

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Marcia Aparecida da Silva

**Metabolismo de α -metil glicosídeo em
*Saccharomyces cerevisiae***

Orientador: Prof. Dr. Pedro Soares de Araujo

São Paulo
30 de outubro de 2007.

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Marcia Aparecida da Silva

**Metabolismo de α -metil glicosídeo em
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do *Título de Mestre* em:

Ciências (Bioquímica)

Orientador: *Prof. Dr. Pedro Soares de Araujo*

São Paulo
2007

Marcia Aparecida da Silva

**Metabolismo de α -metil glicosídeo em
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do *Título de Mestre* em:
Ciências Biológicas (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico esta dissertação:

Aos meus pais (*in memoriam*)

E o pai deitou o primeiro raio de luz, sobre a primeira estrela e na vontade ergueu a fé, o homem agora deitas sobre o seio da Mãe Terra e Adormeces, e te levantarás junto ao ombro do Pai, isto se repetirá tantas vezes quanto necessário for, até a definitiva liberdade e ficará no seio do Pai para nele desfrutar a tua Glória...

Israel Franco Ferreira

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus irmãos e familiares, os quais são pessoas essenciais na minha vida.

Agradeço ao Prof. Pedro S. de Araujo, pela orientação e por todos estes anos de trabalho e convivência ótima no laboratório, os quais contribuíram muito para a minha formação. Obrigada também pela confiança.

À Profa. Iolanda Cuccovia e ao Prof. Hernan Chaimovich, primeiro pela amizade e também pelo incentivo para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Boris Stambuk. Quantas vezes você me perguntou quando eu começaria a fazer o mestrado! Obrigada pelo apoio, colaboração e por todos estes anos de amizade.

Ao Sérgio, pelas discussões, sugestões e críticas que foram de grande importância na redação deste trabalho

Ao pessoal do laboratório que direta ou indiretamente me ajudaram muito: Ana, Kátia, Larissa, Flávio, Paula e também aos ICs Filipe, André, Tiago, Vanessa, Louise.

Aos meus amigos de sempre: Idécio, Antonieta, Fábio, T.C., Palmira, Maraga, Sílvia Helena, Helena (floripa), Fabinho, Ana P., Catarina, Silvinha, Xudão, Maurício, Luiz Gustavo...

À Profa. Maria Júlia e todos de seu laboratório, pelos empréstimos, uso de aparelhos, boa convivência...

Ao Instituto de Química e seus funcionários.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

ABREVIACÕES	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Transporte de α -glicosídios	01
1.2. Metabolismo de trealose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	05
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho	11
3.2. Condições de cultivo	11
3.3. Seleção da cepa AP77-11B	13
3.4. Protocolo para cruzamento de células	14
3.5. Medidas de transporte	15
3.5.1. Utilizando α -glicosídios marcado com ^{14}C	15
3.5.2. Determinação do co-transporte de prótons	16
3.6. Experimento de efluxo e contrafluxo de ^{14}C - α -MG	16
3.7. Dosagem de etanol	17
3.8. Dosagens Enzimáticas	17
3.8.1. Atividade da α -metilglicosidase periplásmica	17
3.8.2. Determinação da atividade de α -glicosidase <i>in situ</i>	18
3.9. Mini extrato bruto livre de células	19
3.10. Dosagem de proteína	19
3.11. Focalização Isoelétrica em gel	20
4. RESULTADOS	22
4.1. Seleção da segregante AP77-11B	22
4.2. Caracterização do transporte de α -MG na cepa AP77-11B	26
4.3. Função dos genes <i>HXT</i> no transporte de α -MG	34
4.4. Elucidação do mecanismo de utilização do α -MG pela cepa AP77-11B	36

5. DISCUSSÃO	45
5.1. Transporte de α -metil glicosídeo	45
5.2. Metabolismo de α -MG em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
6. CONCLUSÕES	54
7. BIBLIOGRAGIA	55
CURRICULUM VITAE	63

ABREVIações

Ade	Adenina
α-MG	α -Metil glicosídeo
α-MGase	α -Metilglicosidase
c-AMP	AMP cíclico (Adenosina monofosfato)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
K_m	Constante de Michaelis-Menten
MES	Ácido 2(N-morfolino) etano sulfônico
MOPS	Ácido 3(N-morfolino) propano sulfônico
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
R_f	migração relativa
rpm	rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletlenodiamina
TES	Ácido N-tris(hidroxi-metil)-metil-2-amino-metano sulfônico
Tris	Tris-(hidroxi-metil)-amino-metano
Ura	uracila

RESUMO

da Silva, M. A. **Metabolismo de α -metil glicosídeo em *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 62p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O transporte de α -metil glicosídeo (α -MG) em *Saccharomyces cerevisiae* foi recentemente reportado como transporte ativo, do tipo simporte de α -MG com H^+ mediado pela permease Agt1p.

A cepa AP77-11B (cepa selecionada em nosso laboratório) transporta ^{14}C - α -MG pelo mecanismo descrito como difusão facilitada porque não existe co-transporte de H^+ durante o transporte de α -MG. Os genes *HXT1-HXT17* pertencem à família dos transportadores de hexoses em *Saccharomyces cerevisiae*. Então, nós decidimos investigar a possibilidade que o transporte de α -MG poderia ser mediado pelos transportadores de hexoses.

Nós demonstramos que cepa MC966A (tipo selvagem), KY73 (isogênica com MC966A mas deletada nos *HXT1-7*), BSY08 (isogênica com KY73 com o *AGT1* deletado), BSY09 (isogênica com MC966A com o *AGT1* deletado) e a EBY.VW4000 (*hxt1-17 agt1 gal2*-null), não cresceram em α -MG como fonte de carbono. Além disso, estas cepas não transportaram α -MG por difusão facilitada quando as células foram cultivadas em meio com maltose, levando-nos a concluir que os transportadores de hexoses não estavam envolvidos no transporte de α -MG.

Nós observamos que a cepa AP77-11B apresentou alta atividade de α -metilglicosidase periplásmica quando as células foram cultivadas em α -MG. Esta atividade enzimática foi ensaiada usando um método descrito primeiramente para invertase periplásmica, no qual as células eram incubadas com fluoreto de sódio, um inibidor da enolase, antes da incubação com α -MG. Então, a glicose produzida durante a hidrólise do α -MG poderia ser determinada. A atividade extracelular só está presente em células cultivadas em α -MG. Células de-reprimidas não mostraram atividade de α -metilglicosidase.

Os parâmetros cinéticos determinados para α -metilglicosidase, indicaram que esta enzima tem baixa afinidade para o α -MG. Além do mais, a atividade específica da α -metilglicosidase periplásmica aumentou ao longo da curva de crescimento em α -MG.

Os resultados reportados mostraram que existem duas vias de utilização de α -MG em *Saccharomyces cerevisiae*. Uma via é mediada pela Agt1p, responsável pelo transporte ativo de α -MG. Na outra via, a α -metilglicosidase é secretada para o espaço periplásmico das células. Então, a glicose produzida pela hidrólise do α -MG é transportada pelos transportadores de hexoses por difusão facilitada.

Palavras-chave: α -metil glicosídeo, permease Agt1p, *Saccharomyces cerevisiae*, transporte ativo, difusão facilitada, α -metilglicosidase.

ABSTRACT

da Silva, M. A. **α -Methyl Glucoside Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 62p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

α -Methyl glucoside (α -MG) transport in *Saccharomyces cerevisiae* was previously reported to be an active transport, a H⁺-symport mediated by the Agt1p permease.

Strain AP77-11B (a strain obtained in our laboratory) takes up ¹⁴C- α -MG by a mechanism which was ascribed to be facilitated diffusion since there is no H⁺-cotransport during the α -MG uptake. The *HXT1-HXT17* genes belong to a family of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, we decided to investigate the possibility that α -MG transport could be mediated by hexose transporters.

We demonstrated that strains MC966A (w.t.), KY73 (isogenic to MC966A but *hxt1-hxt7*-null), BSY08 (isogenic to KY73 with *AGT1* deleted), BSY09 (isogenic to MC966A with *AGT1* deleted) and even strain EBY.VW4000 (*hxt1-hxt17 agt1 gal2*-null), were not able to grow on α -MG as the sole carbon source. Moreover, none of them presented α -MG transport by facilitated diffusion when the strains were grown on maltose leading us to conclude that the HXT glucose transporters were not involved in α -MG transport.

We found that strain AP77-11B displayed a high periplasmic α -methylglucosidase activity when cells were grown on α -MG. This enzymatic activity was assayed using a method first described for periplasmic invertase in which cells were incubated with sodium fluoride, an inhibitor of enolase, prior to the incubation with α -MG. Then the glucose produced during α -MG hydrolysis could be accurately measured. The extracellular activity was present only in cells grown on α -MG. Glucose derepressed cells did not show periplasmic α -methylglucosidase activity.

α -Methylglucosidase kinetic parameters indicated that this enzyme has a low affinity for the α -MG substrate. Moreover, the specific activity increased during growth on α -MG.

The results reported here showed that there are two distinct pathways for α -MG assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. One pathway is mediated by Agt1p permease, responsible for active α -MG transport. In the other pathway α -methylglucosidase is secreted to the cell periplasmic space. Thus, the glucose produced there by α -MG hydrolysis is transported to the cytoplasm via the hexose transporters by facilitated diffusion.

Keywords: α -Methyl glucoside, *Saccharomyces cerevisiae*, α -methylglucosidase, active transport, facilitated diffusion, Agt1p permease.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transporte de α -glicosídios

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo muito utilizado nas indústrias de panificação, álcool combustível e bebidas alcoólicas, devido a sua extraordinária capacidade de fermentar uma grande variedade de açúcares (Cavalieri *et. al.*, 2003 e Ingledew, 1993).

Durante o crescimento em meio líquido contendo glicose como fonte de carbono, verificam-se duas fases: Fase inicial de crescimento exponencial, onde as células reprimidas pela glicose consomem grande parte do açúcar por metabolismo anaeróbico produzindo etanol, mesmo na presença de oxigênio. Quando mais de 50% da glicose do meio já foi consumida, inicia-se a segunda fase de crescimento conhecida por fase de transição ou diauxia. Esta fase é caracterizada por uma queda na taxa de crescimento e início da de-repressão das células. As células assimilam o etanol do meio e o metabolizam aerobicamente ocorrendo uma queda na taxa de crescimento (Fiechter *et al.*, 1981).

A *S. cerevisiae* quando cultivada em laboratório, sob condições controladas, utiliza preferencialmente mono e dissacarídios como fonte de carbono. Como a membrana plasmática destas células tem a mesma estrutura que a descrita para outras membranas biológicas,

uma bicamada de fosfolipídios contendo proteínas (em Stambuk, 1995), a permeabilidade a estes açúcares é quase nula e portanto, são necessários mecanismos de transporte para a captação destes açúcares pelas células.

Dois mecanismos de transporte para carboidratos foram identificados em células de levedura: a difusão facilitada e o transporte ativo (Okada & Halvorson, 1964; Serrano, 1977; Lagunas, 1993). O transporte de glicose e de outros monossacarídios como frutose e manose, ocorre por difusão facilitada e é mediado pelos transportadores de hexoses (revisto por Lagunas, 1993 e Boles & Hollenberg, 1997). A galactose possui um sistema de transporte facilitado indutível e específico (Kuo *et al.* 1970; Kuo & Cirillo, 1970; Kotyk & Michaljanicová, 1974).

Foram identificados 18 genes que codificam para os transportadores de hexoses, *HXT1-17* e *GAL2* (revisto por Boles & Hollenberg, 1997). As permeases codificadas pelos *HXT1-4* e *HXT6-7* foram descritas como as principais transportadoras de glicose em *Saccharomyces cerevisiae* (Reifenberger *et al.*, 1995 e 1997). Neste estudo, foi utilizada uma cepa *hxt1-7* null e observou-se que tanto o crescimento em glicose quanto o transporte deste açúcar estavam abaixo dos níveis de detecção. Entretanto, a expressão de qualquer

um dos genes *HXT1, 2, 3, 4, 6 ou 7*, era suficiente para permitir a captação de glicose, ou seja, a sua utilização como fonte de carbono.

Em 1999, Wiczorke *et al.* publicaram que as permeases Hxt5p e Hxt8-17p, exceto a Hxt12p (*HXT12* é um pseudogene), também são capazes de transportar glicose, frutose e manose. Mas para que este transporte seja observado é necessária a super-expressão destes genes.

A maltose é transportada para o citossol por um sistema de transporte ativo. Em 1977, Serrano demonstrou que o transporte de maltose estava acoplado ao gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática, que fornece a energia necessária para este transporte, sendo portanto um transporte do tipo secundário. O transporte ativo primário, é a extrusão dos prótons gerados pela atividade da ATPase-H⁺ da membrana plasmática que hidrolisa ATPs produzidos no metabolismo. A maltose é transportada a favor de seu gradiente de concentração (é prontamente hidrolisada pela $\alpha(1-4)$ -glicosidase) e cada molécula de maltose é co-transportada com um próton para o interior da célula.

A metabolização de maltose requer a presença de pelo menos um dos 5 loci *MAL*: *MAL1, MAL2, MAL3, MAL4* e *MAL6*. Cada um destes locus contém os três genes necessários para a metabolização deste açúcar. O gene 1 codifica para o transportador de maltose, o gene 2

codifica para a maltase e o gene 3 codifica para o regulador necessário para a expressão destes genes. Estudos bioquímicos mostraram que a maltose permease possui alta especificidade para maltose e turanose e não transporta outros α -glicosídios como trealose, α -metil glicosídeo (α -MG), maltotriose e melezitose (Cheng *et al.*, 1989 e 1991; Dubin *et al.*, 1985; Chang *et al.*, 1989, Oda & Tonomura, 1996; Stambuk *et al.*, 1998). A estrutura química do α -MG é apresentada na **Figura 1**.

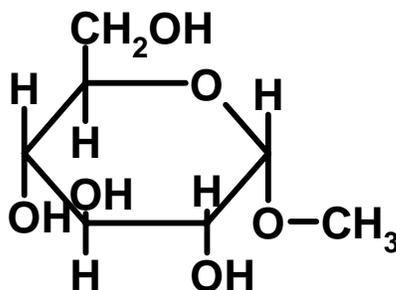


Figura 1. Estrutura química do α -metil glicosídeo.

