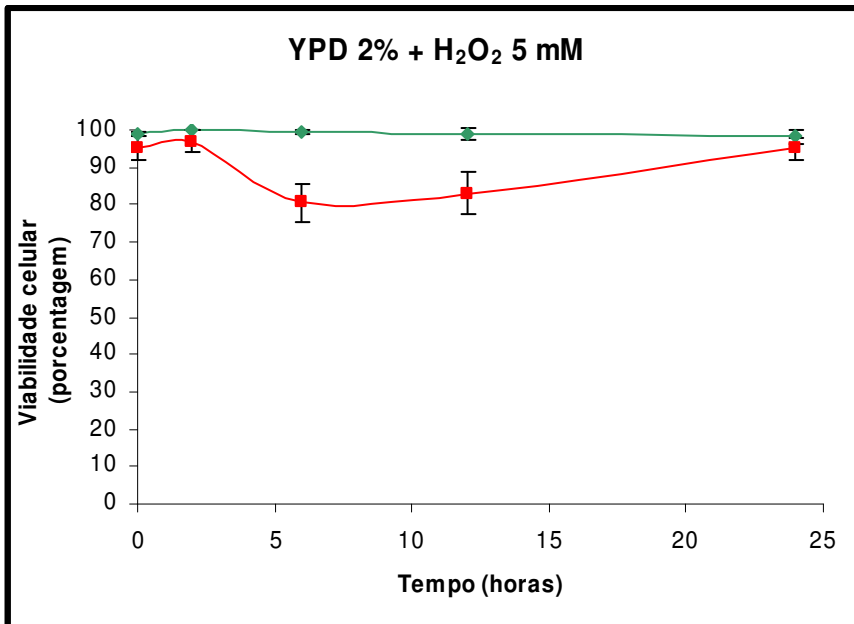
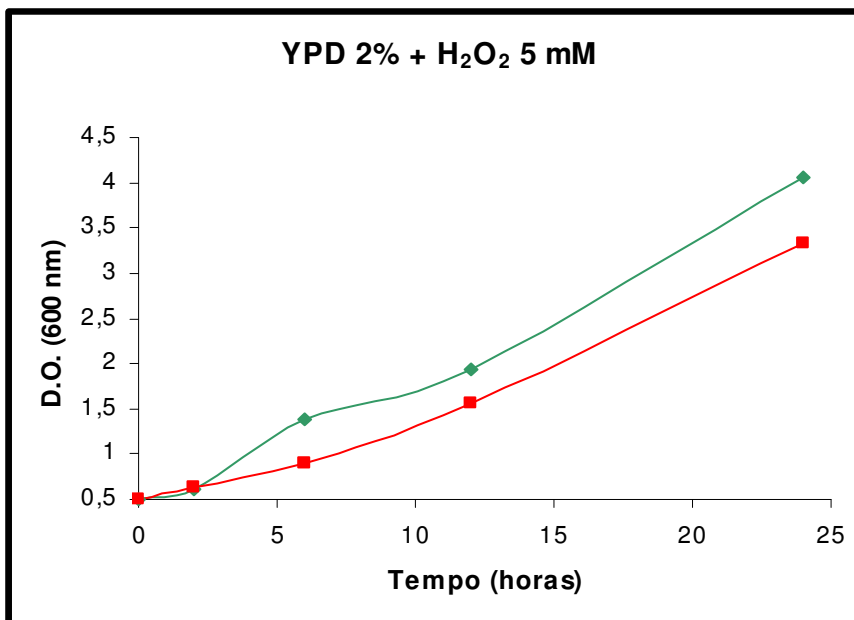


Figura 11- Crescimento em meio YP glicose 2% (A), mais H₂O₂ 5mM (B), H₂O₂ 1mM (C) e H₂O₂ 10mM (D). Cepas selvagem (WT) e mutante *gup1Δ* (*gup1Δ*). W/D (sem diluir) = densidade ótica (D.O.) igual a 1,0.

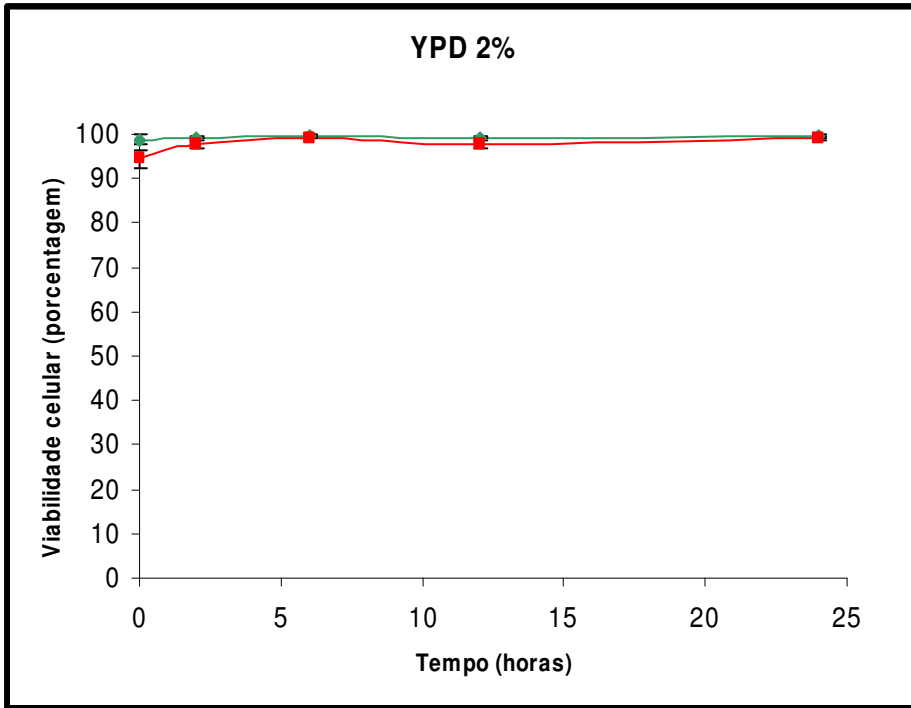


(a)

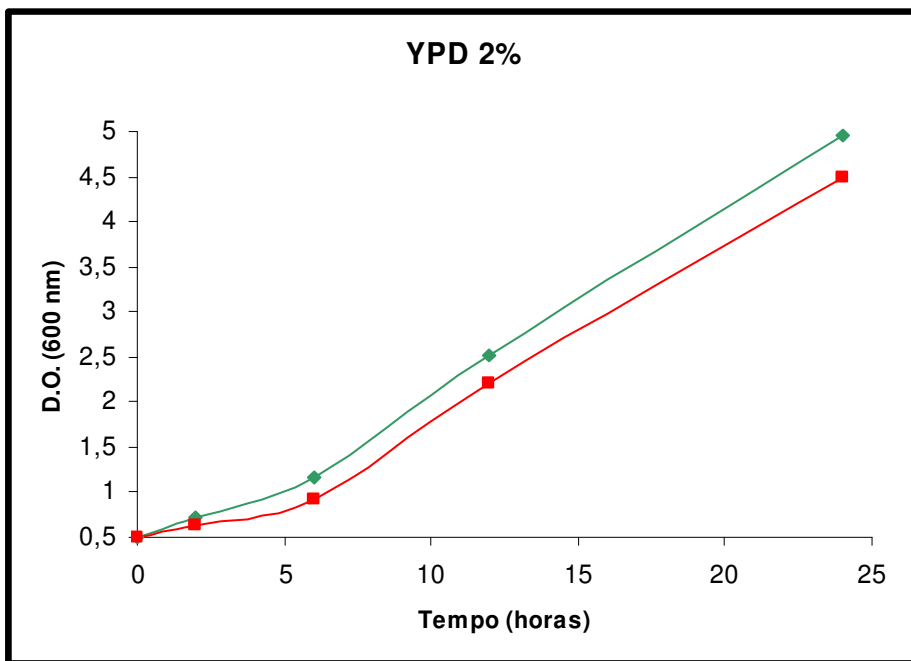


(b)

Figura 12- Viabilidade (a) e crescimento celular (b) em meio YP glicose 2% + H₂O₂ (5 mM). Cepas selvagem (WT, ■) e mutante *gup1Δ* (■).



(a)

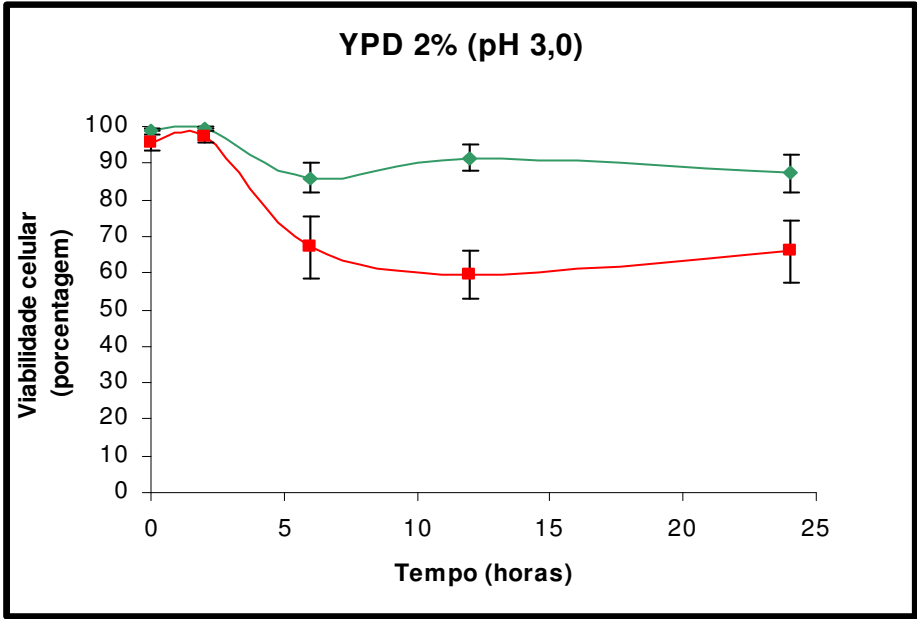


(b)

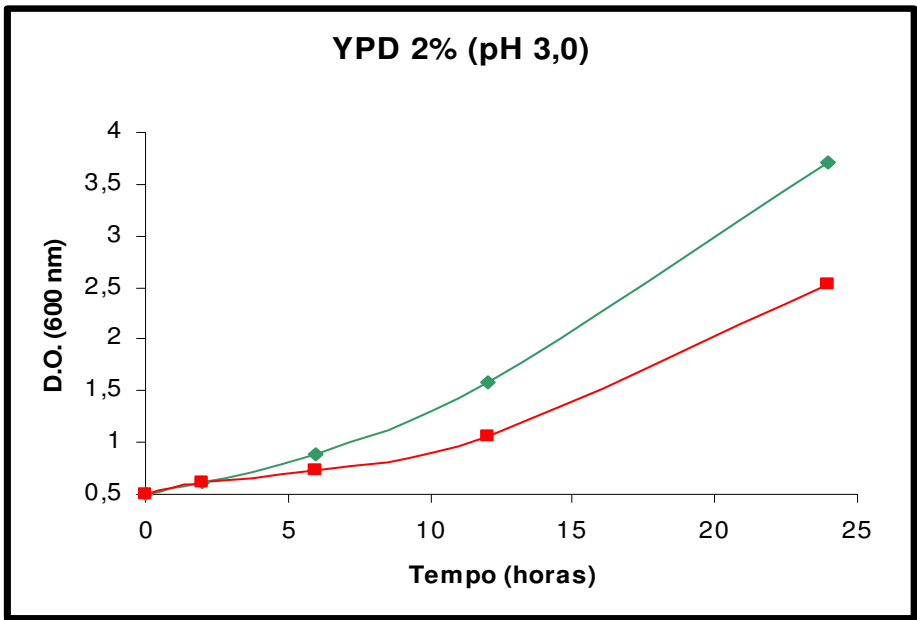
Figura 13- Viabilidade (a) e crescimento celular (b) em meio YP glicose 2%. Cepas selvagem (WT, ■) e mutante *gup1Δ* (■).

