

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Débora Trichez

Identificação de resíduos de aminoácidos envolvidos no transporte ativo de açúcares pela permease Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae*

**FLORIANÓPOLIS
2007**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Débora Trichez

Identificação de resíduos de aminoácidos envolvidos no transporte ativo de açúcares pela permease Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Boris U. Stambuk
Prof. Dr. Hernán Terenzi

FLORIANÓPOLIS
2007

Dedico este trabalho aos
meus pais, Igídio e Marli,
e aos meus irmãos,
Fabiola e Rafael.

Agradecimentos

Agradeço ao professor Boris, pela sua orientação, dedicação, paciência e pelo grande exemplo de pesquisador e, sobretudo, pela oportunidade de experiência concedida a mim de fazer parte de seu grupo de trabalho.

Ao professor Hernán pelo empréstimo de seus equipamentos, pela doação de alguns reagentes e por se responsabilizar pela minha orientação junto ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, durante o período de afastamento para aperfeiçoamento do professor Boris.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFSC, assim como à coordenadoria, secretaria e professores da Pós-graduação em Biotecnologia pelo apoio e esclarecimentos prestados ao longo do curso.

Aos meus colegas de laboratório e amigos, Catarina, Denise, Eduarda, Letícia, Marcelo, Luíza, Paulo, Rafael, Ricardo e Sérgio, que de forma direta ou indireta, colaboraram para a execução deste trabalho. Ao Luiz, pelo grande auxílio e orientação no início do meu trabalho. E a todas as outras pessoas que também se fizeram presentes nas reuniões de sextas-feiras, de intensas discussões, em especial Ana e Marcela.

Às grandes amigas Nina, Pati, Pri e Tita, pela presença e força em todos os momentos de alegria, tristeza e loucura, e à minha família, pelo imenso apoio durante a execução deste trabalho e pela torcida por minhas realizações e conquistas.

Ao Conselho Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	1
2. Justificativa e objetivos	16
3. Material e métodos	17
3.1 Cepas Utilizadas	17
3.2 Meios de Cultura	17
3.3 Condições de crescimento	18
3.4 Dosagem de glicose, etanol e α -glicosídeos	18
3.4.1 Determinação de glicose	19
3.4.2 Determinação de maltose e maltotriose	19
3.4.3 Determinação de etanol	19
3.5 Determinação do transporte ativo de açúcares pela permease Agt1p	20
3.6 Determinação da atividade da α -glicosidase	21
3.7 Técnicas de manipulação do DNA	22
3.7.1 Plasmídeos	22
3.7.2 Transformação de bactérias	22
3.7.3 Extração de plasmídeos de bactérias	24
3.7.4 Hidrólise de plasmídeos	25
3.7.5 Eletroforese	25
3.8 Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.9 Mutagênese sítio-dirigida	26
3.10 Fusão de <i>GFP</i> à extremidade C-terminal do <i>AGT1</i>	27
3.11 Microscopia de fluorescência	29
3.12 Reprodutibilidade dos resultados	30
4. Resultados e discussão	32
4.1 Análise dos resíduos de aminoácidos envolvidos no simporte açúcar- H^+ da permease codificada pelo gene <i>AGT1</i>	32
4.2 Modelo estrutural de Agt1p e mecanismo proposto para o simporte α -glicosídeo- H^+	62
5. Conclusões e perspectivas futuras	69
Referências bibliográficas	71

Lista de figuras

Figura 1.1 Modelo estrutural para os transportadores com 12-TMs pertencentes à MFS.	4
Figura 1.2 Mecanismo proposto para o simporte lactose-H ⁺ .	7
Figura 1.3 Estrutura e regulação dos genes <i>MAL</i> .	13
Figura 3.1 Desenho esquemático do plasmídeo pGRSd-AGT1.	23
Figura 3.2 Desenho esquemático dos oligonucleotídeos utilizados para a mutagênese.	28
Figura 3.3 Fusão de <i>GFP</i> à extremidade C-terminal do <i>AGT1</i> .	30
Figura 4.1 Representação da estrutura secundária da permease Agt1p.	33
Figura 4.2 Alinhamento parcial da seqüência de Agt1p com conhecidos e/ou prováveis transportadores de α -glicosídeos.	36
Figura 4.3 Confirmação da mutação no aminoácido E120 de Agt1p.	39
Figura 4.4 Confirmação da mutação no aminoácido D123 de Agt1p.	40
Figura 4.5 Verificação da mutação no aminoácido R504 de Agt1p.	41
Figura 4.6 Utilização de glicose, maltose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd, que não apresenta o gene <i>AGT1</i> .	43
Figura 4.7 Utilização de glicose, maltose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd-AGT1.	44
Figura 4.8 Utilização de glicose, maltose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo E120A.	46
Figura 4.9 Utilização de glicose, maltose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo D123G.	47
Figura 4.10 Utilização de glicose, maltose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo R504A.	48
Figura 4.11 Atividade de transporte da permease Agt1p.	50
Figura 4.12 Atividade α -glicosidase na cepa LCM003 contendo os diferentes plasmídeos.	53
Figura 4.13 Atividade de transporte ativo de maltose, trealose, maltotriose, sacarose e α -metilglicosídeo	54
Figura 4.14 Cinética do transporte ativo de sacarose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com pGRSd-AGT1 ou D123G.	56
Figura 4.15 Construção do módulo GFP-KanMX e confirmação da correta integração do módulo nos plasmídeos pGRSd-AGT1, D123G, E120A e R504A.	58
Figura 4.16 Localização das permeases Agt1p normal e mutantes, fusionadas à GFP, na cepa LCM003 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	59
Figura 4.17 Representação do modelo estrutural de Agt1p.	63

Figura 4.18 Mecanismo proposto para o transporte açúcar-H⁺ através da permease Agt1p.	68
---	----

Lista de tabelas

Tabela 3.1 Genótipo das cepas utilizadas.	17
Tabela 3.2 Oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho.	28
Tabela 4.1 Propriedades dos transportadores de α-glicosídeos selecionados e comparados com a permease Agt1p.	35

Resumo

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a permease codificada pelo gene *AGT1* é responsável pelo transporte ativo de uma série de α -glicosídeos usados em diversas aplicações industriais de leveduras, como panificação, cervejaria, produção de bebidas destiladas e álcool combustível. O transporte destes açúcares para dentro da célula, através de proteínas transportadoras, é o passo inicial para seu metabolismo e também constitui um fator limitante na fermentação do açúcar. Com o intuito de compreender molecularmente o mecanismo de transporte e contribuir para a otimização do processo fermentativo, no presente trabalho foram analisados os resíduos de aminoácidos da permease Agt1p que poderiam estar envolvidos na ligação do próton e/ou açúcar a serem transportados. Analisando a estrutura prevista para o transportador Agt1p, identificamos 4 resíduos de aminoácidos carregados em seus segmentos transmembrana (Glu-120, Asp-123, Glu-167 e Arg-504), resíduos que estão significativamente conservados nas mesmas posições em outros genes de transportadores de α -glicosídeos presentes em diversas leveduras, incluindo espécies de *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces* e *Candida*. Permeases Agt1p mutantes nos resíduos Glu-120, Asp-123 e Arg-504 foram geradas por mutagênese sítio-dirigida, expressadas em uma linhagem deletada no respectivo gene (*agt1* Δ), e a funcionalidade das permeases foi testada através do crescimento em maltotriose. A substituição do resíduo Arg-504 por alanina aboliu completamente a utilização de maltotriose pelas células, enquanto que as permeases mutantes geradas pela substituição do Asp-123 pela glicina ou do Glu-120 por alanina não impediram o crescimento em maltotriose, mas ocasionaram menores velocidades de consumo de maltotriose e menor rendimento de etanol quando comparado ao transportador Agt1p normal. A atividade de transporte da permease Agt1p normal ou dos mutantes derivados também foi avaliada pelo transporte de *pNP* α G (substrato específico para o transportador Agt1p) e pelo transporte ativo de vários α -glicosídeos (maltose, maltotriose, trealose, sacarose e α -metil glicosídeo). Os resultados indicam que a mutação R504A ocasionou a perda total da atividade de transporte mediada pela permease Agt1p. Em contrapartida, os mutantes E120A e D123G apresentaram atividades de transporte de *pNP* α G e de co-transporte açúcar-H⁺ inferiores à observada para o transportador Agt1p normal, condizendo com o perfil de utilização de maltotriose. Apesar das diferenças nas atividades de transporte encontradas para as permeases construídas, todas essas permeases (normal ou mutantes) quando fusionadas à GFP em sua extremidade C-terminal apresentaram-se normalmente localizadas na membrana plasmática. Portanto, os resultados demonstram o envolvimento dos resíduos mutados no transporte ativo de açúcares realizado pela permease Agt1p, sugerindo a participação dos resíduos Glu-120 e Asp-123 na translocação do próton, e de Arg-504 na ligação do substrato. Porém, estudos ainda são necessários para melhor esclarecer o mecanismo de transporte ativo realizado pela permease Agt1p, o que certamente será de grande relevância para o desenvolvimento de estratégias que permitam a otimização dos processos fermentativos industriais.

Palavras chaves: AGT1, permease, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

In *Saccharomyces cerevisiae* the permease encoded by the *AGT1* gene is responsible for the active transport of several α -glucosides used in many industrial applications of yeasts, such as baking, brewing, and production of distilled beverages or fuel ethanol. Sugar uptake into the cells through transport proteins is the first step in their metabolism, and is also the rate-limiting step for fermentation. In order to understand the molecular mechanism of transport, and contribute for the fermentation process optimization, in this work amino acid residues of the Agt1p permease that could be involved in the proton and/or sugar binding and uptake were analyzed. Analyzing the putative structure for the Agt1p transporter, we identify four charged amino acid residues in the transmembrane segments (Glu-120, Asp-123, Glu-167 and Arg-504) that are significantly conserved in the same positions in other α -glucoside transporters from diverse yeasts, including species of *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces* and *Candida*. Agt1p mutant permeases in residues Glu-120, Asp-123 and Arg-504 were generated by site direct mutagenesis, each mutant permease was expressed in a strain deleted on the corresponding gene (*agt1* Δ), and the functionality of the permeases assayed through growth on maltotriose. The substitution of the Arg-504 residue by alanine totally abolished maltotriose utilization by the yeast cells, while mutant permeases generated by the substitution of Asp-123 by glycine or Glu-120 by alanine did not impaired the growth on maltotriose, but caused a lower rate of maltotriose consumption, and lower ethanol yields when compared with the wild-type Agt1p transporter. The transport activity of the wild-type or mutant Agt1p transporters was also evaluated through *pNP* α G transport (a specific substrate for the Agt1p permease), or through the active transport of several α -glucosides (maltose, maltotriose, trehalose, sacarose and α -metilglucoside). Our results indicate that the R504A mutation caused a total loss of the transport activity mediated by the Agt1p permease. On the other hand, the E120A and D123G mutants showed lower *pNP* α G uptake and sugar- H^+ symport activities, when compared with wild-type Agt1p transporter, in agreement with the maltotriose utilization profile. Although different transport activities were obtained with each permease, all these permeases (wild-type or mutant) when tagged with *GFP* at their C-terminus were normally found at the plasma membrane. Thus, our results indicate that the mutated amino acid residues are involved in the active sugar- H^+ symport activity mediated by the Agt1p permease, suggesting the involvement of the Glu-120 and Asp-123 residues in the proton translocation, and Arg-504 in the binding of the sugar. However, new studies are required in order to clarify the active transport mechanism mediated by Agt1p permease, which will certainly lead to the development of optimization strategies for the industrial fermentative processes.

Key-words: AGT1, permease, *Saccharomyces cerevisiae*.

1 Introdução

O transporte através da membrana plasmática é essencial para a manutenção da vida, comunicação entre as células e adaptação às mudanças do meio ambiente. Os sistemas de transporte permitem a entrada de nutrientes para o interior da célula, possibilitando a metabolização de fontes exógenas de carbono, fósforo e nitrogênio. Eles são também responsáveis pela excreção de produtos das vias metabólicas e de substâncias nocivas, e regulam o fluxo de íons que podem ser mantidos em concentrações intracelulares muito diferenciadas daquelas do ambiente externo (PAO et al., 1998; SAIER, 2000a).

Os solutos podem atravessar a membrana plasmática por difusão simples ou pelo transporte mediado por proteínas através de canais ou carreadores. Moléculas como CO_2 , O_2 e etanol, podem atravessar a membrana por difusão simples, sendo que as concentrações intracelulares desses substratos nunca ultrapassam as do meio externo. Canais e carreadores podem mediar o transporte do soluto sem gasto de energia metabólica e a favor de um gradiente de concentração. Neste processo, denominado de difusão facilitada, os carreadores se distinguem dos canais por sofrerem mudanças conformacionais em consequência da interação com o substrato, de tal forma que o sítio de ligação do substrato é exposto para um ou outro lado da membrana plasmática, permitindo a passagem da molécula. Na difusão facilitada mediada por um canal, o soluto passa de um lado ao outro da membrana via um canal ou poro que permanece inerte durante todo o processo (SAIER, 2000a, 2000b). Um exemplo bem estudado de canais são as aquaporinas, proteínas que são responsáveis pelo fluxo seletivo de água através da membrana, e por isso têm importante papel na osmorregulação de células e organismos (PETTERSSON et al., 2005).

Quando gasto de energia é acoplado à translocação do soluto, o transporte é denominado ativo. Transportadores ativos primários bombeiam H^+ ou outros íons para fora da

célula, convertendo a energia química em um gradiente eletroquímico através da membrana (ex: H⁺-ATPase). Este gradiente eletroquímico pode, então, ser usado pelos transportadores ativos secundários para o transporte de outras moléculas (LAGUNAS, 1993; SAIER, 2000a, 2000b).

Um sistema de classificação de proteínas transportadoras (TC) foi proposto por Saier (2000), baseado na filogenia e nas propriedades funcionais de seqüências relacionadas a transportadores, identificadas em Archaea, Bacteria e Eucaria. Aproximadamente 3000 transportadores ou prováveis transportadores, de todos os reinos de organismos vivos conhecidos, estão organizados em ~ 400 famílias, disponíveis no banco de dados TCDB – Transporter Classification Database (<http://www.tcdb.org>), que reúne informações estruturais, funcionais e evolucionárias dos sistemas de transporte (SAIER et al., 2006). Embora exista um grande número de proteínas de membrana, e estima-se que representem cerca de 20-30% do total das proteínas num genoma, elas constituem apenas 1% das estruturas conhecidas, disponíveis no banco de dados PDB (Protein Data Bank – <http://www.rcsb.org>) (FLEMING, 2000; FORREST et al., 2006). Esta dicotomia entre a abundância dos transportadores e a relativa falta de informações estruturais, é conseqüência das dificuldades experimentais de obtenção de formas solúveis dessas proteínas, para posterior cristalização e determinação da estrutura.

Uma grande variedade de transportadores de procariotos e eucariotos pertence à superfamília de transportadores denominada *Major Facilitator Superfamily* (MFS – TC# 2.A.1), que atualmente conta com centenas de membros com genes já clonados, seqüenciados e caracterizados (PAO et al., 1998; SAIER, 2000a). Membros desta superfamília são capazes de transportar uma variedade de solutos e metabólitos através da membrana, incluindo açúcares, oligossacarídeos, nucleosídeos, drogas, aminoácidos, cátions e ânions orgânicos e inorgânicos.

A principal característica estrutural dos transportadores pertencentes à MFS é a presença de 12 domínios transmembrana (TM I-XII), ricos em aminoácidos hidrofóbicos em estrutura de α -hélice. Estes transportadores geralmente possuem domínios amino e carboxila-terminal longos voltados para o citoplasma da célula, além de um domínio citoplasmático separando os segmentos transmembrana em dois blocos de 6 (vide Figura 1.1), o que sugere que estes transportadores tenham surgido pela duplicação de uma proteína transportadora primordial contendo 6 α -hélices transmembrana. Esta hipótese, como também a provável ocorrência desse evento antes da divergência das famílias MFS, é favorecida pela presença de motivos específicos conservados nos dois blocos de TMs em representantes de todas as famílias (SAIER, 2000a, 2000b).

Todas estas informações estruturais foram deduzidas a partir da análise da hidrofobicidade da seqüência de aminoácidos dos transportadores. Apenas recentemente foram obtidas estruturas tridimensionais de transportadores MFS, sendo que a primeira evidência estrutural, abordando resolução atômica, foi fornecida pela estrutura de baixa resolução do transportador de oxalato (OxIT) de *Oxalobacter formigenes*, obtida por microscopia crio-eletrônica (HIRAI et al., 2003). As informações de OxIT combinadas a dados bioquímicos e de seqüência de outros transportadores MFS conhecidos, permitiram a construção do modelo estrutural para as proteínas MFS, no qual 12 hélices transmembrana são posicionadas em torno de uma cavidade central, por onde é translocado o substrato, exibindo uma estrutura simétrica formada por 2 blocos de 6 TMs (HIRAI et al., 2003).

Estruturas de alta resolução de 3 proteínas desta superfamília recentemente estão disponíveis: o transportador de lactose codificado pelo gene *LacY* (ABRAMSON et al., 2003a, 2003b), o transportador de glicerol-3-fosfato codificado pelo gene *GlpT* (HUANG et al., 2003) e o transportador multidroga codificado pelo gene *EmrD* (YIN et al., 2006), todos de *Escherichia coli*, os quais permitiram uma análise mais detalhada da estrutura, a inferência

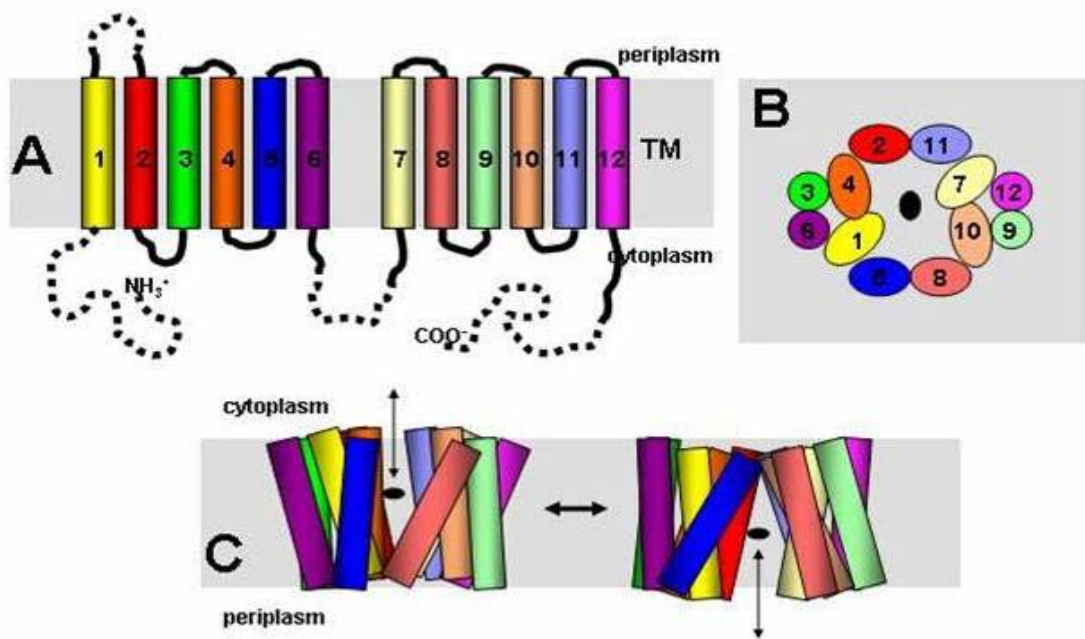


Figura 1.1 Modelo estrutural para os transportadores com 12-TMs pertencentes à Major Facilitator Superfamily (MFS). Figura adaptada de estruturas conhecidas de permeases MFS (ABRAMSON et al., 2003a, 2003b; SORGEN et al., 2002). **A:** Esquema da estrutura secundária mostrando os 12 TMs arranjados em dois domínios de 6 TMs. **B:** Posição relativa dos 12 TMs no plano da membrana. O substrato transportado é representado por uma esfera preta. **C:** Modelo de acesso alternante para o transporte, que propõe mudanças estruturais para a face interior (figura à esquerda) e para a face exterior (figura à direita) durante a passagem da molécula através da membrana.

sobre o mecanismo de transporte, bem como a observação de tipos irregulares de hélices. Entretanto, diversas técnicas de biologia molecular, principalmente a identificação e substituição de aminoácidos essenciais para o transporte e/ou especificidade dos transportadores, vêm possibilitando identificar elementos estruturais importantes para o funcionamento, regulação e localização celular destas proteínas (GUAN e KABACK, 2006; SAHIN-TÓTH et al., 2000; SORGEN et al., 2002).

O membro da MFS mais estudado neste sentido é o transportador de lactose de *E. coli*, codificado pelo gene *LacY* (ABRAMSON et al., 2003; GUAN e KABACK, 2006; SAHIN-TOTH et al., 2000; SORGEN et al., 2002; VENKATESAN e KABACK, 1998). O transporte ativo de lactose mediado por esta permease é um sistema de co-transporte com H^+ (um simporte lactose- H^+) que utiliza o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana para transportar lactose contra um gradiente de concentração. Vários trabalhos têm analisado e identificado os resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade de transporte, na ligação do H^+ ou na especificidade do açúcar a ser transportado pela permease LacY (KABACK, 1997; SAHIN-TOTH et al., 2000; VENKATESAN e KABACK, 1998).

Dados bioquímicos de inibição da atividade de transporte por agentes mercuriais, que causam a alquilação das cisteínas expostas, indicavam que estes resíduos de aminoácidos estariam possivelmente envolvidos na ligação da lactose e/ou do H^+ . Entretanto, a análise por mutagênese sítio-dirigida dos 8 resíduos de cisteína presentes nos segmentos transmembrana revelou que nenhuma cisteína estava envolvida na ligação dos substratos, mas provavelmente elas cumprem papéis estruturais na proteína (FRILLINGOS et al., 1998). Na verdade, os dados obtidos com extensos estudos desta permease indicam que Glu-269 (TM-VIII), Arg-302 (TM-IX), e His-322 e Glu-325 (TM-X) seriam os aminoácidos responsáveis pelo transporte do H^+ acoplado ao co-transporte de lactose. Por outro lado, os resíduos envolvidos na ligação do açúcar estariam localizados no TM-IV (Glu-126) e TM-V (Arg-144)

(ABRAMSON et al., 2003a, 2003b; FRILLINGOS et al., 1998; GUAN et al., 2002; GUAN e KABACK, 2006; SAHIN-TOTH et al., 2000; VENKATESAN e KABACK, 1998).