O transporte de trealose foi caracterizado por Stambuk, *et al.*, 1996, como ativo, do tipo simporte de trealose/ H^+ , de alta afinidade e pH ótimo em torno de 5,0. Entretanto, a trealose é transportada contra o seu gradiente de concentração. Existe uma correlação entre a atividade de transporte de trealose e o nível deste açúcar acumulado pelas células (Stambuk *et al.*, 1998). Stambuk *et al.*, 1998 e 1999, demonstraram que a permease Agt1p, cujo gene está presente no locus parcialmente funcional mal1g, é a responsável pelo transporte ativo de vários α -glicosídios. Foi verificada a atividade de transporte,

simporte com H^+ , com maltose, trealose, maltotriose, α -MG e sacarose como substratos. Uma interessante observação foi a de que o α -MG, quando usado com fonte de carbono, é o melhor indutor da atividade de transporte (Stambuk *et al.*, 1998).

Foi publicado (Okada & Halvorson, 1964a e 1964b) que a atividade de transporte de α -MG pelas células de levedura é transporte ativo indutível de alta afinidade. Outra atividade de transporte de α -MG, de baixa afinidade, que ocorre por difusão facilitada, também foi reportada por Okada & Halvorson (1964a). Ficou estabelecido pelos autores que os pares de genes *MGL1 MGL2* ou *MGL2 MGL3* são responsáveis pela fermentação da isomaltose e do α -MG. Os genes *MGL1* e *MGL3* controlam a síntese da isomaltase e o *MGL2* codifica para o transportador de isomaltose, razão pela qual foi postulado que o gene *MGL2* seria o responsável pelas duas atividades de transporte de α -MG (Okada & Halvorson 1963). Porém, este gene não foi seqüenciado e não está presente no genoma da cepa S288C (Feldmann *et al.*, 1994).

1.2. Metabolismo de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*

A trealose, um dissacarídeo de glicose não redutor, é um carboidrato encontrado em vários organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas, insetos e alguns invertebrados (Elbein, 1974).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, além da função de carboidrato de reserva (Thevelein, 1984; Panek, 1991), a trealose é acumulada em resposta a restrição nutricional, transição para fase estacionária do crescimento (Panek & Mattoon, 1977), e durante várias condições estressantes do meio ambiente (Wiemken, 1990).

Muitos trabalhos foram dedicados ao estudo das enzimas responsáveis pela síntese, degradação e transporte da trealose, bem como os mecanismos regulatórios envolvidos. Foi mostrado que este dissacarídeo cumpre um papel fundamental na fisiologia e metabolismo da levedura.

A trealose é encontrada em vários organismos capazes de sobreviver à desidratação completa. Este estado conhecido como anidrobiose é comum em nematóides, tardígrados, células de leveduras e esporos de fungos (Crowe *et al.*, 1998). Estudos *in vitro* e *in vivo* (Crowe *et al.*, 1988; Leslie *et al.*, 1994) mostraram que a trealose é o dissacarídeo mais efetivo para conferir a estabilidade estrutural às membranas durante o processo de desidratação. Este efeito protetor é o resultado das interações deste açúcar com as cabeças polares dos fosfolipídios da bicamada diminuindo a temperatura da transição de fase das membranas desidratadas. A permease Agt1p (Stambuk *et al.*, 1998 e 1999) permite que a trealose

seja transportada para ambos os folhetos da bicamada impedindo efeitos deletérios e perda da função biológica na membrana.

A hidrólise enzimática de trealose foi descrita pela primeira vez em 1895 por Emil Fischer (em Nwaka *et al.* 1996), e desde então, três trealases foram descritas em *Saccharomyces cerevisiae*. Uma forma pouco ativa da trealase, que é ativada por fosforilação pela proteína quinase dependente de c-AMP, foi reportada em 1974 por Van der Plaats. Em 1982, Keller *et al.* demonstraram que esta trealase estava localizada no citossol, enquanto uma segunda trealase, permanentemente ativa, foi encontrada no vacúolo.

Londesborough & Varimo em 1984 separaram estas duas atividades trealásicas na fração solúvel de fermento de panificação e determinaram o pH ótimo para cada uma delas. A trealase localizada no citossol possui o máximo da sua atividade em pH 7,0 e foi denominada trealase neutra, enquanto a trealase vacuolar, cujo máximo de atividade está em pH 4,5, foi denominada trealase ácida.

A trealase neutra teve o seu gene correspondente, *NTH1*, clonado e sequenciado por Kopp *et al.* em 1993, sendo esta enzima responsável pela hidrólise de trealose no citossol (Koop *et al.*, 1993 e Nwaka *et al.*, 1995). Em 1988, Mittenbühler & Holzer purificaram e caracterizaram a trealase ácida. O gene *ATH1* foi clonado e

sequenciado em 1995 por Destruelle *et al.*, porém, esta enzima não possui mecanismo de regulação conhecido até o momento.

Um terceiro gene, *NTH2*, foi descoberto por Wolfe *et al.* em 1994, e possui alta homologia com a seqüência de aminoácidos do gene *NTH1*, mas o seu papel no metabolismo de trealose também não é conhecido.

Nwaka *et al.*, 1996, mostraram que em *Saccharomyces cerevisiae* a cepa mutante na trealase ácida $\Delta ath1$ não foi capaz de crescer em trealose como fonte de carbono, em contraste com a mutante na trealase neutra $\Delta nth1$. Este resultado sugeriu o envolvimento da trealase ácida na hidrólise da trealose externa, sendo a trealase neutra responsável pela hidrólise da trealose citossólica (Koop *et al.*, 1993 e Nwaka *et al.*, 1995).

Os resultados obtidos pelo grupo de H. Terenzi em 1997 reforçaram esta hipótese. *Mucor rouxii* (um zigomiceto) cresce muito bem utilizando trealose como fonte de carbono. Esta enzima está no espaço periplásmico das células e exibe um pH ótimo em torno de 4,5 em contraste com a trealase citossólica cujo pH ótimo é 6,5 (Almeida *et al.*, 1997).

Em 1996, Silveira *et al.* desenvolveram um método para a determinação da atividade enzimática da invertase periplásmica em *Saccharomyces cerevisiae*. Nas condições do método as células são

incubadas na presença de fluoreto de sódio, inibidor da enolase, e a glicose formada é quantificada no sobrenadante da reação.

Trabalhando com a hipótese da secreção da trealase ácida para o espaço periplásmico das células, utilizamos uma cepa disponível em nosso laboratório, 340-2B/ Δ AGT1, e vimos que esta cepa cresceu em trealose como fonte de carbono, apresentando atividade de trealase ácida quando as células foram incubadas com trealose na presença de NaF.

Porém, Jules *et al.*, 2004, confirmaram esta hipótese. A trealase ácida de *Saccharomyces cerevisiae* é secretada para o espaço periplásmico das células. A trealose é então hidrolisada externamente e captada como glicose por difusão facilitada.

O fato de existir outra via para a assimilação de trealose em levedura nos levou a investigar o metabolismo do α -MG em *Saccharomyces cerevisiae*. Neste trabalho, os nossos resultados mostraram que a cepa AP77-11B (cepa haplóide selecionada em nosso laboratório) apresenta uma alta taxa de crescimento quando cultivada em um meio onde o α -MG era a fonte de carbono. Entretanto, esta cepa não transportou nenhum dos α -glicosídeos ensaiados, **com exceção de ^{14}C - α -MG**, quando medidas de captação de açúcares marcados com ^{14}C foram realizadas com as células desta cepa.

2. OBJETIVOS

Como mencionado na introdução, alguns resultados preliminares por nós obtidos indicaram que a cepa AP77-11B possui um genótipo conhecido e cresce muito bem em α -MG como fonte de carbono. O fato de não existir transporte de maltose, trealose e outros α -glicosídios nesta cepa mostrou que a permease Agt1p não estaria envolvida no transporte de α -MG.

Os objetivos deste trabalho foram estudar detalhadamente o mecanismo de transporte deste α -glicosídio pelas células da cepa AP77-11B e identificar a proteína envolvida neste transporte.

Outra abordagem deste trabalho, foi analisar se a cepa AP77-11B possui atividade de α -metilglicosidase periplásmica nas células incubadas na presença de NaF e em que condições esta atividade é expressa. Como reportado para trealose (Jules *et al.*, 2004), existem duas vias diferentes para a assimilação de trealose em levedura sendo que uma das vias está associada à trealase ácida que hidrolisa a trealose no espaço periplásmico das células.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho:

Cepas	Genótipo
W303-1B	<i>MATα AGT1 MAL12 mal13Δ MAL31 MAL32 mal33Δ ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>
MAL1-1^c-Δ	<i>MATα mal11 mal12 MAL13-1^c [mal21 mal22]::TRP1 mal23 leu1 trp1</i>
AP-77 340-2B	<i>Diplóide da W303-1B x MAL1-1^c-Δ Mata AGT1 MAL12 mal13 ura3-52 lys2 trp1-1 met</i>
MC966A	<i>MATα MAL21 MAL22 MAL23 AGT1 ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 GAL SUC2</i>
KY73	<i>isogênica a MC966A, mas gal2Δ hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6 hxt5::LEU2 hxt7::HIS3</i>
BSY08	<i>isogênica a KY73, mas agt1::kan^r</i>
BSY09	<i>isogênica a MC966A, mas agt1::kan^r</i>
CEN.PK2-1C	<i>MATα MAL21 MAL22 MAL23-8^c MAL41 MAL31 AGT1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1</i>
EBY.VW4000	<i>isogênica com CEN.PK2-1C hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt17::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::lox gal2Δ agt1Δ</i>

3.2. Condições de cultivo

Todos os reagentes utilizados nos meios descritos abaixo são provenientes da Sigma, exceto o extrato de levedura que é da Difco.

Para o cultivo das células foram utilizados os seguintes meios:

- **Meio rico:** extrato de levedura 10 g/L, bactopectona 20 g/L, a fonte de carbono de interesse 20 g/L e antimicina A 3 µg/mL (usada para inibir a respiração e favorecer o crescimento fermentativo das células) ajustado para o pH 5,0 com HCl.

- **Meio mínimo:** base nitrogenada de levedura sem aminoácidos 7 g/L, fonte de carbono 20 g/L e os suplementos: uracila (Ura), leucina (Leu), histidina (His), triptofano (Trp), adenina (Ade) 30 mg/L cada e antimicina A 3 µg/mL. O meio foi preparado em tampão Mes 50 mM ajustado para pH 6,0 com Tris.

Para o meio sólido foi adicionado agar bacteriológico 25 g/L aos meios mencionados acima. Os meios foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120 °C.

As células foram incubadas em erlenmeyers contendo ¼ do seu volume de meio a 28 °C e 160 rpm. A densidade celular do meio foi determinada acompanhando-se a turvação do meio a 570 nm (espectrofotômetro Hitachi U-2000) e a massa celular foi expressa em peso seco.

Para a determinação do fator de peso seco, alíquotas de 10 mL do meio celular com absorbância conhecida foram filtradas em filtros de nitrocelulose com poro de 0,45 µm (HAWP, Millipore) e secos a 60 °C até peso constante. O fator de peso seco foi obtido dividindo-se a concentração de células pela absorbância.

3.3. Seleção da cepa AP77-11B

A cepa AP77 é uma diplóide obtida através do cruzamento entre as cepas W303-1B com a MAL1-1^c-Δ. Esta cepa foi esporulada dando origem a ascos contendo 4 esporos. Foram obtidos 36 esporos na segregação.

Os segregantes foram plaqueados em meio mínimo contendo α-MG 20 g/L e os suplementos Ura, His, Trp, Ade (30 mg/L), com e sem Leu 30 mg/L (a Leu foi usada como marcador auxotrófico). Foram plaqueados 50 μg de células de cada segregante, os quais permaneceram a 28 °C durante 4 dias.

De todos os segregantes da AP77, a AP77-6D, a AP77-11B, a AP77-17D e a AP77-19D foram as únicas cepas que cresceram em α-MG com Leu, mas não cresceram em meio com α-MG sem Leu, isto é, cepas α-MG (+) e Leu (-). Estes segregantes também não cresceram em meio rico com maltose 20 g/L e antimicina A 3 μg/mL.

Dos cruzamentos realizados entre estes segregantes com a W303-1A e a W303-1B (o cruzamento foi realizado com as duas cepas porque não sabíamos o sexo dos segregantes), apenas o cruzamento entre as cepas AP77-11B e W303-1B gerou descendentes capazes de crescerem em meio rico com maltose e antimicina A.

A esporulação da cepa AP77 e a análise dos segregantes em cada asco foram realizados no laboratório da Profa. Anita D. Panek

(UFRJ) seguindo técnicas tradicionais de manipulação de leveduras (Sherman *et al.* 1986).

3.4. Protocolo para cruzamento de células

Uma micro alça de cada cepa selecionada (AP77-6D, AP77-11B, AP77-17D e AP77-19D) foi ressuspensa em 50 μ L de tampão fostato 50 mM pH 6,0. Para as cepas W303-1A e W303-1B, uma alça cheia de cada cepa foi ressuspensa em 700 μ L do mesmo tampão.

Foram adicionados 50 μ L da suspensão da W303-1A na suspensão de cada segregante. O mesmo procedimento foi repetido com a W303-1B. As células foram misturadas e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente.

De cada "cruzamento", 5 μ L foram plaqueados em meio rico com maltose 20 g/L e antimicina A 3 μ g/mL e incubados a 28 $^{\circ}$ C.

Foram usadas as cepas W303-1A e W303-1B como controles negativos e a cepa AP77 como controle positivo.

Todos os cruzamentos foram realizados em duplicata e em condições estéreis.

3.5. Medidas de transporte

As atividades de transporte foram expressas em nmols transportados x mg⁻¹ de células (peso seco) x min⁻¹ (nmols/mg.min ou U/mg).

3.5.1. Utilizando α -glicosídios marcado com ¹⁴C

O transporte de ¹⁴C- α -MG foi determinado como descrito por Stambuk *et al.*, 1996. Entre 3 a 6 mg de células foram ressuspensas em 300 μ L de tampão succinato 50 mM pH 5,0 ajustado com Tris. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, 16 μ L de uma solução 100 mM de α -MG contendo 5,5 nmols de ¹⁴C- α -MG (Amersham, 316 mCi/mmol) foram adicionados às células. Nos intervalos de tempo 20, 80 e 240 segundos, 100 μ L do meio de reação foram coletados, filtrados em filtro de nitrocelulose (HAWP, Millipore) e lavados com 2 mL de água gelada. Os filtros foram colocados em tubos com 10 mL de líquido de cintilação miscível (Sardi) e a radioatividade foi medida em um contador de cintilação 1214 Rackbeta (LKB). As velocidades iniciais de transporte foram obtidas a partir de regressões lineares com coeficiente de correlação (r^2) igual ou superior a 0,98.