4.4 – Envolvimento de *GUPI* na resistência ao estresse ácido

O mutante *gup1Δ* apresenta sensibilidade ao estresse ácido (pH 3,0) similarmente ao que ocorre com o mutante *pkc1Δ* (Figura 14). Em meio de cultura YP glicose 2% (pH 1,0), a viabilidade de *gup1Δ* é zero no tempo 3,5 horas, enquanto a cepa selvagem só atinge esse patamar no tempo 24 horas (Figura 15). O controle positivo é o crescimento em meio YP glicose 2% (Figura 13). Buscando elucidar a causa da sensibilidade ao estresse ácido, medimos os níveis de acidificação, induzida por glicose, desse mutante. A acidificação do meio extracelular é uma medida indireta da atividade da enzima H⁺-ATPase de membrana citoplasmática (Pma1 p). Essa enzima é codificada pelo gene *PMA1* e é regulada por glicose a nível transcricional e pós-traducional (Serrano, 1983; De la fuente *et al.*, 1997). Pma1 p regula o pH intracelular e cria o gradiente eletroquímico para a captação de nutrientes em *S. cerevisiae*. Os níveis de acidificação extracelular medidos para o mutante *gup1Δ* são comparáveis aos níveis obtidos para a cepa selvagem, não havendo diferença estatisticamente significativa (Tabela 2). Portanto, a sensibilidade de *gup1Δ* ao estresse ácido, provavelmente, não está relacionada a incapacidade de bombear prótons para o meio extracelular.



(a)



(b)

Figura 14- Viabilidade (a) e crescimento celular (b) em meio YP glicose 2% (pH 3,0).
Cepas selvagem (WT, ■) e mutante *gup1Δ* (■).

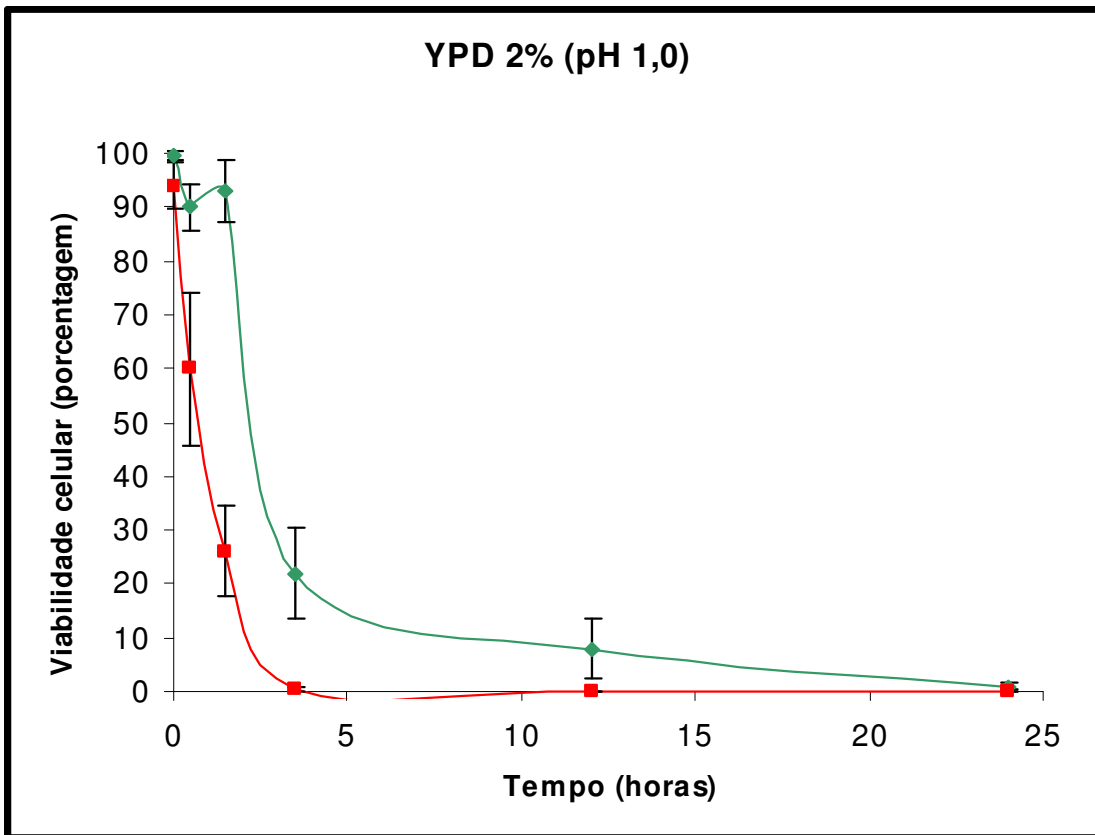


Figura 15- Viabilidade celular em meio YP glicose 2% (pH 1,0). Cepas selvagem (WT, ■) e mutante *gup1Δ* (■).

Tabela 2: Acidificação induzida por glicose ($\text{mmol H}^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g de células}^{-1}$). Cepas selvagem (WT) e mutante *gup1* Δ .

Cepa	Acidificação ($\text{mmol H}^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g de células}^{-1}$)
WT	0,790 +/- 0,067
<i>gup1</i> Δ	0,868 +/- 0,028

4.5 – *GUP1* e proteínas com âncora de GPI em *Saccharomyces cerevisiae*

Sabendo que Gup1 p está envolvida no remodelamento da âncora de GPI em *S. cerevisiae* (Bosson *et al.*, 2006), procuramos identificar quais são as proteínas que apresentam âncora de GPI em *S. cerevisiae*, no anseio de encontrarmos proteína (s) que pode (m) estar relacionada (s) aos fenótipos observados no mutante *gup1Δ*.

A âncora de GPI é adicionada às proteínas que possuem um sinal para adição. Até o momento, alinhando-se as proteínas que sabidamente possuem âncora de GPI, não foi possível determinar a sequência consenso que sinaliza para a adição de GPI. A adição se dá no retículo endoplasmático (RE). Portanto, apenas proteínas que tenham um sinal de endereçamento para o RE na região N-terminal podem ter GPI adicionada à proteína. O sinal de adição no C-terminal é clivado durante a ligação de GPI, que ocorre no sítio protéico denominado Omega (ω) (Takeda e Kinoshita, 1995).

Caro *et al.* (1997), descreveram a existência de 58 proteínas com âncora de GPI. Como esse trabalho utilizou o algoritmo Von Heijne, que falhou em detectar 7 proteínas que sabidamente têm âncora de GPI, insistimos na busca por mais genes. A estratégia foi buscar genes dentre aqueles que são regulados pela via PKC-MAPKinase, que está envolvida na formação e estabilidade da parede celular, tendo em vista que as proteínas ancoradas por GPI se localizam principalmente na parede celular e membrana plasmática. A via PKC-MAPKinase controla a expressão gênica por meio de dois fatores transcricionais, Swi4 p e Rlm1 p. Para encontrar os genes que são regulados por esses dois fatores transcricionais fizemos uso do banco de dados YEASTRACT (YEAst Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking,) (Teixeira *et al.*, 2006), disponível em rede (www.yeasttract.com). De acordo com o YEASTRACT, Rlm1 p controla e expressão de 96 genes, enquanto Swi4 p a de 254 genes. A lista dos genes controlados por Rlm1 p está ordenada de acordo com o componente biológico na Tabela 3.

A partir da lista dos genes controlados pela via PKC-MAPKinase, analisamos individualmente aqueles no programa GPI-SOM, no intuito de detectarmos o sinal de adição da âncora de GPI localizado na porção carboxi-terminal das sequências protéicas (Fankhauser e Mauser, 2005). Como resultado, obtivemos 17 genes, controlados por Rlm1 p, que codificam para proteínas potencialmente com âncora e 19 genes, controlados

por Swi4 p, potencialmente ancorados. Desse total, 5 genes são controlados por ambos fatores transcricionais, gerando dessa forma um total de 31 genes (Tabela 4). Dentre os 31 genes, 18 estavam na lista de genes descritos por Caro *et al.* (1997). O restante são novos candidatos, não identificados pelo algoritmo Von Heijne. Na lista dos 31 genes, 14 genes têm função desconhecida baseando-se no SGD (Saccharomyces Genome Database); alguns possuem função estrutural relacionada à formação e estabilidade da parede celular, e particularmente dois, *SEDI* e *UTH1*, apresentam funções interessantes como a manutenção do genoma mitocondrial e envolvimento com estresse oxidativo, respectivamente (Camougrand *et al.*, 2000; Phadnis *et al.*, 2004). A lista dos genes encontrados por Caro *et al.* (1997) e os novos candidatos identificados por GPI-SOM estão listados na Tabela 5 que apresenta um total de 67 genes, uma vez que quatro ORF's descritas por Caro *et al.* (1997) foram posteriormente identificadas como sendo pseudogenes.