A determinação da estrutura de LacY por difração de raios-X confirmou a maioria desses dados, obtidos anteriormente por mutagênese sítio-dirigida e/ou estudos bioquímicos e biofísicos, o que mostra a relevância desses estudos para a compreensão das interações locais que ocorrem durante o transporte. Do mesmo modo, a estrutura tridimensional não providencia informações sobre a dinâmica dessas proteínas durante o transporte, então, o uso de técnicas de biologia molecular, para construir proteínas de membrana modificadas para estudos bioquímicos e biofísicos sobre a dinâmica do processo, se torna extremamente necessário (GUAN e KABACK, 2006; MIRZA et al., 2006). Assim, tanto as técnicas bioquímicas e moleculares bem como a análise de cristais por difração de raios-X, são abordagens necessárias para a compreensão do mecanismo de transporte promovido por estas permeases.

Embora muitos aspectos ainda não estejam claros quanto ao mecanismo de transporte, Kaback e seu grupo propuseram o mecanismo de transporte de acesso alternante para a LacY (suportado também pelas outras duas estruturas resolvidas de membros da MFS, GlpT e EmrD), no qual a proteína é submetida a mudanças conformacionais de forma que o sítio de ligação do substrato é alternativamente acessível para um lado da membrana e para outro, mas não para ambos os lados simultaneamente (ABRAMSON et al., 2003a; GUAN e KABACK, 2006; HUANG et al., 2003; LOCHER et al., 2003; MIRZA et al., 2006; YIN et al., 2006). Resumidamente, no caso de LacY, na presença de ligantes apropriados, resíduos críticos da permease adotam diferentes conformações que alteram a orientação do transportador para a conformação com a face voltada para o interior (inward-facing), ou com a face voltada para o exterior (outward-facing), como mostrado na Figura 1.2.

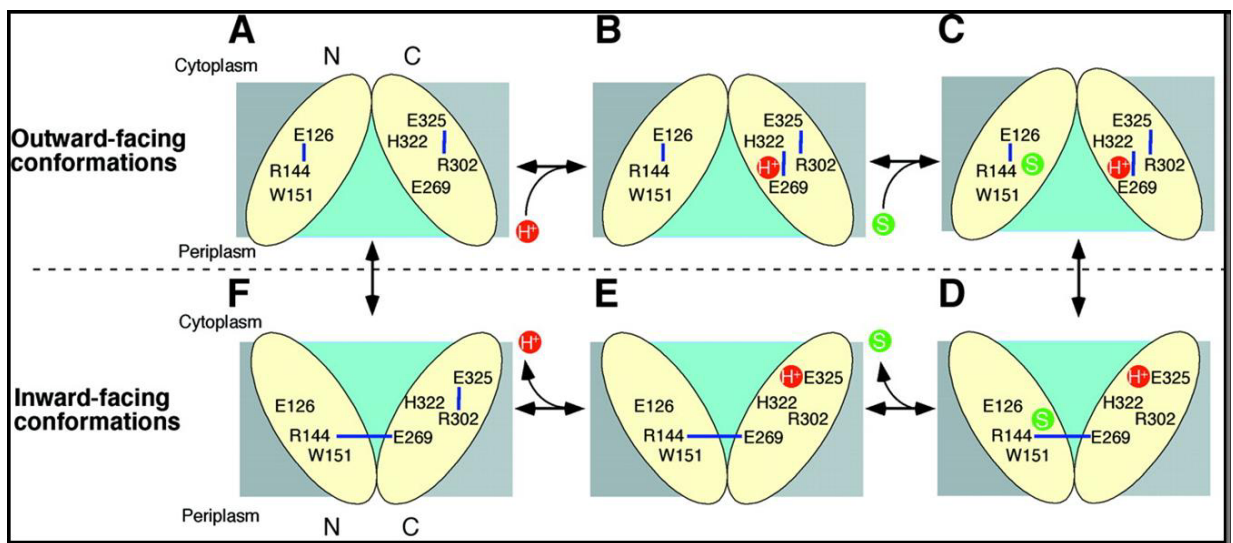


Figura 1.2 Mecanismo proposto para o simporte lactose-H⁺ mediado pela permease LacY. Figura extraída de Abramson et al. (2003a). Resíduos importantes estão representados na figura; pontes salinas são mostradas como linhas azuis; círculos vermelhos e verdes são, respectivamente, o próton e o substrato; e a cavidade hidrofílica é representada pela área azul clara. (A) Na conformação voltada para o exterior, LacY deve ser instável e Glu-269 deve ser rapidamente protonado (B); o substrato é reconhecido por Trp-151, Arg-144 e Glu-126 (C), promovendo a quebra da ponte salina entre Arg-144 e Glu-126 e a formação de uma nova ponte salina entre Arg-144 e Glu-269 (que libera o próton), formando o sítio de ligação do substrato e provocando a transição conformacional para a orientação da face voltada para o interior (D); o substrato é então liberado para dentro do citoplasma (E); a seguir o próton é liberado e as pontes salinas são restabelecidas (F) promovendo a mudança da conformação da proteína para a orientação com a face voltada para o exterior (A).

Como citado anteriormente, outro transportador com estrutura resolvida é a permease GlpT, que transporta glicerol-3-fosfato para dentro do citoplasma e fosfato inorgânico para o periplasma (antiporte glicerol-P_i). Segundo Huang et al. (2003), GlpT opera com um simples sítio de ligação, através do mecanismo de acesso alternante, no qual apenas duas argininas (Arg-45, no TM I, e Arg-269, no TM VII) estão envolvidas na translocação do substrato. Este mesmo mecanismo de transporte é suposto para o transportador EmrD (YIN et al., 2006), porém esta permease difere significativamente de LacY e GlpT por apresentar uma cavidade interna hidrofóbica, com vários resíduos aromáticos e com cadeias laterais volumosas, o que condiz com sua função de transportar compostos hidrofóbicos através do antiporte com prótons. Para esta proteína, os resíduos críticos para o processo ainda não foram identificados, mas supõe-se que alguns resíduos de arginina, tirosina, triptofano e fenilalanina, encontrados ao longo da cavidade interna, poderiam estar envolvidos com o reconhecimento e especificidade do substrato, enquanto resíduos de glutamato e aspartato, na porção próxima ao periplasma, poderiam participar da translocação do H⁺.

Apesar da baixa identidade entre as seqüências de LacY, GlpT e EmrD e do mecanismo de ação parecer diferente por causa da forma de transporte (antiporte ou simporte), observa-se que as estruturas mostram dobras muito similares. Interessantemente, isto sugere a possibilidade de que as dobras desses transportadores constituem um arcabouço para todos os transportadores da superfamília MFS com 12 hélices (VARDY et al., 2004). Assim, a especificidade funcional deve ser obtida por diferentes conjuntos de resíduos de aminoácidos nos domínios de translocação e ligação do substrato.

A identificação de resíduos de aminoácidos importantes para a atividade de transporte e/ou especificidade pelo substrato de outras proteínas transportadoras da MFS já foram alvos de inúmeros estudos. Como exemplo, podemos citar Arg-126, Gln-161, Val-165 e Trp-388 do transportador Glut1 humano (MUECKELER et al., 1994; MUECKLER e MAKEPEACE,

1999; SALAS-BURGOS et al., 2004); Gln-179, Gln-298 e Val-433 nos simportes H⁺-hexoses de *Chlorella* (WILL et al., 1994); Asp-129, Arg-147, Glu-270, Arg-300, His-320 e Glu-323 do transportador de sacarose CscB de *E. coli* (VADYVALOO et al., 2006); ou Asp-41, Asp-44, Arg-124 e Arg-328 da permease PcaK de *Pseudomonas putida*, que catalisa um simporte hidroxibenzoato-H⁺ (DITTY e HARWOOD, 2002). A característica mais significativa que pode ser deduzida das análises mencionadas acima é que os transportadores do tipo simporte com H⁺ possuem aminoácidos com grupos funcionais ionizáveis (p. ex. ácido glutâmico, ácido aspártico, histidina) no meio dos domínios transmembrana, indicando que estes aminoácidos seriam os responsáveis pela ligação do próton durante o processo de transporte (vide, por exemplo, DITTY e HARWOOD, 2002).

Saccharomyces cerevisiae é um microrganismo amplamente utilizado nas indústrias de produção de álcool combustível, panificação e bebidas alcoólicas, pela sua extraordinária capacidade de fermentar uma grande variedade de açúcares, mesmo na presença de oxigênio. Além disso, as células de *S. cerevisiae* constituem um excelente modelo experimental de estudo de biologia celular, molecular e bioquímica de células eucarióticas (BOTSTEIN e FINK, 1988; CAVALIERI et al., 2003; INGLEDEW, 1993; LANDRY et al., 2006).

A utilização dos açúcares pelas leveduras envolve inicialmente o seu transporte para o interior da célula (LAGUNAS, 1993). No caso dos monossacarídeos glicose e frutose, a captação para o interior da célula ocorre pelo processo de difusão facilitada. Já foram descritos mais de 20 genes envolvidos no transporte de hexoses (*HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3*, *RGT2*), diferindo uns dos outros pela afinidade, função e regulação. Sabe-se que os genes *HXT1-7* codificam as principais permeases responsáveis pelo transporte de hexoses (glicose, frutose e manose), sendo que possuem afinidades menores pela frutose e manose do que pela glicose, motivo pelo qual este último carboidrato é captado mais rapidamente. Já o gene *GAL2* codifica para um transportador de galactose e glicose, porém induzido apenas pela

galactose. Enquanto que os genes *SNF3* e *RGT2* codificam proteínas transmembranas que funcionam como sensores de glicose extracelular, envolvidos na regulação da expressão dos outros genes *HXT* (JOHNSTON e KIM, 2005; LAGUNAS, 1993; OZCAN e JOHNSTON, 1999; VAN BELLE e ANDRE, 2001; WIECZORKE et al., 1999).

Informações estruturais de alta resolução para os transportadores Hxt ainda não estão disponíveis, porém alguns sítios estruturais relacionados à função de transporte foram investigados por mutagênese sítio-dirigida e construção de permeases quiméricas. Tais estudos revelaram alguns aspectos sobre a atividade de transporte, como por exemplo, que no transportador Hxt2 os TMs 1, 5, 7 e 8 são requeridos para a atividade de alta afinidade, e que o TM 10 está envolvido com o reconhecimento da glicose. Análises mais detalhadas revelaram que Phe-431 é importante para o reconhecimento do substrato, e Leu-201, Cys-195 e Phe-198 estão envolvidos com o transporte de alta afinidade pelo açúcar (KASAHARA et al., 1996; KASAHARA e KASAHARA, 2003; KASAHARA e MAEDA, 1998).

A levedura *S. cerevisiae* é também capaz de utilizar e fermentar uma série de α -glicosídeos, incluindo maltose, trealose, maltotriose e sacarose. No caso destes açúcares existe vários genes codificando para proteínas transportadoras, entre eles *MALxT*, *AGT1*, *MPH2* e *MPH3* (CHENG e MICHELS, 1991; DAY et al., 2002; HAN et al., 1995). Os transportadores de α -glicosídeos de *S. cerevisiae* são H^+ -simporters (STAMBUK et al., 1996, 1999) que apresentam ampla homologia ao nível de seqüência, mas possuem especificidade pelo substrato distintas. Os genes *MALxT* codificam para transportadores de alta afinidade (K_m 2-5 mM) para maltose, mas baixa afinidade (K_m 90-120 mM) para trealose e sacarose, não sendo aparentemente capazes de transportar maltotriose ou α -metilglicosídeo (STAMBUK et al., 2000; STAMBUK e DE ARAUJO, 2001). Já o gene *AGT1* codifica para uma permease com alta afinidade para trealose e sacarose ($K_m \sim 7$ mM) e baixa afinidade (K_m 20-50 mM) para maltose, maltotriose e α -metilglicosídeo (STAMBUK et al., 2000;

STAMBUK e DE ARAUJO, 2001). As permeases codificadas pelos genes *MPH2* e *MPH3*, localizados em cromossomos diferentes embora apresentem alta homologia, foram descritos como transportadores de alta afinidade (K_m 5-7 mM) para maltose e maltotriose (DAY et al., 2002). Recentemente, outro transportador de α -glicosídeos isolado a partir de leveduras Lager (uma levedura híbrida entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus* utilizada em cervejaria e denominada de *S. pastorianus*) foi caracterizado funcionalmente por dois grupos de pesquisa, e é aparentemente capaz de transportar maltose e maltotriose (DIETVORST et al., 2005; SALEMA-OOM et al., 2005).

Todos estes genes (principalmente *MALxT* e *AGT1*) encontram-se amplamente distribuídos em cepas de leveduras industriais (cepas de panificação, cervejaria, etc) já que estes processos utilizam α -glicosídeos como principais substratos a serem fermentados (JESPERSEN et al., 1999). Inclusive, a atividade destes transportadores ativos constitui um dos fatores limitantes na fermentação de maltose (KODAMA et al., 1995; WEUSTHUIS et al., 1993), trealose (MALLUTA et al., 2000), maltotriose (ALVES-JR, 2005; ZASTROW et al., 2001) ou sacarose (BATISTA et al., 2004; STAMBUK et al., 2000) pela levedura *S. cerevisiae*.

A utilização de maltose e maltotriose pela levedura envolve seu transporte ativo para o interior da célula e posterior hidrólise pela ação da maltase (α -glicosidase), liberando moléculas de glicose que serão metabolizadas até etanol pela glicólise (HAN et al., 1995; LAGUNAS, 1993; NOVAK et al., 2004; STAMBUK et al., 1998, 1999, 2000). Extensos estudos bioquímicos e genéticos foram realizados sobre a metabolização da maltose por leveduras. Para que ocorra a fermentação da maltose é necessário que a levedura apresente no mínimo um dos cinco loci *MAL* encontrados em diferentes regiões teloméricas: *MAL1* (cromossomo VII), *MAL2* (cromossomo III), *MAL3* (cromossomo II), *MAL4* (cromossomo XI) e *MAL6* no cromossomo VIII (JESPERSEN et al., 1999; KODAMA et al., 1995). Cada

locus contém três genes (Figura 1.3): *MALxS* que codifica para a maltase, *MALxT* que codifica para o transportador de maltose e *MALxR* que codifica uma proteína reguladora que interage com a região promotora UAS_{MAL} , induzindo a expressão dos genes *MALxS* e *MALxT* na presença de maltose no meio (NOVAK et al., 2004). Além desses loci *MAL*, existem ainda pelo menos três tipos de loci *MAL* parcialmente funcionais (*malp*, *malg* e *mal⁰*), sendo que as cepas incapazes de fermentar maltose geralmente apresentam algum destes loci. O locus *malp* contém apenas o gene regulador *MALx3*, o locus *malg* contém apenas os genes para o transportador de maltose e para a α -glicosidase (*MALx1* e *MALx2*, respectivamente) e o locus *mal⁰* apresenta apenas o gene para a α -glicosidase (MICHELS et al., 1992). A organização dos genes *MAL* em um cluster é também observada em outras espécies de *Saccharomyces* e em leveduras filogeneticamente distantes como *Torulaspota delbrueckii*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* e *Debaromyces hansenii* (FABRE et al., 2005; VIIGAND et al., 2005; VIIGAND e ALAMÃE, 2007).

Na presença de maltose o regulador Malx3p se liga ao DNA da região promotora UAS_{MAL} induzindo a transcrição das proteínas transportadoras e das α -glicosidases. Por outro lado, na presença de glicose a expressão dos genes *MAL* é inibida pela ativação de proteínas repressoras (p.ex. *MIG1*) que se ligam na região promotora, impedindo a transcrição dos genes *MAL*, ou pela inibição da ativação da proteína reguladora Malx3p através de um mecanismo não bem caracterizado. Além disso, a glicose exerce um controle pós-traducional através da inativação catabólica (fosforilação, ubiquitinação e degradação) dos transportadores de maltose (HORAK, 1997; MEDINTZ et al., 2000; NOVAK et al., 2004; STAMBUK, 2002).

Até o presente momento, poucos dados sobre a estrutura destes transportadores estão disponíveis. Os poucos trabalhos publicados na literatura descrevendo uma análise de transportadores *MALxT* modificados através de mutagênese sítio-dirigida identificaram os

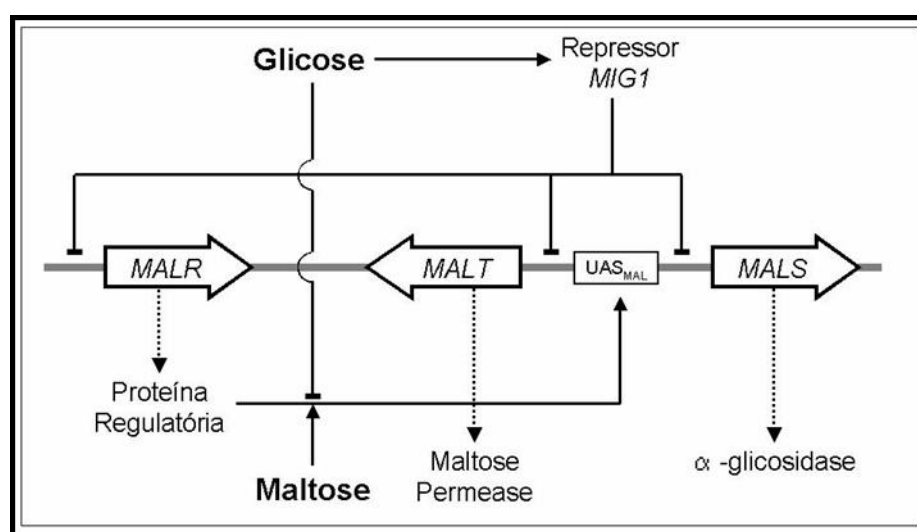


Figura 1.3 Estrutura e regulação dos genes *MAL*. As setas maiores indicam a organização cromossômica de cada gene *MAL* (telômero à direita, centrômero à esquerda), as linhas pontilhadas indicam os produtos da transcrição e tradução de cada gene, a linha contínua com seta indica indução e as linhas contínuas com pontas rombas indicam repressão (adaptado de STAMBUK, 1999).

resíduos de aminoácidos envolvidos na regulação (inativação) da permease. Desta forma foi possível identificar 3 resíduos (Ser-295, Tre-363 e Ser-487) que aparentemente seriam fosforilados durante a inativação catabólica do transportador (BRONDIJK et al., 1998). Mais recentemente, Medintz et al. (2000) identificaram uma seqüência rica em prolina, glutamato, aspartato, serina e treonina (seqüência PEST) no domínio citoplasmático N-terminal, envolvida na inativação dos transportadores de maltose pela glicose. De fato, Gadura e Michels (2006) mostraram que tanto a seqüência PEST como um motivo dileucina, presentes no domínio N-terminal, são importantes para o correto direcionamento das proteínas internalizadas (via endocitose) para o vacúolo, onde serão degradadas, sendo que permeases portando mutações nesses resíduos são resistentes à proteólise, mas não à internalização induzida pela glicose.

Em relação à maltotriose, as informações não são tão detalhadas sobre a sua utilização pelas leveduras quanto para a maltose. Ao analisarem alelos naturais do transportador de maltose presentes em locus *mal1g*, Han et al. (1995) caracterizaram um gene que passou a ser chamado *AGT1* (*α -glucoside transporter*), responsável pelo transporte ativo (através do simporte com prótons) de uma série de α -glicosídeos, incluindo maltose, maltotriose, sacarose, trealose, α -metilglicosídeo e turanose. Este gene é aparentemente regulado pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos demais genes *MAL*, uma vez que possui uma seqüência UAS_{MAL} na sua região promotora (HAN et al., 1995; STAMBUK et al., 1998, 1999, 2000; STAMBUK e DE ARAUJO, 2001). Embora a permease *Agt1p* seja também regulada por inativação catabólica (HOLLATZ e STAMBUK, 2001), este transportador não possui a região PEST no domínio N-terminal (DAY et al., 2002) e apenas dois possíveis sítios de fosforilação (Ser-301 e Tre-369) estão conservados.

Recentemente, transportadores de α -glicosídeos encontrados em outras espécies de *Saccharomyces* e em diferentes microrganismos estão sendo estudados. Por exemplo, em *T.*

delbrueckii foi encontrado o gene *TdMAL11*, que codifica para um transportador de maltose de alta-afinidade (ALVES-ARAÚJO et al., 2004). Viigand e Alamae (2007) mostraram que *H. polymorpha* apresenta um transportador de α -glicosídeos, codificado pelo gene *HpMAL2*, com afinidade pela maltose, maltotriose, sacarose e turanose; encontrado em um locus *MAL* com similar organização aos de *S. cerevisiae*, sendo que sua expressão é induzida na presença de maltose ou sacarose e reprimida por glicose. A permease Mty1p foi identificada em *S. pastorianus* (SALEMA-OOM et al., 2005), exibindo uma maior afinidade para maltotriose do que maltose e sendo incapaz de transportar sacarose e α -metil glicosídeo. Estas mesmas características foram também identificadas para o gene *MTT1* (DIETVORST et al., 2005).

Apesar da importância das proteínas transportadoras de açúcares na levedura *S. cerevisiae* para os inúmeros processos fermentativos em que estão envolvidas, pouco se conhece a cerca de sua estrutura e, portanto, ainda não foram identificados quais aminoácidos estariam envolvidos na atividade de transporte, na ligação do próton ou na especificidade pelo(s) substrato(s). Deste modo, uma melhor compreensão do transporte ativo de α -glicosídeos pela levedura, fornecendo as bases moleculares do processo, é de extrema relevância para o desenvolvimento de estratégias que permitam a otimização dos processos fermentativos industriais. Estes dados poderão inclusive permitir a obtenção de permeases mutantes com especificidade e/ou propriedades cinéticas incrementadas (vide, por exemplo, LU e BUSH, 1998). As informações obtidas certamente permitirão identificar interações entre domínios ou seqüências transmembrana, fornecendo importantes dados sobre a estrutura terciária que a proteína transportadora adota no ambiente lipídico da membrana.