O transporte de ¹⁴C-trealose (sintetizada em nosso laboratório) e ¹⁴C-maltose (Amersham, 664 mCi/mmol) foram determinados como

descrito acima porém utilizando-se os tempos 1, 3 e 5 minutos para trealose e 30, 90 e 150 segundos para maltose.

3.5.2. Determinação do co-transporte de prótons

O co-transporte de prótons associado ao transporte de açúcares foi determinado registrando-se mudanças de pH em suspensão de células (descrito por Serrano, 1977). As células foram ressuspensas em água, em concentração maior que 10 mg/mL, e incubadas sob agitação a 28⁰C. Após a obtenção de uma linha base, a capacidade tampão das células foi determinada com pulsos de 50 ou 100 nmols de H⁺ (HCl). A seguir foi adicionado o açúcar em uma solução 100 mM em água, pH ajustado para 5,0 de forma a atingir a concentração final de 5 mM. O pH foi registrado com um pHmetro registrador gráfico modelo REA112 (Radiometer).

3.6. Experimento de efluxo e contrafluxo de ¹⁴C- α -MG

O experimento de captação de ¹⁴C- α -MG foi realizado de acordo com o descrito para medidas de transporte. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas no mesmo volume com água ou α -MG 100 mM. O efluxo ou contrafluxo, respectivamente, de ¹⁴C- α -MG foram observados pela radioatividade presente nas células (Stambuk *et al.*, 1996).

3.7. Dosagem de etanol

O etanol produzido no meio foi dosado pelo método enzimático da álcool desidrogenase (Lundquist, 1957) utilizando-se o kit de diagnóstico para álcool da Sigma Chem. Co.

No ensaio, 10 μ L de amostra foram incubados com 1,0 mL da solução de álcool desidrogenase (50 unidades), NAD^+ (0,6 μ mol) preparada em tampão glicina 0.5 M pH 9.0. Após incubação a 30 $^{\circ}$ C por um tempo no máximo de até 10 minutos a absorbância foi determinada a 340 nm. Foram utilizados 10 μ L de padrão de etanol 0,8 mg/mL e 10 μ L de água como branco.

3.8. Dosagens Enzimáticas

3.8.1. Atividade da α -metilglicosidase periplásmica

Para a determinação da atividade periplásmica, 100 μ L de uma suspensão entre 5-10 mg/mL de células foram incubados com 100 μ L de α -MG 100 mM preparado em tampão citrato 50 mM EDTA 6,5 mM NaF 50 mM pH 5,0 ou tampão maleato 50 mM EDTA 6,5 mM NaF 50 mM pH 7,0. Após 15 minutos de incubação a 30 $^{\circ}$ C a reação foi interrompida por aquecimento em banho de água fervente por 3 minutos. A glicose formada foi determinada em 100 μ L de sobrenadante pelo método da glicose oxidase-peroxidase utilizando-se

um kit comercial para a determinação de glicose (BioTécnica). A atividade da α -metilglicosidase citoplasmática foi determinada utilizando-se 100 μ L de extrato solúvel de células.

3.8.2. Determinação da atividade de α -glicosidase *in situ*

Para a determinação da atividade de α -glicosidase *in situ* foram utilizadas células permeabilizadas (Serrano *et al.*, 1973). Aproximadamente 2,0 mg de células foram ressuspensas em 100 μ L de tampão MOPS-NaOH 100 mM pH 6,8 contendo 1 mM EDTA, 1 mM DTT e glicerol 200 g/L. Após a adição de 6 μ L da mistura de tolueno/etanol/Triton X-100 100 g/L em água, 1:4:1 (v/v), as células foram agitadas em vórtex por 1 minuto, centrifugadas, lavadas duas vezes em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 7,0 e ressuspensas em 100 μ L do mesmo tampão (células permeabilizadas).

Para a realização do ensaio de atividade, 20 μ L da suspensão de células permeabilizadas foram adicionados a uma solução de α -MG 100 mM, para um volume final da reação de 100 μ L com uma concentração final de α -MG de 50 mM. A reação foi incubada por 3 minutos a 30°C e interrompida em banho de água fervente por 3 minutos. A glicose formada foi determinada em 10 μ L do sobrenadante da reação pelo método enzimático da glicose oxidase – peroxidase utilizando-se um kit comercial para a determinação de glicose (BioTécnica).

3.9. Mini extrato bruto livre de células

Foram coletadas 50 mg de células (peso seco) por centrifugação a 1.200xg por 5 minutos. Após lavar duas vezes com água bi-destilada e uma vez com o tampão de homogeneização (tampão citrato 50 mM EDTA 6,5 mM NaF 50 mM pH 5,0 ou tampão maleato 50 mM EDTA 6,5 mM NaF 50 mM pH 7,0), as células foram ressuspensas em 0,5 mL do mesmo tampão e transferidas para tubo de fundo redondo contendo 1,5 g de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro). As células foram rompidas por agitação vigorosa em vortex: três ciclos de um minuto cada com intervalo de um minuto para resfriamento em banho de gelo. Após centrifugação do extrato a 25.000xg por 10 minutos, o sobrenadante (extrato solúvel) foi recolhido para medidas de atividade (Zastrow *et al.*, 2001).

3.10. Dosagem de proteína

Para a determinação da concentração de proteína, foi usado o método do mini Biureto (Peters *et al.*, 1982). A sensibilidade do método está na faixa de 0,5 a 2,5 mg de proteína e foi usada albumina do soro bovino como padrão.

3.11. Focalização Isoelétrica em gel

Para a separação da α -metilglicosidase foi utilizado o método descrito por Spielman e Mowshowitz (1982) e modificado por Zastrow *et al.* em 2001. O gel de focalização isoeletrica continha acrilamida 7%, bis-acrilamida 0.2%, anfolito pH 3,5-10 3,2%, anfolito pH 5-7 0,45% (todos reagentes da Sigma) e glicerol 9,1% (Merck). O gel foi polimerizado com persulfato de amônio 0,023% (Sigma) e 15 μ L de Temed (Sigma). As dimensões do gel eram 100 x 80 x 1,5 mm. A eletroforese foi realizada utilizando-se um aparelho vertical da marca Hoefer SE250/SE260 a 4 °C, 100V e 10 W por aproximadamente 24 horas. No catodo foi utilizada uma solução de NaOH 0,02M e no anodo uma solução de H₃PO₄ 0,01M.

As amostras de extrato solúvel a serem isofocalizadas continham glicerol 10%, anfolito pH 5-7 10% e concentração final de proteína 50 μ g. Foi utilizada uma mistura de proteínas padrão com PIs conhecidos variando de 3,6 a 9,3 (Sigma). Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram reveladas com Coomassie Blue Brilhante R250. A atividade da α -metilglicosidase no gel foi determinada colocando-se o gel sobre papel de filtro Whatman 3MM embebido em solução de glicose oxidase e peroxidase (reagente utilizado na determinação de glicose). Em seguida, uma solução de α -MG 200 mM preparada em tampão citrato 50 mM EDTA 6,5 mM NaF 50 mM pH 5,0, foi espalhada

sobre o gel que ficou incubando por aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, até que a glicose produzida pela hidrólise do α -MG reagisse com o reativo para determinação de glicose.

Alternativamente, para a revelação das diferentes α -glicosidases presentes no gel foi utilizado o 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glicopiranosídeo (Calbiochem). Quando hidrolisado pelas α -glicosidases este composto produz uma coloração azul facilmente detectável. O PI da α -metilglicosidase foi determinado a partir de gráficos construídos com os Rfs dos padrões em função dos seus respectivos PIs com regressões lineares com coeficiente de correlação (r^2) igual ou superior a 0,97.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção do segregante AP77-11B

O cruzamento entre as cepas haplóides W303-1B e MAL1-1^c-Δ, realizado no laboratório da Profa. Dra. Anita D. Panek (UFRJ), resultou na diplóide AP77 (**Esquema 1**). A cepa W303-1B apresenta no cromossomo II os genes *MAL31* e *MAL32* e no cromossomo VII os genes *AGT1* e *MAL12*, enquanto a cepa MAL1-1^c-Δ apresenta o cromossomo II sem locus *MAL* e apresenta no cromossomo VII o gene *MAL13-1^c*. Assim, a cepa diplóide AP77 apresenta, em seu genoma, os genes:

- *AGT1*, que codifica para o transportador de α-glicosídeos;
- *MAL31*, que codifica para o transportador de maltose;
- *MAL12* e *MAL32*, que codificam para a maltase;
- *MAL13-1^c*, que codifica para o regulador constitutivo necessário para expressão destes genes.

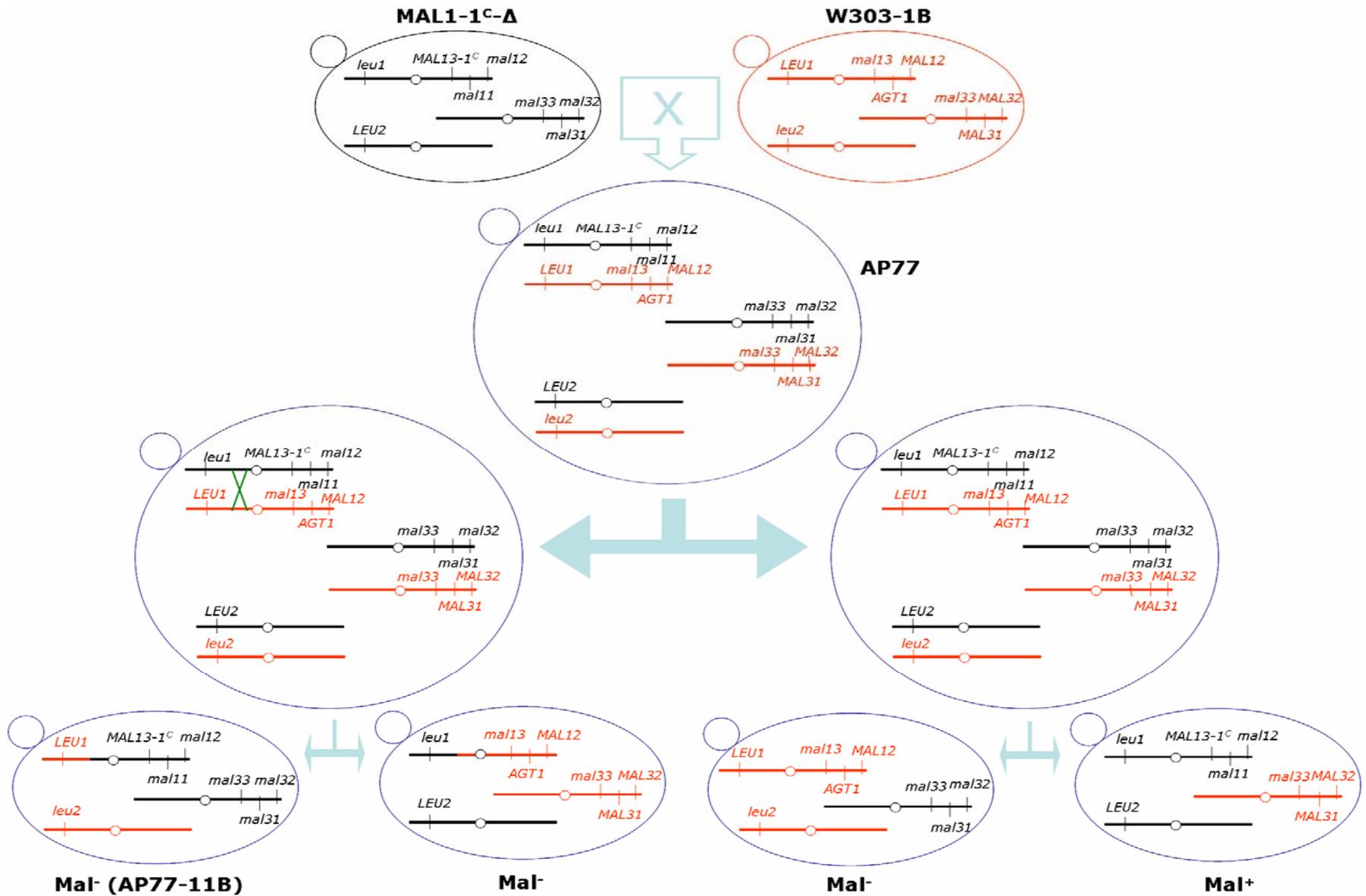
Dessa forma, as cepas utilizadas no cruzamento não crescem na presença de maltose (cepas Mal⁻) por não possuírem todos os três genes necessários para a metabolização deste açúcar: o transportador, a maltase e o regulador (Needleman *et al.*, 1984, Needleman 1991 e Cohen *et al.*, 1984). Já a cepa AP77, resultante do cruzamento, cresce em maltose porque possui o gene *AGT1* e o regulador constitutivo *MAL13-1^c*, bem como genes que codificam maltases (**Esquema 1**).

Portanto, ela apresenta transporte ativo de vários α -glicosídios, como maltose, trealose e α -MG (Stambuk *et al.*, 1998 e 1999). Quando esporulada, esta cepa deu origem a ascos contendo 4 esporos cada. Nesta segregação usando 9 ascos foram obtidas 36 cepas.

Inicialmente, ao trabalhar com as cepas segregantes, o objetivo foi selecionar uma cepa Mal⁻, isto é, uma cepa que não crescesse em maltose, porém que carregasse o gene *MAL13-1^c*. Na época trabalhávamos na caracterização do transporte de trealose mediado pela permease Agt1p e havia o interesse do grupo em encontrar uma cepa que possuísse o gene regulador constitutivo, mas que não transportasse maltose e nem trealose. A cepa selecionada, AP77-4C, foi transformada com um plasmídeo multicópia carregando o gene *AGT1* e então, a especificidade desta permease foi estudada para os diferentes α -glicosídios (Stambuk *et al.*, 1999).

O α -MG foi reportado como o melhor indutor do transporte de trealose em uma cepa selvagem e em cepas industriais (Stambuk *et al.*, 1999). Porém a cepa transformada, AP77-4C-YepAGT1, que expressa a permease Agt1p, não foi induzida pelo α -MG, possivelmente pela diferença entre o regulador *MAL13-1^c*, presente na cepa em questão, e os reguladores presentes nas cepas selvagens avaliadas por Stambuk *et al.* (1999).