Tabela 3: Componente celular dos genes regulados por Rlm1 p segundo YEASTRACT

GO-Gene Ontology	Porcentagem	ORF/Genes
intracelular	52.1 %	APQ12, ASE1, ASK10, ATG8, BUD22, CCW14, CHS1, CHS3, CIS3, CRH1, CRM1, CTT1, FBP26, FKS1, GIC2, HSP12, HUF1, HUF2, KTR2, LYS9, MLP1, MNN1, MUM2, PCM1, PGK1, POG1, PRB1, PRY2, PTP2, RNH203, RPA34, RTS3, SEC59, SED1, SLT2, SMF1, SRL3, SUR1, SVS1, VPS74, WSC2, WSC4, YBR071w, YGL157w, YJL171c, YLR414c, YNL058c, YNL208w, YSR3
intracelular (organela)	38.3 %	APQ12, ASE1, ATG8, BUD22, CCW14, CHS1, CHS3, CIS3, CRM1, FKS1, GIC2, HSP12, HUF1, KTR2, MLP1, MNN1, PCM1, POG1, PRB1, PRY2, PTP2, RNH203, RPA34, RTS3, SEC59, SED1, SLT2, SMF1, SVS1, VPS74, WSC4, YGL157w, YJL171c, YNL058c, YNL208w, YSR3
Ligado a membrana de organela	36.2 %	APQ12, ASE1, ATG8, BUD22, CCW14, CHS1, CHS3, CIS3, CRM1, HSP12, HUF1, KTR2, MLP1, MNN1, PCM1, POG1, PRB1, PRY2, PTP2, RNH203, RPA34, RTS3, SEC59, SED1, SLT2, SMF1, SVS1, VPS74, WSC4, YGL157w, YJL171c, YNL058c, YNL208w, YSR3
Estrutura externa	23.4 %	BGL2, CCW12, CCW14, CIS3, CRH1, CWP1, EXG1, EXG2, FIT2, HSP150, PIR1, PIR3, PST1, SED1, SPS100, SPS2, SVS1, YJL171c, YLR040c, YLR194c, YGP1, YPS1
membrana	19.1 %	APQ12, CHS1, CHS3, CIS3, DFG5, FRQ1, HSP12, HXT15, HXT16, MCH5, MID2, MLP1, NFT1, PRM5, SEC59, SMF1, WSC4, YPS3
Sítio de crescimento polarizado	7.4 %	AFR1, CHS3, CIS3, GIC2, HUF1, SLT2, WSC2
Broto	7.4 %	CHS3, CIS3, GIC2, HUF1, SLT2, YLR414c, YMR295c
Não-ligado a membrana de organela	5.3 %	ASE1, FKS1, GIC2, RPA34, SED1
Fração celular	4.3 %	WSC2, WSC3, WSC4, YOL159c
Complexo ribonucleoprotéico	2.1 %	MLP1, SED1
Localização descincida	1.1 %	RTS3
Complexo alfa-trealose-fosfato sintase	1.1 %	TSL1
Complexo RNA polimerase	1.1 %	RPA34
Esporo imaturo	1.1 %	CHS3
polymerase II holoenzima.	1.1 %	ASK10

Tabela 4: Genes que codificam proteínas potencialmente ancoradas por GPI, regulados por Rlm1 p e Swi4 p, em *Saccharomyces cerevisiae*.

Gene/ORF	Função Molecular
AGA1	Subunidade que ancora alfa-aglutinina nas células a parede celular
CRH1	Provável glucosidase (PC)
CWP1	Manoproteína (PC)
CWP2	Manoproteína envolvida na resistência ao estresse ácido (PC)
ECM33	Função desconhecida
EXG2	Exo 1,3-betaglucanase (PC)
GAS1	Beta-1,3-glucanosiltransferase
PLB3	Fosfolipase B (MP)
SED1	Possível papel na manutenção do genoma mitocondrial
YCR064c	Função desconhecida
YDR134c	Função desconhecida
YDR526c	Função desconhecida
YDR542w	Função desconhecida
YNL300w	Função desconhecida
YOR248w	Função desconhecida
YPL056c	Função desconhecida
UTH1	Papel na biogênese mitocondrial e na resposta ao estresse oxidativo
UTR2	Provável glucosidase
YPS3	Aspartato protease (MP)
CCW12	Função desconhecida (PC)
CCW14	Função estrutural (PC)
DFG5	Provável manosidase
FIT2	Manoproteína (PC)
PST1	Função desconhecida
SPS100	Função desconhecida
YJL171C	Função desconhecida
YLR040C	Função desconhecida
YLR194C	Função estrutural (PC)
YGP1	Glicoproteína
YKE4	Função desconhecida
YPS1	Aspartato protease (MP)

Tabela 5- Lista dos 67 genes potencialmente ancorados por GPI dos quais 54 foram descritos por Caro *et al.* (1997) e os 13 restantes são candidatos identificados pelo programa GPI-SOM.

Gene/ORF	Função Molecular
AGA1	Subunidade que ancora alfa-aglutinina nas células a parede celular
CRH1	Provável glucosidase (PC)
CWP1	Manoproteína (PC)
CWP2	Manoproteína envolvida na resistência ao estresse ácido (PC)
ECM33	Função desconhecida
EXG2	Exo 1,3-betaglucanase (PC)
GAS1	Beta-1,3-glucanosiltransferase
PLB3	Fosfolipase B (MP)
SED1	Possível papel na manutenção do genoma mitocondrial
YCR064c	Função desconhecida
YDR134c	Função desconhecida
YDR526c	Função desconhecida
YDR542w	Função desconhecida
YNL300w	Função desconhecida
YOR248w	Função desconhecida
YPL056c	Função desconhecida
UTH1	Papel na biogênese mitocondrial e envolvida na resposta ao estresse oxidativo
UTR2	Provável glucosidase
YPS3	Aspartato protease (MP)
CCW12	Função desconhecida (PC)
CCW14	Função estrutural (PC)
DFG5	Provável manosidase
FIT2	Manoproteína (PC)
PST1	Função desconhecida
SPS100	Função desconhecida
YJL171C	Função desconhecida
YLR040C	Função desconhecida
YLR194C	Função estrutural (PC)
YGP1	Glicoproteína
YKE4	Função desconhecida
YPS1	Aspartato protease (MP)
GAS2	Provável 1,3-beta-glucanosiltransferase
GAS3	Provável 1,3-beta-glucanosiltransferase
GAS4	Provável 1,3-beta-glucanosiltransferase
GAS5	Provável 1,3-beta-glucanosiltransferase
MKC7	Aspartato protease (PC)
YPS7	Provável Aspartato protease (citoplasma e RE)
SPS2	Organização da camada de betaglucano (PC)

SPS22	Função desconhecida
PLB2	Fosfolipase B
PLB1	Fosfolipase B
ROT1	Função desconhecida
KRE1	Glicoproteína (PC)
YNL190w	Função desconhecida
YPL261c	Função desconhecida
TIP1	Manoproteína, possível atividade de lipase (PC)
TIR1	Manoproteína (PC)
YIB1	Manoproteína (PC)
TIR4	Manoproteína (PC)
TIR2	Provável manoproteína (PC)
FLO9	Envolvida na floculação (PC)
FLO1	Envolvida na floculação (PC)
FLO5	Envolvida na floculação (PC)
FLO10	Envolvida na floculação (PC)
FLO11	Formação de pseudohifas
SPI1	Expressão induzida na diauxia, similaridade com <i>SEDI</i>
SAG1	Alfa-aglutinina
FIG2	Adesina (PC)
FIT1	Manoproteína envolvida na retenção do siderophore-iron (PC)
FIT3	Manoproteína envolvida na retenção do siderophore-iron (PC)
PRY3	Função desconhecida
DCW1	Provável manosidase
EGT2	Endoclunase, necessária para separação das células após citocinese.
YOL155c	Glucosidase
YOR214c	Função desconhecida
SPO19	Função desconhecida
YHR126c	Função desconhecida

4.6- Regulação da atividade de Gup1 p

Os mutantes *pkc1Δ* e *gup1Δ* compartilham uma série de fenótipos como a sensibilidade a cafeína, a agentes que perturbam a parede celular e aos estresses ácido e oxidativo; além de apresentarem baixa performance de crescimento em fontes de carbono alternativas como rafinose, glicerol e etanol. Além disso, Pkc1 p está envolvida em processos celulares comuns a participação de Gup1 p como: a biogênese da membrana plasmática celular, a polarização do citoesqueleto de actina e as vias de secreção/endocitose (Ferreira *et al.*, 2006). Por último, considerando que *GUP1* está menos expresso no mutante *pkc1Δ* em relação a cepa selvagem, quando as células são crescidas na fonte de carbono alternativa rafinose (resultados não publicados), investigamos se Pkc1 p controlaria a expressão do gene *GUP1* em células de *S. cerevisiae*.

Para comprovarmos a hipótese de regulação da expressão do gene *GUP1* por Pkc1p, realizamos a PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR) do gene *GUP1* utilizando-se o cDNA do mutante *pkc1Δ* crescido em glicose ou rafinose. Além disso, efetuou-se a qRT-PCR do gene *RCK1* nas mesmas condições de crescimento descritas acima. De acordo com o YEASTRACT, Rlm1 p controla a expressão de *RCK1*, uma Ser/Thr quinase que é induzida no estresse oxidativo, que não tem papel biológico completamente conhecido em *S. cerevisiae*. De acordo com os nossos resultados, Pkc1 p não controla a expressão de *GUP1* e *RCK1*, uma vez que não há diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão gênica medidos (Figura 16).

Por outro lado, não podemos descartar a hipótese da regulação da atividade de Gup1 p no nível pós-traducional. Segundo o endereço eletrônico de PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>), Gup1 p apresenta sítios potenciais para N-glicosilação, fosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina, N- miristoilação e amidação. Como Pkc1 p é uma Ser/Thr quinase optamos por refinarmos a busca por potenciais sítios para fosforilação desses resíduos. Gup1 p tem 560 resíduos de aminoácidos sendo que nem todos estariam acessíveis para uma eventual modificação por fosforilação. Existem vários domínios transmembranares e por isso é preciso conhecer a topologia dessa proteína para então inferirmos sobre potenciais sítios de fosforilação. Todos os programas de predição da topologia protéica disponíveis em <http://www.expasy.ch/tools/>, mostraram que Gup1p

apresenta 11 domínios transmembranares. A topologia de Gup1p está representada na figura 17 (http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui_submit.html). A região N-terminal estaria no lado extracelular e o C-terminal teria localização citoplasmática, quando presente na membrana plasmática. Por outro lado, teria o C-terminal no lúmen do retículo endoplasmático (RE) quando presente no RE. Considerando a tabela 7 (<http://www.predictprotein.org/>), que mostra os resíduos de aminoácidos que estariam no lado citoplasmático ou lúmen do RE, foi feita a busca por potenciais sítios de fosforilação. Como resultado identificamos os resíduos de serina: 64, 79, 91, 93 e o resíduo de treonina 389, como sítios potenciais para fosforilação por uma Ser/Thr quinase.