2 Justificativa e Objetivos

Saccharomyces cerevisiae é o principal microrganismo utilizado em processos biotecnológicos devido a sua capacidade de fermentar diferentes açúcares. Enquanto que na cervejaria e panificação os principais açúcares são maltose e maltotriose, no mosto utilizado nas destilarias para produção de bebidas alcoólicas e álcool combustível o açúcar majoritário é a sacarose. Assim, a eficiente utilização desses α -glicosídeos pela levedura requer o transporte ativo para o interior da célula e posterior hidrólise pela α -glicosidase. Até o momento foram identificados vários genes que codificam para transportadores de α -glicosídeos em *S. cerevisiae*, sendo que a permease codificada pelo gene *AGTI* é capaz de transportar o maior número de diferentes α -glicosídeos, incluindo maltose, trealose, sacarose, maltotriose e α -metil glicosídeo.

No intuito de iniciar uma análise estrutural do transportador Agt1p e melhor compreender os detalhes moleculares da atividade de transporte, investigamos os resíduos de aminoácidos da permease envolvidos na ligação do H^+ e/ou especificidade pelo substrato durante o transporte ativo de α -glicosídeos pela levedura. Com este propósito, pretendíamos:

- Identificar *in silico* possíveis resíduos de aminoácidos envolvidos no simporte açúcar- H^+ mediado pela permease Agt1p;
- Substituir os possíveis resíduos presentes nos segmentos transmembrana da permease através de mutagênese sítio-dirigida;
- Analisar a utilização de maltotriose (crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol) pela cepa portando as permeases mutadas ou a Agt1p normal;
- Determinar a atividade de co-transporte de H^+ com diferentes α -glicosídeos das permeases construídas;
- Propor um mecanismo para o transporte ativo de α -glicosídeos realizado pela Agt1p.

3 Material e Métodos

3.1 Cepas utilizadas

Os genótipos das cepas de *Escherichia coli* e de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho estão detalhados na Tabela 3.1. A cepa de *E. coli* DH5 α -T1 (Invitrogen) foi utilizada para armazenar e replicar os plasmídeos, incluindo a obtenção dos genes *AGT1* mutantes. A cepa de *S. cerevisiae* LCM003 foi usada para analisar os mutantes na permease Agt1p. Esta cepa foi obtida neste laboratório a partir da linhagem de laboratório CENPK2-1C, através da deleção do gene *AGT1* por recombinação homóloga utilizando-se o gene de resistência à Geneticina, conforme descrito por Batista et al. (2004). A cepa CENPK2-1C foi obtida da EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis) e descrita por Entian e Kötter (1998).

Tabela 3.1 Genótipo das cepas utilizadas

Cepa	Genótipo
<u><i>Escherichia coli</i></u> DH5 α -T1	<i>F- recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK-mK+) supE44 relA1 Δ(lacZYA- argF) U169 ϕ80 lacZ ΔM15 phoA tonA</i>
<u><i>Saccharomyces cerevisiae</i></u> CENPK2-1C	<i>MATa MAL21 MAL22 MAL23-8^C AGT1 ura3-52 his3Δ1 leu2-3 112 trp1-289</i>
LCM003	Isogênica a CENPK2-1C, mas <i>agt1::kan^r</i>

3.2 Meios de cultura

As leveduras foram crescidas em meio rico (YP) contendo 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona, suplementado com 20 g/L da fonte de carbono de interesse (glicose, maltose ou maltotriose) ou em meio sintético (SC) contendo 6,7 g/L de base nitrogenada sem aminoácidos (Difco), 20 g/L da fonte de carbono e 1,92 g/L de suplemento

de aminoácidos e bases nitrogenadas necessários ao crescimento das células, mas isento de uracila (Ura drop-out supplement, Sigma). Quando necessário foi adicionado aos meios 20 g/L de agar (meios sólidos), 40 mg/L de adenina (meios usados na transformação das leveduras) ou 200 µg/mL de Geneticina (Sigma), seguindo recomendações da literatura (SHERMAN, 2005). Os meios tiveram seu pH ajustado para pH 5,0 com ácido clorídrico e foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos.

Para o crescimento das bactérias foi utilizado o meio Luria-Bertani, pH 7,5 ajustado com NaOH, esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos, contendo 100 µg/mL de Ampicilina quando requerido (MANIATIS et al., 1982).

3.3 Condições de crescimento

Para o pré-cultivo, as células foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio líquido e incubadas por 48 horas em temperatura ambiente, sob agitação de 40 rpm em uma incubadora giratória para tubos de ensaio (DIST – 431).

Uma alíquota do pré-cultivo foi transferida para erlenmeyers contendo 1/5 do volume de meio líquido, sendo a cultura mantida em uma incubadora orbital de frascos (Nova Ética 430) a 28°C e 160 rpm. A partir de alíquotas coletadas em intervalos de tempo pré-determinados, foi analisado o crescimento celular através da densidade óptica (DO_{570nm}) medida em espectrofotômetro (Beckman DU-7) e os sobrenadantes obtidos por centrifugação a 3.000 g por 3 minutos foram armazenados a -20 °C para posterior análise.

3.4 Quantificação de glicose, etanol e α -glicosídeos

Amostras das culturas de células, retiradas em tempos pré-determinados, foram centrifugadas e os sobrenadantes utilizados na determinação de etanol e consumo de glicose e α -glicosídeos.

3.4.1 Determinação de glicose

A concentração de glicose foi determinada através do método enzimático da glicose oxidase/peroxidase, utilizando um kit comercial (BioTécnica). As análises foram realizadas seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 505 nm. A concentração de glicose foi determinada correlacionando a absorbância apresentada pela amostra com a absorbância apresentada por uma solução padrão de glicose 0,1% (1 g/L).

3.4.2 Determinação de maltose ou maltotriose

Maltose e maltotriose foram determinadas colorimetricamente através da reação com metilamina, em pH alcalino, conforme Cáceres et al. (1999) e Hollatz e Stambuk (2001). Um volume de 600 µL (amostra + água) foi incubado com 300 µL de NaOH 1M e 300 µL de metilamina 1%, a 100 °C por 5 minutos. Através de espectrofotometria a 540 nm, a concentração de açúcar foi determinada, correlacionando a absorbância apresentada pela amostra com a equação de reta extraída de uma curva padrão construída a partir de uma solução de maltose ou maltotriose 2 %.

3.4.3 Determinação de etanol

O etanol foi determinado através da reação com as enzimas álcool oxidase e peroxidase como descrito por Herberts (2006), adaptado dos protocolos descritos por Salgado et al. (2000) e Rodionov et al. (2002). Uma alíquota de 10 µL das amostra foi incubada em placas de ELISA (96 orifícios de fundo plano) com 200 µL de reagente enzimático contendo 0,5 U/mL de álcool oxidase (AOD, de *Pichia pastoris*, Sigma), 4 U/mL de peroxidase (POD, de raiz-forte, Toyobo, Brasil), 14 mM de aminoantipirina e 60 mM de fenol em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,5). Após incubação de 1 hora a 37 °C, determinou-se a

absorbância em 415 nm utilizando um leitor para placas de ELISA (TECAN SUNRISE). A concentração de etanol foi determinada pela correlação da absorbância apresentada pela amostra com a equação de reta extraída de uma curva padrão, construída com soluções padrão de etanol (0-10 g/L).

3.5 Determinação do transporte ativo de açúcares pela permease Agt1p

O transporte ativo e a cinética de captação de açúcares foram determinados através do co-transporte de H^+ com cada α -glicosídeo, como descrito por Stambuk et al. (1996, 1998, 1999, 2000) e Stambuk e De Araujo (2001). As células, crescidas em meio mínimo contendo 20 g/L de maltose, foram centrifugadas e ressuspensas em água de modo a atingirem uma concentração celular de 15 g/L. Após ajustar o pH dessa suspensão celular para 5,0, em um recipiente com temperatura controlada (30 °C), a reação foi iniciada pela adição de diferentes concentrações do açúcar de interesse (maltose, maltotriose, sacarose, trealose ou α -metil glicosídeo), o que ocasionou mudanças no pH. Essas alterações foram monitoradas em um pHmetro PHM84 acoplado a um registrador gráfico TT1 (ambos da Radiometer). As atividades de transporte foram calculadas a partir da inclinação da curva (transcorridos 10 segundos) obtida no registrador, provocada pelo influxo de prótons para o interior das células (co-transporte açúcar- H^+).

Alternativamente, a atividade da permease Agt1p foi avaliada colorimetricamente, utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*NP α G) como descrito em Hollatz e Stambuk (2001) e Stambuk et al. (2000). Depois de crescidas em meio mínimo com maltose, as células foram centrifugadas, lavadas com água e ressuspensas de modo a atingirem a concentração celular de 20 g/L. Um volume de 100 μ L dessa suspensão foi adicionado a 100 μ L do substrato de transporte (100 mM Tris-succinato pH 5,0; contendo 10 mM de *p*NP α G) e incubado à temperatura ambiente por 5-10 minutos. A reação foi

interrompida pela adição de 1 mL de bicarbonato de sódio 2 M (pH >9,0). A seguir as células foram centrifugadas (12.000 g por 3 minutos) e o *p*-nitrofenol liberado no sobrenadante estimado a 400 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os controles negativos, com células previamente fervidas, em duplicata. As atividades de transporte foram expressas em nmoles (H⁺ captado ou *p*-nitrofenol liberado) por mg⁻¹ de células (peso seco) por min⁻¹.

3.6 Determinação da atividade da α -glicosidase

A atividade da α -glicosidase foi determinada utilizando-se células permeabilizadas, como descrito por Stambuk (1999). As células foram crescidas em meio mínimo com maltose como fonte de carbono, centrifugadas, lavadas com água e ressuspensas de modo a atingirem a concentração celular de 20 g/L. Em seguida, aproximadamente 2 mg de células foram lavadas em 0,5 mL de tampão 100 mM MOPS-NAOH pH 6,8 (tampão A) e ressuspensas em 200 μ L do mesmo tampão contendo 20% de glicerol, 1 mM EDTA e 1 mM DTT (tampão B). Para permeabilizar as células, foram adicionados 12 μ L de uma solução de tolueno/etanol/10% triton X-100 em água (1:4:1; v/v) e os tubos foram vigorosamente vortexados durante 1 minuto. Após centrifugação, as células foram lavadas com o tampão B e ressuspensas em 1 mL de tampão A. Um volume de 50 μ L da suspensão celular foi adicionado a 950 μ L de uma solução 2 mM de *p*NP α G ou, alternativamente, 40 μ L de células foram adicionados a 60 μ L de uma solução 200 mM de maltose ou maltotriose.

Essas amostras foram incubadas a 30 °C por 1 minuto (para as determinações com *p*NP α G) ou 5 minutos (para as amostras com carboidratos), fervidas a 100 °C por 5 minutos e centrifugadas. Os sobrenadantes foram utilizados para determinar a atividade enzimática através da determinação do *p*-nitrofenol liberado com a hidrólise do *p*NP α G ($A_{400\text{nm}}$) e através da determinação da glicose formada pela hidrólise da maltose ou maltotriose. Todas as

determinações foram realizadas em triplicata e os controles negativos, com células previamente fervidas, em duplicata. A atividade da α -glicosidase é expressa em nmoles de glicose ou *p*-nitrofenol produzidos por mg^{-1} de células (peso seco) por min^{-1} .

3.7 Técnicas de manipulação do DNA

As manipulações de DNA, incluindo eletroforese, transformação de bactérias, digestão com enzimas de restrição e outras técnicas, foram realizadas segundo metodologias padrão descritas em Ausubel et al. (1992).

3.7.1 Plasmídeos

O plasmídeo centromérico pGRSd-AGT1 (*CEN6 amp^r URA3 AGT1*), vide Figura 3.1, foi utilizado como DNA molde na construção dos genes *AGT1* mutantes e usado na transformação da cepa LCM003 para análise da atividade de transporte da permease. Esse plasmídeo contém o promotor GPD do gene *TDH3* (que codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), garantindo a sobre-expressão constitutiva do gene *AGT1* (JULES et al., 2004). Quando requerido, a linhagem LCM003 foi transformada também com o plasmídeo pGRSd (*CEN6 amp^r URA3*) sem o gene *AGT1*.

Para a construção do módulo de fusão de *GFP* no gene *AGT1* foi utilizado o plasmídeo pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 (*Amp^r ori GFP(S65T)-T_{ADHI}-P_{TEF}-kan^r-T_{TEF}*), contendo o gene *kan^r* que confere resistência à Geneticina (LONGTINE et al., 1998; PETRACEK e LONGTINE, 2002).

3.7.2 Transformação de bactérias

Para preparar células competentes, uma colônia isolada de DH5 α T1 foi crescida em 3 mL de meio LB, *overnight* a 37 °C e 160 rpm. Uma alíquota de 500 μL do pré-inóculo foi

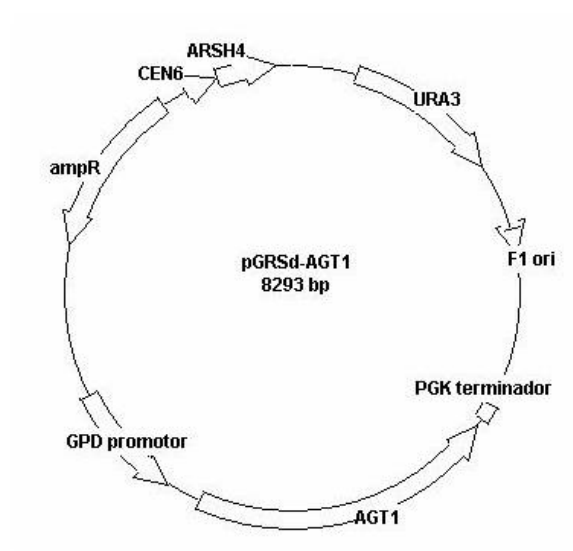


Figura 3.1 Desenho esquemático do plasmídeo pGRSd-AGT1. O plasmídeo pGRSd-AGT1 possui o gene *AGT1* sob controle do promotor forte *GPD*, o marcador auxotrófico *URA3*, além de origens de replicação para bactérias (F1 ori) e leveduras (ARSH4).

para 50 mL de meio LB e incubada a 37 °C e 160 rpm até uma $D.O._{600nm} = 0,6$. A cultura foi centrifugada, lavada duas vezes com uma solução de 10 mM Pipes contendo 60 mM $CaCl_2$ e 15% de glicerol, ressuspensa nesta mesma solução e aliqotada em tubos eppendorf estéreis para armazenamento em freezer a -80 °C.

No momento da transformação foi adicionado às células competentes 2 µL do plasmídeo de interesse. Esta mistura foi mantida por 10 minutos no gelo, e após este tempo, foi incubada por 2 minutos em banho a 42 °C. Depois do choque térmico, foi adicionado meio LB e as células foram incubadas por 1 hora a 37 °C e 160 rpm. Posteriormente, as células foram centrifugadas, ressuspensas em meio LB e plaqueadas no mesmo meio sólido contendo Ampicilina.

3.7.3 Extração de plasmídeos de bactérias

Uma colônia da bactéria contendo o plasmídeo desejado foi inoculada em meio LB líquido contendo Ampicilina, incubada *overnight* a 37 °C e 160 rpm. A cultura foi centrifugada (5000 g, 3 min), ressuspensa em 100 µL de solução GTE contendo 50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA e 1 µL de RNase A (1 mg/mL), e mantida em temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 200 µL de uma solução 0,2 M NaOH/ 1% SDS e 150 µL de Acetato de Potássio 5 M. Após incubação no gelo, essa mistura foi centrifugada (10.000 g por 5 min) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril, no qual foi acrescentado 800 µL de álcool 95%. O DNA foi precipitado por centrifugação (12.000 g por 10 minutos), lavado com álcool 70% e ressuspensa em tampão TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 8,0). Os plasmídeos foram armazenados sob refrigeração a -20 °C.

3.7.4 Hidrólise de plasmídeos

A reação de hidrólise dos plasmídeos foi preparada adicionando-se o plasmídeo, num volume final de 5 μ L, a 1 μ L do tampão específico para a enzima 10x concentrado, 0,5 μ L da enzima de restrição e 3,5 μ L de água. Essa mistura foi incubada por 1 hora a 37 °C e o seu padrão de restrição foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1%, para observação dos fragmentos de DNA esperados para cada mutação no gene *AGTI*.

3.7.5 Eletroforese

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5x (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0) contendo 2,5 μ g/mL de Brometo de etídio. Depois de solidificado o gel, foram aplicadas as amostras de DNA com tampão de corrida 10x concentrado (20% Ficoll 400; 0,1 M EDTA; 1,6% SDS e 0,05% de Azul de bromofenol). A corrida foi realizada em cuba com tampão TBE 0,5x sob voltagem de 100 V. Depois de realizada a corrida, o gel foi analisado sob luz ultravioleta.

3.8 Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras foram transformadas conforme o protocolo descrito por Knop et al. (1999). Uma alíquota de células foi inoculada em 50 mL de meio YP contendo 2% de glicose e suplementado com adenina, e crescidas até atingir uma concentração de aproximadamente 2×10^7 células/mL. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água estéril e uma vez com solução SORB contendo 100 mM acetato de lítio, 10 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM de EDTA-NaOH e 1 mM sorbitol. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 360 μ L da mesma solução SORB e 40 μ L de SS DNA carreador 10 mg/mL (previamente desnaturado a 100 °C, por 10 minutos e resfriado em banho de gelo), alíquotadas em frações de 50 μ L e armazenadas a -80 °C. Para cada reação de transformação foram utilizados 50 μ L

destas células competentes, cerca de 2 a 10 μL do DNA de interesse e 360 μL de solução SORB contendo 40% de PEG-3350. Essa mistura foi mantida em temperatura ambiente por 30 minutos, posteriormente foram adicionados 47 μL de DMSO, incubado a 42 °C por 20 minutos, e a seguir as células foram centrifugadas (3000 g por 3 min).

No caso do uso de marcadores auxotróficos para a seleção dos transformantes, as células foram ressuspensas em 200 μL de água estéril e plaqueadas em meio sintético sem uracila, contendo glicose como fonte de carbono. Quando o marcador foi o gene de resistência à Geneticina, as células foram ressuspensas em meio rico YP contendo 2% de glicose e mantidas por 3 h a 28 °C com agitação. Após esta incubação, as células foram centrifugadas, ressuspensas em 200 μL de água estéril e inoculadas em placas contendo meio sólido YP com 2% de glicose, acrescido de 200 $\mu\text{g/mL}$ de Geneticina. As placas de cultura foram incubadas a 28 °C até o aparecimento de colônias que foram purificadas e a seguir analisadas.

3.9 Mutagênese sítio-dirigida

Os aminoácidos de interesse na permease Agt1p foram modificados por mutagênese sítio-dirigida utilizando-se o kit *Gene TailorTM Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen). O plasmídeo pGRSd-AGT1 (Figura 3.1) foi metilado e, então, amplificado por PCR com oligonucleotídeos específicos para cada mutação (Tabela 3.2) que apresentam uma região complementar no final 5' de suas seqüências, e as bases modificadas de forma a mudar o códon do aminoácido correspondente, e ao mesmo tempo inserir um novo sítio de restrição na seqüência, conforme demonstrado na Figura 3.2. O produto resultante da amplificação, DNA fita dupla linear contendo a mutação desejada, foi utilizado para transformar *E. coli* DH5 α -T1. Uma vez que esta cepa é capaz de degradar o DNA metilado, o DNA molde utilizado será degradado, restando apenas as novas seqüências de DNA, portando a mutação de interesse.

As bactérias transformadas foram selecionadas em placas de meio LB agar contendo Ampicilina e os plasmídeos obtidos a partir delas foram testados quanto à presença da mutação desejada no gene *AGT1* através da digestão do DNA com enzimas de restrição cujos sítios foram introduzidos pela mutação. Os mutantes E120A, que têm substituído o ácido glutâmico-120 por uma alanina, apresentam um novo sítio de restrição para a enzima *HpaII*. Os mutantes D123G (substituição do ácido aspártico-123 por uma glicina) apresentam um novo sítio de restrição para *KpnI*, enquanto que o mutante R504A (substituição da arginina-504 por uma alanina) tem introduzido um sítio de restrição para *BstUI*. Além deste método de screening e verificação dos possíveis plasmídeos mutantes através de enzimas de restrição, foi realizado o sequenciamento das regiões de interesse nos genes *AGT1* mutantes para confirmação da seqüência. O sequenciamento foi realizado utilizando-se os primers AGT1-F e AGT1-R.

Depois de confirmadas as mutações, os plasmídeos contendo os diferentes mutantes, bem como o *AGT1* normal e o plasmídeo controle pGRSd, foram utilizados para transformar células competentes da cepa de *S. cerevisiae* LCM003 (a qual é deletada no gene *AGT1*) para avaliar a atividade de transporte de α -glicosídeos pelas permeases.