Esquema 1 – Segregação da cepa AP77



Com o objetivo de encontrarmos uma cepa Mal⁻, capaz de crescer em α -MG iniciamos uma nova seleção dos segregantes em meios contendo essa fonte de carbono. Os segregantes foram plaqueados em meio mínimo contendo α -MG e leucina (como marcador auxotrófico). As cepas AP77-6D, -11B, -17D e -19D cresceram em meio mínimo com α -MG contendo leucina, e, no entanto, não cresceram em meio mínimo com α -MG na ausência deste aminoácido (conseqüentemente, cepas Leu⁻). Estas cepas também não cresceram em maltose como fonte de carbono (Mal⁻), portanto, um dos nossos objetivos havia sido atingido: a obtenção de uma cepa Mal⁻ que crescesse em α -MG. A partir de então, entretanto, pensávamos ainda ter que garantir que esta cepa possuísse o gene regulador constitutivo. Para isto, o próximo passo foi realizar o cruzamento das cepas AP77-6D, -11B, -17D e -19D com a W303-1A e a W303-1B. No entanto, apenas o cruzamento entre as cepas AP77-11B e W303-1B foi capaz de gerar descendentes capazes de crescerem efetivamente em maltose. Isto sugere que a cepa AP77-11B carrega o gene regulador constitutivo *MAL13-1^c*, uma vez que complementa a W303-1B para o fenótipo Mal⁺ (**Esquema 1**).

Os resultados acima, entretanto, nos permitiram verificar que a presença da permease Agt1p não é necessária para o transporte e utilização do α -MG, visto que quando cultivada em meio rico com este

açúcar, a cepa AP77-11B apresentou alta taxa de crescimento, porém não foi capaz de transportar maltose, trealose e nenhum outro α -glicosídeo. Esta cepa apresentou somente captação de ^{14}C - α -MG e não ocorreu co-transporte deste açúcar com H^+ . Este resultado foi interessante uma vez que o transporte de α -MG em *Saccharomyces cerevisiae* foi reportado por Stambuk *et al.*, 1999, como transporte ativo, simporte com H^+ , mediado pela permease Agt1p.

4.2. Caracterização do transporte de α -MG na cepa AP77-11B

Em função dos resultados obtidos com a cepa AP77-11B, decidimos realizar uma caracterização detalhada do mecanismo de transporte de α -MG e da permease envolvida.

A curva de crescimento da cepa AP77-11B em meio rico com α -MG (**Figura 2**) mostrou que esta cepa apresentou metabolismo fermentativo. Há variação da concentração de etanol durante as diferentes fases de crescimento, sendo que na fase exponencial observou-se um aumento na concentração de etanol, atingindo-se uma concentração máxima na diauxia (fase de transição). Nesta fase, grande parte do α -MG já foi consumido e é caracterizada por uma queda na taxa de crescimento. As células se adaptam para o crescimento respiratório (aeróbico) e também utilizam o etanol como fonte de carbono (**Figura 2**).

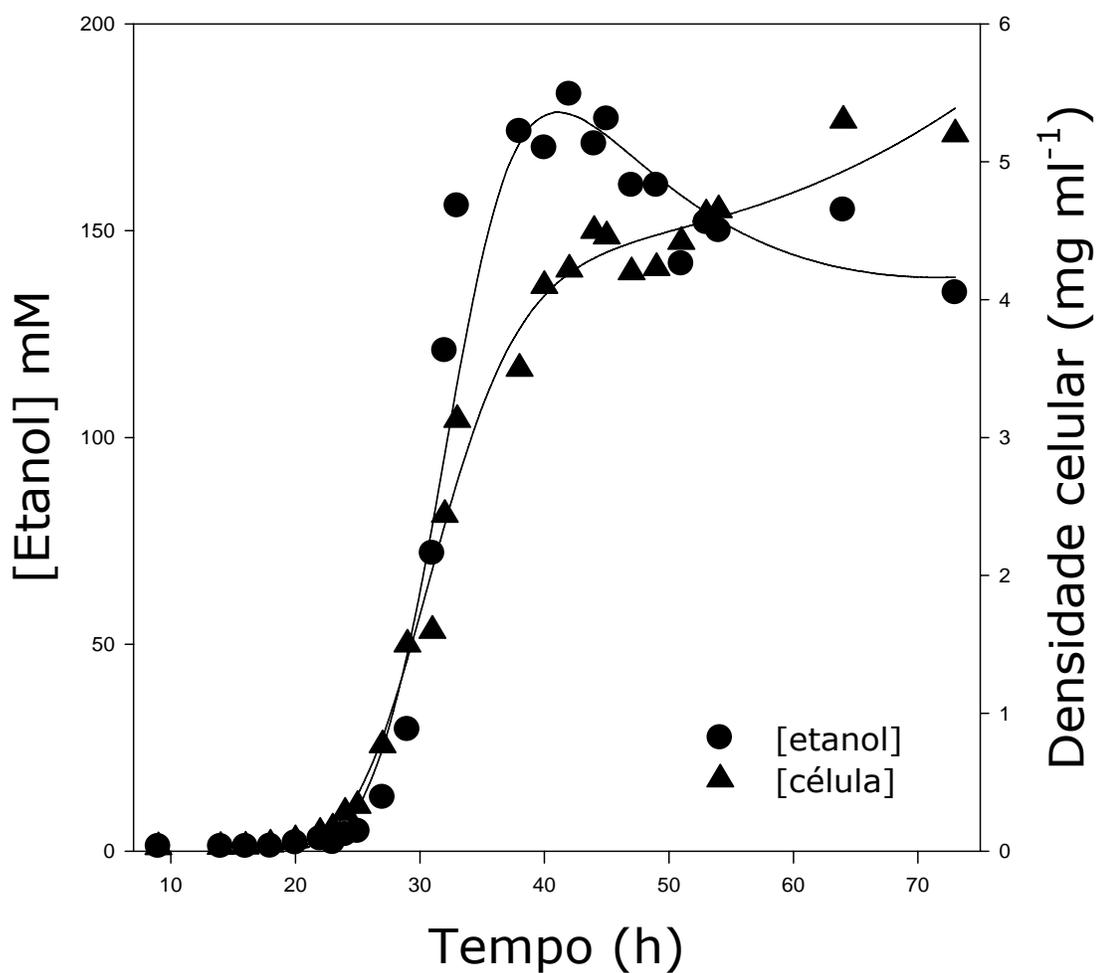


Figura 2 – Curva de crescimento da cepa AP77-11B em α -MG com produção de etanol. Células da cepa AP77-11B foram cultivadas em meio rico com α -MG 20 g/L. Nos tempos indicados foi determinada a densidade celular no meio (\blacktriangle) e a concentração de etanol (\bullet), como descrito em Materiais e Métodos.

A ausência de transporte de α -MG associado ao transporte de H^+ nos levou a sugerir que o mecanismo de transporte deste açúcar pela cepa AP77-11B provavelmente fosse por difusão facilitada (Stambuk *et al.*, 1996 e 1999). Na **Figura 3B**, não observamos alcalinização do meio de incubação, isto é, não ocorreu aumento de pH em função do tempo quando o α -MG foi adicionado para uma concentração final de 5 mM em células não tamponadas.

Vale salientar que a cepa AP77-11B também não apresentou co-transporte com H^+ com trealose, maltose, sacarose e maltotriose.

A determinação da atividade de transporte de ^{14}C - α -MG em diferentes valores de pH mostrou que não há uma variação significativa desta atividade no intervalo de pH entre 3 e 7, ocorrendo uma queda desta atividade em pH 8,0 (**Figura 4**).

No experimento de efluxo e contra fluxo de α -MG apresentado na **Figura 5**, quando as células que estavam transportando e acumulando ^{14}C - α -MG (o) foram transferidas para água (\blacktriangle), ocorreu efluxo ou quando transferidas para solução de α -MG 100 mM (\blacksquare), ocorreu contra fluxo de ^{14}C - α -MG a favor do gradiente de concentração de α -MG. Todos os resultados apresentados acima corroboraram o mecanismo proposto de difusão facilitada.

A análise dos parâmetros cinéticos da atividade de transporte de ^{14}C - α -MG apresentou uma cinética linear, indicando a ocorrência de

somente uma componente de baixa afinidade para α -MG com K_m da ordem de 30 mM e $V_{max} = 127,0$ nmols/min.mg (**Figura 6**). Um K_m de baixa afinidade da ordem de 35 mM também foi descrito para o simporte de α -MG/H⁺, Stambuk *et al.*, 2001.

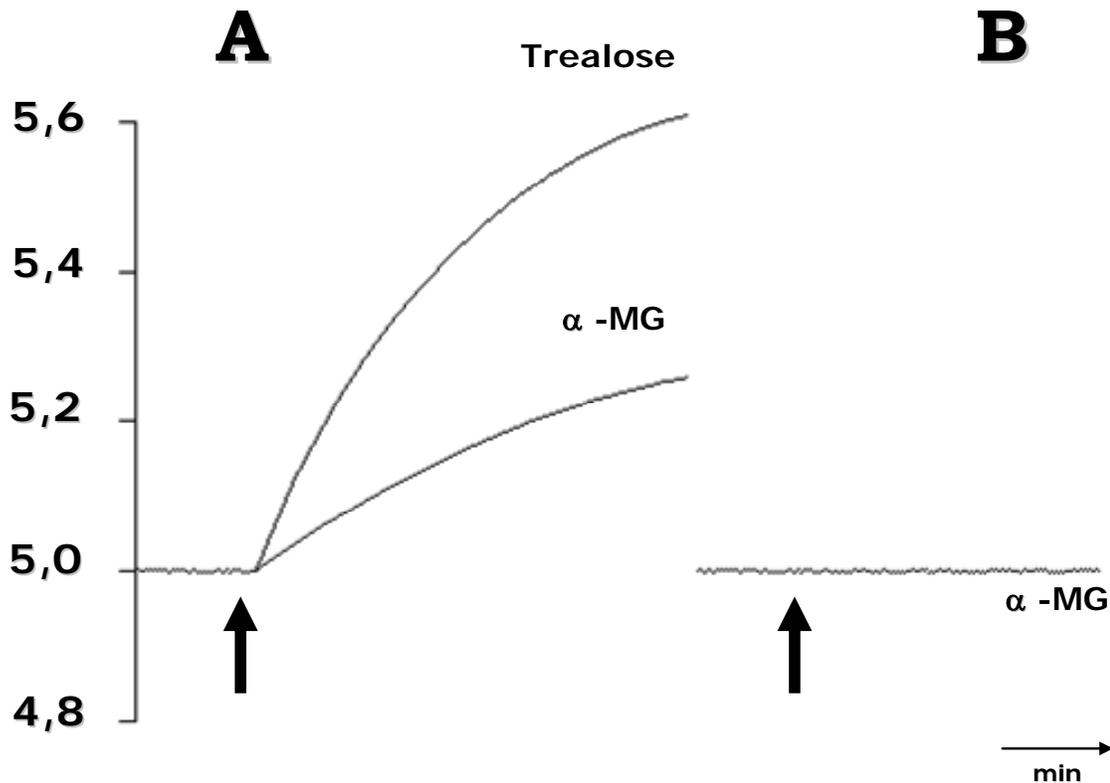


Figura 3 - Co-transporte de H^+ associado ao transporte de α -MG. Células da cepa S14 não reprimidas por glicose, em Stambuk *et al.*, 1999, (A) e células da cepa AP77-11B cultivadas em α -MG (B) foram ressuspensas em meio não tamponado sob agitação a 28 °C. Nos tempos indicados pelas setas foi adicionado α -MG para uma concentração final 5 mM e o pH registrado continuamente como descrito em Materiais e Métodos.

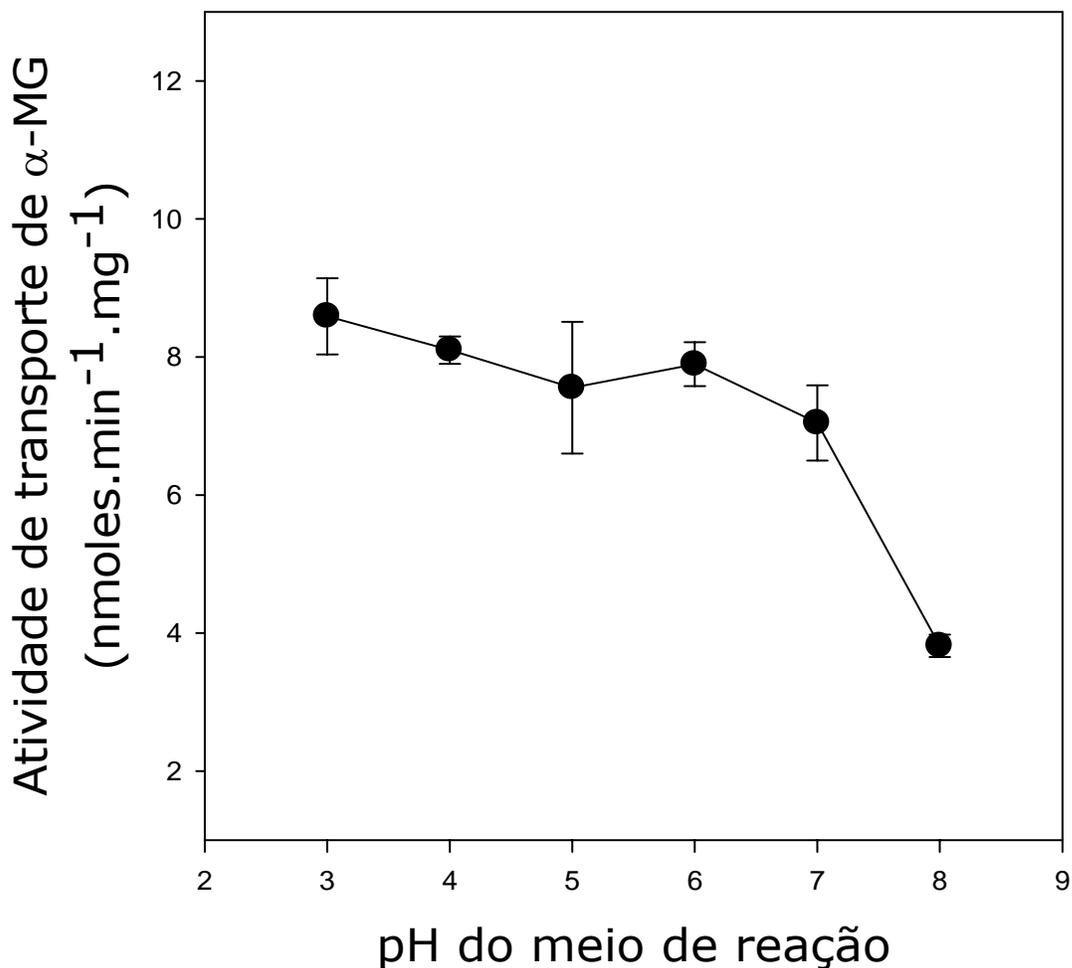


Figura 4 - Velocidade de transporte de ^{14}C - α -MG na cepa AP77-11B em função do pH. Células da cepa AP77-11B foram cultivadas em meio rico com α -MG 20 g/L e o transporte de ^{14}C - α -MG foi determinado em tampão succinato ajustado para o pH desejado com Tris como descrito em Materiais e Métodos.