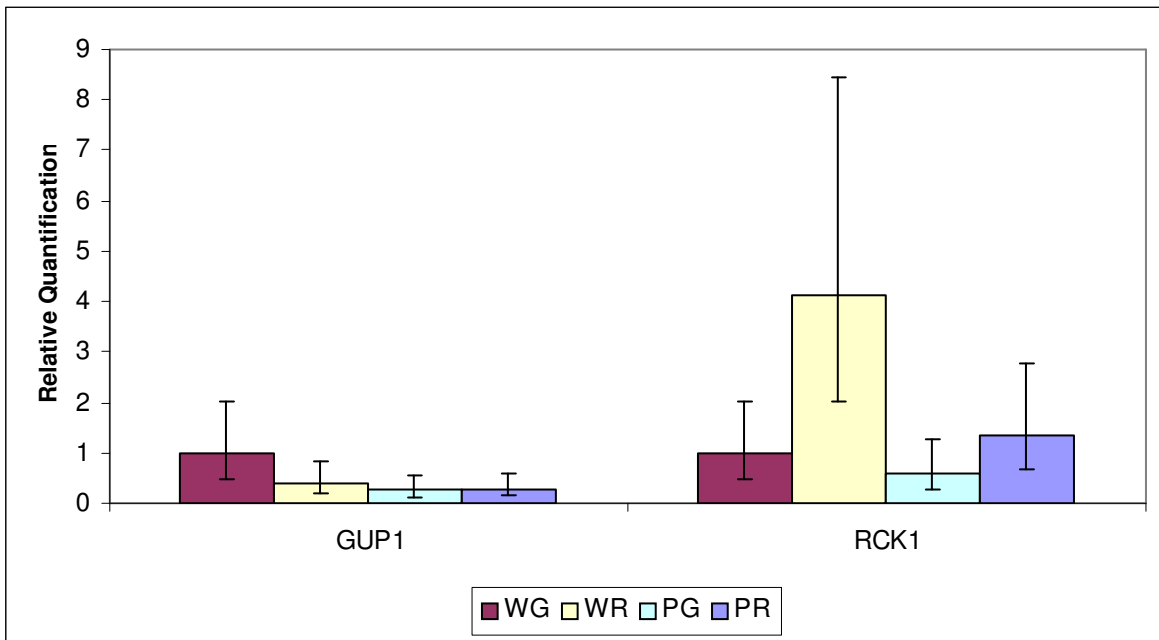


Figura 16- PCR em tempo real quantitativa dos genes *GUP1* e *RCK1*. Cepas e condições de crescimento: WG- cepa selvagem crescida em glicose, WR- cepa selvagem crescida em rafinose, PG- mutante *pkc1Δ* crescido em glicose, PR- mutante *pkc1Δ* crescido em rafinose.

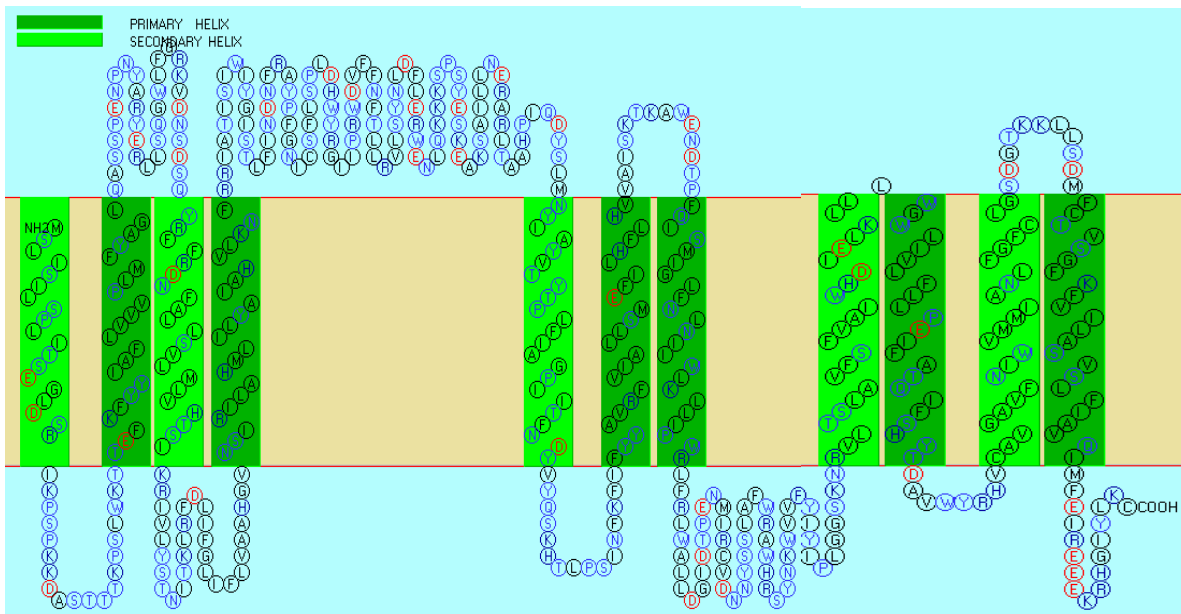


Figura 17 - Topologia de Gup1p de acordo com http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui_submit.html. A proteína Gup1 possuiria 11 domínios transmembranares, sendo que a porção carboxi-terminal estaria localizada no lado intracelular.

Tabela 6: Localização subcelular dos resíduos de aminoácidos de Gup1 p (<http://www.predictprotein.org/>).

Resíduos aminoácidos	Localização
1-41	Extracelular
42-59	Transmembrana
60-102	Citoplasmática
103-120	Transmembrana
121-135	Extracelular
136-156	Transmembrana
157-168	Citoplasmática
169-186	Transmembrana
187-278	Extracelular
279-296	Transmembrana
297-319	Citoplasmática
320-337	Transmembrana
338-358	Extracelular
359-376	Transmembrana
377-429	Citoplasmática
430-447	Transmembrana
448-451	Extracelular
452-469	Transmembrana
470-488	Citoplasmática
489-506	Transmembrana
507-524	Extracelular
525-542	Transmembrana
543-560	Citoplasmática

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

5- Discussão e conclusão

O estudo de vias de transdução de sinal em leveduras se por um lado é facilitado pela relativa facilidade no manuseio desse microrganismo, por outro se torna complexo quando o efeito da deleção de um gene produz severas deficiências em vários processos celulares. Por ter o genoma compacto e a complexidade de um eucarioto, ainda que primitivo, o efeito pleiotrópico observado em algumas deleções, dificulta demasiadamente o estudo do envolvimento do gene deletado em determinado processo fisiológico. A comunicação entre diferentes vias de sinalização pode suprir e deficiência do gene deletado, em determinadas condições de experimentação, podendo levar o pesquisador a conclusões errôneas sobre o envolvimento de determinado gene em um dado processo fisiológico.

Nosso estudo com o microrganismo *S. cerevisiae* buscou elucidar o envolvimento de Pkc1p no metabolismo de glicerol e posteriormente, a partir de observações realizadas com o mutante *gup1Δ*, estudamos a possível participação de Pkc1p no controle de funções celulares relacionadas à proteína Gup1.

Estudando a via de catabolismo do glicerol, os ensaios de captação do glicerol, de atividade da enzima glicerol quinase e expressão de *GUT1*, nossos resultados mostraram que *pkc1Δ* tem uma deficiência no transporte de glicerol a partir do meio externo. Entretanto, essa deficiência não é suficiente para explicar a incapacidade de crescimento de *pkc1Δ* em glicerol (Gomes *et al.*, 2005). A atividade da enzima glicerol quinase medida nos extratos celulares livres de células, mostrou que essa enzima apresenta menor atividade em *pkc1Δ* quando comparada com as demais cepas em teste. A causa da baixa atividade é o fato de *GUT1* apresentar níveis de expressão menores no mutante *pkc1Δ* em comparação as cepas selvagem e *bck1Δ*. O fato de *bck1Δ* apresentar níveis de expressão e atividade de Gut1 p comparáveis aos da cepa selvagem, sinalizam para existência de uma bifurcação, a partir de Pkc1 p, da via PKC-MAPKinase relacionada ao controle do metabolismo de glicerol (Gomes *et al.*, 2005).

Pkc1 p parece ser responsável pela fosforilação de Opi1 p, o fator transcricional que regula negativamente a expressão do gene *GUT1* (Grauslund *et al.*, 1999; Sreenivas *et al.*, 2001). Pkc1 p pode, dessa forma, estar afetando a localização subcelular de Opi1 p, ao

promover sua fosforilação. Entretanto, o relato de que o mutante *opi1Δ* não é capaz de crescer em meio contendo glicerol como única fonte de carbono (Grauslund *et al.*,1999), complica demasiadamente um modelo hipotético em que Pkc1 p fosforilaria Opi1 p promovendo sua saída do núcleo e o gene *GUT1* seria expresso. De acordo com as observações feitas (Grauslund *et al.*,1999), uma vez cessada a regulação negativa sobre *GUT1*, é preciso que os fatores transcricionais que regulam positivamente a expressão de *GUT1*, Adr1 p e Ino2/4 p, atuem para que efetivamente ocorra a transcrição desse gene.

Como o gene *GUP1*, inicialmente implicado no transporte do glicerol (Holst *et al.*, 2000), se mostrou deficiente no crescimento em fontes de carbono alternativas como rafinose, glicerol e etanol, decidimos estudá-lo de forma a esclarecer a razão pela qual esse mutante apresenta tal fenótipo.

O crescimento diminuído de *gup1Δ* em glicerol já havia sido descrito por Holst *et al.* (2000). Esse fenótipo é similar ao observado para o mutante *pkc1Δ*, no que tange a baixa performance de crescimento em fontes de carbono alternativas. O crescimento em meio de cultura sólido contendo glicerol, rafinose ou etanol como única fonte de carbono demonstra a fraca performance de crescimento do mutante *gup1Δ* em comparação à cepa selvagem. Quando o mutante *gup1Δ* cresce em meio YP glicose 2% com antimicina, observa-se a ocorrência de segunda fase de crescimento ainda que essa seja discreta. A antimicina é um composto que bloqueia a cadeia transportadora de elétrons impedindo dessa forma a segunda fase de crescimento (metabolismo respiratório) em células de levedura.

A dosagem de atividade da enzima invertase demonstrou que o fraco crescimento em meio contendo rafinose não pode ser relacionado a uma baixa atividade dessa enzima já que a enzima invertase (Suc2p) é fundamental para o catabolismo de rafinose. Portanto, similarmente ao que Holst *et al.* (2000) haviam demonstrado para o glicerol, ou seja, o crescimento lento em glicerol do mutante *gup1Δ* não é causado por uma baixa atividade de Gut1 p, o crescimento afetado em rafinose não está relacionado a baixa atividade da enzima invertase. Esses achados estão em desacordo com os encontrados para o mutante *pkc1Δ*, onde o fraco crescimento em glicerol e rafinose estão associados a baixa atividade das enzimas glicerol quinase e invertase (Gomes *et al.*, 2005), respectivamente.

Bosson *et al.* (2006), demonstraram que Gup1 p está implicado no remodelamento da âncora de GPI, especificamente da porção lipídica da mesma. O modelo proposto é que

uma lipase ainda não identificada remove o ácido graxo em sn2 e que Gup1 p adiciona ácido graxo C26:0 gerando pG1 (Bosson *et al.*, 2006). Essa âncora então vai ser novamente modificada com a troca de DAG por Cer ou ácido fosfatídico por Cer-1-fosfato. Portanto, a atividade de Gup1, facilitaria a introdução de Cer PHS-C26:0 e PHS-C26:0-OH as âncoras. Mutantes que apresentam defeitos na biosíntese da âncora de GPI têm parede celular frágil e são sensíveis ao Calcofluor White, fenótipos esses pertinentes a *gup1Δ*.