3.10 Fusão de *GFP* à extremidade C-terminal do *AGT1*

O gene da proteína verde fluorescente (*GFP*) foi fusionado a porção C-terminal do gene *AGT1* por recombinação homóloga e metodologias baseadas em PCR como descrito por Petracek e Longtine (2002). Através de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos AGT1-PFA6-F2 e pGRSd-PFA6-R1 (Tabela 3.2) juntamente com o plasmídeo pFA6-GFP(S65T)-kanMX6, foi produzido um fragmento linear de DNA com ~2,5 kb portando em suas extremidades regiões homólogas à região C-terminal do gene *AGT1* e ao terminador *PGK* localizado após o gene *AGT1* presente no plasmídeo pGRSd-AGT1. Localizados entre essas -

Tabela 3.2 Oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho

Primer	Seqüência* (5'-3')
AGT1-F	ATGAAAAATATCATTTTCATTGG
AGT1-R	TTAACATTTATCAGCTGC
AGT1-E120A-F	TCTACTACCCTGGTTATGG CC GGTTATGATA
AGT1-E120A-R	CATAACCAGGGTAGCAGACACTAATATG
AGT1-D123G-F	CTGGTTATGGAAGGTTATGG T ACCGCACTAC
AGT1-D123G-R	ATAACCTTCCATAACCAGGGTAGTAGAC
AGT1-R504A-F	AAGACTATAGTGCTGGCC CG ATTTGCTACA
AGT1-R504A-R	GGCCAGCACTATAGTCTTAGTTCTCAAC
AGT1-PFA6-F2	CAGTCCTCAAGCATAAAACAGCGAGAATTAATGCAGCTGA TAAATGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
pGRSd-PFA6-R1	CCAATAATTCCAAAGAAGCACCACCAGTAGAGACATGG GGCATAGGCCACTAGTGGATC
V-Kan ^r -R	GGAATCGAATGCAACCGG

*Nucleotídeos modificados pela mutagênese sítio-dirigida visando alterar os códons correspondentes (p.ex. ácido glutâmico 120 por alanina, E120A) estão indicados em negrito, e os nucleotídeos em itálico indicam sítios de restrição introduzidos pela mutação.



Figura 3.2 Desenho esquemático dos oligonucleotídeos utilizados para a mutagênese. Alinhamento dos oligonucleotídeos AGT1-D123G-F e AGT1-D123G-R, mostrando a região complementar (cinza) no final 5' de suas seqüências, o nucleotídeo mutado (negrito) que altera o códon GAT (aspartato) para GGT (glicina), e a nova seqüência de reconhecimento pela enzima de restrição *KpnI* (GGTACC, sublinhado).

extremidades, estão o gene da *GFP*, e o gene *Kan^r* que confere resistência à Geneticina. Esse fragmento, quando inserido nas células de *S. cerevisiae*, integrou-se no plasmídeo pGRSd-AGT1 (ou nos seus derivados contendo as mutações específicas E120A, D123G, e R504A), substituindo o códon de terminação do *AGT1* pelo códon de início da *GFP*. Para isolar as células contendo as modificações esperadas, as cepas foram selecionadas em meio YP sólido contendo 2% de glicose e Geneticina.

Em seguida, as cepas parentais e os transformantes selecionados foram analisados por PCR (Tabela 3.2) com os oligonucleotídeos AGT1-R504A-F (correspondente aos nucleotídeos 1492 a 1522 do gene *AGT1*) e V-Kan^r-R (correspondente aos nucleotídeos 382 a 400 do gene *Kan^r*) permitindo a amplificação de uma banda de aproximadamente 2100 pb nas cepas contendo a correta inserção do módulo de fusão de *GFP* (Figura 3.3), e nenhuma banda nas cepas parentais. Além disso, um controle positivo foi feito amplificando o locus *AGT1* de ambos plasmídeos, sem ou com *GFP*, utilizando os oligonucleotídeos AGT1-F e AGT1-R (dados não mostrados).

3.11 Microscopia de fluorescência

A localização celular da permease Agt1p e das permeases mutantes derivadas foram baseadas na observação, por microscopia de fluorescência, da distribuição dessas proteínas fusionadas a *GFP*, em células vivas de *Saccharomyces cerevisiae*. Células da levedura LCM003 portando o plasmídeo pGRSd-AGT1-GFP ou os mutantes E120A-GFP, D123G-GFP, R504A-GFP, crescidas em maltose, foram centrifugadas e lavadas com água. Amostras das suspensões celulares (5 µL) foram misturadas a um mesmo volume de agarose 1% (pré-aquecida a 60 °C) em lâminas de microscopia, e a análise das células foi realizada em um microscópio de epifluorescência Olympus BX-40FLA com filtros disponíveis para análise da

fluorescência de FITC (485 nm para excitação e 510 nm para emissão) como descrito por Stambuk (2002).

3.12 Reprodutibilidade dos resultados

Os experimentos foram repetidos ao menos duas vezes, sendo que os resultados obtidos foram sempre semelhantes. Resultados representativos foram apresentados. Nas determinações das atividades realizadas em triplicata, são apresentados os valores médios, com os respectivos desvio padrão.

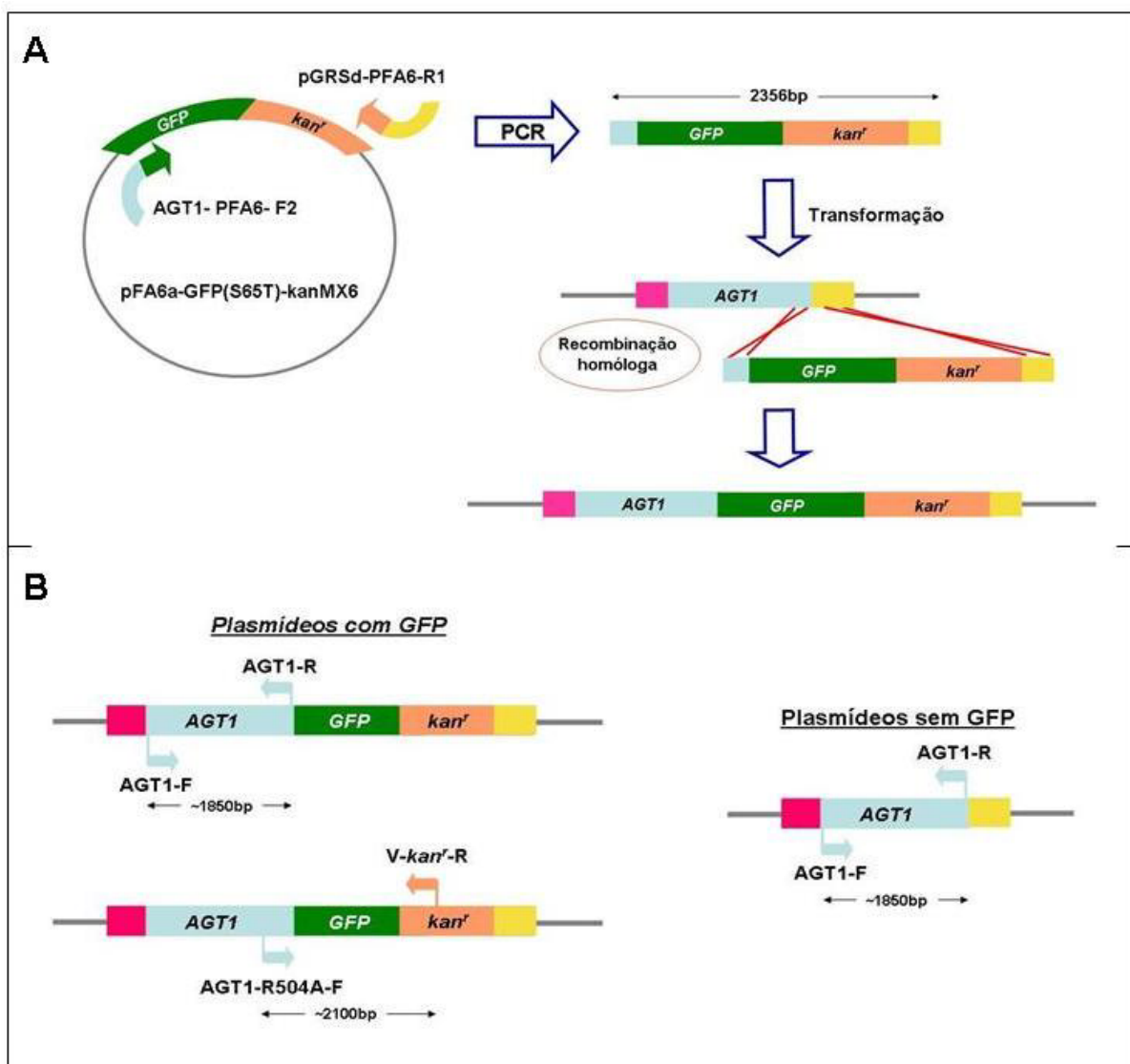


Figura 3.3 Fusão da *GFP* à extremidade C-terminal do *AGT1*. (A) O módulo GFP-KanMX6 obtido por PCR foi utilizado para transformar células competentes da cepa LCM003. Nestas células, o módulo foi integrado corretamente nos plasmídeos pGRSd-*AGT1*, E120A, D123G e R504A por recombinação homóloga. (B) Os oligonucleotídeos V-Kan^r-R, AGT1-R504A-F, AGT1-F e AGT1-R foram utilizados para confirmar a correta integração do módulo GFP-KanMX6 nos plasmídeos.

4 Resultados e discussão

4.1 Análise dos resíduos de aminoácidos envolvidos no simporte açúcar- H^+ da permease codificada pelo gene *AGTI*

A permease Agt1p é membro da superfamília MFS que é formada por um grande grupo de proteínas transportadoras que utilizam o gradiente eletroquímico através da membrana para catalisar o transporte de diversos substratos contra um gradiente de concentração (ANDRÉ, 1995; LAGUNAS, 1993; PAO et al., 1998; SAIER, 2000a). Deste modo, como demonstrado por Han et al. (1995), Stambuk et al. (1998, 1999, 2000) e Stambuk e De Araujo (2001), a proteína Agt1p é responsável pelo transporte ativo, através de um sistema de co-transporte com H^+ (um simporte açúcar- H^+), de diversos α -glicosídeos, incluindo maltose, trealose, sacarose e maltotriose.

Inúmeros trabalhos têm demonstrado que transportadores do tipo simporte com H^+ possuem resíduos de aminoácidos com grupos funcionais ionizáveis presentes nos segmentos transmembrana (p.ex. ácido glutâmico, ácido aspártico, histidina, arginina), indicando que estes resíduos seriam os responsáveis pela ligação do próton durante o processo de transporte, ou que estariam envolvidos no processo de translocação do soluto (ABRAMSON et al., 2003a; DITTY e HARWOOD, 2002; GUAN e KABACK, 2006; HUANG et al., 2003; MUECKELER et al., 1994; MUECKLER e MAKEOEACE, 1999; PINSON et al., 1999; SAHIN-TÓTH et al., 2000; SORGEN et al., 2002).

Analisando a estrutura secundária prevista para o transportador Agt1p, pode-se observar que esta permease possui apenas quatro resíduos de aminoácidos carregados em seus segmentos transmembrana (vide Figura 4.1): Glu-120 e Asp-123 (no TM-I), Glu-167 (no TM-II), e Arg-504 (no TM-XI). Para verificar se esses resíduos mantêm-se conservados em outros transportadores de α -glicosídeos, selecionamos diversas proteínas homólogas ao *AGTI* para comparação das seqüências de aminoácidos através de alinhamento com o programa

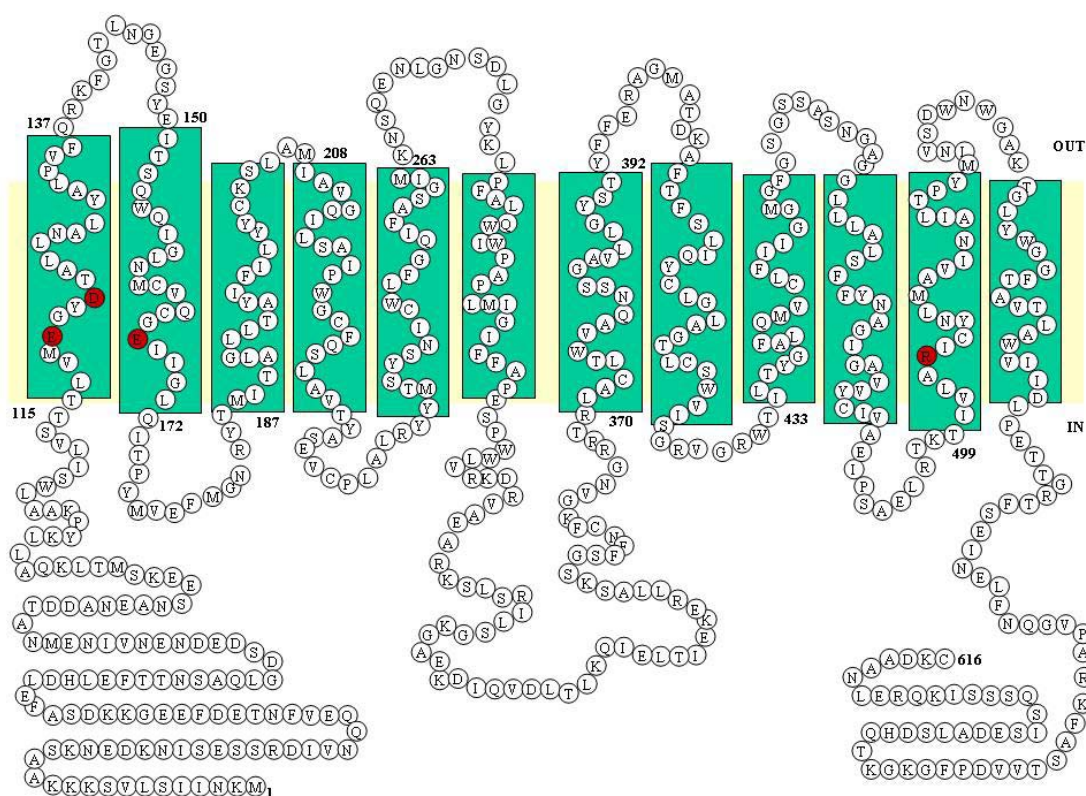


Figura 4.1 Representação da estrutura secundária da permease Agt1p. Modelo da topologia previsto para a Agt1p, mostrando os 12 TMs e os domínios N e C-terminal voltados para o citoplasma. Aminoácidos carregados presentes nos TMs estão realçados em vermelho.

CLUSTALW. Os transportadores homólogos foram identificados por pesquisa BLAST no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando a seqüência de aminoácidos do Agt1p para comparação. Na Tabela 4.1 encontram-se listadas as seqüências selecionadas.

Conforme pode ser observado na Figura 4.2, dos quatro resíduos carregados (E120, D123, E167 e R504) encontrados nos TMs da permease Agt1p, três deles (E120, D123, e R504) estão significativamente conservados em todos os transportadores de α -glicosídeos já caracterizados, incluindo as permeases codificadas pelos genes *MALx1*, *MPH2* e *MPH3* de *S. cerevisiae* (CHENG e MICHELS, 1991; DAY et al., 2002; HAN et al., 1995); *MTY1* e *MTT1* de *S. pastorianus* (DIETVORST et al., 2005; SALEMA-OOM et al., 2005), *MAL11* de *T. delbrueckii* (ALVES-ARAUJO et al., 2004), e *HpMAL2* de *Hansenula polymorpha/Pichia augusta* (VIIGAND et al., 2005; VIGAND e ALAMAE, 2007), bem como em genes postulados como transportadores de α -glicosídeos de diferentes fungos e leveduras. No caso do resíduo Glu-167, este aminoácido também encontra-se conservado na maioria dos transportadores analisados (Figura 4.2), mas em *Candida albicans* e em *Aspergillus fumigatus* este resíduo é substituído por um resíduo (glutamina) com carga oposta ao do ácido glutâmico.

Desta forma, decidimos inicialmente analisar o envolvimento dos resíduos E120, D123 e R504 na atividade de transporte de α -glicosídeos mediada pela permease Agt1p. É importante salientar que além da significativa conservação desses resíduos em outros transportadores, análises cinéticas do transporte de trealose pela permease Agt1p também sugerem a importância de resíduos de aminoácidos carregados para o processo de co-transporte açúcar- H^+ . Segundo Stambuk et al. (1996), a velocidade máxima e a afinidade do transportador pelo açúcar são afetadas pelo pH, revelando que possivelmente resíduos de aminoácidos com valores de baixo pK (entre 4,2 e 5,5) poderiam estar envolvidos na atividade

Tabela 4.1 Propriedades dos transportadores de α -glicosídeos selecionados e comparados com a permease Agt1p

Nº de acesso NCBI, Proteína	Microrganismo	Nº aa	Função	(%) aa idênticos	(%) aa similares
P53048 AGT1_SAC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	616	Transportador de α -glicosídeos	100	100
AAQ75121 MAL_TODE	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	627	Transportador de α -glicosídeos	69	82
NP_009857 MAL31_SAC	<i>S. cerevisiae</i>	614	Transportador de maltose	57	73
P15685 MAL61_SAC	<i>S. cerevisiae</i>	614	Transportador de maltose	57	73
NP_012694 MPH2_SAC	<i>S. cerevisiae</i>	602	Transportador de α -glicosídeos	55	72
NP_010034 MPH3_SAC	<i>S. cerevisiae</i>	609	Transportador de α -glicosídeos	55	72
AAAY67707 MTT1_SAP	<i>S. pastorianus</i>	594	Transportador de α -glicosídeos	57	73
CAD36557 MTY1_SAP	<i>S. pastorianus</i>	615	Transportador de α -glicosídeos	57	73
XP_453082 MAL_KLU	<i>Kluyveromyces lactis</i>	584	Provável transportador de maltose	55	74
XP_456684 MAL_DE	<i>Debaryomyces hansenii</i>	579	Provável transportador de maltose	47	70
AAX92669 MAL_PI	<i>Pichia angusta</i>	582	Transportador de maltose	44	65
XP_571538 MAL_CRNE	<i>Cryptococcus neoformans</i>	563	Provável transp. de α -glicosídeos	43	62
XP_722051 MAL_CA	<i>Candida albicans</i>	588	Provável transportador de maltose	42	65
XP_748871 MAL_ASP	<i>Aspergillus fumigatus</i>	548	Provável transportador de maltose	42	65

da permease. Como esses valores de pK para o transporte de trealose são próximos ao pK_a dos aminoácidos ácido glutâmico e aspártico, e histidina, esses resíduos seriam possíveis candidatos a estar envolvidos no simporte açúcar- H^+ promovido pela permease Agt1p.

No intuito de elucidar o papel de cada aminoácido carregado presente nos TMs da permease Agt1p na atividade de transporte de α -glicosídeo- H^+ , construímos permeases mutadas individualmente nos resíduos E120, D123 e R504, e analisamos o impacto dessas modificações na utilização de açúcares pela cepa LCM003, uma cepa isogênica à levedura de laboratório CENPK2-1C, mas deletada no gene *AGT1*. As modificações no gene *AGT1* foram construídas por mutagênese sítio-dirigida através de PCR (vide seção 3.9), onde os resíduos carregados E120 e R504 tiveram seus códons alterados para codificar um resíduo de alanina, e o D123 teve seu códon alterado para codificar uma glicina, ambos aminoácidos neutros.

O DNA molde utilizado na mutagênese sítio-dirigida foi o plasmídeo pGRSd-AGT1, que apresenta o gene *AGT1* sob regulação de um promotor forte. O produto obtido por PCR, utilizando os oligonucleotídeos apropriados para cada mutação conforme descrito em Material e Métodos, foi utilizado para transformar bactérias *E. coli*, das quais foi posteriormente extraído o plasmídeo circularizado. Estes plasmídeos foram hidrolisados com enzimas de restrição específicas para verificar se as mutações foram corretamente introduzidas no plasmídeo. Exemplos dos resultados obtidos com a análise dos padrões de restrição para os plasmídeos contendo as mutações E120A e D123G podem ser visualizados nas Figuras 4.3 e 4.4. A seguir, as mutações foram confirmadas através de sequenciamento parcial do gene, sendo que os eletroferogramas do sequenciamento para as mutantes E120A e D123G podem ser visualizados nas Figuras 4.3 e 4.4, enquanto que o resultado de sequenciamento obtido com a mutante R504A está mostrado na Figura 4.5 (no caso deste mutante, o perfil de restrição não foi analisado por falta da enzima *Bst*UI). Uma vez confirmadas as mutações

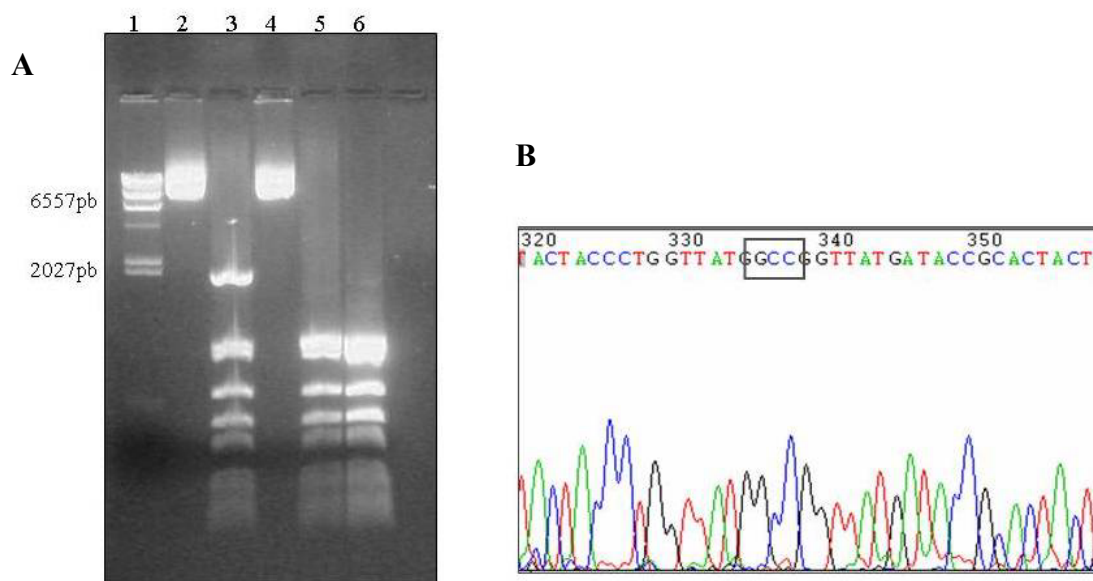


Figura 4.3 Confirmação da mutação no aminoácido E120 de Agt1p. (A) Eletroforese em gel de agarose da hidrólise com a enzima *HpaII* mostrando os diferentes perfis de digestão entre o plasmídeo pGRSd-AGT1 (portanto o gene *AGT1* normal) e o plasmídeo E120A portando a mutação. Linhas: 1 - marcador molecular Lambda/*HindIII*; 2 - pGRSd-AGT1; 3 - pGRSd-AGT1 digerido com *HpaII*; 4 - plasmídeo E120A; 5 e 6 - plasmídeos E120A digeridos com a enzima. (B) Eletroferograma do sequenciamento parcial do gene *AGT1*, confirmando a mutação E120A. O códon modificado está indicado (caixa) na figura.