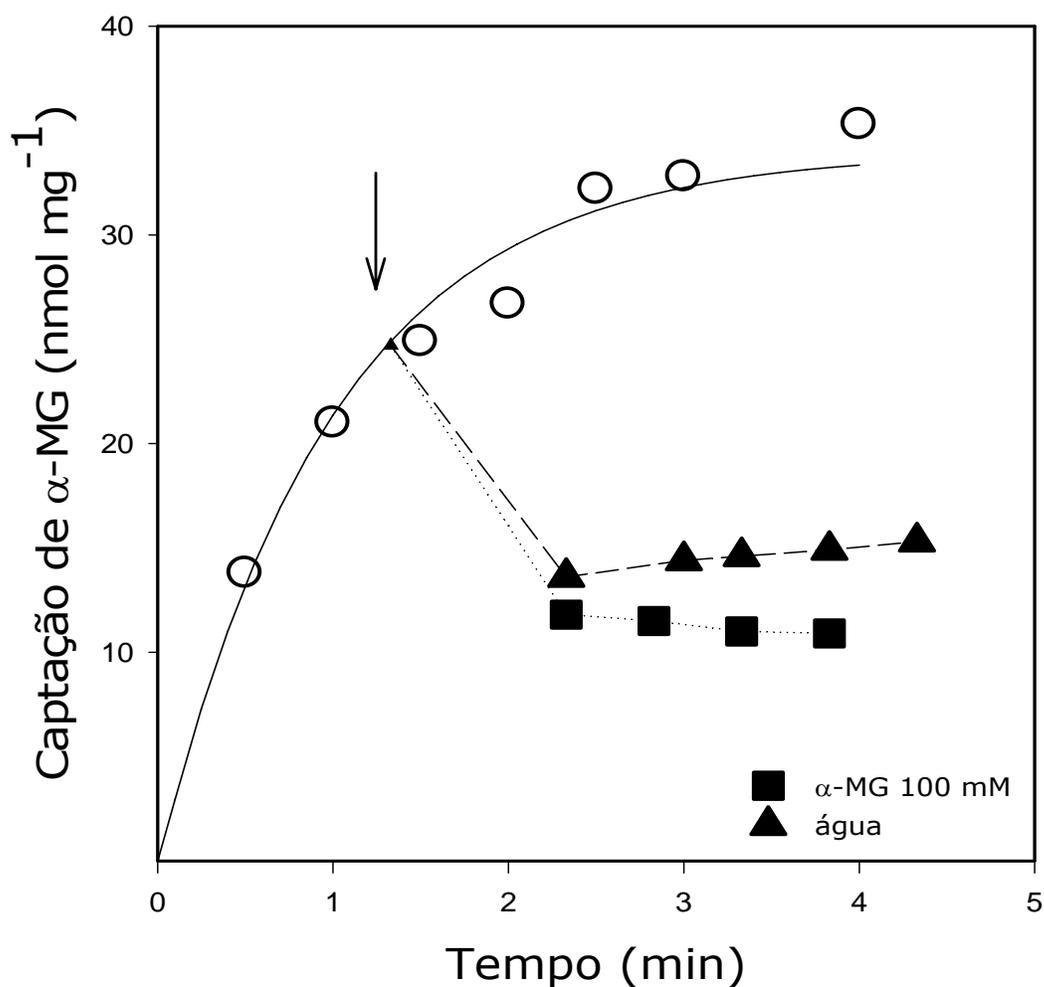


Figura 5 - Efluxo e contra-fluxo de ^{14}C - α -MG na cepa AP77-11B. Células da cepa AP77-11B cultivadas em meio rico com α -MG 20 g/L foram incubadas em tampão succinato-Tris 50 mM pH 5,0 contendo ^{14}C - α -MG 5 mM e sua captura (o) foi acompanhada ao longo do tempo. No ponto indicado pela seta as células foram centrifugadas e ressuspenso em água (\blacktriangle) ou em ^{14}C - α -MG 100 mM em tampão succinato-Tris 50 mM pH 5,0 (\blacksquare). A radioatividade presente nas células foi determinada como descrito em Materiais e Métodos.

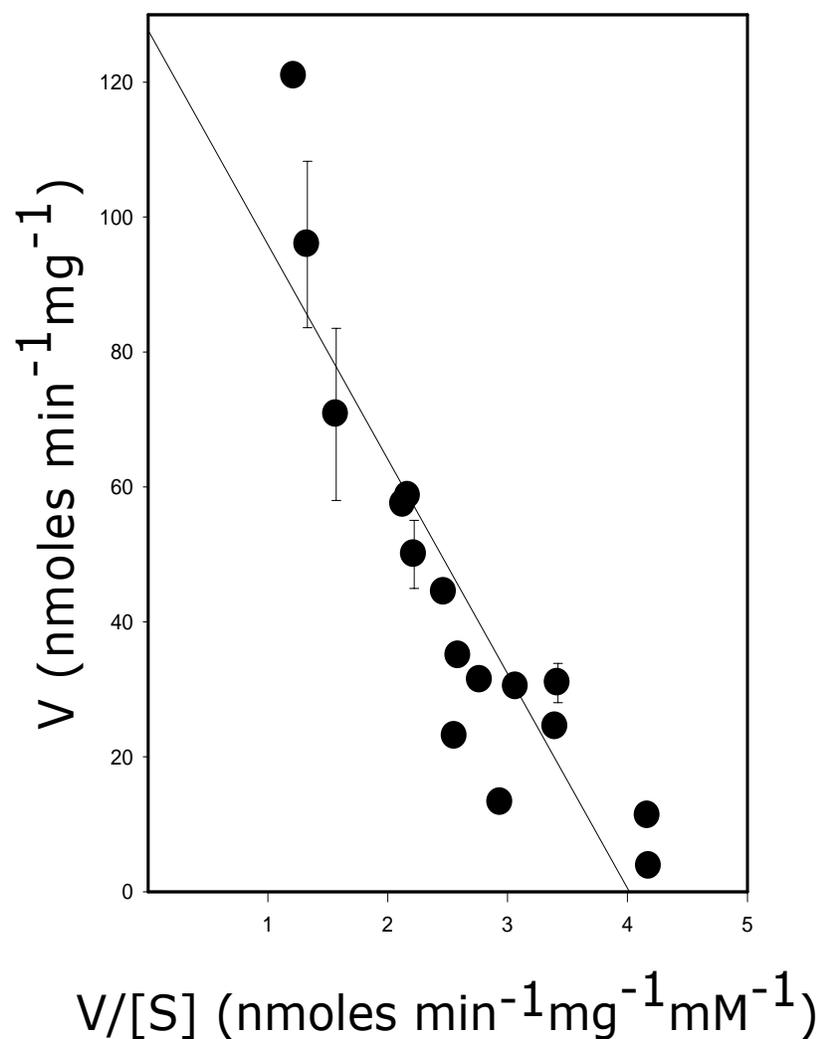


Figura 6 - Análise cinética do transporte de α -MG na cepa AP77-11B. Células da cepa AP77-11B foram cultivadas em α -MG e o transporte de ^{14}C - α -MG foi determinado como descrito em Materiais e Métodos variando-se a concentração final de α -MG de 1 a 100 mM.

4.3. Função dos genes *HXT* no transporte de α -MG

Como revisto por Lagunas (1993), o mecanismo de transporte dos monossacarídios como a glicose, frutose, manose e galactose, foi reportado como difusão facilitada. Em *S. cerevisiae* existem pelo menos 18 permeases (Hxt1-17p e Gal2p) envolvidas no transporte destas hexoses (Boles & Hollenberg, 1997).

Com os dados obtidos na caracterização do transporte de α -MG na cepa AP77-11B, foi possível concluir que o mecanismo do transporte era difusão facilitada, portanto decidimos investigar se as permeases Hxtp estariam envolvidas no transporte deste açúcar.

Iniciamos os experimentos utilizando algumas das cepas disponíveis em nosso laboratório: a MC966A, a KY73, a BSY08 e a BSY09.

A cepa MC966A possui o gene *AGT1* e o regulador indutível *MAL23*. Entretanto, esta cepa não cresceu em α -MG como fonte de carbono, mas quando cultivada em maltose apresentou captação de ^{14}C - α -MG e simporte com H^+ , mediados pela permease Agt1p. A KY73 que é isogênica à MC966A, mas que no entanto possui os genes *HXT1-7* excluídos (genes expressos com maior frequência em *S. cerevisiae* - Wiczorke *et al.*, 1999), também não cresceu em α -MG. Entretanto, quando cultivada em maltose, apresentou transporte ativo deste açúcar. As cepas BSY08 e BSY09, que são isogênicas à KY73 e à

MC966A, respectivamente, possuem o gene *AGT1* excluído. Também não apresentaram transporte de α -MG e não cresceram neste açúcar, como as cepas parentais. Com estes resultados eliminamos a hipótese do transporte de α -MG ser mediado pelas permeases Hxt1-7p (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Determinação da atividade de transporte de ^{14}C - α -MG, co-transporte de H^+ , atividade da α -metilglicosidase em células inteiras e no extrato solúvel das células das cepas cultivadas em maltose como fonte de carbono, como descrito em Materiais e Métodos.

Cepa	^{14}C - α -MG U/mg peso seco	α -MG/ H^+ U/mg peso seco	α -MGase cito* U/mg peso seco	α -MGase peri** U/mg peso seco
MC966A	15,1 \pm 0,2	9,5 \pm 1,1	16,0 \pm 1,2	0
KY73	13,6 \pm 1,5	10,7 \pm 0,8	16,9 \pm 1,0	0
BSY08	0,31 \pm 0,05	0	16,5 \pm 1,8	0
BSY09	0,24 \pm 0,02	0	15,6 \pm 0,9	0

*citoplasmática

**periplásmica

4.4. Elucidação do mecanismo de utilização do α -MG pela cepa AP77-11B

Em 1996, Silveira *et al.* desenvolveram um método para a determinação da atividade da invertase periplásmica em *S. cerevisiae*. Nesta metodologia, as células foram incubadas na presença de NaF 50 mM, o qual atua na inibição da enolase. A glicose formada pode ser quantificada no meio de reação.

Utilizando esta mesma abordagem, observamos que a cepa AP77-11B apresentou uma alta atividade de α -metilglicosidase periplásmica, sendo esta atividade maior em pH 5,0 do que em pH 7,0 (**Tabela 2**). Escolhemos o pH 5,0 para as realizações experimentais, em consequência de uma maior atividade α -metilglicosidásica, tanto nas células como no extrato solúvel da cepa AP77-11B.

Células cultivadas em glicose até a de-repressão ou em galactose (açúcar de-repressor) não apresentaram atividade de α -metilglicosidade periplásmica (**Tabela 2**). Entretanto, o extrato solúvel destas mesmas células apresentou atividade de aproximadamente 6 nmols/min/mg para ambos os casos ($6,2 \pm 0,1$ nmols/min/mg para células de-reprimidas e $6,1 \pm 0,3$ nmols/min/mg para células cultivadas em galactose).

Tabela 2 - Determinação da atividade da α -metilglicosidase periplásmica em pH 5,0 e em pH 7,0 nas cepas cultivadas nas respectivas fontes de carbono, como descrito em Materiais e Métodos.

Cepa	Fonte de carbono	Atividade (U/mg)	
		pH 5,0	pH 7,0
	α -MG 2%	44,8 \pm 0,35	23,3 \pm 0,29
AP77-11B	glicose 2%	0	0
	galactose 2%	0	0
340-2B/ Δ AGT1	α -MG 2%	14,5 \pm 0,01	0,95 \pm 0,001
CEN.PK2-1C	α -MG 2%	1,85 \pm 0,07	_____
EBY.VW4000	maltose 2%	0,46 \pm 0,06	_____

A atividade da α -metilglicosidase periplásmica foi determinada na presença e na ausência de NaF, e sofreu um aumento de 1,3 vezes na presença deste inibidor (18,6 \pm 0,6 nmols/min/mg para 23,9 \pm 2.1 nmole/min/mg). O mesmo experimento foi realizado para invertase periplásmica e na presença de NaF foi observado um aumento de 2,3 vezes da atividade (14,2 \pm 0,6 nmols/min/mg para 32,3 \pm 0,5 nmols/min/mg).

A cepa 340-2B/ Δ AGT1 cresceu em α -MG e também apresentou atividade de α -metilglicosidase periplásmica (**Tabela 2**). Para a cepa CEN.PK2-1C esta atividade foi pequena, provavelmente em consequência do AGT1 ser expresso nesta cepa. A EBY.VW4000 é isogênica à CEN.PK2.1C, mas excluída nos *HXT1-17*, *AGT1* e *GAL2*. Portanto, esta cepa não cresce em glicose (Wieczorke *et al.*, 1999) e também não cresceu em α -MG. Ao cultivarmos a EBY.VW4000 em maltose, verificamos que esta cepa apresentou uma atividade mínima de α -metilglicosidase periplásmica (**Tabela 2**), embora esta atividade tenha sido observada no extrato solúvel ($63.5 \pm 0,2$ nmols/min/mg).

Para verificarmos se a atividade da α -metilglicosidase periplásmica estava firmemente ligada as células, determinamos sua atividade após sucessivas lavagens da suspensão celular. Neste caso, observamos que não houve redução da atividade enzimática (**Figura 7**).

Na **Figura 8**, determinamos a atividade da α -metilglicosidase ao longo da curva de crescimento em α -MG e observamos um aumento, ou seja, uma indução na expressão da α -metilglicosidase ao longo da curva.

O gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise de α -MG no extrato solúvel da cepa AP77-11B mostrou que esta atividade é saturável (**Figura 9**).