Uma vez que Gup1 p está envolvida no remodelamento da âncora de GPI, procuramos identificar o universo de proteínas que são ancoradas por GPI em *S. cerevisiae*. Existe além de GPI-SOM, mais dois programas para predição do sinal de adição da âncora de GPI na região C-terminal, Big-PI (Eisenhaber *et al.*, 1999, http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) e o DGPI (Kronegg e Buloz, 1999, <http://129.194.185.165/dgpi/>). Ambos programas estão baseados na composição de aminoácidos ao redor do sítio omega (Udenfriend e Kodukula, 1995; Eisenhaber *et al.*, 1998). Esses programas são úteis na predição do sítio omega de proteínas que sabidamente possuem âncora de GPI. Para uma busca por proteínas ainda não identificadas como tendo âncora, as chances de erros são grandes, ocorrendo muitos falso-positivos e falso-negativos. A maior fonte de falso-positivos são proteínas integrais de membrana que possuem um domínio transmembrana na região C-terminal. De fato, já foi demonstrado que uma mutação pontual pode modificar uma seqüência transmembrana para um sinal de adição da âncora de GPI (Dalley e Bulleid., 2003). Não se podem classificar proteínas que apresentem múltiplos domínios transmembranares como falsas para âncora de GPI, pois nada impede que uma proteína seja ancorada por GPI em seu C-terminal, além de estar inserida na bicamada lipídica por domínios transmembranares. Encorajados por essas últimas observações foi criado um novo programa, GPI-SOM (Kohonen self-organizing map), buscando atender aqueles que necessitem fazer uma varredura em busca de proteínas que possuam sinal para adição da âncora de GPI. Esse programa classifica as proteínas como tendo âncora de GPI somente se as mesmas possuírem os sinais no N- e C-terminal. A predição do sinal na região N-terminal pode ser feita através do programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997). A presença de sinal exclusivamente no C-terminal pode levar a falsos positivos durante a busca, visto que o sinal no N-terminal, responsável pelo endereçamento da proteína recém-sintetizada para o RE é fundamental, considerando que a adição de GPI se dá

exclusivamente no RE. Comparando-se os programas BigPI, DGPI e GPI-SOM, o último demonstrou ser o mais sensível. BigPI é bastante específico, mas apresenta altas taxas de resultados falso-negativos.

Optamos por pesquisarmos proteínas potencialmente ancorados por GPI que estariam sob o controle da via PKC-MAPKinase. Para definição de quais genes são regulados por essa via de sinalização, utilizamos o banco de dados YEASTRACT para conhecermos os genes regulados por Swi4 p e Rlm1 p, dois fatores transcricionais que sabidamente são controlados pela via PKC-MAPKinase (Heinisch *et al.*, 1999).

O banco de dados YEASTRACT é útil no estudo de associações regulatórias entre fatores transcricionais e genes alvo, ao unir em um mesmo banco de dados informações a respeito de sítios de ligação de fatores transcricionais e evidências experimentais da relação entre determinado gene e um fator transcricional (Teixeira *et al.*, 2006). Outros bancos de dados como TRANSFAC (Wingender *et al.*, 2001) e SCPD (Zhu *et al.*, 1999) não possuem essa versatilidade. A existência de um sítio de ligação para um dado fator transcricional não é evidência definitiva de que o gene presente próximo àquela região do DNA seja de fato controlado a nível transcricional pelo fator transcricional em questão. Evidências experimentais *in vivo*, encontradas nos trabalhos publicados, devem estar documentadas para que se considere uma dada associação fator transcricional-gene válida. Diante dessas considerações, fizemos a opção de considerarmos somente os genes documentados que são regulados por Rlm1 p e Swi4 p. De outro modo, a análise de genes potencialmente regulados teria caráter especulativo.

Dentre os genes regulados pela via PKC-MAPKinase e ancorados por GPI, dois (*UTH1* e *SEDI*) apresentam função biológica interessante no que tange ao metabolismo respiratório e defesa contra o estresse oxidativo. O gene *UTH1* apresenta altos níveis de expressão gênica durante a fase de diauxia observando-se um decréscimo até a fase estacionária (Bandara *et al.*, 1998). Esse gene não é essencial uma vez que a sua deleção não torna a célula inviável. O mutante *uth1Δ* apresenta crescimento celular em meio YP glicose 2% comparável a cepa selvagem. Entretanto, em meio YP lactato (fonte de carbono alternativa), observa-se uma pequena queda da taxa de crescimento comparando-a com a cepa selvagem (Bandara *et al.*, 1998). O mutante *uth1Δ* se mostrou sensível a diamida e radicais livres superóxido (Bandara *et al.*, 1998). Comparações da seqüência de *UTH1*

através de banco de dados revelaram que Uth1 p tem um sítio potencial para ligação de ferro e essa ligação pode estar diretamente ligada à função de defesa contra o estresse oxidativo (Bandara *et al.*, 1998). Além disso, Uth1 p está envolvida na biogênese de mitocôndrias em levedura, sendo que sua deleção provoca a queda do conteúdo protéico mitocondrial, com redução de citocromo aa3 (Camougrand *et al.*, 2000). Entretanto, a quantidade de DNA mitocondrial não é alterada (Camougrand *et al.*, 2000).

Por outro lado, Sed1 p está envolvida na manutenção do genoma mitocondrial. A deleção de *SEDI* provoca um aumento de 3,5 vezes na taxa de mutações pontuais do DNA mitocondrial bem como uma perda de 4,3 vezes da taxa de respiração celular. *SEDI* tem alta expressão na fase estacionária. Além disso, o mutante *sed1Δ* apresenta redução da quantidade de Mip1 p (polimerase mitocondrial) que é responsável pela replicação do genoma mitocondrial em *S. cerevisiae* (Phadnis *et al.*, 2004). Sed1 p interage com a proteína Hem13 p que está localizada na membrana mitocondrial interna e com Mip1p. O mutante *sed1Δ* apresenta fraco crescimento em meio contendo glicerol como única fonte de carbono. O tempo de duplicação desse mutante é de 2,6 horas enquanto a cepa selvagem tem um tempo de 3,0 horas. Embora essa diferença não seja muito grande, ela sugere que Sed1 p tem função relacionada ao crescimento em condições de estresse oxidativo (Phadnis *et al.*, 2004). A atividade mitocondrial avaliada *in situ* com o corante Mitotracker revelou que *sed1Δ* apresenta disfunção da atividade mitocondrial quando as células são crescidas em glicerol. Por outro lado, quando as células são crescidas em glicose não há disparidade entre *sed1Δ* e a cepa selvagem (Phadnis *et al.*, 2004).

O envolvimento de proteínas de parede celular na função mitocondrial já foi descrito (Velours *et al.*, 2002). Sed1p, assim como ocorre com outras proteínas de parede celular já descritas, pode ter função no transporte de algumas proteínas mitocondriais. Pir1p e Uth1p estão implicados na importação de proteínas para a mitocôndria (Vongsamphanh *et al.*, 2001; Velours *et al.*, 2002).

Dessa forma, a possível falta das proteínas Sed1 p e Uth1 p ativas no mutante *gup1Δ*, devido a não ocorrência do remodelamento da âncora de GPI nesse mutante, pode explicar a sensibilidade ao estresse oxidativo observado.

Os ensaios de sensibilidade ao composto H₂O₂ estão de acordo com Vilella *et al.* (2005), onde a concentração de 10 mM provoca a morte inclusive da cepa selvagem. Por

outro lado, a constatação de que o mutante *gup1Δ* apresenta sensibilidade em um intervalo de tempo definido, com recuperação posterior dos níveis de viabilidade celular encontrados para a cepa selvagem pode ser explicado pela observação de que nem todas proteínas ancoradas por GPI estão inativas no mutante *gup1Δ*. Bosson *et al.* (2006), observaram que não existem problemas com a degradação de Gas1 p em *gup1Δ*, visto que, a inativação das vias de degradação de proteínas não altera a maturação de Gas1 p. Embora grande parte de Gas1 p esteja na forma imatura e seja perdida para o meio extracelular, as poucas proteínas que mantêm-se funcionais são extremamente importantes, já que o duplo mutante *gas1Δgup1Δ* apresenta mais problemas que *gup1Δ*. Do mesmo modo, Sed1 p e Uth1 p, podem estar sendo ativadas ou transportadas para seu local de ação tardiamente e em pequeno número, de modo que a sensibilidade ao estresse oxidativo seja verificada até que um número suficiente dessas proteínas estejam ativas.

Existe um projeto em andamento denominado PROPHECY (PROfilig of PHenotypic Characteristics in Yeast, <http://prophecy.lundberg.gu.se/>), que visa a identificação dos mutantes de levedura que sejam sensíveis ao estresse por NaCl, diamida, DTT (1,4-ditiotreitól) e paraquat. As três últimas substâncias são agentes oxidantes. Resultados ainda não publicados, mas disponíveis no site descrito acima, mostram que o mutante *gup1Δ* é sensível a diamida, DTT e paraquat. Isso corrobora o modelo proposto nesse trabalho de participação de Gup1 p na resposta ao estresse oxidativo. Os efeitos provocados pelos agentes oxidantes diamida e peróxido de hidrogênio parecem ser diferentes. O primeiro, provoca danos a parede celular o que leva a ativação da via PKC-MAPKinase por exemplo (Vilella *et al.*, 2005). Por outro lado, H₂O₂ tem ação intracelular mais pronunciada, levando a despolarização do citoesqueleto de actina (Vilella *et al.*, 2005). O mutante *gup2Δ* não apresenta sensibilidade ao estresse oxidativo (<http://prophecy.lundberg.gu.se/>).

A predição da topologia de Gup1p está de acordo com a literatura. De acordo com Bleve *et al.* (2005), Gup1 p teria a porção N-terminal no espaço periplasmático e sua porção C-terminal estaria no citoplasma. A localização do N-terminal não é comum em proteínas que desempenham o papel de transportadores, essa característica é comum de receptores acoplados a proteína G, como o receptor do fator- α (Cartwright *et al.*, 1991) e a

MRP humana (proteína de resistência a drogas) (Hipfner *et al.*, 1997). Gup1p está localizado na membrana plasmática e no retículo endoplasmático.