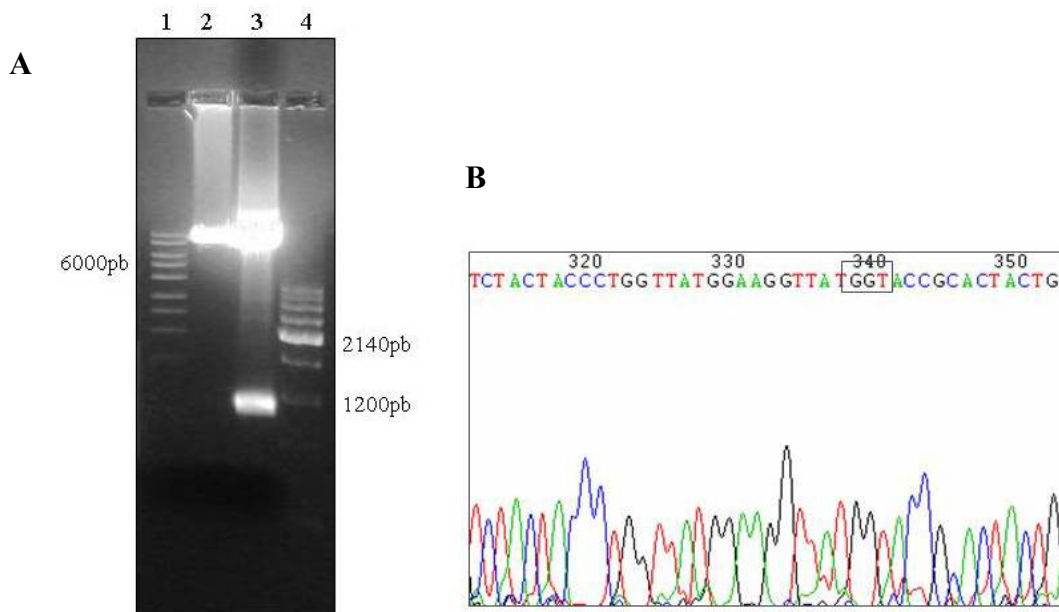


Figura 4.4 Confirmação da mutação no aminoácido D123 de Agt1p. (A) Eletroforese em gel de agarose da clivagem dos plasmídeos com a enzima de restrição *Kpn*I. O plasmídeo pGRSd-AGT1 foi linearizado por apresentar um único sítio para a enzima (linha 2), enquanto que o plasmídeo portando a mutação D123G apresentou um novo sítio para *Kpn*I, o que provocou a formação de 2 fragmentos (~ 1,1 e 7 kb) após a digestão (linha 3). Linhas: 1 e 4 - marcadores moleculares; (B) Eletroferograma obtido do sequenciamento parcial do gene *AGT1*, confirmando a mutação D123G. O códon modificado está indicado (caixa) na figura.

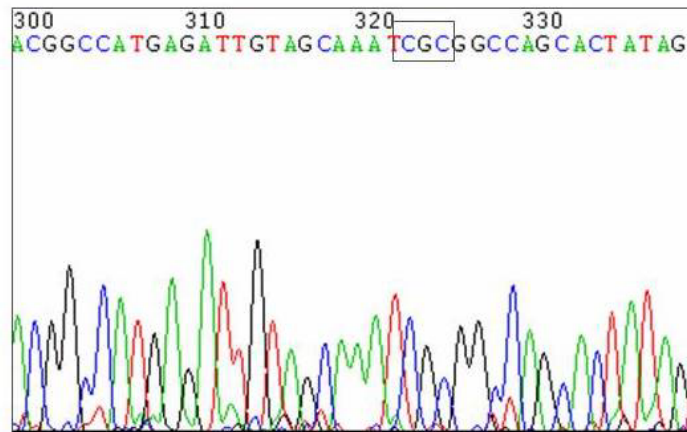


Figura 4.5 Verificação da mutação no aminoácido R504 de *Agt1p*. O resíduo Arginina-504 foi substituído por uma alanina através de mutagênese sítio-dirigida. A seqüência modificada está indicada (caixa) no eletroferograma do sequenciamento parcial da fita complementar (não codante) do gene *AGT1*, confirmando a mutação.

desejadas no gene *AGT1*, a cepa LCM003 foi transformada com os plasmídeos portando as diferentes mutações (plasmídeos denominados E120A, D123G e R504A), como também com os plasmídeos controles pGRSd (sem o gene *AGT1*) e pGRSd-AGT1 (que carrega o gene *AGT1* normal).

A Figura 4.6 mostra o perfil de utilização de açúcares pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo controle pGRSd. Como pode ser observado nesta figura, esta cepa foi capaz de crescer em meios de cultura sintéticos contendo glicose ou maltose como fonte de carbono, e de fermentar eficientemente ambos açúcares. Isso se deve ao fato desta cepa possuir os transportadores Hxt, que permitem a utilização de glicose, bem como vários transportadores de maltose (p.ex., *MAL21*, *MAL31*, vide ENTIAN e KOTTER, 1998; VIDGREN et al., 2005). Além destes genes, o plasmídeo contém o gene *URA3* capaz de complementar a mutação *ura3-52* do genoma da cepa LCM003 (vide Material e Métodos), permitindo o crescimento em meio sintético sem uracila e conseqüente manutenção do plasmídeo nas células. No entanto, as células da cepa LCM003 transformadas com o plasmídeo pGRSd não foram capazes de crescer em meio de cultura contendo maltotriose como fonte de carbono. Estas células não captaram o açúcar do meio mesmo possuindo vários transportadores Malx1p no seu genoma (Fig. 4.6).

Um perfil fenotípico diferente é obtido quando a linhagem LCM003 é transformada com o plasmídeo pGRSd-AGT1. A presença da permease Agt1p, como mostra a Figura 4.7, permitiu uma eficiente utilização de maltotriose pelas leveduras, permitindo o rápido crescimento nesta fonte de carbono. As células consumiram completamente o açúcar presente no meio, produzindo quantidades significativas (~ 4 g/L) de etanol. Estes resultados reforçam a importância de Agt1p para a eficiente fermentação de maltotriose por células de *S. cerevisiae*, já que as células sem a permease não foram capazes de utilizar este açúcar (Fig. 4.6; vide ALVES-JR, 2005). Portanto, a funcionalidade da permease Agt1p, ou de suas

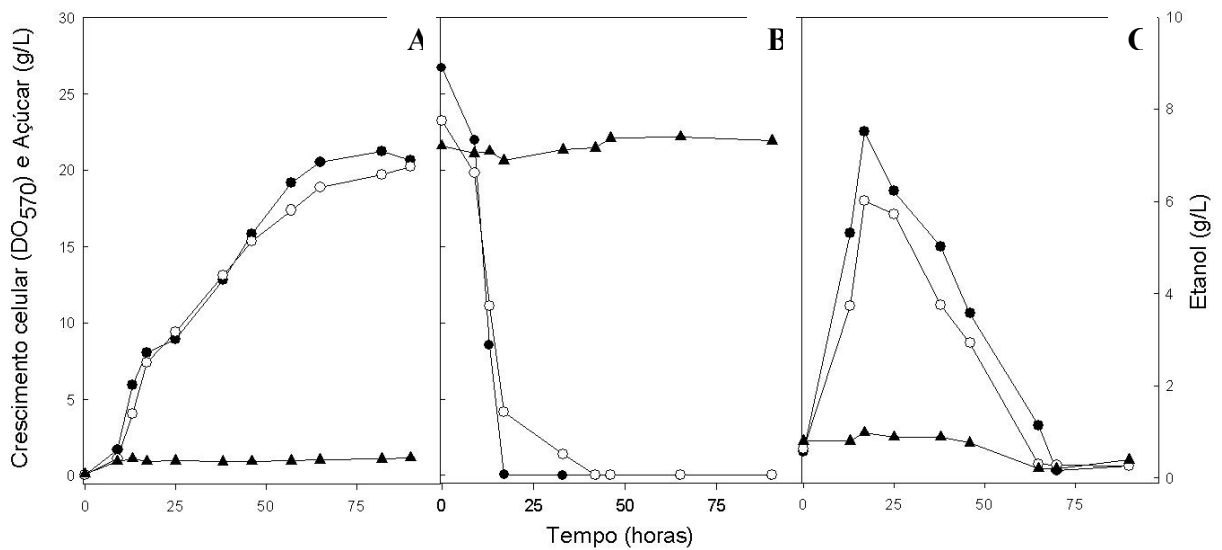


Figura 4.6 Utilização de glicose, maltose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd, que não apresenta o gene *AGT1*. Nos tempos indicados, alíquotas dos meios foram retiradas e utilizadas para a determinação do crescimento (A), do consumo de açúcares (B) e da produção de etanol (C) pela cepa LCM003 portando o plasmídeo pGRSd em meio sintético contendo 2% de glicose (●), maltose (○) ou maltotriose (▲) como fonte de carbono.

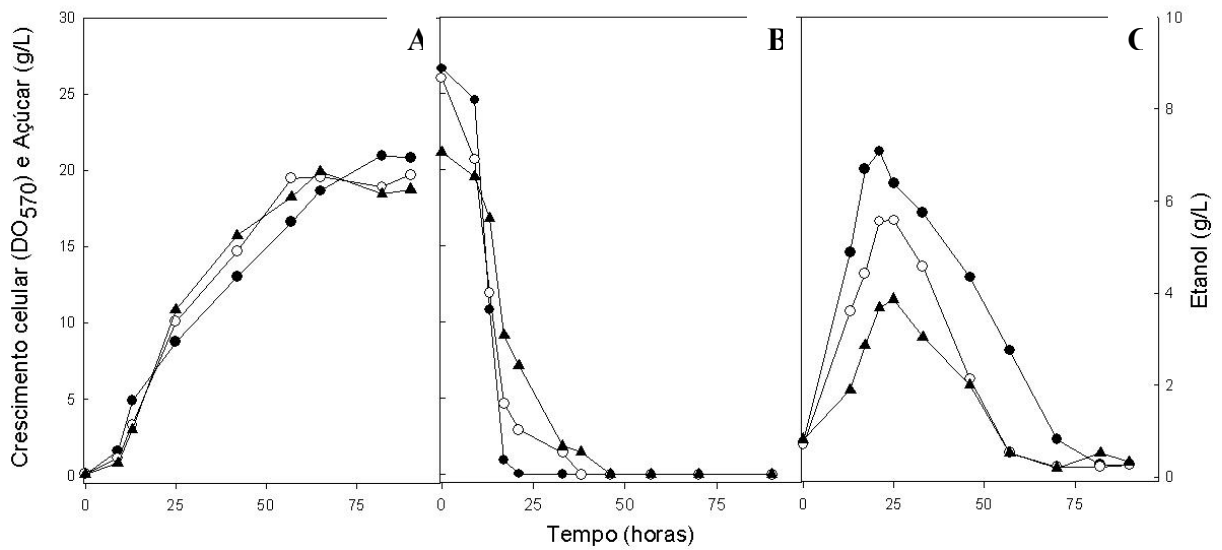


Figura 4.7 Utilização de glicose, maltose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd-AGT1. Nos tempos indicados, alíquotas dos meios foram retiradas e utilizadas para a determinação do crescimento (A), do consumo de açúcares (B) e da produção de etanol (C) pela cepa LCM003 portando o plasmídeo pGRSd-AGT1 em meio sintético contendo 2% de glicose (●), maltose (○) ou maltotriose (▲) como fonte de carbono.

mutantes, pode ser avaliada através do padrão de utilização de maltotriose pelas células, sendo que foram também analisados os açúcares glicose e maltose como controles positivos do crescimento e fermentação pelas leveduras (fenótipos independentes da permease Agt1p).

Conforme pode ser observado na Figura 4.8, as células de *S. cerevisiae* contendo a permease mutante gerada pela substituição do Glu-120 por alanina apresentaram um lento crescimento em maltotriose, após uma extensiva fase *lag* (>25 h), consumindo lentamente o açúcar (a maltotriose nem chega a ser totalmente consumida), sem ocorrer produção de etanol. É importante salientar que foi demonstrado anteriormente que várias linhagens de levedura, incluindo inúmeras cepas industriais, apresentam este padrão de utilização de maltotriose (ALVES-JR 2005; STAMBUK et al., 2006; ZASTROW et al., 2000, 2001). Portanto, seria extremamente interessante verificar se o gene *AGT1* presente nestas linhagens são, na verdade, versões mutantes (E120A) desta permease.

Por outro lado, a substituição do resíduo Asp-123 por glicina (Figura 4.9) provocou um fenótipo diferente: as células de *S. cerevisiae* cresceram normalmente em maltotriose, mas o açúcar foi consumido lentamente quando comparado à glicose ou maltose (ou inclusive se comparado à utilização de maltotriose pela cepa portando a permease Agt1p não mutada, vide Fig. 4.7). Consequentemente, a produção de etanol caiu pela metade (~2 g/L) quando comparada à produção de etanol pelas leveduras portando a permease Agt1p normal (Fig. 4.7). Este resultado sugere que as células contendo a permease mutante D123G estão conseguindo crescer eficientemente em maltotriose direcionando parte desta fonte de carbono para a respiração (metabolismo aeróbico), em detrimento do metabolismo fermentativo característico desta levedura.

Por último, a mutação do resíduo Arg-504 por alanina aboliu completamente o crescimento celular em maltotriose, uma vez que as células foram incapazes de consumir essa fonte de carbono (Figura 4.10), indicando que este transportador mutante é não funcional (o

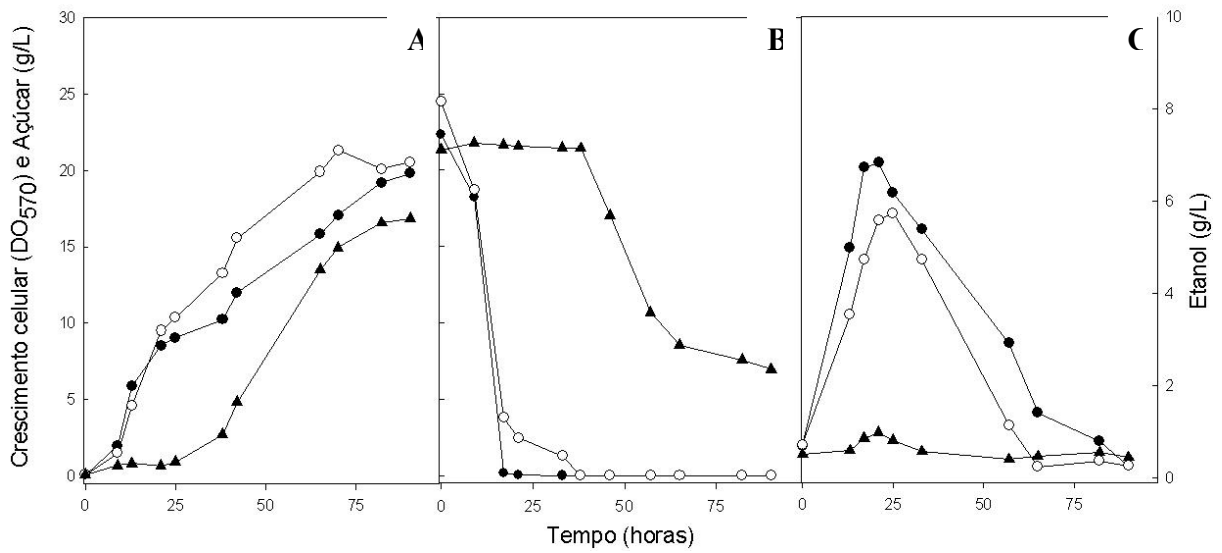


Figura 4.8 Utilização de glicose, maltose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo E120A. Nos tempos indicados, alíquotas dos meios foram retiradas e utilizadas para a determinação do crescimento (A), do consumo de açúcares (B) e da produção de etanol (C) pela cepa LCM003 portando o plasmídeo E120A em meio sintético contendo 2% de glicose (●), maltose (○) ou maltotriose (▲) como fonte de carbono.

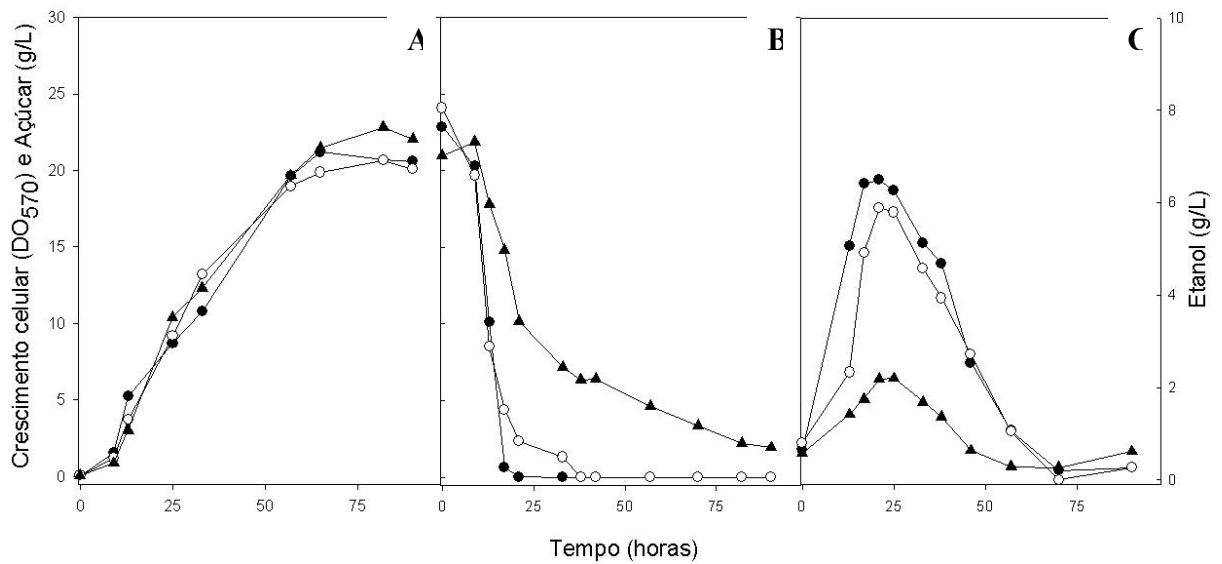


Figura 4.9 Utilização de glicose, maltose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo D123G. Nos tempos indicados, alíquotas dos meios foram retiradas e utilizadas para a determinação do crescimento (A), do consumo de açúcares (B) e da produção de etanol (C) pela cepa LCM003 portando o plasmídeo D123G em meio sintético contendo 2% de glicose (●), maltose (○) ou maltotriose (▲) como fontes de carbono.

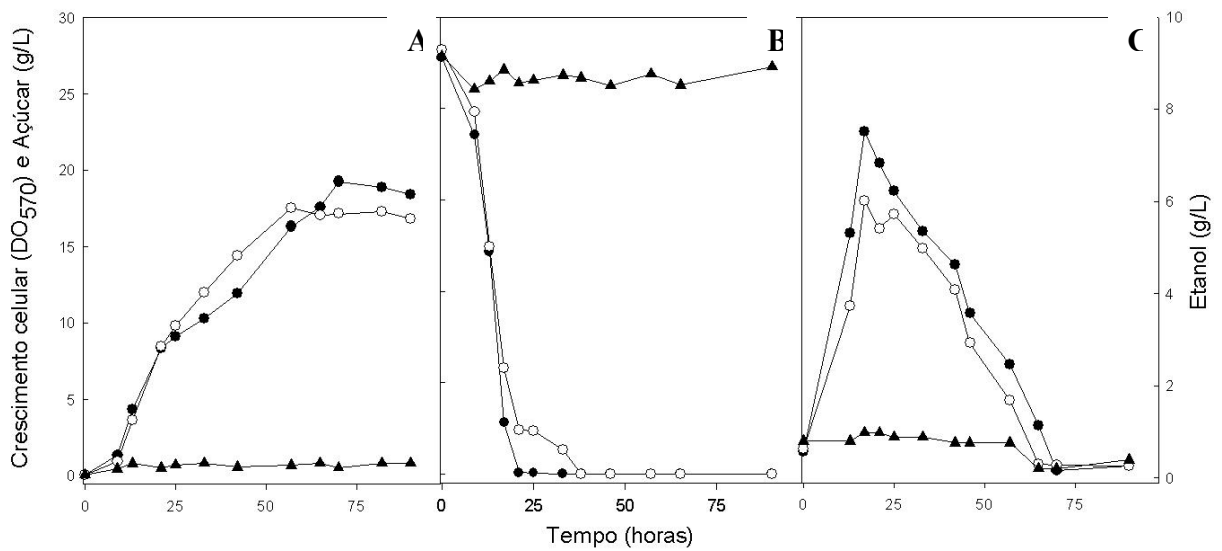


Figura 4.10 Utilização de glicose, maltose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com o plasmídeo R504A. Nos tempos indicados, alíquotas dos meios foram retiradas e utilizadas para a determinação do crescimento (A), do consumo de açúcares (B) e da produção de etanol (C) pela cepa LCM003 portando o plasmídeo R504A em meio sintético contendo 2% de glicose (●), maltose (○) ou maltotriose (▲) como fontes de carbono.

fenótipo lembra a levedura carregando o plasmídeo controle, sem *AGTI*). Como esperado, em virtude de a cepa LCM003 possuir os transportadores de glicose e maltose, a utilização desses açúcares não foi alterada por nenhuma das mutações analisadas (vide Figuras 4.6 a 4.10).