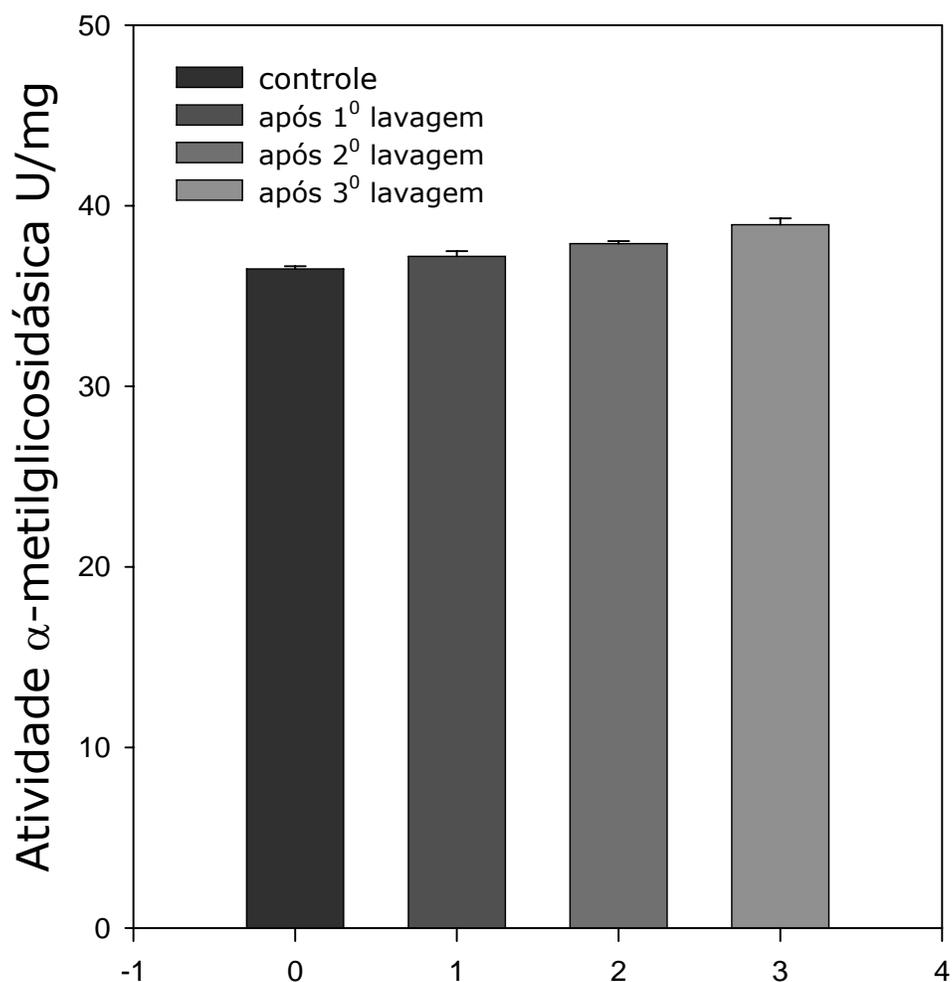


Figura 7 - Atividade α -metilglicosidásica firmemente ligada às células. Células da cepa AP77-11B cultivadas em α -MG foram utilizadas para a determinação da atividade da α -metilglicosidase periplásmica (controle). Estas células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão para o mesmo volume final e a atividade da α -metilglicosidase periplásmica determinada como descrito em Materiais e Métodos.

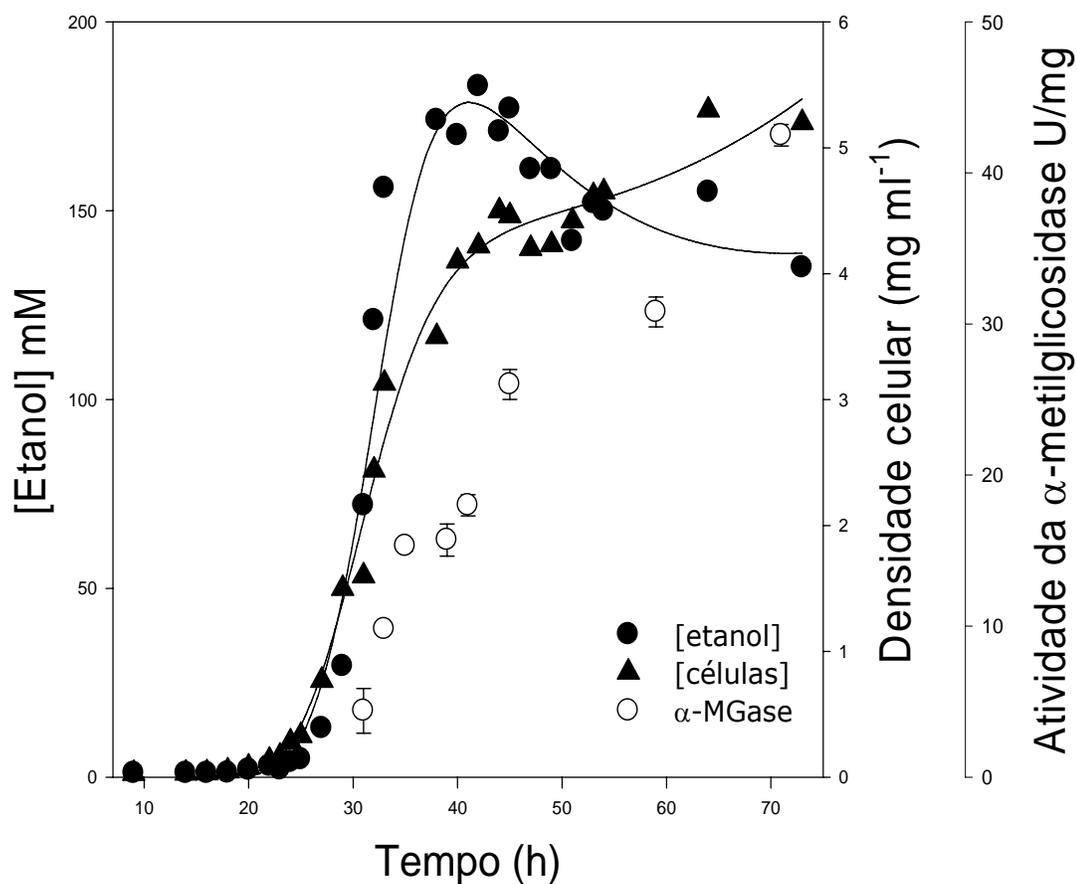


Figura 8 - Atividade α -metilglicosidásica durante crescimento em α -MG. Alíquotas de células da cepa AP77-11B foram coletadas durante o crescimento em α -MG e utilizadas para a determinação da atividade da α -metilglicosidase periplásmica determinada como descrito em Materiais e Métodos.

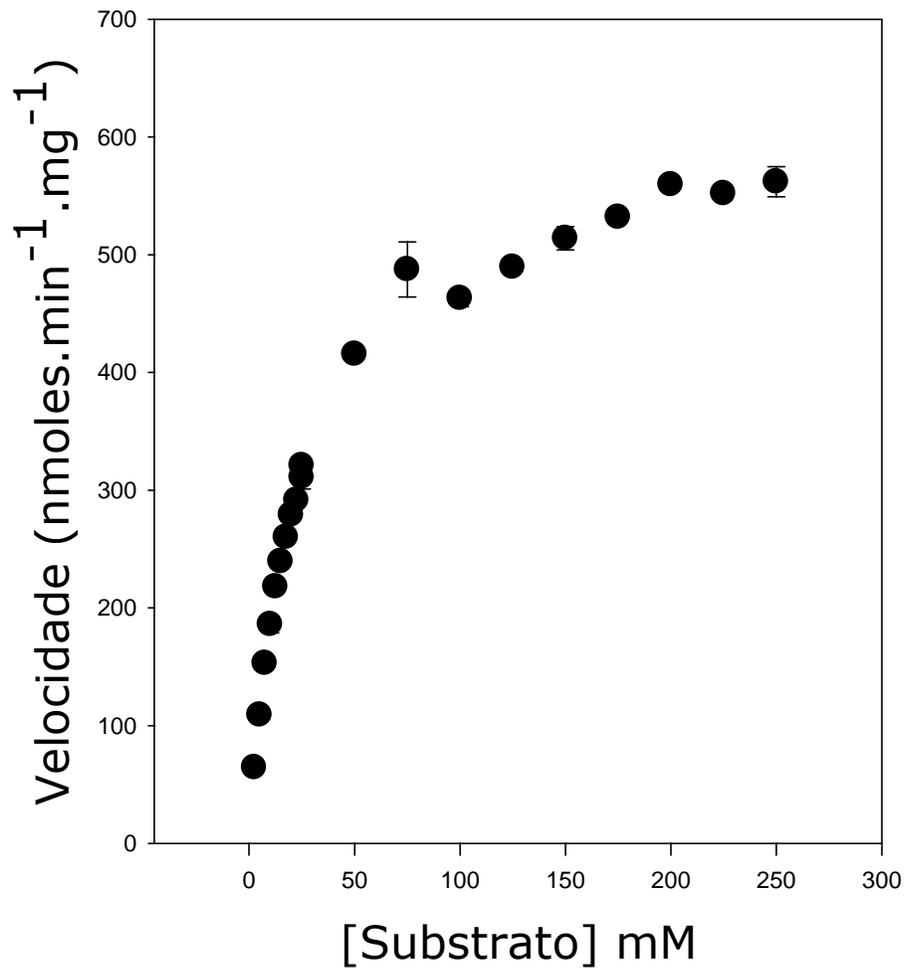


Figura 9 - Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise de α -MG na cepa AP77-11B. Extrato solúvel de células da cepa AP77-11B cultivada em α -MG foi utilizado para a determinação da atividade da α -metilglicosidase, como descrito em Materiais e Métodos, variando-se a concentração final de α -MG de 1 a 250 mM.

No gráfico de Eadie-Hofstee (**Figura 10**) observamos que esta atividade possui somente uma componente de baixa afinidade com K_m na ordem de 20 mM, quando comparada com a trealase ácida que possui K_m 4,7 mM (Nwaka & Holzer, 1998).

Realizamos uma focalização isoeétrica dos extratos obtidos das células das cepas AP77-11B cultivada em α -MG e da MC966A cultivada em maltose (esta cepa não cresceu em α -MG mas apresentou atividade de α -metilglicosidase no extrato solúvel) para a identificação da α -metilglicosidase. Após a focalização para a separação das proteínas, determinamos a atividade da α -metilglicosidase no gel utilizando o reagente de glicose oxidase e peroxidase. Assim, a glicose produzida pela hidrólise do α -MG poderia ser determinada. Também utilizamos o 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glicopiranosídeo para a determinação da atividade de diferentes α -glicosidases (Zastrow *et al.*, 2001).

Uma forte banda azul com um Rf igual ao da α -metilglicosidase foi localizada no extrato solúvel da cepa AP77-11B cultivada em α -MG. Este Rf está na faixa de 0,7 e o PI na ordem de $4,14 \pm 0.35$. Esta banda foi menos evidente no extrato solúvel da cepa MC966A cultivada em maltose (**Figura 11**).

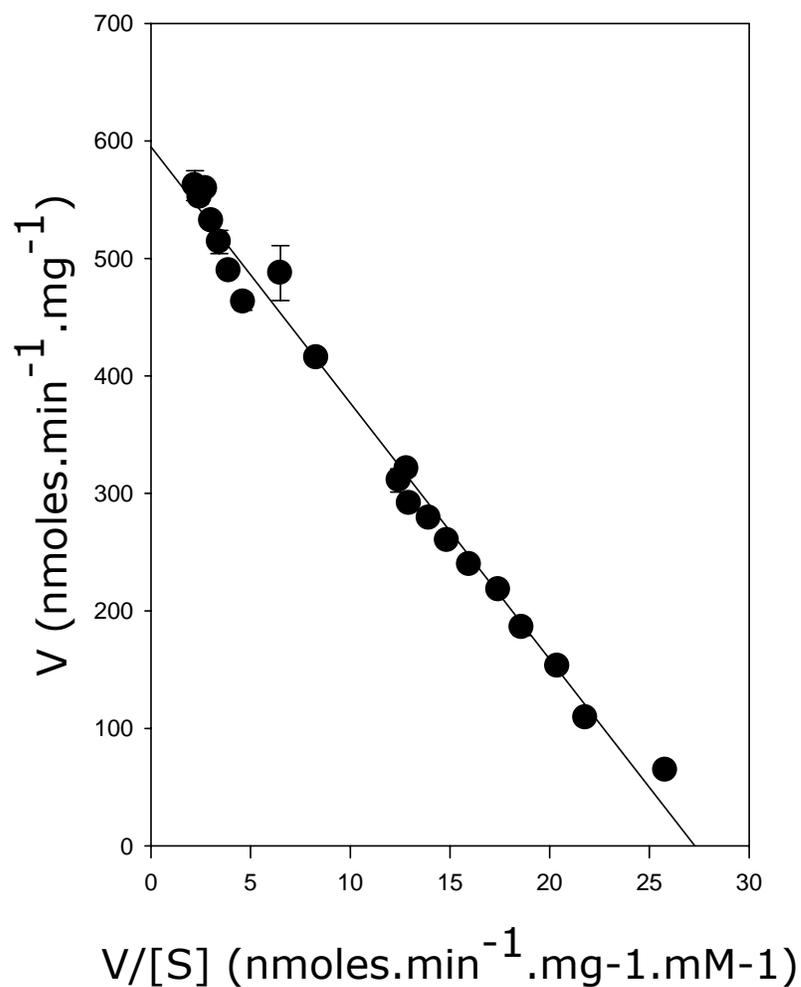


Figura 10 - Análise cinética da hidrólise de α -MG na cepa AP77-11B. Gráfico de Eadie-Hofstee para a hidrólise de α -MG utilizando extrato solúvel de células da cepa AP77-11B cultivada em α -MG como descrito em Materiais e Métodos.