O mutante *gup1Δ* apresenta um fenótipo de sedimentação Ca^{2+} -dependente e morfologia defeituosa do vacúolo (Bonangelino *et al.*, 2002). A tendência à sedimentação, ocorre inclusive em células crescendo exponencialmente em glicose. A natureza dessa agregação é desconhecida, experimentos de Western-blot revelaram que Flo1p e p37, duas das principais proteínas relacionadas ao processo de floculação (Stratford, 1993; Delgado *et al.*, 2001), apresentam os mesmos níveis em relação à cepa selvagem, não caracterizando portanto, um evento de floculação (Ferreira *et al.*, 2006). A composição alterada da parede celular, leva a exposição de resíduos de açúcar, que por sua vez, estão envolvidos em eventos de adesão celular. Esse fato pode explicar em parte o fenótipo de agregação observado em *gup1Δ* (Ferreira *et al.*, 2006). Como uma grande parte dos genes potencialmente ancorados por GPI identificados ainda não têm função biológica definida, alguns desses genes podem ter papel importante para explicação de determinados fenótipos de *gup1Δ*. Como exemplo, sugere-se que Sun4 p participe da separação celular após a multiplicação. Sun4 p é uma proteína ancorada por GPI que tem localização mitocondrial e na parede celular (Velours *et al.*, 2002). Sun4 p faz parte da família *SUN*, da qual também inclui-se Uth1 p. Portanto, o fenótipo de agregação observado no mutante *gup1Δ* pode ser devido ao atraso na produção de Sun4 p ativa.

O mutante *gup1Δ* apresenta sensibilidade a sais orgânicos ácidos como acetato, benzoato e sorbato, em meios ajustados para pH 4,5 (Ferreira *et al.*, 2006). De acordo com os resultados da acidificação extracelular induzida por glicose, a sensibilidade de *gup1Δ* a ácidos orgânicos fracos não deve estar relacionada a atividade deficiente de Pma1 p, uma vez que o nível de acidificação extracelular induzida por glicose alcançado por *gup1Δ* é igual ao encontrado para a cepa selvagem. O gene *CWP2*, regulado por Swi4 p, codifica para uma proteína ancorada por GPI. Essa manoproteína de parede celular é um dos maiores constituintes da parede e tem o papel de estabilizá-la e ainda está envolvida na resistência ao pH ácido. Portanto, tal como descrito para Sed1 p e Uth1 p, Cwp2 p pode ter problemas no remodelamento da âncora no mutante *gup1Δ*, o que explicaria a sensibilidade de *gup1Δ* ao estresse ácido.

O fenótipo pleiotrópico de *gup1Δ*, com possível envolvimento em processos celulares que envolvem, por exemplo: a biogênese da membrana plasmática celular, a polarização do citoesqueleto de actina, as vias de secreção/endocitose; sugerem a existência de uma relação com a via de integridade celular da qual Pkc1p participa. A via de PKC-MAPKinase está ativa no mutante *gup1Δ*, em condições de choque hiposmótico (Ferreira *et al.*, 2006).

O presente trabalho investigou um modelo em que Pkc1 p estaria envolvida na regulação da atividade de Gup1 p, de forma direta ou indireta, afetando desse modo às funções celulares desempenhadas pela proteína Gup1 p em *S. cerevisiae*. A regulação da expressão do gene *GUP1*, provou não estar sob o controle de Pkc1 p, nas condições de crescimento em glicose e rafinose, já que as cepas selvagem e mutante *pkc1Δ* apresentaram níveis de expressão desse gene similares. Como os níveis de expressão de *GUP1* se mostraram baixos tanto em glicose como em rafinose, provavelmente, a principal forma de regulação da atividade de Gup1 p se dê a nível pós-traducional e a efetiva participação de Pkc1 p nessa regulação permanece desconhecida.

PERSPECTIVAS

6 Perspectivas

- a) Determinar a localização subcelular das proteínas Uth1 p, Sed1 p, Cwp2 p e Sun4 p nas cepas selvagem e mutante *gup1Δ*.
- b) Avaliar o crescimento dos mutantes *sed1Δ* e *uth1Δ* em meio contendo fontes de carbono não-fermentáveis (glicerol, etanol e rafinose).
- c) Medir a capacidade respiratória (atividade mitocondrial) do mutante *gup1Δ*.
- d) Avaliar a presença de proteínas ancoradas por GPI no mutante *pkc1Δ*.
- e) Analisar a localização subcelular da construção *GUP1-GFP* no mutante *pkc1Δ*.

REFERÊNCIAS

7 Referências bibliográficas

AHMAD S. (1995). Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. In: Ahmad S (ed) Oxidative stress and antioxidant defences in biology. Chapman and Hall, New York, pp 238–272.

AHUTZI, D., HERRERO, P., CERA, T., MORENO, F. (2004). The glucose regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1 dependent. IN Press.

ALEPUZ, P.M., MATHEOS, D., CUNNINGHAM, K.W. AND ESTRUCH, F. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* Ran-GTP-binding protein Msn5p is involved in different signal transduction pathways. *Genetics* 153, 1219–1231.

ALMS, G.R., SANZ, P., CARLSON, M., HAYSTEAD, T.A.J. (1999). Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in *Saccharomyces cerevisiae*: characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. *EMBO J.* **18**, 4157-4168.

AMES, B., SHIGENAGA, M., AND HAGEN, T. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7915–7922

ANDREWS, P.D. AND STARK, M.J. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J. Cell Sci.* 113, 2685–2693.

ANSELL R., GRANATH K., HOHMANN S., THEVELEIN J.M. & ADLER L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J* **16**: 2179-2187.

ANSELL R, GRANTH K, HOHMANN S, THEVELEIN J.M., ADLER L., (1997) The two enzymes for yeast NAD⁺ dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J*;16:2179-97.

BANDARA P. D. S., FLATTERY-O'BRIEN J., GRANT C. M., DAWES I. W. (1998). Involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* UTH1 gene in the oxidative stress response. *Curr Genet* 34: 259-268.

BANUETT, F. (1998). Signaling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol. Bio. REV.* **62**, 249-274.

BEULLENS, M., MBONYI, K., GEERTS L., GLADINES, D., DETREMERIE, K., JANS, A.W. H., THEVELEIN, J.M. (1998). Studies on the mechanism of the glucose-induced cAMP signal in glycolysis and glucose repression mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EUR J Biochem.* **172**, 227-231.

BILL, R.M., HEDFALK, K., KARLGREN, S., MULLINS, J.G., RYDSTROM, J. AND HOHMANN, S. (2001). Analysis of the pore of the unusual major intrinsic protein channel, yeast Fps1p. *J. Biol. Chem.* 276, 36543–36549

BLEVE G., ZACHEU G., CAPPELLO M. S., DELLAGLIO F., GRIECO F. (2005). Subcellular localization and functional expression of the glycerol uptake protein 1 (GUP1) of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with green fluorescent protein. *Biochem. J.* 390 p. 154-155.

BLOMBERG A., (2002). Use of two-dimensional gels in yeast proteomics. *Methods Enzymol.* **350**, 559.

BONANGELINO, C. J., CHAVEZ, E. M. AND BONIFACINO, J. S. (2002). Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2486–2501.

BONNEFOY N. AND FOX T., (2002). Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Enzymol.* **350**, 97.

BOSSON R, JAQUENOUD M, CONZELMANN A., (2006). GUP1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an O-acyltransferase involved in remodeling of the GPI anchor. *Mol Biol Cell.* Jun;17(6):2636-45

BOUKABA, A., GEORGIEVA, E.I., MYERS, F.A., THORNE, A.W., LOPEZ-RODAS, G., CRANE-ROBINSON, C. AND FRANCO, L. (2004) A short-range gradient of histone H3 acetylation and Tup1p redistribution at the promoter of the *Saccharomyces cerevisiae* SUC2 gene. *J. Biol. Chem.* 279, 7678–7684.

BRITON N. F., AND WHEALS A. E. (1987). Mathematical models for a G0 phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol.* 7;125(3):269-81.

BROECK, D., SAMIY, N., FASANO, O., FUJIYAMA, A., TAMANOI, F., NORTHUP, J., WIGLER, M. (1985). Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild type and mutant Ras protein. *Cell* **41**, 763-769.

BROECK, D., TODA, T., MICHAELI, T, LEVIN, L., BIRCHMEIER, C., ZOLLER, M., POWERS, S., WIGLER, M. (1987). The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* **48**, 789-799.

BUETTNER G. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, a-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300:535–543.

CADENAS E. (1995). Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: Ahmad S (ed) *Oxidative stress and anti-oxidant defences in biology*. Chapman and Hall, New York, pp 1–6.

CAMONIS, J.H., KALÉKINE, M., GONDRÉ, B., GARREAU, H., BOY-MARCOTTE, E., JACQUET, M. (1986). Characterization, cloning and sequence analysis of the *CDC25* gene which controls the cyclic AMP level of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **5**, 375-380.

CAMOUGRAND N. M., MOUASSITE M., VELOURS G. M., GUÉRIN M. G. (2000). The SUN family: UTH1, an ageing gene, is also involved in the regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **375**: 154-160.

CARTWRIGHT, C. P. AND TIPPER, D. J. (1991). In vivo topological analysis of Ste2, a yeast plasma membrane protein, by using beta-lactamase gene fusions. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2620-2628.

CASTRO, I.M. AND LOUREIRO-DIAS, M.C. (1991) Glycerol utilization in *Fusarium oxysporum* var. *lini*: regulation of transport and metabolism. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1497-1502.

CHANG, M., FRENCH-CORNAY, D., FAN, H., KLEIN, H., DENIS, C.L. AND JAEHNING, J.A. (1999). A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signalling. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1056-1067.

CLARET S., GATTI X., DOIGNON F., THORAVAL D., CROUZET M. (2005). The Rgd1p Rho GTPase-Activating Protein and the Mid2p Cell Wall Sensor Are Required at Low pH for Protein Kinase C Pathway Activation and Cell Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* **p.** 1375-1386.

COCCE TI P., TISI R., MARTEGANI E., TEIXEIRA L. S., BRANDÃO R. L., CASTRO I. M., THEVELEIN J. M. (1998). The PLC1 encode phospholipase C in the yeast

Saccharomyces cerevisiae is essential for glucose-induced phosphatidylinositol turnover and activation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1405, 147-154.

COLOMBO, S., MA, P., CAUWENBERG, L., WINDERICKX, J., CRAUWELS, M., TEUNISSE, A., NAUWELARES, D., DE WIDE, J.H., GORWA, M-F, COLAVIZZA, D., THEVELEIN, J.M. (1998). Involvement of distinct G-protein, Gpa2 and Ras, in glucose and intracellular acidification-induced cAMP signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**, 3326-3341.

CRAWELS, M., WINDERICKX, J., DE WINDE, J.H., THEVELEIN, J.M. (1997). Identification of genes with nutrient-controlled expression by PCR-mapping in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 973-984.

DALLEY J.A. AND BULLEID N.J. (2003). The endoplasmic reticulum (ER) translocon can differentiate between hydrophobic sequences allowing signals for glycosylphosphatidylinositol anchor addition to be fully translocated into the ER lumen. *J. Biol. Chem.*, **278**, 51749–51757.

DAVENPORT, K. R., SOHASKEY, M., KAMADA, Y., LEVIN, D. E., AND GUSTIN, M. C., (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 30157–30161.

DAVIE, J.K., EDMONDSON, D.G., COCO, C.B. AND DENT, S.Y.R. (2003) Tup1–Ssn6 interacts with multiples class I deacetylases in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 50158–50162.