Os resultados dos ensaios de crescimento descritos acima mostram que as mutações nos diferentes resíduos de aminoácidos da permease *Agt1p* provocaram alterações na capacidade de utilização de maltotriose pela cepa LCM003, seja diminuindo o consumo e fermentação da maltotriose, ou até, no caso da construção R504A, causando uma incapacidade de utilizar esta fonte de carbono. Como a utilização de maltotriose pela levedura requer o transporte ativo para o interior da célula (HAN et al., 1995; ZASTROW et al., 2001), decidimos inicialmente avaliar a atividade de transporte da permease *Agt1p* com o substrato *pNPαG*. Com este intuito, as células foram crescidas em meio mínimo com maltose, açúcar normalmente metabolizado por todas as linhagens analisadas, o que permite o crescimento equitativo de todas as cepas, mesmo das células portadoras de permeases mutantes. Entretanto, de acordo com Hollatz e Stambuk (2001), o substrato sintético *pNPαG* é transportado apenas pela permease codificada pelo gene *AGTI*, e não é transportado pelas permeases codificadas pelos genes *MALx1*. Desta forma, o ensaio colorimétrico utilizando *pNPαG* permite avaliar a importância de cada aminoácido mutado para o transporte ativo do açúcar realizado por esta permease.

Conforme pode ser observado na Figura 4.11, a mutação R504A ocasionou a total perda da atividade de transporte de *pNPαG* pelas células, tendo em vista que apresentou velocidades de transporte similares às obtidas com as células sem o transportador *Agt1p* (LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd). Esses dados estão de acordo com os observados na Figura 4.10, uma vez que o mutante R504A apresentou perda total da capacidade de utilização de maltotriose do meio pelas células de levedura. Em contrapartida, os mutantes E120A e D123G apresentaram atividades de transporte de *pNPαG* inferiores à

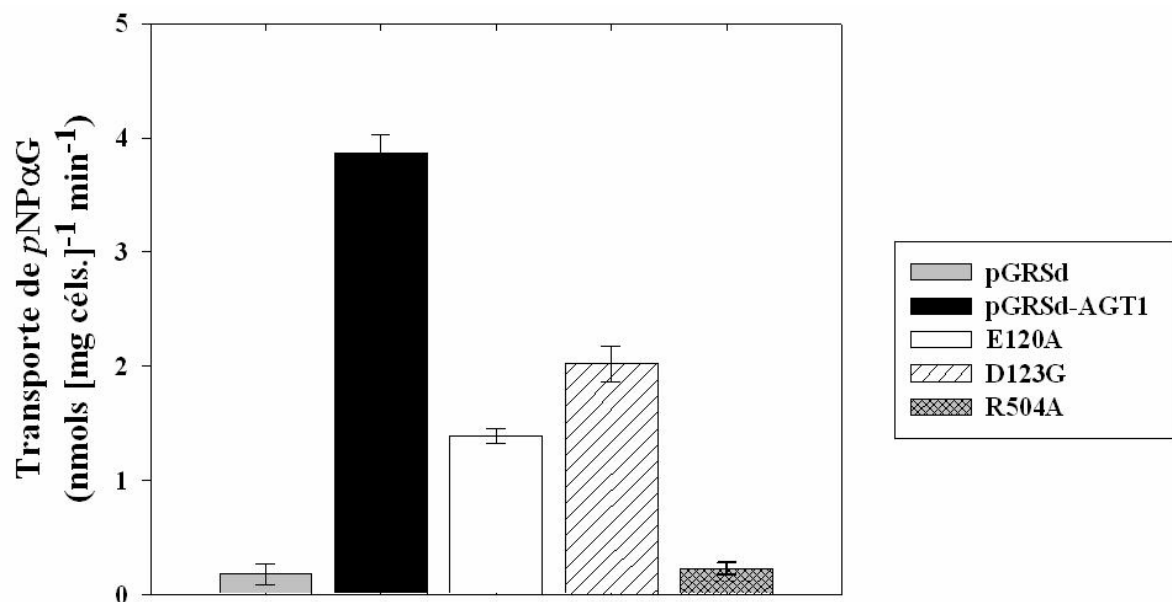


Figura 4.11 Atividade de transporte da permease Agt1p. A atividade de transporte da permease codificada pelo gene *AGT1* e pelos seus respectivos mutantes presentes na cepa LCM003 foi determinada após o crescimento das leveduras em meio mínimo, contendo 2% de maltose, e utilizando o substrato sintético *pNPαG*, como descrito em Material e Métodos. Como controle negativo foram utilizadas células da cepa LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd, o qual não possui a permease Agt1p.

observada para o transportador não mutado (queda de ~60% e ~50%, respectivamente). Estes resultados reforçam os resultados fenotípicos obtidos (vide Figs. 4.6 a 4.9), e apontam para uma clara correlação entre a atividade de transporte de *pNPαG* e o perfil de utilização e fermentação de maltotriose por *S. cerevisiae*.

Como o ensaio colorimétrico de determinação do transporte de *pNPαG* depende também da hidrólise intracelular do substrato pela enzima α -glicosidase (maltase), avaliamos também esta atividade enzimática (utilizando *pNPαG*, maltose e maltotriose como substrato) nas mesmas células utilizadas para a determinação da atividade da permease Agt1p mostradas na Figura 4.11. Como pode ser observado na Figura 4.12, a atividade de hidrólise de maltotriose foi menor do que a atividade de hidrólise de maltose e *pNPαG*, o que está de acordo com Zastrow et al. (2000) e Alves-Junior (2005), que mostraram que a afinidade da α -glicosidase pela maltotriose é menor que a afinidade dessa enzima pelos outros substratos testados. Entretanto, a atividade de hidrólise de cada substrato pela α -glicosidase foi semelhante em todas as células, portando ou não a permease, ou mesmo com as substituições nos resíduos selecionados, confirmando que a alteração no fenótipo da cepa LCM003 foi devido a uma variação no transporte ativo dos açúcares através da membrana (Fig. 4.11), e não ao nível de hidrólise intracelular do açúcar (Fig. 4.12).

A seguir determinamos a atividade de co-transporte açúcar- H^+ nas diferentes linhagens contendo a permease Agt1p ou suas versões mutantes (Figura 4.13). Podemos verificar que todas as cepas apresentaram altas velocidades de simporte maltose- H^+ (38 ± 5 nmoles [mg célula]⁻¹ min⁻¹), independentemente da presença ou não da permease Agt1p. Já no caso dos outros α -glicosídeos, as velocidades de co-transporte com H^+ apresentam valores menores do que com maltose, sendo que significativas diferenças foram obtidas para cada permease mutada. Em geral, verificamos os mesmos perfis de atividade de co-transporte H^+ -açúcar e na determinação da atividade utilizando o *pNPαG* (vide Fig. 4.11), principalmente no caso da

maltotriose. As atividades de H⁺-simporte com sacarose, trealose e α -metil glicosídeo obtidos com as diferentes permeases (Fig. 4.13) mostram uma evidente redução do transporte ativo desses açúcares em todos os mutantes, quando comparados a Agt1p normal, sendo que o transporte de sacarose foi aparentemente o mais afetado.

De qualquer forma, os dados apresentados na Figura 4.13 também condizem com os perfis de utilização de maltose e maltotriose mostrados anteriormente (Figs. 4.6-4.10), uma vez que as mutações não alteraram a utilização de maltose, e os mutantes que tiveram maior dificuldade para transportar a maltotriose foram os que apresentaram, proporcionalmente, menor capacidade para fermentar esse açúcar.

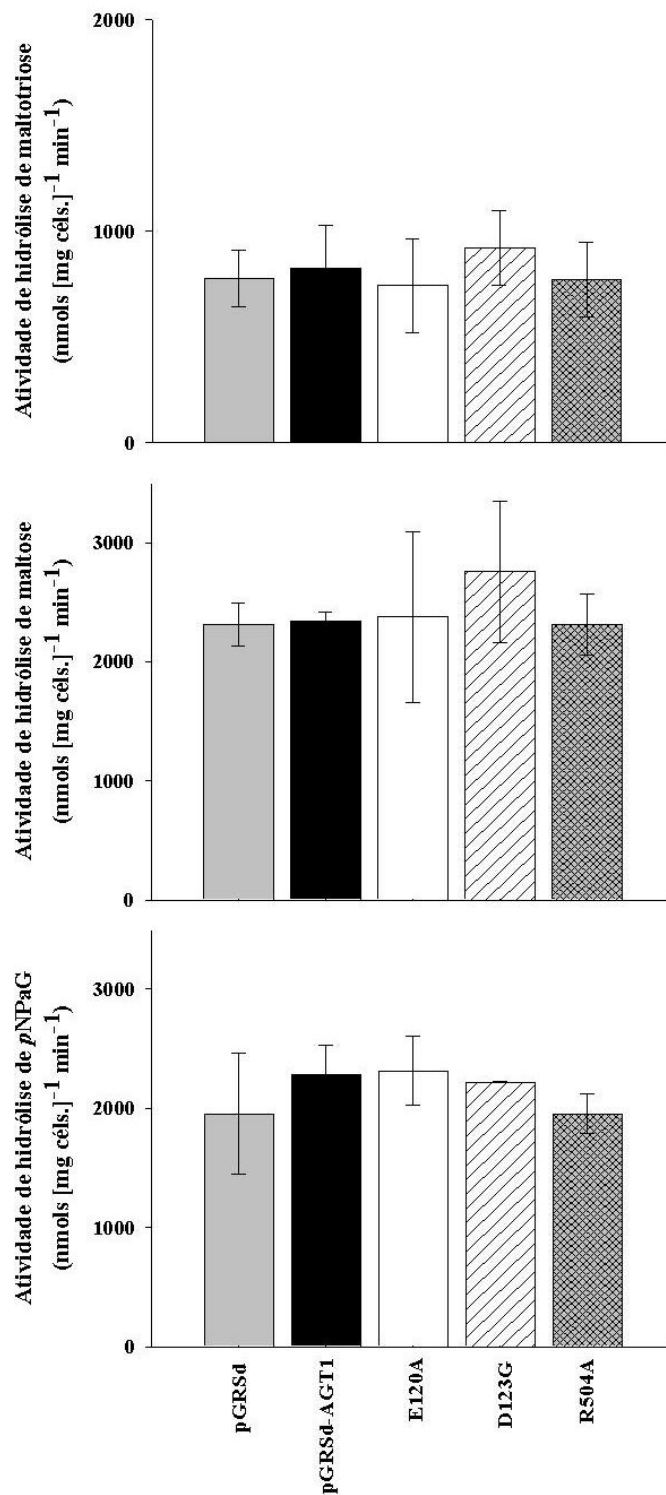


Figura 4.12 Atividade α -glicosidase na cepa LCM003 contendo os diferentes plasmídeos. Após o crescimento das leveduras portando os plasmídeos indicados em meio mínimo contendo 2% de maltose, foi determinada a atividade α -glicosidase nas células permeabilizadas como descrito em Material e Métodos, utilizando maltotriose (A), maltose (B) ou pNPaG (C) como substrato.

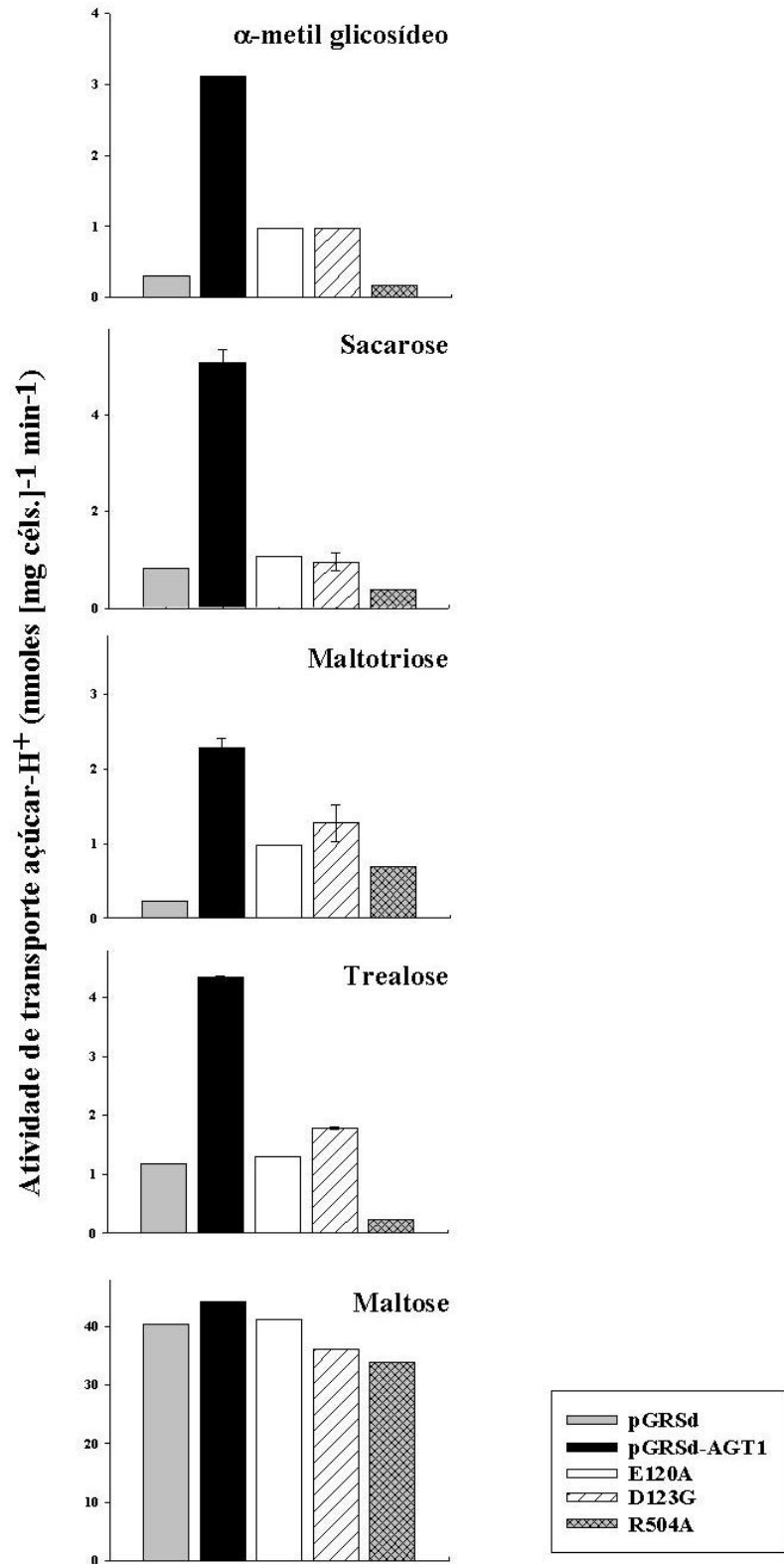


Figura 4.13 Atividade de transporte ativo de maltose, trealose, maltotriose, sacarose e α -metil glicosídeo. Após o crescimento das leveduras, portando os plasmídeos citados, em meio mínimo contendo 2% de maltose, a atividade de simporte açúcar-H⁺ foi determinada pelo influxo de prótons nas células de leveduras incubadas com 10 mM dos açúcares indicados, como descrito em Material e Métodos.

No intuito de ter uma visão mais detalhada de quais parâmetros cinéticos do transporte ativo de açúcares estariam sendo afetados pela mutação D123G, determinamos a atividade de H^+ -simporte com várias concentrações de sacarose e maltotriose por células da cepa LCM003, portando os plasmídeos pGRSd-AGT1 ou D123G, crescidas em maltose (Figura 4.14). A cepa portando o plasmídeo pGRSd-AGT1 apresentou atividade de transporte ativo de sacarose por dois sistemas distintos, um com alta afinidade ($K_m \sim 7$ mM) mediado pela permease Agt1p, e outro com baixa afinidade pelo substrato ($K_m \sim 100$ mM) provavelmente mediado pelos transportadores Mal21p e Mal31p presentes nesta levedura (vide BATISTA et al., 2004; STAMBUK et al., 1999).

O mutante D123G apresentou apenas o transporte de baixa afinidade, sugerindo que a mutação no aspartato-123 teria provocado a perda da capacidade do transportador Agt1p de transportar sacarose, ou então, teria alterado a afinidade do transportador pelo substrato transformando-o em um transportador com baixa afinidade para a sacarose. A cinética do transporte ativo de maltotriose pela linhagem LCM003 portando o plasmídeo pGRSd-AGT1 mostra apenas um único componente de baixa afinidade ($K_m \sim 20$ mM), confirmando que o gene *AGT1* codifica para um transportador com baixa afinidade para este açúcar (STAMBUK e DE ARAUJO, 2001). Neste caso, a mutação no resíduo Asp-123 provocou uma menor atividade de transporte de maltotriose pela permease, apresentando aproximadamente metade da $V_{m\acute{a}x}$ observada para a permease Agt1p normal, aparentemente sem ter afetado a afinidade pelo substrato.

Logicamente que os resultados cinéticos mostrados acima são prejudicados pela presença dos transportadores *MALx1* na linhagem LCM003, transportadores que podem transportar tanto a sacarose como, provavelmente, a maltotriose, com baixa afinidade. Idealmente, estas cinéticas de transporte deverão ser realizadas em linhagens de levedura

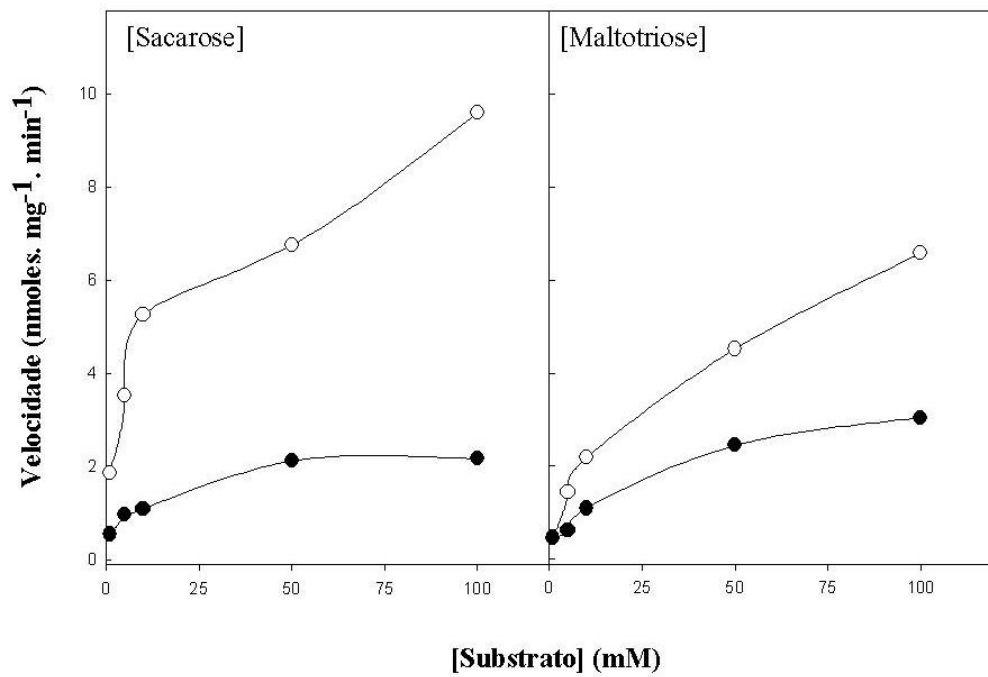


Figura 4.14 Cinética do transporte ativo de sacarose e maltotriose pela cepa LCM003 transformada com pGRSd-AGT1 ou D123G. O co-transporte de H⁺ com sacarose, ou maltotriose, foi determinado com as concentrações do substrato indicadas e células crescidas em meio sintético contendo 2 % de maltose, portando o plasmídeo pGRSd-AGT1 (○) ou D123G (●).

contendo só a permease Agt1p (ou suas mutantes) como único transportador de α -glicosídeos, portanto, sem a interferência de outros transportadores. Da mesma forma, seria necessário determinar se com alguns dos mutantes não ocorreu o desacoplamento do transporte do H^+ e açúcar (ABRAMSON et al., 2003a, 2003b; GUAN e KABACK, 2006). Neste caso, os ensaios de transporte do açúcar marcado radioativamente e do H^+ -simporte terão que ser realizados nas mesmas células, permitindo calcular a estequiometria do co-transporte.

Finalmente, como as mutações provocaram a perda total da atividade ou reduziram consideravelmente a atividade da permease, era necessário verificar se as mutações introduzidas nos transportadores não estariam provocando problemas na síntese e/ou encaminhamento correto da proteína até a membrana plasmática via retículo endoplasmático rugoso (KOTA et al., 2007; PIZZIRUSSO e CHANG, 2004; SHERWOOD e CARLSON, 1999). Por outro lado, as mutações poderiam afetar a permanência da proteína na membrana plasmática, sendo que o processo de inativação (envolvendo a fosforilação, ubiquitinação e endocitose para posterior degradação vacuolar) já foi descrito tanto para os transportadores codificados pelos genes *MALx1*, quanto para o *AGT1* (BRONDIJK et al., 1998; HOLLATZ e STAMBUK, 2001; MEDINTZ et al. 2000; STAMBUK, 2001;).

Com o propósito de verificar a localização celular das permeases normais e mutantes, fusionamos o epítipo GFP na extremidade C-terminal de Agt1p através de recombinação homóloga e metodologias baseadas em PCR (PETRACEK e LONGTINE 2002; STAMBUK, 2001). Para isso, um fragmento linear de DNA com ~2,4 kb foi gerado (Figura 4.15), portando o gene *GFP* e o gene *kan^r*, flanqueados por regiões homólogas à região C-terminal do gene *AGT1* e ao terminador *PGK* localizado após o gene *AGT1* presente no plasmídeo pGRSd-AGT1 (vide Figura 4.15). Após transformação com o módulo GFP-KanMX, as colônias foram selecionadas em meio rico YP contendo glicose e Geneticina e, posteriormente, analisadas por PCR para verificar a correta integração do módulo nos

plasmídeos. A amplificação de uma banda de ~ 2,1 kb utilizando primers verificadores (Figura 4.15) permitiu confirmar a correta inserção do módulo de fusão de GFP na extremidade C-terminal da permease Agt1p contida em cada plasmídeo (que passaram a receber a denominação xxxx-GFP). Analisando as células de levedura portando os plasmídeos-GFP, pré-crescidas em meio sintético contendo maltose, através de microscopia de fluorescência (Figura 4.16) pode-se verificar a presença de fluorescência em toda superfície celular das leveduras contendo os diferentes plasmídeos, o que indica que as mutações em questão não alteraram a correta síntese e localização da proteína transportadora. Cabe salientar que células da linhagem LCM003 carregando os diferentes plasmídeos mutantes fusionados à GFP mostraram os mesmos fenótipos na utilização de maltotriose já descritos anteriormente (dados não mostrados, e vide Figs. 4.7 a 4.10 acima).