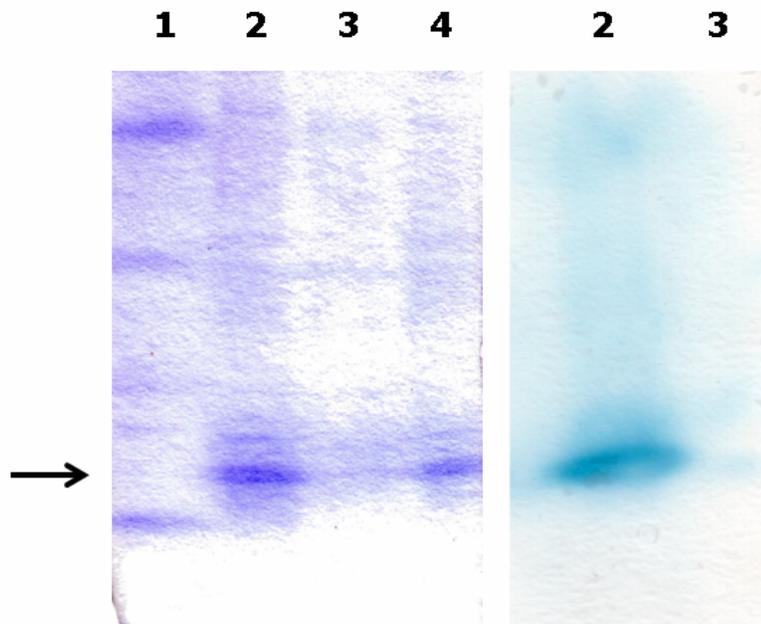


Figura 11 - Focalização isoeétrica dos extratos solúveis das cepas usadas. (1) padrões de pI de 3.6 a 9.3; (2 e 4) cepa AP77-11B; e (3) cepa MC966A. A seta indica a posição da banda de atividade α -MGásica.

5. DISCUSSÃO

5.1. Transporte de α -metil glicosídeo

Como mencionado na introdução, na literatura encontram-se informações sobre o mecanismo de transporte de α -MG, onde o gene *MGL2* foi postulado como responsável pela expressão da atividade de transporte deste açúcar (Okada & Halvorson, 1964).

Em 1988, Charron & Michels descreveram um alelo do gene 1, presente no locus parcialmente funcional *mal1g*, diferente dos genes 1 presente nos outros loci MAL. Estes autores sugeriram que este gene codificasse um transportador de α -glicosídios com especificidade de substratos diferente da permease codificada pelo gene 1 do locus MAL6.

Na caracterização desta permease, Han *et al.*, 1995 verificaram que ela apresentava 57% de identidade e 75% de similaridade com a permease Mal61p e também era capaz de transportar maltose, turanose (substratos específicos da Mal61p), além de transportar isomaltose, α -MG, maltotriose, palatinose, trealose e melezitose. Estes autores denominaram esse gene como transportador de α -glicosídios, *AGT1*, pela variedade de substratos transportados.

A especificidade da Agt1p pelos vários α -glicosídios descrita por Han *et al.*, 1995, foi determinada utilizando-se cepas geneticamente modificadas, as quais expressavam somente o *AGt1* ou o *MAL61*. Eles

compararam o crescimento e a capacidade de fermentação destas cepas para os diferentes α -glicosídeos. Entretanto, este tipo de abordagem não é a mais adequada quando se trata da capacidade de transporte de um determinado α -glicosídeo. O fato de uma cepa não fermentar um determinado açúcar e não crescer utilizando-o como fonte de carbono pode estar relacionado não somente com a incapacidade de transportá-lo, mas também à alguma falha na expressão dos genes necessários para a metabolização deste açúcar, como as hidrolases específicas. Além disso, este tipo de análise não fornece o mecanismo de transporte e/ou grau de afinidade com que os açúcares são transportados (Stambuk *et al.*, 1999).

No caso da trealose, Stambuk *et al.*, 1999 observaram que algumas cepas não apresentavam simporte de trealose/H⁺, mas eram capazes de crescer em meio mínimo contendo trealose como fonte de carbono. É possível que nas condições de cultivo onde encontram-se altas concentrações de açúcar, a atividade de transporte de trealose de baixa afinidade suportasse o crescimento das células.

Han *et al.*, 1995 também utilizaram a cepa 1412-4D para testar a habilidade desta na fermentação dos diferentes α -glicosídeos. Esta cepa possui em seu genoma *MGL2*, *MGL3* e *AGT1*, além de carregar o regulador indutível *MAL33*. Dos α -glicosídeos estudados, somente a maltose, a turanose e o α -MG foram fermentados. A ausência de

fermentação da maltotriose, isomaltose e palatinose sugeriu que o *AGT1* não estaria envolvido na fermentação do α -MG.

Em Stambuk (1995), os resultados obtidos com as cepas 1412-4D, N502 e 50613-2D (as duas últimas são $Mgl^+ Mal^-$) mostraram que estas cresceram em α -MG, porém nenhuma delas apresentou atividade simporte α -MG/ H^+ . Estes resultados são contraditórios em relação aos dados publicados por Okada & Halvorson (1964), onde foi reportado que o transporte ativo de α -MG é induzido por este açúcar. Além disso, a captação do α -MG na 1412-4D, N502 e 50613-2D poderia ocorrer via difusão facilitada, o que possivelmente explica o crescimento destas cepas neste açúcar.

Os nossos resultados para seleção da cepa de estudo mostraram que:

- i. a cepa AP77-11B possui um genótipo conhecido;
- ii. carrega o gene regulador constitutivo *MAL13-1^c* ;
- iii. apresenta alta taxa de crescimento em α -MG, no entanto não transporta nenhum dos açúcares testados, **com exceção do α -MG.**

Esta última observação refere-se à medidas de captação de açúcares marcados com ^{14}C realizadas com as células desta cepa. Os resultados obtidos também sugerem que o transporte de α -MG na cepa AP77-11B poderia ser por difusão facilitada em consequência de

não ocorrer co-transporte de α -MG com H^+ (**Figura 3**) e deste transporte ser independente do pH do meio (**Figura 4**).

Em comparação, na caracterização do transporte de trealose, Stambuk *et al.*, 1996, foi mostrado que a adição deste açúcar em uma suspensão de células não tamponada provocou uma alcalinização do meio de incubação. Foi determinado que este transporte ocorre estequiometricamente, onde um próton é co-transportado com uma molécula de trealose. O pH ótimo para este transporte foi determinado e é pH 5,0. Para valores acima ou abaixo deste pH, observou-se uma queda acentuada do transporte. Estes autores também demonstraram que a permease Agt1p é a responsável pelo transporte ativo de vários α -glicosídeos, incluindo a trealose, a maltose, o α -MG, a maltotriose e a melezitose, sendo este transporte do tipo simporte com H^+ .

A presença de efluxo e contra fluxo em água ou em solução de α -MG 100 mM (**Figura 5**) também está de acordo com o mecanismo de difusão facilitada.

Em Stambuk *et al.* (1996), para trealose tanto efluxo quanto contra fluxo estão ausentes, sendo estes resultados consistentes com o mecanismo de transporte ativo, que ocorre contra o gradiente de concentração e é cineticamente unidirecional.

Realizamos um experimento preliminar da inibição da velocidade de transporte de α -MG quando a glicose ou a frutose eram adicionadas

ao meio de incubação e observamos que ocorreu uma queda na velocidade de transporte.

É conhecido que os genes *HXT1-7* codificam para os transportadores de hexoses expressos com maior frequência em *S. cerevisiae*, como descrito na introdução (Reifenberger *et al.*, 1995 e 1997). Em Wieczorke *et al.*, 1999, os genes *hxt1-7* foram deletados da cepa MC966A e o mutante resultante não cresceu em glicose. As cepas selecionadas para os nossos experimentos foram originadas a partir de deleções nesta cepa.

Com estas informações decidimos investigar se as permeases Hxtp estariam envolvidas no transporte de α -MG e foi observado que as cepas BSY08 (*hxt1-hxt7* null *agt1* Δ) e BSY09 (*agt1* Δ) não transportaram α -MG, quando as células eram cultivadas em maltose (**Tabela 1**). Este fenômeno nos levou a concluir que para esta condição de cultivo das células as permeases Hxt1-17p não estavam envolvidas no transporte de α -MG.

5.2. Metabolismo de α -MG em *Saccharomyces cerevisiae*

Em 1996, Nwaka *et al.*, postularam que a trealase ácida é essencial para a assimilação de trealose em *S. cerevisiae*. Eles observaram que uma cepa mutante nesta enzima (*Lat1*) não cresce na presença deste açúcar como fonte de carbono, em contraste com a

mutante na trealase neutra ($\Delta anth1$). No entanto, não apresentaram dados que fornecessem uma explicação plausível de como a trealose chegaria até o vacúolo, local onde seria degradada pela trealase ácida.

A existência de duas trealases diferentes, uma ácida e outra neutra, foi reconhecida em várias espécies de fungos (Thevelein, 1984). Estudos utilizando fungos filamentosos sugeriram que a trealase neutra seria a responsável pela mobilização de trealose no citossol, enquanto a trealase ácida hidrolisaria somente a trealose extracelular (Bonini *et al.*, 1995 e Jorge *et al.*, 1997).

Trabalhando com a hipótese da secreção da trealase ácida para o espaço periplásmico das células (Silveira *et al.*, 1996), observamos que a cepa 340-2B/ $\Delta AGT1$ cresceu em trealose como fonte de carbono e apresentou atividade de trealase ácida, quando as células foram incubadas com trealose na presença de NaF (dados não mostrados). Estes resultados estão de acordo com os dados publicados por Jules *et al.*, 2004. Foi confirmado que mais de 90% da atividade da trealase ácida está presente no espaço periplásmico, onde a trealose é hidrolisada.

Na determinação da atividade da invertase periplásmica em *S. cerevisiae*, Silveira *et al.*, 1996 não detectaram atividade enzimática em células não inibidas com NaF. Nesta condição, a captação de glicose era, pelo menos, equivalente a velocidade de produção deste

açúcar pela ação da invertase. As células encontram-se na fase logarítmica neste trabalho. Nossos dados reportam valores relacionados à células em fase de transição.

Observamos que na cepa AP77-11B ocorreu um aumento da atividade da α -metilglicosidase periplásmica na presença deste inibidor: 1,3 vezes para α -metilglicosidase e 2,3 vezes para invertase. Esta observação pode ser atribuída a uma alta velocidade de produção de glicose por estas enzimas. Um aumento da atividade específica da α -metilglicosidase ao longo da curva de crescimento em meio contendo α -MG (**Figura 8**) foi observado em nossos resultados. Este aumento na produção de glicose pode estar relacionado com o crescimento celular.

A secreção da α -metilglicosidase só ocorreu na presença de α -MG e não em células de-reprimidas, como apresentado na **Tabela 2**. Ao contrário, no caso da trealose, em Jules *et al.*, 2004 observa-se que existe atividade de trealase ácida em células na fase estacionária cultivadas em glicose, indicando que a secreção desta para o espaço periplásmico não é específica para trealose.

De modo geral, os resultados apresentados são relevantes e nos levam a concluir que também existem duas vias de utilização de α -MG em *S. cerevisiae*: uma via na qual a Agt1p é a responsável pelo transporte ativo de α -MG e outra, onde a α -metilglicosidase é

secretada para o espaço periplásmico das células. A glicose formada pela hidrólise de α -MG é então assimilada pelos transportadores de hexoses por difusão facilitada. Dados semelhantes foram recentemente reportados para a trealose (Jules *et al.*, 2004 e Parrou *et al.*, 2005).

Em relação à trealase ácida, o fato desta estar presente tanto no vacúolo quanto no espaço periplásmico das células é ainda um assunto a ser esclarecido. Ela foi caracterizada como uma proteína com alto nível de glicosilações e apresenta um domínio trans-membrana N-terminal. Estas características poderiam contribuir para sua localização na superfície celular (Alizadeh *et al.*, 1996 e Parrou *et al.*, 2005).

Em 1998, Nwaka e Holzer propuseram um mecanismo de entrada da trealase ácida para dentro do vacúolo. Primeiramente, esta chegaria até o espaço periplásmico pela via secretória, onde então seria endocitada para o vacúolo. Em 2005, Parrou *et al.* identificaram vários genes que codificam proteínas que estão envolvidas na regulação da exportação da trealase ácida para o espaço periplásmico, entretanto este mecanismo ainda não foi esclarecido.

Como mencionado em nossos resultados, a secreção da α -metilglicosidase é específica para α -MG e possivelmente deve ser regulada por mecanismos específicos nas cepas que são capazes de hidrolisar α -MG no espaço periplásmico. As cepas MC966A, KY73,

BSY08, BSY09 e EBY.VW4000 não apresentaram atividade de α -metilglicosidase periplásmica, mesmo possuindo atividade de α -metilglicosidase citoplasmática (**Tabelas 1 e 2**) ou em células permeabilizadas (dados não apresentados).

Os dados relacionados à regulação do metabolismo do α -MG em *S. cerevisiae* abordados em nossos estudos são inéditos e trouxeram informações relevantes para esta linha de pesquisa.

No caso da maltose, foi reportado que *Schizosaccharomyces pombe* possui atividade de maltase extracelular, Jansen *et al.*, 2006. Em 2007, Leifso *et al.* identificaram em *Kluyveromyces lactis* uma maltase que é acumulada no meio de cultura após a depleção da glicose do meio. Porém, em *Saccharomyces cerevisiae*, maltase extracelular ainda não está descrita.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesta dissertação claramente mostraram que:

- A permease Agt1p é a responsável pelo transporte ativo de α -MG.
- Na ausência da Agt1p as células podem utilizar α -MG secretando a α -metilglicosidase para o espaço periplásmico das células.
- A glicose formada pela hidrólise de α -MG é transportada pelos transportadores de hexoses por difusão facilitada.

7. BIBLIOGRAGIA

- Alizadeh P and Klionsky DJ (1996). Purification and biochemical characterization of the *ATH1* gene product, vacuolar acid trehalase, from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters. 391, 273-278.
- Almeida FM, Lúcio AKB, Polizeli MLTM, Jorge JA and Terenzi HF (1997). Function and regulation of the acid and neutral trehalases of *Mucor rouxii*. FEMS Microbiol. Lett. 155, 73-77.
- Boles E and Hollenberg CP (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeast. FEMS Microbiol. Revs. 21, 85-111.
- Bonini B, Neves MJ, Jorge JA and Terenzi HF (1995). Effects of temperature shifts on trehalose metabolism in *Neurospora crassa* wild type and a trehalase-deficient (*tre*) mutant. Evidence against the participation of periplasmic trehalase in the catabolism of intracellular trehalose. Biochim. Biophys. Acta. 1245, 339-347.
- Cavaliere D, McGovern PE, Harti DL, Mortimer R and Polsinelli M (2003). Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. J. Mol. Evol. 57, S226-S232.
- Chang YS, Dubin RA, Perkins E, Michels CA and Needleman RB (1989). Identification and characterization of the maltose permease in a genetically defined *Saccharomyces* strain. J. Bacteriol. 171 (11), 6148-6154.
- Charron MJ and Michels CA (1988). The naturally occurring alleles of *MAL1* in *Saccharomyces* species evolved by various mutagenic processes including chromosomal rearrangement. Genetics 12: 83-93.
- Cheng Q and Michels CA (1991). *MAL11* and *MAL61* encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 173 (5), 1817-1820.