DE LA FUENTE, N., MALDONADO, A. M. & PORTILLO, F. (1997). Glucose activation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase requires the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *FEBS Lett* 411, 308±312.

DELGADO M.L, O'CONNOR E., AZORI I., RENAUI-PIQUERAS J., GIL M.L. & GOZALBO D. (2001). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *TDH1*, *TDH2* and *TDH3* genes are also cell wall proteins. *Microbiology* **147**: 411- 417.

DELLEY, P.A. AND HALL, M.N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J. Cell Biol.* 147, 163–174.

DERISI J. L., IYER V. R., AND BROWN P. O., (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680.

DEVIT, M.J. AND JOHNSTON, M. (1999). The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Biology*. **9**, 1231-1241.

DUNEZ, P., PERNAMBUCO, M.B., ORIS, E., ARGUELLES, J.C., MERGELSBERG, H., THEVELEIN, J.M., (1994). Activation of trehalase during growth induction by nitrogen sources in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on the free catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase, but not on functional Ras protein. *Yeast* **10**, 1049-1064.

EISENHABER, B. BORK P., EISENHABER F. (1998). Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng.*, **11**, 1155–1161.

EISENHABER B., BORK P., EISENHABER F. (1999). Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *J. Mol. Biol.*, **292**, 741–758.

FANKHAUSER N. AND MASER P., (2005). Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics*. May 1;21(9):1846-52.

FARR S.B. AND KOGOMA T. (1991). Oxidative-stress responses in *Eschericia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 55:561– 585.

FERREIRA C., VON VOORST F., MARTINS A., NEVES L., OLIVEIRA R., LIELLAND-BRANDT M.C., LUCAS C., BRANDT A.. (2005). A member of the sugar transporter family, Stl1p, is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**: 2068-2076.

FERREIRA M.M., LOUREIRO-DIAS M.C. & LOUREIRO V. (1997). Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* **36**: 145-153.

FRANÇOIS, J., VILLANUEVA, M.E., HERS, H.G. (1988). The control of glycogen metabolism in yeast. 1. Interconversion in vivo of glycogen synthase and glycogen phosphorylase induced by glucose, a nitrogen source or uncouplers. *Eur J Biochem* **174**, 551-559.

FRANÇOIS, J., NEVES, M.J., HERS, H.G. (1991). The control of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*- evidence for a catabolite inactivation and repression of trehalose-6-phosphate phosphatase. *Yeast* **7**, 575-587.

FRANÇOIS, J. AND PARROU, J.L. (2001). Reserve carbohydrate metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems microbiology reviews* **25**, 125-145.

GANCEDO, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 334-361.

GARRELS J. I., MCLAUGHLIN C. S., WARNER J. R., FUTCHER B., LATTER G. I., KOBAYASHI R., SCHWENDER B., VOLPE T., ANDERSON D. S., MESQUITA-FUENTES R., AND PAYNE W. E., (1997). Proteome studies of *Saccharomyces*

cerevisiae: identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis* **18**, 1347.

GASH, A. P., SPELLMAN, P. T., KAO, C. M., CARMEL-HAREL, O., EISEN, M. B., STORZ, G., BOTSTEIN, D., AND BROWN, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241–4257

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

GOFFEAU A., BARRELL B. G., BUSSEY H., DAVIS R. W., DUJON B., FELDMANN H., GALIBERT F., HOHEISEL J. D., JACQ C., JOHNSTON M., LOUIS E. J., MEWES H. W., MURAKAMI Y., PHILIPSEN P., TETTELIN H., AND OLIVER S. G., (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546.

GOMES, K N; FREITAS, S M A C; PAIS, T M; FIETTO, J L R; ARANTES, R M; M, A J; LUCAS, C; SCHULLER, D; CASTRO, I M; FIETTO, L G; BRANDÃO, R L. (2005). Deficiency of Pkc1 activity affects glycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Research* 5(8): 767-776.

GRAUSLUND, M., LOPES, J.M. AND RONNOW, B. (1999). Expression of GUT1, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. *Nucleic Acids Res.* 27, 4391–4398.

GUSTIN M.C., ALBERTYN J., ALEXANDER M. AND DAVENPORT K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1264-1300.

HALLIWELL B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91:3C-14S–3C-38S.

HAMBURGER D., EGERTON M., RIEZMAN H. (1995). Yeast *gaa1p* is required for attachment of a completed GPI anchor onto proteins. *J. Cell Biol.*, **129**, 629–639.

HARDIE, D. G., CARLING, D., CARLSON, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 821–855.

HARRISON, J.C., BARDES, E.S., OHYA, Y. AND LEW, D.J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nature Cell Biol.* 3, 417–420.

HEINISCH, J. J., LORBERG, A., SCHMITZ, H. P., AND JACOBY, J. J. (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **32**, 671–680

HIPFNER, D. R., ALMQUIST, K. C., LESLIE, E. M., GERLACH, J. H., GRANT, C. E., DEELEY, R. G. AND COLE, S. P. (1997). Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *J. Biol. Chem.* **272**, 23623–23630.

HIRIMBUREGAMA, K., DURNEZ, P., KELEMAN, J., ORIS, E., VERGAUWEN, R., MERGELSBERG, H., THEVELEIN, J.M. (1992). Nutrient-induced activation of trehalase in nutrient-starved cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cAMP is not involved as second messenger. *J. Gen Microbiol* **138**, 2035-2043.

HOFMANN, K. (2000). A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci*, 25, 111-112.

HOHMANN AND MAGER (1997). Yeast stress response. *Mol. Biol. Intelligent Unit*.

HOHMANN S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.

HOLST, B., LUNDE, C., LAGES, F., OLIVEIRA, R., LUCAS, C. AND KIELLAND-BRANDT, M.C. (2000). GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **37**, 108–124.

HONG, S., LEIPER, F.C., WOODS, A., CARLING, D. AND CARLSON, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *PNAS* **100**, 8839-8843.

ITO T., TASHIRO K., MUTA S., OZAWA R., CHIBA T., NISHIZAWA M., YAMAMOTO K., KUHARA S., AND SAKAKI Y., (2000). Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 1143.

JAMIESON D.J. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol* **174**:6678–6681.

JIANG, R. AND CARLSON, M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* **10**, 3105-3115.

JONES, S., VIGNAIS, M-L., BROACH, J.R. (1991). The *CDC25* protein of *Saccharomyces cerevisiae* promotes exchange of guanine nucleotides bound to RAS. *Mol. Cell Biol.* **11**, 2641-2646.

KAMADA, Y., JUNG, U. S., PIOTROWSKI, J., AND LEVIN, D. E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* **9**, 1559–1571

KATAOKA, T., BROECK, D., WIGLER, M. (1985). DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell* **43**, 493-505.

KETELA, T., GREEN, R., AND BUSSEY, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* **181**, 3330–3340

KITAGAKI, H., WU, H., SHIMOI, H., AND ITO, K. (2002). Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **46**, 1011-1022.

KOLLAR, R., REINHOLD, B.B., PETRAKOVA, E., YEH, H.J., ASHWELL, G., DRGONOVA, J., KAPTEYN, J.C., KLIS, F.M., AND CABIB, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta (1-6)-glucan interconnects mannoprotein, beta (1,3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem*, **272**, 17762-17775.

KRAAKMAN, L., LEMAIRE, K., MA, P., TEUNISSEN, A.W.R.H., DONATON, M.C.V, VAN DIJCK, P., WINDERICKX, J., DE WINDE, J.H., THEVELEIN, J.M. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* **32**, 1002-1012.

KRAUSE S. A. AND GRAY J. V., (2002), The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Biology*, vol. 12, 588-593.

KRONEGG J. AND BULOZ D. (1999). Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI).

KUBLER, E., MOSCH, H.U., RUPP, S., LISANTI M.P. (1997). Gpa2, a g-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J. Biol Chem* **272**, 20321-20323.

KUMAR A. AND SNYDER M., (2001). Emerging technologies in yeast genomics. *Nature Rev. Genetics* **2**, 302.

LAGES, F., SILVA-GRAC A, M. AND LUCAS, C. (1999). Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology* **145**, 2577–2585.

LARSSON, C., PAHLMAN, I., ANSELL, R., RIGOULET, M., ADLER, L. AND LARSON, L.G. (1998). The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 347–357.

LIVAK, K.J. AND SCHMITTGEN, T.D., (2001). Analysis of gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *METHODS* **25**, 402–408.

LORENZ, M.C., PAN, X., HARASHIMA, T., CARDENAS, M.E., XUE, Y., HIRSCH, J.P., HEITMAN, J. (2000). The G protein-coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**, 609-622.

LOUREIRO-DIAS M.C. AND SANTOS H. (1990). Effects of ethanol on *Saccharomyces cerevisiae* as monitored by *in vivo* ³¹P and ¹³C nuclear magnetic resonance. *Arch Microbiol* **153**: 384-391.

LU, C.F., MONTIJN, R.C., BROWN, J.L., KLIS, F., KURJAN, J., BUSSEY, H., AND LIPKE, P.N. (1995). Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha agglutinin and beta 1,6- glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol*, 128, 333-340.

LUDIN, M., NEHLIN, J.O., RONNE, H. (1994). Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein Mig1. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1979-1985.

LUDIN, K., JIANG, R. AND CARLSON M. (1998). Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 6245-6250.

LUSSIER M., WHITE A.M., SHERATON J., DI PAOLO T., TREADWELL J., SOUTHARD S.B., HORENSTEIN C.I., CHEN-WEINER J., RAM A.F., KAPTEYN J.C., ROEMER T.W., VO D.W., BONDOC D.C., HALL J., ZHONG W.W., SDICU A.M., DAVIES J., KLIS F.M., ROBBINS P.W., BUSSEY H. (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 435-450.

LUYTEN, K., ALBERTYN, J., SKIBBE, W.F., PRIOR, B.A., RAMOS, J., THEVELEIN, J.M. AND HOHMANN, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* 14, 1360–1371.

MARTIN H., RODRIGUEZ-PACHON J.M., RUIZ C., NOMBELA C. AND MOLINA M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1511-1519.

MARTIN-YKEN, H., DAGKESSAMANSKAIA, A., BASMAJI, F., LAGORCE, A., AND FRANCOIS, J. (2003). The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for

signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **49**, 23–35

MARTZEN M. R., MCCRAITH S. M., SPINELLI S. L., TORRES F. M., FIELD S., GRAYHACK E. J., AND PHIZICKY E. M., (1999). A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* **286**, 1153.

MATSUMOTO, K., UNO, I., ISHIKAWA, T. (1984). Identification of the structural gene and nonsense alleles for adenylate cyclase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol* **180**, 2253-2256.

MAZZONI, C., ZARZAV, P., RAMBOURG, A. AND MANN, C. (1993). The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **123**, 1821–1833.

MBONYI, K., BEULLENS, M., DETREMERIE, K., GEERTS, L., THEVELEIN, J. M., (1988). Requirement of one functional *RAS* gene and inability of an oncogenic ras-variant to mediate the glucose-induced cAMP signal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **8**, 3051-3057.