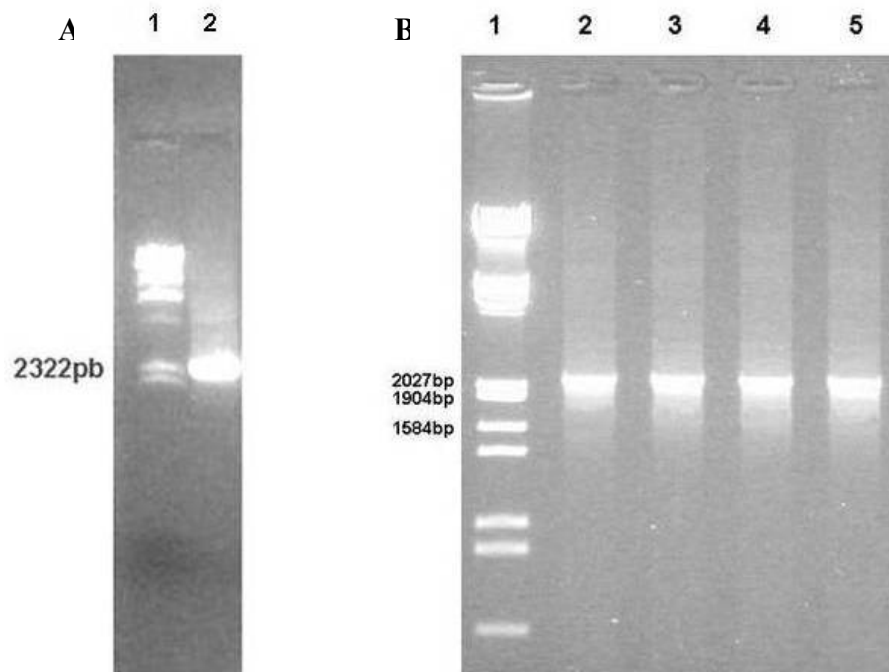


Figura 4.15 Construção do módulo GFP-KanMX e confirmação da correta integração do módulo nos plasmídeos pGRSd-AGT1, D123G, E120A e R504A. Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação por PCR (A) do módulo GFP-KanMX (linha 2), com ~2,4 kb, e confirmação (B) da fusão da GFP com a extremidade 3' do gene *AGT1* presente nos plasmídeos pGRSd-AGT1-GFP, D123G-GFP, E120A-GFP e R504A-GFP (linhas 2 a 5, respectivamente) utilizando os oligonucleotídeos AGT1-R504A-F e V-Kanr-R, que produzem um fragmento de ~2,1 kb. Em ambos os painéis na linha 1 encontramos o marcador λ HindIII (A) ou λ Hind III + Eco RI (B).

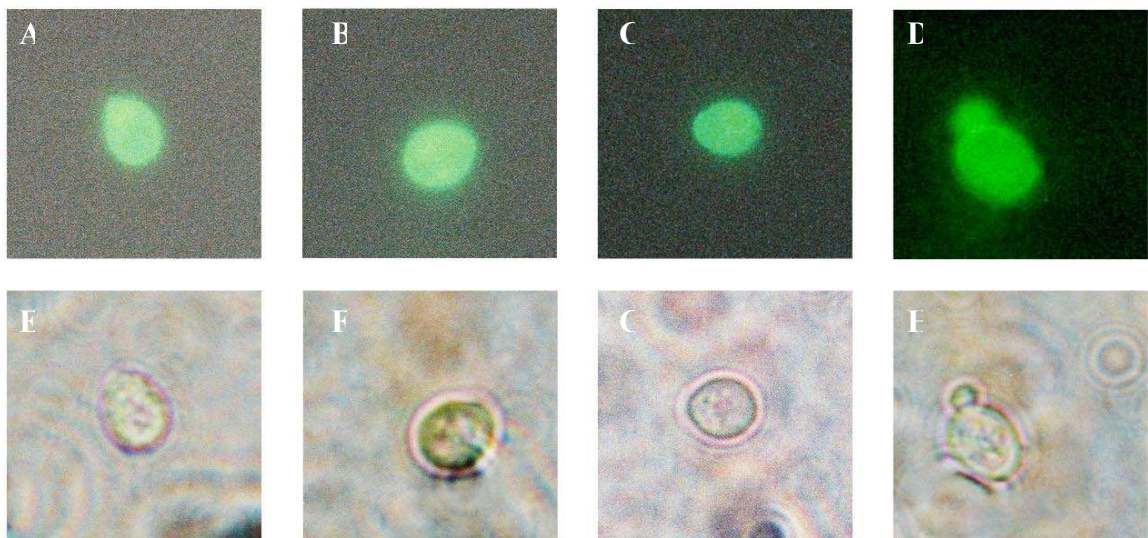


Figura 4.16 Localização das permeases Agt1p normal e mutantes, fusionadas à GFP, na cepa LCM003 de *Saccharomyces cerevisiae*. Fotomicrografias representativas de células de leveduras, pré-crescidas em maltose, carregando, respectivamente, os mutantes R504A-GFP (A e E), D123G-GFP (B e F), E120A-GFP (C e G) e a permease AGT1-GFP (D e H). Os painéis A-D mostram imagens de fluorescência, enquanto E-H são micrografias em contraste de fase.

Desta forma, nossos resultados indicam que os aminoácidos E-120, D-123 e R-504 estão envolvidos no simporte açúcar- H^+ realizado pela permease Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae*. Tais dados também estão de acordo com trabalhos anteriores referentes à caracterização do mecanismo de co-transporte de outros transportadores da superfamília MFS. No caso do transportador codificado pelo gene *LacY* (ABRAMSON et al., 2003a; FRILLINGOS et al., 1998; GUAN e KABACK, 2006; MIRZA et al., 2006; SAHIN-TOTH et al., 2000; VENKATESAN e KABACK, 1998), diversos estudos mostraram que resíduos de glutamato, arginina e histidina são indispensáveis para o simporte lactose- H^+ efetuado por essa permease de *E. coli*. Por outro lado, segundo Huang et al. (2003), dois resíduos de arginina são indicados como os responsáveis pela ligação do substrato durante o processo de transporte mediado pelo transportador glicerol-3-fosfato (GlpT), um antiporte com fosfato. E ainda, recentemente, Vadyvaloo et al. (2006) mostrou que o transportador de sacarose (CscB) de *E. coli* possui uma organização estrutural dos resíduos envolvidos na ligação do açúcar e na translocação do H^+ semelhante ao transportador LacY, e estes resíduos, quando substituídos por mutagênese sítio-dirigida, refletiram em diferenças na especificidade e na afinidade pelo substrato, e no caso da mutação do resíduo Glu-270, abolição da atividade de transporte de sacarose.

Como pudemos perceber, para a permease Agt1p em estudo, a substituição da Arg-504 por uma alanina aboliu completamente a atividade de transporte pela permease Agt1p, o que pode ser observado pela incapacidade da cepa portando este mutante de utilizar maltotriose, como também pela ausência da atividade de transporte de *pNP* α G ou de outros α -glicosídeos por estas células. Por outro lado, as permeases mutantes geradas pela substituição do Asp-123 por glicina ou do Glu-120 por alanina não impediram o crescimento em maltotriose, apesar de terem ocasionado menores taxas de consumo desse α -glicosídeo quando comparadas ao transportador não mutado. Para estas células, a translocação de H^+ parece estar sendo mais

afetada, já que os ensaios de co-transporte (que levam em consideração o influxo de prótons) foram os que mostraram uma maior diminuição na atividade de transporte, ou até mesmo atividade nula no caso da sacarose.

4.2 Modelo estrutural de Agt1p e mecanismo proposto para o simporte α -glicosídeo- H^+

Como descrito anteriormente, poucas estruturas de alta-resolução de transportadores da MFS foram publicadas: o transportador LacY (ABRAMSON et al., 2003a, 2003b), o transportador GlpT (HUANG et al., 2003) e o transportador EmrD (YIN et al., 2006). Apesar da baixa similaridade entre as seqüências, esses transportadores apresentam estruturas com dobramentos muito similares, o que sugere a existência de um arcabouço comum a todos os transportadores da superfamília MFS com 12 TMs (VARDY et al., 2004). Deste modo, muitos trabalhos têm utilizado modelos tridimensionais, baseados principalmente nas estruturas conhecidas de LacY e GlpT, para a análise de proteínas transportadoras (vide LAGERSTEDT et al., 2004; SALAS-BURGOS et al., 2004).

Visando simular o arranjo tridimensional de Agt1p e localizar os aminoácidos substituídos no transportador, construímos um modelo tridimensional teórico da permease baseado na estrutura resolvida de LacY. Para a identificação das seqüências homólogas com estruturas conhecidas que poderiam ser utilizadas como moldes, e para o alinhamento das seqüências, utilizamos o server HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). A estrutura de LacY foi utilizada como molde e o alinhamento entre as duas seqüências foi usado para calcular o modelo 3D da permease Agt1p através do programa MODELLER 9v1 (<http://www.salilab.org/modeller>). Para o alinhamento e predição da estrutura de Agt1p foram removidas as regiões citoplasmáticas N e C-terminal, com o propósito de aumentar o grau de similaridade, e além desta alteração, nenhuma outra otimização manual foi feita.

A Figura 4.17 mostra uma representação do modelo estrutural de Agt1p. Pode-se observar as 12 hélices transmembrana organizadas em 2 blocos, sendo que os TMs 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 e 11 estão formando a cavidade hidrofílica, enquanto os TMs 3, 6, 9 e 12 ficam localizados mais externamente. Os domínios N e C-terminal estariam voltados para o citoplasma, como previsto para os transportadores pertencentes à MFS. Na Fig. 4.17 também

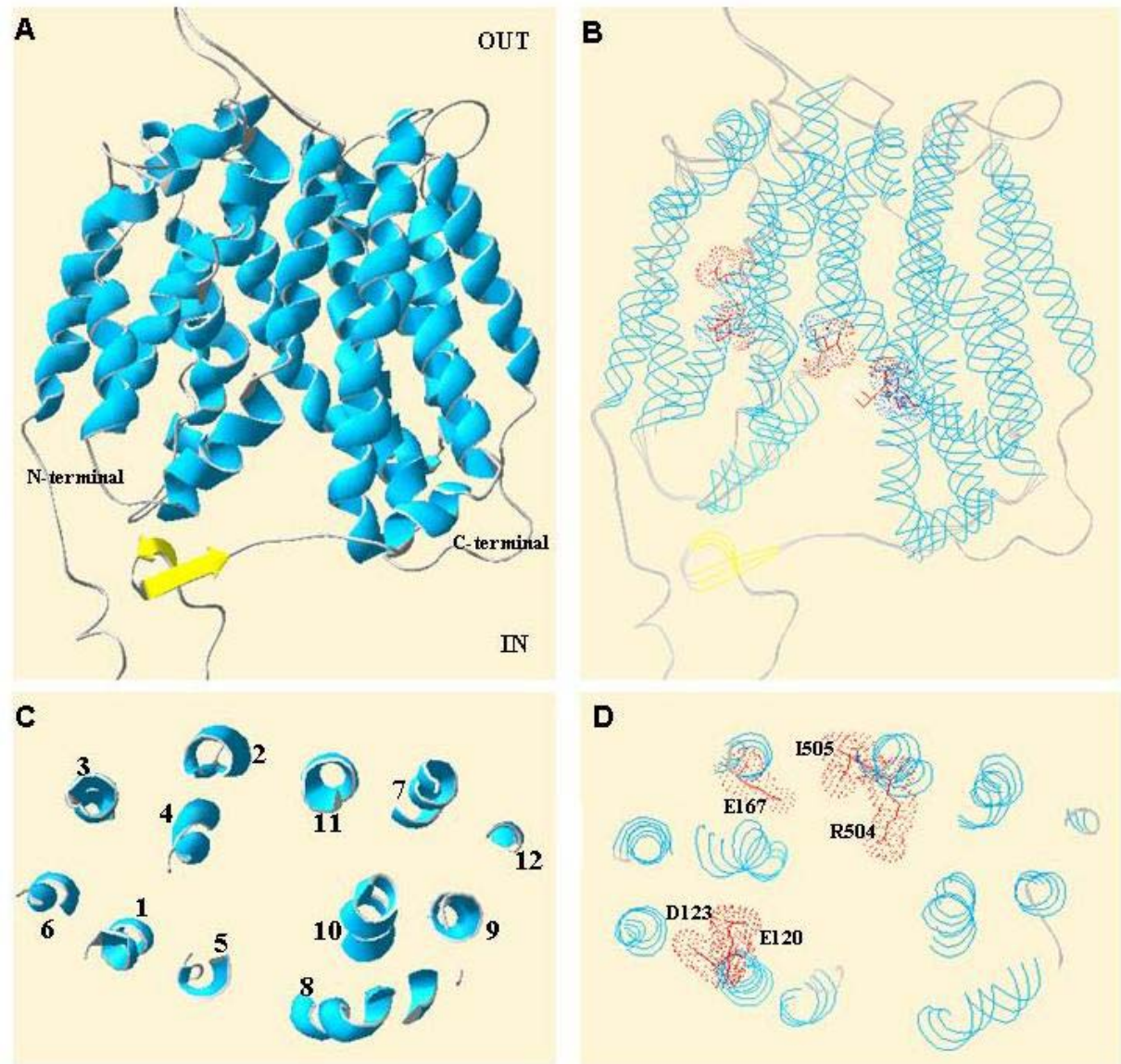


Figura 4.17 Representação do modelo estrutural de Agt1p. A estrutura tridimensional para o transportador Agt1p foi construída por comparação com a estrutura conhecida de LacY. (A) Visão lateral da proteína mostrando as posições relativas das hélices, e em (B) estão marcados os resíduos de aminoácidos (E120, D123, E167, R504 e I505) que poderiam estar envolvidos na atividade de transporte. (C) Visão frontal da permease mostrando os 12 TMs formando a cavidade hidrofílica, e em (D) a localização dos resíduos próximos a cavidade.

estão representados os resíduos de aminoácidos analisados no presente trabalho, além da isoleucina-505 e glutamato-167, resíduos possivelmente envolvidos na atividade de transporte (vide abaixo).

O modelo construído para a permease Agt1p satisfaz considerações observadas em estudos que mostram a localização de diferentes motivos ou resíduos de aminoácidos conservados nas proteínas pertencentes à MFS, como por exemplo, o motivo RXGRR que é encontrado nas alças entre os TMs 2 e 3 e os TMs 8 e 9 (PAO et al., 1998). No caso da permease Agt1p, apenas a alça entre os TMs 8 e 9 apresenta este motivo parcialmente conservado (RXGR). Outro motivo comumente presente entre os TMs 7 e 8 de transportadores de açúcares de leveduras é RAG (sendo que R pode estar substituído por K), motivo este presente em Agt1p, além de dois possíveis sítios de fosforilação (Ser-301 e Tre-369) que estão conservados na alça citoplasmática, entre os TMs 6 e 7, em localização conservada com os transportadores de maltose codificados pelos genes *MALxT* (BRONDIJK et al., 1998).

Os resíduos de aminoácidos Glu-120, Asp-123 e Arg-504, substituídos no presente estudo por mutagênese sítio-dirigida, estão localizados nos TMs I e XI, conforme representado no modelo em 3D da proteína Agt1p (Fig. 4.17). No modelo tridimensional construído para a permease, todos estes resíduos estão próximos à cavidade hidrofílica por onde provavelmente ocorre a translocação do substrato. De acordo com os resultados, os 3 resíduos mutados Glu-120, Asp-123 e Arg-504 estão envolvidos na atividade de transporte açúcar- H^+ realizada pela permease Agt1p. A substituição de Arg-504 por um aminoácido neutro aboliu completamente a atividade de transporte, portanto este resíduo parece ser necessário para a ligação dos substratos e/ou processo catalítico envolvido no transporte (mudança conformacional envolvida na abertura da cavidade hidrofílica para o outro lado da membrana). Segundo Guan e Kaback (2006) e Venkatesan e Kaback (1998), diferentemente

das mutações em resíduos importantes para a ligação do açúcar que inativam o transportador, permeases mutantes nos resíduos envolvidos com a ligação do próton podem continuar catalisando a translocação do açúcar, porém geralmente a afinidade é comprometida. Nossos resultados mostram que as mutações nos resíduos Glu-120 e Asp-123 permitiram a utilização de maltotriose pela levedura, apesar de menores velocidades de consumo ser observadas. Nestas células, os ensaios de co-transporte (que levam em consideração o influxo de prótons) foram os mais afetados, sugerindo que esses resíduos possivelmente estão envolvidos com a translocação de H^+ .

Entretanto, analisando o modelo estrutural do transportador Agt1p (vide Fig. 4.17), pode-se observar que o outro resíduo carregado Glu-167 (não mutagenizado por não estar conservado entre os vários transportadores de α -glicosídeos) está localizado no TM II próximo ao resíduo Arg-504, o que poderia sugerir a formação de uma ponte salina entre estes dois resíduos, contribuindo para a mudança conformacional da proteína da orientação com a face voltada para o periplasma para a orientação com a face voltada para o citoplasma. Assim, o rompimento da possível ponte salina entre estes dois resíduos, provocada pela substituição de Arg-504 por um resíduo neutro, levaria à perda do sítio de ligação do substrato, e consequentemente, ausência de mudanças conformacionais, o que explicaria a incapacidade de catalisar o transporte do açúcar. Contudo, estudos de mutagênese sítio-dirigida de E-167 são necessários para esclarecer o papel deste resíduo na atividade de transporte da permease.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, Vidgren e colaboradores (2005) descreveram uma série de alelos do gene *AGTI* presentes em leveduras de cervejaria Ale e Lager. No caso das leveduras Lager, o gene *AGTI* apresentava a inserção de uma timina extra na posição 1183 (contando a partir do primeiro nucleotídeo da região codificante do gene), o que provoca uma mudança de fase e, consequentemente, a produção de um polipetídeo truncado não funcional com apenas 394 aminoácidos. As leveduras Ale apresentaram também

polimorfismos na sequência do gene, responsáveis pela substituição de ~ 28 resíduos de aminoácidos na permease Agt1p (VIDGREN et al., 2005). Embora algumas dessas substituições ocorrem em segmentos transmembrana que formam a cavidade hidrofílica onde o substrato deveria ligar (p.ex. L164Q, M168T e T175P no TM-I; I215V e I219M no TM-II; L409V no TM-V; A488T no TM-VII e L509I no TM-VIII), a maioria destas variações são neutras e fica difícil correlacioná-las com possíveis alterações na atividade destes alelos da permease Agt1p. Lamentavelmente, estes alelos não foram analisados em detalhe quanto às suas propriedades cinéticas.

Já num trabalho mais recente, Smit et al. (2007) investigaram diferenças nas sequências de transportadores codificados pelo gene *AGT1* de cepas industriais e de laboratório, e relacionaram estas diferenças com a capacidade destes alelos da permease de transportar maltotriose e *p*NP α G. Interessantemente, a cepa mais eficiente na utilização de maltotriose portava o gene *AGT1* com algumas mutações pontuais, muitas delas já descritas acima (vide VIDGREN et al., 2005), mas apresentava uma substituição nova (I505T) na sequência da permease capaz de transportar melhor os açúcares (SMIT et al., 2007). Estes resultados vão de encontro com a importância do resíduo de aminoácido R504 para a atividade de transporte revelada no presente trabalho, sugerindo que Arg-504 e Ile-505 fazem parte do sítio de ligação do açúcar na permease Agt1p, e que possivelmente, a substituição de Ile-505 por uma treonina poderia facilitar o reconhecimento do açúcar ou aumentar a afinidade da permease pelo substrato.

Considerando todas as observações apresentadas no presente trabalho e os dados publicados para os transportadores LacY, GltT e EmrD (ABRAMSON et al., 2003a, 2003b; GUAN e KABACK, 2006; HUANG et al., 2003; MIRZA et al., 2006; YIN et al., 2006), propomos um mecanismo para o simporte açúcar-H⁺ realizado pela permease Agt1p (Figura 4.18). Na ausência do açúcar, o transportador Agt1p na conformação com a face voltada para

o periplasma é instável e possivelmente o resíduo Glu-167 encontra-se protonado. Provavelmente, o açúcar é reconhecido pela região envolvendo este resíduo e também Arg-504 e Ile-505. Uma vez ligado o substrato, ocorreria a formação de uma ponte salina entre Arg-504 e Glu-167, provocando a desprotonação do resíduo Glu-167, e a indução da transição conformacional para a orientação da proteína com a face voltada para o interior onde o próton passa a ser partilhado entre os resíduos Glu-120 e Asp-123. Por fim, o substrato é liberado para o interior do citoplasma, e a ponte salina entre Arg-504 e Glu-167 é quebrada. Então, o próton é finalmente liberado no interior da célula e a conformação da permease volta para a orientação com a face da proteína voltada para o periplasma.

Desta forma, nossos dados sugerem que os aminoácidos Glu-120, Asp-123 e Arg-504 estão envolvidos no simporte açúcar- H^+ realizado pela permease Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae*. Possivelmente, Glu-167, e Ile-505, também seriam importantes para o processo, participando tanto na ligação do substrato como na ligação do próton. Portanto, novos estudos de mutagênese destes resíduos seriam necessários para elucidar em maior detalhe o mecanismo de transporte de α -glicosídeos mediado pela permease Agt1p.