- Cheng Q and Michels CA (1989). The maltose permease encoded by the *MAL61* gene of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits both sequence and structural homology to other sugar transporters. *Genetics* 123, 477-484.
- Cohen JD, Goldenthal MJ, Buchferer B and Marmur J (1984). Mutational analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces*: identification and functional characterization of three genes. *Mol. Gen. Genet.* 196: 208-216.
- Crowe JH, Carpenter JF and Crowe LM (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Ann. Rev. Physiol.* 60, 73-103.
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Rudolph AS, Wistrom CA, Spargo BJ and Anchordoguy TJ (1988). Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 947 (2), 367-384.
- Destruelle M, Holzer H and Klionsky DJ (1995). Isolation and characterization of a novel yeast gene, *ATH1*, that is required for vacuolar acid trehalase activity. *Yeast* 11: 1015-1025.
- Dubin RA, Needleman RB, Gossett D and Michels CA (1985). Identification of the structural gene encoding maltase within the *MAL6* locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Bacteriol.* 164 (2), 605-610.
- Elbein AD (1974). The metabolism of α,α -trehalose. *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30, 227-256.
- Feldmann H, Aigle M, Aljinovic G, André B, Baclet MC, Barthe C, Baur A, Bécam AM, Biteau N, Boles E, Brandt T, Brendel M, Bruckner M, Bussereau F, Christiansen C, Contreras R, Crouzet M, Cziepluch C, Démolis N, Delaveau Th, Doignon F, Domdey H, Dusterhus S, Dubois E, Dujon B, Bakkoury M El, Entian KD, Feuermann M, Fiers W, Fobo GM, Fritz C, Gassenhuber H, Glansdorff N, Goffeau A, Grivell LA, de Haan M, Hein C, Herbert CJ, Hollenberg CP, Holmstrom K, Jacq C, Jacquet M, Jauniaux JC, Jonniaux JL, Kallesoe T, Kiesau P,

- Kirchrath L, Kotter P, Korol S, Liebl S, Logghe M, Lohan AJE, Louis EJ, Li ZY, Maat MJ, Mallet L, Mannhaupt G, Messenguy F, Miosga T, Molesmans F, Muller S, Nars F, Obermaier B, Perea J, Piérard A, Piravandi E, Pohl FM, Pohl TM, Potier S, Proft M, Purnelle B, Ramezani Rad M, Rieger M, Rose M, Schaaff-Gerstenschlager I, Scherens B, Schwarzlose C, Skala J, Slonimski PP, Smits PHM, Souciet JL, Steensma HY, Stucka R, Urrestarazu A, van der Aart QJM, van Dyck L, Vassarotti A, Vetter I, Vierendeels F, Vissers S, Wagner G, de Wergifosse P, Wolfe KH, Zagulski M, Zimmermann FK, Mewes HW and Kleine K (1994). Complete DNA sequence of yeast chromosome II. *The EMBO Journal* vol. 13 (24), 5795-5809.
- Fiechter A, Fuhrmann GF and Kappeli O (1981). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microbiol. Physiol.* 22, 123-183.
- Han EK, Cotty F, Sottas C, Jiang H and Michels CA (1995). Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* 17(6), 1093-1107.
- Ingledeu WM (1993). Yeast for production of fuel ethanol. In: Rose AH, Harrison JS (eds). *The yeast*. San Diego, USA: Academic Press 5, 245-291.
- Jansen MLA, Krook DJJ, De Graaf K, van Dijken JP, Pronk JT and de Winde JH (2006). Physiological characterization and fed-batch production of an extracellular maltase of *Schizosaccharomyces pombe* CBS 356. *FEMS Yeast Res.* 1-14.
- Jorge JA, Polizeli MLTM, Thevelein JM and Terenzi HF (1997). Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 154, 165-171.
- Jules M, Guillou V, François J and Parrou JL (2004). Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast

- Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 70 (5), 2771-2778.
- Keller F, Schellenberg M and Wiemken A (1982). Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 131 (4), 298-301.
- Koop M, Muller H and Holzer H (1993). Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 268, 4766-4774.
- Kotyk A and Michaljanicová D (1974). Nature of the uptake of D-galactose, D-glucose and α -methyl-D-glucoside by *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 332 (1), 104-113.
- Kuo SC, Christensen MS and Cirillo VP (1970). Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Characteristics of galactose uptake and exchange in galactokinaseless cells. J. Bacteriol. 103 (3), 671-678.
- Kuo SC and Cirillo VP (1970). Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. III Characteristics of galactose uptake in transferaseless cells: Evidence against transport-associated phosphorylation. J. Bacteriol. 103 (3), 679-685.
- Lagunas R (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Revs. 104, 229-242.
- Leifso KR, Williams D and Hintz WE (2007). Heterologous expression of cyan and yellow fluorescent proteins from the *Kluyveromyces lactis* KIMAL21-KIMAL22 bi-directional promoter. Biotechnol. Lett. 29:1233-1241.
- Leslie SB, Teter SA, Crowe LM and Crowe JH (1994). Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. Biochim. Biophys. Acta. 1192 (1), 7-13.
- Londesborough J and Varimo K (1984). Characterization of two trehalases in baker's yeast. Biochem. J. 219, 511-518.

- Lundquist F (1957). The determination of ethyl alcohol in blood and tissues. *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. VII, D. Glick, Editor, Interscience, New York, pp. 217-251.
- Mittenbühler K and Holzer H (1988). Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant. *J. Biol. Chem.* 263 (17), 8537-8543.
- Needleman R (1991). Control of maltase synthesis in yeast. *Mol. Microbiol.* 5(9): 2079-84.
- Needleman RB, Kaback DB, Dubin RA, Perkins EL, Rosenberg NG, Sutherland KA, Forrest DB and Michels CA (1984). *MAL6* of *Saccharomyces*: A complex genetic locus containing three genes required for maltose fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2811-2815.
- Nwaka S and Holzer H (1998). Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Progr. Nucl. Acid Res.* 198-237.
- Nwaka S, Mechler B and Holzer H (1996). Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Letters.* 386, 235-238.
- Nwaka S, Koop M and Holzer H (1995). Expression and function of the trehalase genes *NTH1* and *YBR0106* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270 (17), 10193-10198.
- Oda Y and Tonomura K (1996). Detection of maltose fermentation genes in the baking yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 23 (4), 266-268.
- Okada H and Halvorson HO (1964a). Uptake of α -thioethyl D-glucopyranoside by *Saccharomyces cerevisiae*. I. The genetic control of facilitated diffusion and active transport. *Biochim. Biophys. Acta* 82, 538-546.
- Okada H and Halvorson HO (1964b). Uptake of α -thioethyl D-glucopyranoside by *Saccharomyces cerevisiae*. II. General

- characteristics of an active transport system. *Biochim. Biophys. Acta* 82, 547-555.
- Okada H and Halvorson HO (1963). Gene-controlled facilitated diffusion and active transport of α -thioethylglucopyranoside in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 71, 227-229.
- Panek AD (1991). Storage carbohydrates. In: Rose & Harrison JS (Editors), *The Yeast*. Academic Press, New York, 655-677.
- Panek AD & Mattoon JR (1977). Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Relationship between catabolite repression, trehalose synthesis and mitochondrial development. *Arch. Biochem. Biophys.* 183 (1), 306-316.
- Parrou JL, Jules M, Beltran G and François J (2005). Acid trehalase in yeast and filamentous fungi: localization, regulation and physiological function. *FEMS Yeast Research* 5, 503-511.
- Peters TJ, Biamonte G and Dumas BT (1982). Protein (total protein) in serum, urine and cerebrospinal fluid; albumin in serum. In: *Selected Methods of Clinical Chemistry*. (GENERIC). Vol.9. Faulkner WR and S. Meiters (eds). American Association for Clinical Chemistry, Washington, D. C., USA.
- Reifenberger E, Boles E and Ciriacy M (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* 245, 324-333 (1997).
- Reifenberger E, Freidel K and Ciriacy M (1995). Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol. Microbiol.* 16(1), 157-67.
- Serrano R, Gancedo JM and Gancedo C (1973). Assay of yeast enzymes *in situ*. A potential tool in regulation studies. *Eur. J. Biochem.* 34 (3), 479-482.

- Serrano R (1977). Energy requirements for maltose transport in Yeast. *Eur. J. Biochem.* 80, 97-102.
- Sherman F, Fink GR and Hicks JB (1986). In: *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Silveira MCF, Carvajal E and Bon EPS (1996). Assay for *in vivo* yeast invertase activity using NaF. *Analyt. Biochem.* 238, 26-28.
- Spielman LL and Mowshowitz DB (1982). A specific stain for α -glucosidases in isoelectric focusing gels. *Anal. Biochem.* 120, 66-70.
- Stambuk BU and de Araujo PS (2001). Kinetics of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 1, 73-78.
- Stambuk BU, da Silva MA, Panek AD and de Araujo PS (1999). Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 105-110.
- Stambuk BU, Panek AD, Crowe JH, Crowe LM and de Araujo PS (1998). Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1379, 118-128.
- Stambuk BU, de Araujo PS, Panek AD and Serrano R (1996). Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 237, 876-881.
- Stambuk BU (1995). Caracterização do transportador de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de doutorado. Instituto de Química – USP.
- Thevelein JM (1984). Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.* 48 (1), 42-59.

- Van der Plaats JB (1974). Cyclic 3'5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56 (3), 580-587.
- Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP and Boles E (1999). Concurrent Knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 464, 123-128.
- Wiemken A (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek* 58 (3), 209-217.
- Wolfe KH and Lohan AJ (1994). Sequence around the centromere of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome II: similarity of Cen2 to Cen4. *Yeast* 10, S41-S46.
- Zastrow CR, Hollatz C, de Araujo PS and Stambuk BU (2001). Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27 (1), 34-38.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS:

Nome: Márcia Aparecida da Silva

Local e data de nascimento: São Paulo, Brasil em 12 de novembro de 1966.

End. residencial: Rua Simão da Mata, 223.

Bairro: Jabaquara – São Paulo - SP CEP 04314-000

EDUCAÇÃO:

E.E.P.G. Cel. Domingos Quirino Ferreira - São Paulo – de 1973 a 1980.

E.E. Carlos Augusto de Freitas Vilalva Jr. – São Paulo – de 1981 a 1983.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Bioquímica pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo – de 2004 a 2007.

Bacharelado em Ciências (habilitação em Química) pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Oswaldo Cruz - São Paulo – de 1987 a 1991

OCUPAÇÃO:

Técnica de Laboratório nível III-B contratada pela Universidade de São Paulo – Instituto de Química pelo regime CLT desde 05/10/89.

PUBLICAÇÕES:

Artigos Publicados:

Stambuk, B.U., da Silva, M.A., Panek, A.D. and de Araujo, P.S. -
Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*.
FEMS Microbiology Letters 170: 105-110, 1999.

Cuccovia, I.M., da Silva, M.A., Ferraz, H.M.C., Pliego, Jr., J.R., Riveros, J.M. and Chaimovich, H. – Revisiting the reactions of nucleophiles with arenediazonium ions: Dediazonation of arenediazonium salts in aqueous and micellar solutions containing alkyl sulfates and alkanesulfonates and an *ab initio* analysis of the reaction pathway. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2000, 1896-1907.

Resumos em Congressos:

de Araujo, P.S.; da Silva, M.A. and Stambuk, B.U. – Trehalose transport in plasma membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae* – XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq 1995.

J.C. Ferreira; A.D. Panek; M.A. da Silva; and P.S. de Araujo – α -Glucosidade, maltose and trehalose transport activities during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* - XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq 1996.

da Silva, M.A.; Stambuk, B.U. and de Araujo, P.S. - α -Methyl glucoside transport mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* - XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq 1999.

Silva, M.A.; Stambuk, B.U. and de Araujo, P.S. – The kinetics of α -Methyl glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae* - XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq 2000.

da Silva, M.A.; Stambuk, B.U. and de Araujo, P.S. - α -Methyl glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae* - XXX

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq 2001.

de Araujo, P.S.; da Silva, M.A.; Stambuk, B.U.; De Mesquita, J.F.; Degaki, T.L. and Sogayar, M.C. – Expression of mutated trehalose transporter in yeast cells - XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq 2002.

da Silva, M.A.; Stambuk, B.U.; De Mesquita, J.F. and de Araujo, P.S. – Characterization of a fluorescent yeast trehalose transporter - XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq 2003.

De Mesquita, J.F.; Stambuk, B.U.; da Silva, M.A.; Machado-Santelli, G.M. and de Araujo, P.S. – Evidences for the down regulation of *Saccharomyces cerevisiae* trehalose transporter by endocytosis - XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq 2003.

Pedro Soares de Araujo; Marcia Aparecida da Silva and Joelma Freire De Mesquita. – Mobilization of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* – 21st Small Meeting on Yeast Transport & Energetics – SMYTE – Bonn, Germany – 2003.

da Silva, M.A.; De Mesquita, J.F.; Stambuk, B.U. and de Araujo, Pedro S. - α -Methyl glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae* – 22nd Small Meeting on Yeast Transport & Energetics - SMYTE – Azores, Portugal – 2004.

da Silva, M.A.; Stambuk, B.U.; De Mesquita, J.F. and de Araujo, P.S. – Regulação do metabolismo de trehalose em *Saccharomyces cerevisiae* – VII Congresso do Departamento de Bioquímica da USP – 2004.

da Silva, M.A.; Stambuk, B.U. and de Araujo, P.S. - α -Methyl glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae* – XXXIV

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq 2005.

da Silva, M.A.; Stambuk, B.U. and de Araujo, P.S. - α -Methyl glucoside metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* – XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq 2006.

da Silva, M.A.; Alves Jr., S.L.; Stambuk, B.U. and de Araujo, P.S. – GST-Tagged α -glucoside transporter in *Saccharomyces cerevisiae* - XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molécula e 10th IUBMB Conference – SBBq 2007.

Alves Jr., S.L.; Trichez, D.; da Silva, M.A.; Miletti, L.C.; de Araujo, P.S. and Stambuk, B.U. – Molecular and structural analysis of the *AGT1* active α -glucoside-H⁺ symporter of *Saccharomyces cerevisiae* – 25th Small Meeting on Yeast Transport & Energetics – SMYTE – Arraial d'Ajuda – Bahia - 2007.

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](#)