MBONYI, K., VAN AELST, L., ARGÜELLES, J.C., JANS, A.W.H., THEVELEIN, J.M. (1990). Glucose-induced hyperaccumulation of cyclic AMP and defective glucose repression in yeast strains with reduced activity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol.* **10**, 4518-4523.

MCCARTNEY, R.R. AND SCHMIDT M.C. (2001). Regulation of Snf1 kinase: activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.* **276**, 36460-36466.

MORADAS-FERREIRA P., COSTA V., PIPER P., MAGER W. (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol* **19**:651–658.

MOSKVINA, E., SCHULLER, C., MAURER, C.T.C., MAGER, W.H., RUIS, H. (1998). A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast* **14**, 1041-1050.

NATH, N., MCCARTNEY, R., SCHMIDT, M.C. (2003). Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 3909-3917.

NEHLIN, J.O. AND RONNE, H. (1990). Yeast Mig1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilm's tumour finger proteins. *EMBO J.* **9**, 2891-2898.

NEVES, L., OLIVEIRA, R. AND LUCAS, C. (2004). Yeast orthologues associated with glycerol transport and metabolism. *FEMS Yeast Res.* 5(1):51-62

NI, L. AND SNYDER, M. (2001). A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2147-2170.

NIELSEN H., ENGELBRECHT J., BRUNAK S., VON HEIJNE G. (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural Syst.*, **8**, 581-599.

NIERRAS C. R. AND WARNER J. R. (1999). Protein kinase C enables the regulatory circuit that connects membrane synthesis to ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *JBC* vol 274, n 19, 13235-13241.

NORBEEK J., POLMAN A.K., AKHTAR N., BLOMBERG A., ADLER L., (1996) Purification and characterization of two isozymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the corresponding GPP1 and GPP2 genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*;271:13875-81.

OELKERS, P., TINKELENBERG, A., ERDENIZ, N., CROMLEY, D., BILLHEIMER, J. T. AND STURLEY, S. L. (2000). A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast. *J. Biol. Chem.* **275**, 15609–15612.

OLIVEIRA, R. (2003). PhD Thesis, Minho Univ., Braga, Portugal.

OLIVER S, (1996). From DNA sequence to biological function. *Nature* **379**, 597.

PARK, H., AND LENNARZ W. J. (2000). Evidence for interaction of yeast protein kinase C with several subunits of oligosaccharyl transferase. *Glycobiology* **10**:737–744.

PAVLIK, P., SIMON, M., SCHUSTER, T. AND RUIS, H. (1993). The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Curr. Genet.* **24**, 21–25.

PHADNIS, N., AND SAI, E. A., (2004). Role of putative structural protein Sed1p in mitochondrial genome maintenance. *J. Mol. Biol.* **342**: 1115-1129.

PHILIPS, J. AND HERSKOWITZ, I. (1997). Osmotic balance regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **138**, 961–974.

PIPER P., CALDERON C.O., HATZIXANTHIS K. AND MOLLAPOUR M. (2001). Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* **147**: 2635-2642.

RAJAVEL, M., PHILIP, B., BUEHRER, B. M., ERREDE, B., AND LEVIN, D. E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3969–3976.

ROLLAND, F., DE WINDE, J.H., LEMAIRE, K., BOLES, E., THEVELEIN, J.M., WINDERICKX, J. (2000). Glucose-induced cAMP signaling in yeast requires both a G-

protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol* **38**, 348-358.

ROLLAND, F., WINDERICKX, J., TREVELEIN J.M. (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *TRENDS in Biochemical Sciences* **26**, 310-317. 310-317.

ROLLAND, F., WINDERICKX, J., TREVELEIN J.M. (2002). Glucose-sensing and-signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research* **1457**, 1-19.

RONNOW, B. AND KIELLAND-BRANDT, M.C. (1993). GUT2, a gene for mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 1121–1130.

ROSS-MACDONALD P., SHEEHAN A., FRIDDLE C., ROEDER G. S., AND SNYDER M., (1999). Transposon mutagenesis for the analysis of protein production, function, and localization. *Meth. Enzymo.* **303**, 512

RUNDONI, S., COLOMBO, S., COCCETTI, P., MARTEGANI, E. (2001). Role of guanine nucleotides in the regulation of the Ras/cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim biophys Acta* **1538**, 181-189.

SALGADO, A.P.C., SCHULLER, D., CASAL, M., LEÃO, C., FIETTO, L.G., TROPIA, M.J.M., CASTRO, I.M. AND BRANDÃO, R.L. (2002). Relationship between protein kinase C and derepression of different glucose-controlled enzymes. *FEBS Lett.* **532**, 324–332.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SANZ, P., ALMS, G.R., HAYSTEAD, T.A.J., CARLSON, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biological* **20**, 1321-1328.

SCANDALIOS J.G., (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38(7)

SERRANO, R. (1983). *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* 156, 11±14.

SIDERIUS M., VAN WUYTSWINKEL O., REIJENGA K.A., KELDERS M. AND MAGER W.H. (2000). The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Mol Microbiol* **36**: 1381-1390.

SIES H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91:3C-31S–3C-38S.

SMITH, R. AND JOHNSON, A.D. (2000) Turning genes off by Ssn6– Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 25, 325–330.

SMITS G.J., VAN DEN ENDE H. AND KLIS F.M. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**: 781-794.

SPRAGUE, G.F. AND CRONAN, J.E. (1977). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism. *J. Bacteriol.* 129, 1335–1342.

SREENIVAS, A., VILLA-GARCIA, M.J., HENRY, S.A. AND CARMAN, G.M. (2001). Phosphorylation of the yeast phospholipid synthesis regulatory protein Opi1p by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 276, 29915–29923.

STRATFORD M. (1993). Yeast flocculation: flocculation onset and receptor availability. *Yeast* **9**: 85-94.

SUTTERLIN C., ESCRIBANO M.V., GEROLD P., MAEDA Y., MAZON M.J., KINOSHITA P., SCHWARZ R.T., RIEZMAN H. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* gpi10, the functional homologue of human pig-b, is required for glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis. *Biochem. J.*, **332** (Pt 1), 153–159.

TAKEDA, J. AND KINOSHITA, T. (1995). GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 367–371.

TAMAS, M.J., LUYTEN, K., SUTHERLAND, F.C., HERNANDEZ, A., ALBERTYN, J., VALADI, H., LI, H., PRIOR, B.A., KILIAN, S.G., RAMOS, J., GUSTAFSSON, L., THEVELEIN, J.M. AND HOHMANN, S. (1999). Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol. Microbiol.* **31**, 1087–1104.

TEIXEIRA M.C., MONTEIRO P., JAIN P., TENREIRO S., FERNANDES A.R., MIRA N.P., ALENQUER M., FREITAS A.T., OLIVEIRA A.L., SA-CORREIA I., (2006). The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* Jan 1;34(Database issue):D446-51.

THEVELEIN, J.M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast* **10**, 1753-1790.

THEVELEIN, J.M., BEULLENS, M., HONSHOVEN, F., HOEBEECK, G., DETREMERIE, K., GRIEWEL, B., DEN HOLLANDER, J. A., JANS, A.W.H. (1987). Regulation of the cAMP level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the glucose-induced cAMP signal is not mediated by a transient drop in the intracellular pH. *J Gen Microbiol.* **133**, 2197-2205.

THEVELEIN, J.M. AND DE WINDE, J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the Camp-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **32**, 1002-1012.

TODA, T., UNO, I., ISHIKAWA, T., POWERS, S., BROECK, D., CAMERON, S., BROACH, J., MATSUMOTO, K., WIGLER, M. (1985). In yeast, Ras proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40**, 27-36.

TODA, T., CAMERON, S., SASS P, ZOLLER M., SCOTT, J.D., MCBULLEN, B., HURWITZ, M., KREBS, E.G., WINGLER, M. (1987-a). Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**,1371-1377.

TODA, T., CAMERON, S., SASS P, ZOLLER M., WIGLER, M. (1987-b) Three different genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **50**, 277-287.

TOLEDANO, M. B., DELAUNAY, A., BITEAU, B., SPECTOR, D., AND AZEVEDO, D. (2003). *Topics in Current Genetics, Vol. 1* (Hohmann, S., and Hager, P. W. H., eds) pp. 242–303, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

TREITEL, M.A. AND CARLSON, M. (1995). Repression by Ssn6-Tup1 is directed by Mig1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 3132-3136.

TREITEL, M.A., KUCHIN, S AND CARLSON, M. (1998). Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6273-6280.

UDENFRIEND, S. AND KODUKULA, K. (1995). Prediction of ω site in nascent precursor of glycosylphosphatidylinositol protein. *Methods Enzymol.*, **250**, 571–582.

VAN UDEN N. (1989). *Alcohol toxicity in yeast and bacteria*. (van Uden, N., Ed.), CRC Boca Raton, FL.

VELCULESCU V. E., ZHANG L., ZHOU W., VOGELSTEIN J., BASRAI M. A., BASSETT D. E., JR., . HIETER P, VOGELSTEIN B., AND KINZLER K. W., (1997). Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* **88**, 243.

VELOURS, G., BOUCHERON, C., MANON, S. AND CAMOUGRAND, N. (2002). Dual cell wall/mitochondria localization of the "SUN" family proteins. *FEMS Microbiol. Letters*, 207, 165–172.

VERNA, J., LODDER, A., LEE, K., VAGTS, A., AND BALLESTER, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13804–13809.

VILELLA F., HERRERO E., TORRES J., TORRE-RUIZ M. A., (2005). Pkc1 and upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *JBC* vol 280, 10, 9149-9159.

VONGSAMPHANH, R., FORTIER, P. AND RAMOTAR, D. (2001). Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic instability. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1647–1655.

WATSON, A.D., EDMONDSON, D.G., BONE, J.R., MUKAI, Y., YU, Y., DU, W., STILLMANN, D.J. AND SHARON, Y.R. (2000) Ssn6–Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev.* 14, 2737–2744.

WILSON, W.A., HAWLEY, S.A. AND HARDIE, D.G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: snf1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol.* **6**, 1426-1434.

WINGENDER, E., CHEN, X., FRICKE, E., GEFFERS, R., HEHL, R., LIEBICH, I., KRULL, M., MATYS, V., MICHAEL, H., OHNHUSER, R., PRUSS M., SCHACHERER F., THIELE S., URBACH S. (2001). The TRANSFAC system on gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.*, 29, 281–283.

WU, J. AND TRUMBLY, R.J. (1998). Multiple regulatory proteins mediate repression and activation by interaction with the yeast Mig1 binding site. *Yeast* **14** (11), 985-1000.

XUE, Y., BATLLE, M., HIRSCH, J.P (1998). GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J.* **17**,1996-2007.

ZHU, J. AND ZHANG, M.Q. (1999). SCPD: a promoter database of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics*, 15, 607–611.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)