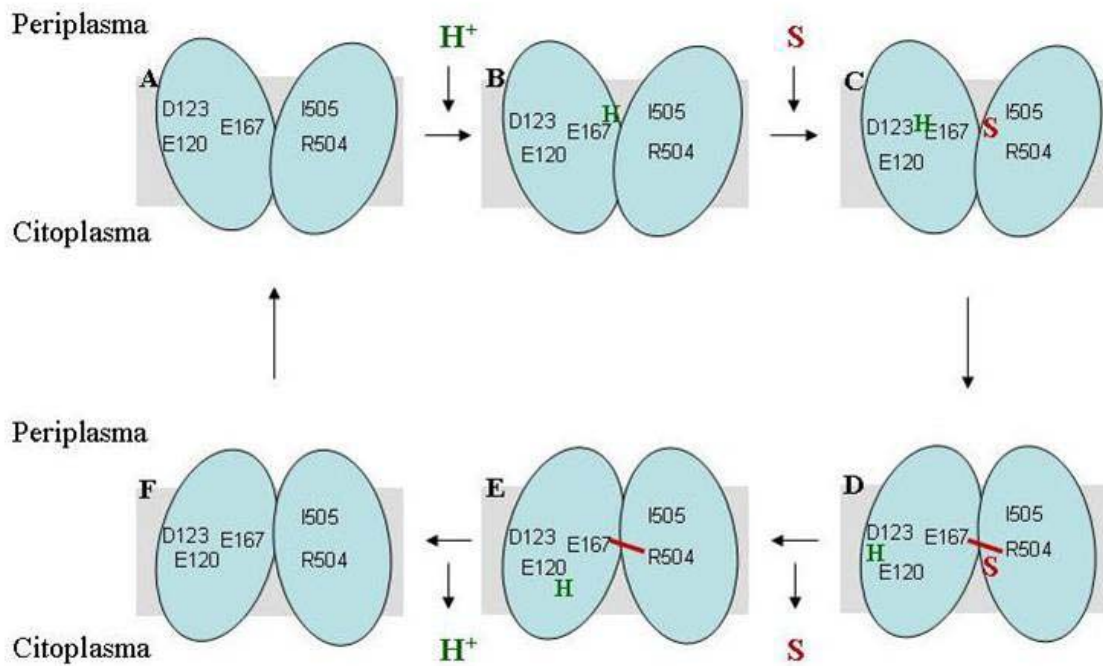


Figura 4.18 Mecanismo proposto para o transporte açúcar- H^+ através da permease Agt1p. Resíduos de aminoácidos considerados importantes para a atividade de transporte estão representados na figura. Pontes salinas entre os resíduos são mostradas como linhas vermelhas; o próton (H^+) e o substrato (S) são mostrados em verde e vermelho, respectivamente. (A) Na conformação voltada para o exterior, Agt1p deve ser instável e provavelmente E167 é protonado (B); o açúcar é reconhecido por I505, R504 e E167, e o próton passa a ser partilhado pelos resíduos E167 e D123 (C). A seguir uma ponte salina é formada entre R504 e E167, e o próton passa a ser partilhado por E120 e D123 (D), ocorrendo a transição conformacional da proteína para a orientação com a face voltada para o citoplasma. O substrato é liberado para o citoplasma, e a ponte salina é quebrada (E). Então, finalmente o próton é liberado (F), e a conformação da proteína retorna para a orientação com a face voltada para o periplasma (A).

5 Conclusões e perspectivas futuras

A otimização do processo fermentativo depende da eficiente utilização dos açúcares pela levedura *S. cerevisiae*, sendo que o passo inicial neste processo é o transporte dos α -glicosídeos para o interior das células através de proteínas transportadoras presentes na membrana plasmática. A permease Agt1p é um importante transportador de *S. cerevisiae*, capaz de transportar uma grande variedade de α -glicosídeos, incluindo maltose, maltotriose e sacarose, que são os açúcares predominantes nos processos industriais de panificação, cervejaria e produção de álcool combustível ou bebidas alcoólicas. Dessa forma, almejando-se uma melhor compreensão dos detalhes moleculares do processo de transporte de α -glicosídeos realizado pela permease Agt1p de *S. cerevisiae*, investigou-se os resíduos de aminoácidos que poderiam estar envolvidos com a atividade de co-transporte H^+ -açúcar.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que os resíduos Glu-120, Asp-123 e Arg-504 estão envolvidos com a atividade de transporte da permease Agt1p. Células da levedura LCM003, portando a permease mutada no resíduo Arg-504 (R504A), foram incapazes de utilizar maltotriose, indicando que esta permease encontra-se não-funcional. De fato, a mutação neste resíduo aboliu completamente a atividade de transporte ativo de vários açúcares normalmente transportados pela permease Agt1p. Já os transportadores mutados nos resíduos Glu-120 ou Asp-123 conseguiram crescer em meio com maltotriose como fonte de carbono, apesar de apresentarem menores velocidades de consumo do açúcar, e menor produção de etanol. No caso da mutação no resíduo Glu-120 (E120A), a atividade de transporte foi mais afetada, sendo que o açúcar foi consumido lentamente após uma significativa fase *lag* e praticamente nenhum etanol foi produzido. As permeases mutadas nestes resíduos apresentaram atividades de transporte do substrato sintético *pNP α G* menores do que o transportador não-mutado, condizentes com os fenótipos encontrados para a utilização da maltotriose. As atividades de co-transporte açúcar- H^+ , determinadas pelo influxo

de prótons nas células, indicam que estes resíduos seriam importantes para a translocação do próton. Portanto, seria interessante fazer ensaios de transporte com açúcares marcados radioativamente, paralelamente aos ensaios de co-transporte de prótons, para observar a estequiometria do processo, o que permitiria, por exemplo, observar se está ocorrendo desacoplamento entre o transporte do açúcar e a captação do H^+ . Além disso, observar as cinéticas de transporte em linhagens portando apenas Agt1p como transportador de α -glicosídeo (ou os mutantes derivados), seria extremamente relevante para analisar os efeitos das mutações sem nenhuma interferência de outros transportadores.

Conforme observado no modelo teórico da permease Agt1p, outros aminoácidos também poderiam estar envolvidos com a atividade de transporte, como é o caso do resíduo Glu-167 (que possivelmente interagiria com o resíduo Arg-504), ou ainda o resíduo Ile-505, para o qual foram recentemente descrito alelos em permeases com atividade de transporte incrementada. Desta forma, a substituição desses resíduos por mutagênese sítio-dirigida, como também a construção de duplos mutantes, permitirá melhor compreender o mecanismo de transporte de açúcares realizado pela permease codificada pelo gene *AGT1*.

Referências bibliográficas

- ABRAMSON, J.; SMIRNOVA, I.; KASHO, V.; VERNER, G.; KABACK, H. R.; IWATA, S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, v. 301, p. 610-615, 2003a.
- ABRAMSON, J.; SMIRNOVA, I.; KASHO, V.; VERNER, G.; KABACK, H. R.; IWATA, S. The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport. *FEBS Letter*, v. 555, p.96-101, 2003b.
- ALVES-ARAÚJO, C.; LOPEZ-HERNANDEZ, M. J.; SOUZA, M. J.; PRIETO, J. A.; RANDEZ-GIL, F. Cloning and characterization of the *MAL11* gene encoding a high-affinity maltose transporter from *Torulaspota delbrueckii*. *FEMS Yeast Res*, v. 4, p. 467-476, 2004.
- ALVES-JR S. L. Análise molecular do transporte ativo e da fermentação de maltotriose por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.
- ANDRÉ, B. An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 11, p. 1575-1611, 1995.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. G.; STRUHL, J. A. *Short protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates, John Wiley e Sons. NY, 1992.
- BATISTA, A.S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, v. 8, p. 26-33, 2004.
- BRONDIJK, T. H.; VA DER REST, M. E.; PLUIM, D.; DE VRIES, Y.; STINGL, K.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. Catabolite inactivation of wild-type and mutant maltose transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 15352-15357, 1998.
- BOTSTEIN, D; FINK, G.R. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*, v. 240, p. 1439-1443, 1988.

- CÁCERES, A.; CARDENAS, A.; GALLEGO, M.; VALCARVEL, M. A continuous spectrophotometric system for the discrimination/determination of monosaccharides and oligosaccharides in foods. *Anal. Chim. Acta*, v. 404, p. 121-129, 2000.
- CAVALIERI, D.; MCGOVERN, P.E.; HARTI, D.L.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.*, v. 57, p. S226-S232, 2003.
- CHENG, Q.; MICHELS, C. A. *MAL11* and *MAL61* encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, v. 173, p.1817-1820, 1991.
- DAHL, S. G.; SYLTE, I.; RAVNA, A. W. Structures and models of transporter proteins. *J. Pharma. Exp. Ther.*, v. 309, p. 853–860, 2004.
- DAY, R. E.; HIGGINS, V. J.; ROGERS, P. J.; DAWES, I. W. Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. *Yeast*, v. 19, p. 1015-1027, 2002.
- DIETVORST, J.; LONDESBOROUGH, J.; STEENSMA, H. Y. Maltotriose utilization in lager yeast strains: *MTT1* encodes a maltotriose transporter. *Yeast*, v. 22, p. 775-788, 2005.
- DITTY, J.L.; HARWOOD, C.S. Charged amino acids conserved in the aromatic acid/H⁺ symporter family of permeases are required for 4-hydroxybenzoate transport by PcaK from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, v. 184, p. 1444-1448, 2002.
- ENTIAN, K.D.; KÖTTER, P. Yeast mutant and plasmid collections. *Methods Microbiol.* v. 26, p. 431-449, 1998.
- FABRE, E.; MULLER, H.; THERIZOLS, P.; LAFONTAINE, I.; DUJON, B.; FAIRHEAD, C. Comparative genomics in hemiascomycetes yeast: evolution of sex, silencing and subtelomeres. *Mol. Biol. Evol.*, v. 22, p. 856-873, 2005.
- FLEMING, K. G. Riding the wave: structural and energetic principles of helical membrane proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 11, p. 67–71, 2000.

- FORREST, R. L.; TANG, C. L.; HONIG, B. On the Accuracy of Homology Modeling and Sequence Alignment Methods Applied to Membrane Proteins. *Biophys. J.*, v. 91, p. 508-517, 2006.
- FRILLINGOS, S.; SAHIN-TOTH, M.; WU, J.; KABACK, H. R. Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. *FASEB J.*, v. 12, p. 1281-1299, 1998.
- GADURA, N.; MICHELS, C. A. Sequences in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces cerevisiae* maltose permease are required for vacuolar degradation but not glucose-induced internalization. *Curr. Genet.*, v. 50, p. 101-114, 2006.
- GUAN, L.; KABACK, H. R. Lessons from lactose permease. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 35, p. 67-91, 2006.
- GUAN, L.; SAHIN-TOTH, M.; KABACK, H. R. Changing the lactose permease of *Escherichia coli* into a galactose-specific symporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, p. 6613-6618, 2002.
- HAN, E.K.; COTTY, F.; SOTTAS, C.; JIANG, H.; MICHELS, C.A. Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.*, v. 17, p. 1093-1107, 1995.
- HERBERTS, R.A. Transporte ativo de α -glicosídeos: Uma metodologia para avaliar a vitalidade de leveduras cervejeiras. Dissertação de mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- HIRAI, T.; HEYMANN, J. A. W.; MALONEY, P. C.; SUBRAMANIAN, S. Structural Model for 12-Helix Transporters Belonging to the Major Facilitator Superfamily. *J. Bacteriol.*, v. 185, p. 1712-1718, 2003.
- HOLLATZ, C.; STAMBUK, B.U. Colorimetric determination of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Methods*, v. 46, p. 253-259, 2001.
- HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 331, p. 41-79, 1997.

- HUANG, Y.; LEMIEUX, J.M.; SONG, J.; AUER, M.; WANG, D.N. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science*, v. 301, p. 616-620, 2003.
- INGLEDEW, W.M. Yeasts for production of fuel ethanol. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (eds). *The yeasts*. San Diego, USA: Academic Press. v. 5, p. 245-291, 1993.
- JESPERSEN, L.; CESAR, L. B.; MEADEN, P. G.; JAKOBSEN, M. (1999) Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 450-456, 1999.
- JOHNSTON, M.; KIM, J. H. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 33, p. 247-252, 2005.
- JULES, M.; GUILLOU, V.; FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, p. 2771-2778, 2004.
- KABACK, H. R. A molecular mechanism for energy coupling in a membrane transport protein, the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 94, p. 5539-5543, 1997.
- KASAHARA, T.; KASAHARA, M. Transmembrane segments 1, 5, 7 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *Saccharomyces cerevisiae* Hxt2 transporter. *Biochem. J.*, v. 372, p. 247-252, 2003.
- KASAHARA, M.; MAEDA, M. Contribution to substrate recognition of two aromatic amino acid residues in putative transmembrane segment 10 of the yeast sugar transporter Gal2 and Hxt2. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 29106-29112, 1998.
- KASAHARA, M.; SHIMODA, E.; MAEDA, M. Transmembrane segment 10 is important for substrate recognition in Gal2 and Hxt2 sugar transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, v. 389, p. 174-178, 1996.
- KNOP, M.; SIEGERS, K.; PEREIRA, G.; ZACHARIAE, W.; WINSOR, B.; NASMYTH, K.; SCHIEBEL, E. Epitope Tagging of Yeast Genes using a PCR-based Strategy: More Tags and Improved Practical Routines. *Yeast*, v. 15, p. 963-972, 1999.

- KODAMA, Y.; FUKUI, N.; ASHIKARI, T.; SHIBANO, Y.; MORIOKA-FUJIMOTO, K.; HIRAKI, Y.; NAKATANI, K. Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, v. 53, p. 24-29, 1995.
- LAGERSTEDT, J. O.; VOSS, J. C.; WIESLANDER, A.; PERSSON, B. L. Structural modeling of dual-affinity purified Pho84 phosphate transporter. *FEBS letters*, v. 578, p. 262-268, 2004.
- LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 104, p. 1107-1112, 1993.
- LANDRY, C.R.; TOWNSEND, J.P.; HARTL, D.L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Ecol.*, v. 15, p. 575-591, 2006.
- LOCHER, K. P.; BASS, R. B.; REES, D. C. Breaching the barrier. *Science*, v. 301, p. 603-604, 2003.
- LONGTINE, M.S.; MCKENZIE, A.; DEMARINI, D.J.; SHAH, N.G.; WACH, A.; BRACHAT, A.; PHILIPPSEN, P.; PRINGLE, J.R. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 14, p. 953-961, 1998.
- LU, J. M.; BUSH, D. R. His-65 in the proton sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increases transport activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 9025-9030, 1998.
- MALLUTA, E. F.; DECKER, P.; STAMBUK, B.U. The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Basic Microbiol.*, v. 40, p. 199-205, 2000.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, 1982.
- MEDINTZ, I.; WANG, X.; HRADEK, T.; MICHELS, C. A. A PEST-like sequence in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces* maltose permease is required for glucose-induced proteolysis and rapid inactivation of transport activity. *Biochemistry*, v. 39, p. 4518-4526, 2000.

- MICHELIS, C. A.; READ, E.; NAT, K.; CHARRON, M. J. The telomere-associated *MAL3* locus of *Saccharomyces cerevisiae* is a tandem array of repeated genes. *Yeast*, v. 8, p. 655-665, 1992.
- MIRZA,O.; GUAN, L.; VERNER, G.; IWATA,S.; KABACK, H. R. Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY. *EMBO J.*, v. 25, p. 1177-1183, 2006.
- MUECKLER, M.; MAKEOEACE, C. Transmembrane segment 5 of the Glut1 glucose transporter is an amphipathic helix that forms part of the sugar permeation pathway. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p.10923-10926, 1999.
- MUECKLER, M.; WENG, W.; KRUSE, M. Glutamine 161 of Glut1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. *J. Biol. Chem.* v. 269, p. 20533-20538, 1994.
- NOVAK, S.; ZECHNER-KRPAN, V.; MARIÉ, V. Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* v. 42, p. 213-218, 2004.
- OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 63, p. 554-559, 1999.
- PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; SAIER, M. H. JR. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 1-34, 1998.
- PETRACEK, M.E.; LONGTINE, M.S. PCR-based engineering of yeast genome. *Methods in Enzymol.*, v. 350, p. 445-469, 2002.
- PETTERSSON, N.; FILIPSSON, C.; BECIT, E.; BRIVE, L.; HOHMANN, S. Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biol. Cell.* v. 97, p. 487-500, 2005.
- PINSON, B.; CHEVALLIER, J.; URBAN-GRIMAL, D. Only one of the charged amino acids located in membrane-spanning regions is important for the function of the *Saccharomyces cerevisiae* uracil permease. *Biochem. J.*, v. 339, p. 37-42, 1999.
- RODIONOV, Y.V.; KEPPEN, O.I.; SUKHACHEVA, M.V. A photometric assay for ethanol. *Appl. Biochem. Microbiol.*, v. 38, p. 395-396, 2002.

- SAIER, M. H. JR. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 64, p. 354 – 411, 2000(a).
- SAIER, M. H. JR. Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J. Bacteriol.*, v. 182, p. 5029-5035, 2000 (b).
- SAIER, M. H. JR. Tracing pathways of transport protein evolution. *Mol. Microbiol.*, v. 48, p. 1145–1156, 2003.
- SAIER, M. H. JR.; TRAN, C. V.; BARABOTE, R. D. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* v. 34, p. 181– 186, 2006.
- SAHIN-TOTH, M.; KARLIN, A.; KABACK, H. R. Unraveling the mechanism of lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 10729-10732, 2000.
- SALAS-BURGOS, A.; ISEROVICH, P.; ZUNIGA, F.; VERA, J. C.; FISCHBARG, J. Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter Glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules. *Biophys. J.*, v. 87, p. 2990-2999, 2004.
- SALEMA-OOM, M.; PINTO, V. V.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces* strains: characterization of a new member of the α -glucoside transporter family. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 71, p. 5044-5049, 2005.
- SALGADO, A.M.; FOLLY, R.O.M.; VALDMAN, B.; CÓS, O.; VALERO, F. Colorimetric method for the determination of ethanol by flow injection analysis. *Biotechnol. Letters.* v. 22, p. 327-330, 2000.
- SERRANO, R. Energy requirements for maltose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.*, v. 80, p. 97-102, 1997.
- SHERMAN, F. Getting started with yeast. *Methods in Enzymol.*, v. 350, p. 3-41, 2002.
- SMIT, A.; CORDERO OTERO, R. R.; PRETORIUS, I. S. Differences among AGT1-encoded α -glucoside transporters and their ability to transport maltotriose in *Saccharomyces* yeast. *Ann. Microbiol.*, v. 57, p. 77-84, 2007.

- SORGEN, P. L.; HU, Y.; GUAN, L.; KABACK, H. R.; GIRVIN, M. E. An approach to membrane protein structure without crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, p. 14037-14040, 2002.
- STAMBUK, B.U. A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase. *Biochem. Educ.* v. 27, p. 178-181, 1999.
- STAMBUK, B.U. Transcriptional and posttranslational regulation of a membrane nutrient transporter. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, v. 30, p. 388-393, 2002.
- STAMBUK, B.U.; PANEK, A.D.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; DE ARAUJO, P.S. Expression of high-affinity trehalose- H^+ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1379, p. 118-128, 1998.
- STAMBUK, B.U.; DA SILVA, M.A.; PANEK, A.D.; DE ARAUJO, P.S. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Letters*. v. 170, p. 105-110, 1999.
- STAMBUK, B.U.; BATISTA, A.S.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* v. 89, p. 212-214, 2000.
- STAMBUK, B.U.; DE ARAUJO, P.S. Kinetics of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* v.1, p. 73-78, 2001.
- STAMBUK, B.U.; ALVES JR, S.L.; HOLLATZ, C.; ZASTROW, C.R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters Appl. Microbiol*, v.43, p. 370-376, 2006.
- STAMBUK, B. U.; DE ARAUJO, P. S.; PANEK, A. D.; SERRANO, R. Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* v. 237, p. 876-881, 1996.
- VADYVALOO, V.; SMIRNOVA, I. N.; KASHO, V. N.; KABACK, H. R. Conservation of residues involved in sugar/ H^+ symport by the sucrose permease of *Escherichia coli* relative to lactose permease. *J. Mol. Biol.*, v. 358, p. 1051-1059, 2006.
- VAN BELLE, D.; ANDRE, B. A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 13, p. 389-398, 2001.

- VARDY, E.; ARKIN, I. T.; GOTTSCHALK, K. E.; KABACK, H. R.; SCHULDINER, S. Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling. *Protein Science*, v. 13, p. 1832-1840, 2004.
- VENKATESAN, P.; KABACK, H. R. The substrate-binding site in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 95, p. 9802-9807, 1998.
- VIDGREN, V.; RUOHONEN, L.; LONDESBOROUGH, J. Characterization and functional analysis of the *MAL* and *MPH* loci for maltose utilization in some Ale and Lager yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*; v. 71, p.7846-7857, 2005.
- VIIGAND, K.; TAMMUS, K.; ALAMAE, T. Clustering of *MAL* genes in *Hansenula polymorpha*: Cloning of the maltose permease gene and expression from the divergent intergenic region between the maltose permease and maltase genes. *FEMS Yeast Res.*, v.5, p. 1019-1028, 2005.
- VIIGAND, K.; ALAMAE, T. Further study of the *Hansenula polymorpha* MAL locus: characterization of the α -glucoside permease encoded by the *HpMAL2* gene. *FEMS Yeast Res.*, p. 1-11, 2007.
- YIN, Y.; HE, X.; SZEWCZYK, P.; NGUYEN, T.; CHANG, G. Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science*, v. 312, p. 741-744, 2006.
- WEUSTHUIS, R. A.; ADAMS, H.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DAM, K. Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 59, p. 3102-3109, 1993.
- WIECZORKE, R.; KRAMPE, S.; WEIERSTALL, T.; FREIDEL, K.; HOLLEMBERG, C. P.; BOLES, E. Concurrent knock-out of least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, v. 464, p. 123-128, 1999.
- ZASTROW, C.R.; MATTOS, M.A.; HOLLATZ, C.; STAMBUK, B.U. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*. v. 22, p. 455-459, 2000.
- ZASTROW, C.R.; HOLLATZ, C.; DE ARAUJO, P.S.; STAMBUK, B.U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v. 27, p. 34-38, 2001.

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](#)