

LETÍCIA VELOSO RIBEIRO FRANCO

**Superexpressão de *CDC48* e *HSP104*
na levedura *Saccharomyces cerevisiae***

São Paulo

2017

LETÍCIA VELOSO RIBEIRO FRANCO

**Superexpressão de *CDC48* e *HSP104*
na levedura *Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Doutor em Ciências

São Paulo

2017

LETÍCIA VELOSO RIBEIRO FRANCO

**Superexpressão de *CDC48* e *HSP104*
na levedura *Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração:
Engenharia Química

Orientador:
Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert
Coorientador
Prof. Dr. Mario Henrique de Barros

São Paulo

2017

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 14 de FEVEREIRO de 2017

Assinatura do autor: Leticia V. R. Franco

Assinatura do orientador: André G. Fournier

Catálogo-na-publicação

Franco, Leticia Veloso Ribeiro
Superexpressão de CDC48 e HSP104 na levedura *Saccharomyces cerevisiae* / L. V. R. Franco – versão corr. – São Paulo, 2017. –
176 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia Química.

1. Leveduras 2. Fisiologia 3. Fermentação alcoólica 4. Tolerância a estresse
I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II. I.

*À minha mãe, Maria Teresinha, pela vida e dedicação.
Ao meu irmão, Adolpho, pela parceria na infância.
Ao meu marido, Martielo, pelo companheirismo na vida adulta.
Aos três, meu esteio, por todo o amor.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente Martielo, Maria Teresinha, Adolpho, Juju, Antônio Augusto, Tio Raul, Tia Malba, Tio Armando e Maria Helena, por sempre torcerem por mim, por tanto amor e cuidados.

Aos meus amigos do coração por serem uma extensão da minha família.

Ao meu orientador, Prof. Andreas Gombert, pela oportunidade de realizar o doutorado, orientação, ensinamentos, reuniões, flexibilidade e correções na tese.

Ao meu coorientador, Prof. Mario Henrique de Barros, obrigada por ter me recebido em seu laboratório, pela estrutura de trabalho que me forneceu, por ter ido à bancada me ensinar biologia molecular, por estar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas. Obrigada pela paciência e confiança. Minha gratidão e admiração serão eternas.

Ao Prof. José Gregório C. Gomez, por ter me recebido em seu laboratório, por tudo que me ensinou, pela estrutura de trabalho que me forneceu. Obrigada pela didática e generosidade.

Ao Prof. José Ribamar Ferreira Jr., pelos ensinamentos, conversas científicas e filosóficas, por sempre estar disposto a esclarecer minhas dúvidas e dar ideias, pelos conselhos, desabafos e amizade.

Ao Prof. Thiago O. Basso, que chegou na hora certa! Obrigada por ter oferecido ajuda quando eu mais precisei, pela disponibilidade e boa vontade em fazer dar certo, por me ensinar, pelos conselhos, pela amizade e por me fazer enxergar um caminho.

Ao Prof. Erich B. Tahara, pelos ensinamentos, pela ajuda com extração de proteínas, por sempre estar disposto a tirar minhas dúvidas, dar sugestões e me ajudar a interpretar os resultados no laboratório. Obrigada também pela amizade e companheirismo.

À Profa. Marilene Demasi e aos integrantes de seu laboratório, especialmente à Dra. Janaina Leme, pelo apoio e ensinamentos na parte das linhagens mutantes de proteassomo.

À Profa. Luiziana Ferreira, por ter me recebido em seu laboratório, possibilitando que eu fizesse os ensaios em leitor de placas. Obrigada pela confiança.

Ao Bruno Labate, pelas análises de cromatografia e por ter inclusive realizado cultivos para me ajudar. Não tenho como agradecer tamanha boa vontade, dedicação e amizade.

A Dra. Mariana de Paula, pelas análises de cromatografia, conselhos, desabafos e amizade.

Ao Dr. Karel O. Gamez, por me ensinar as primeiras transformações de bactéria e por permitir que eu utilizasse o leitor de placas. Obrigada por compartilhar comigo as suas ideias sobre ATPases.

Ao Henrique Oliveira que foi fundamental para os experimentos em placa de micropoços. Obrigada pelo empenho em me ajudar e pela amizade.

Ao Martielo, novamente, pois além de ajudar sendo marido, sempre esteve disposto a ler e revisar meus textos e assistir meus ensaios de apresentações, dando ótimos conselhos, mesmo não sendo da área científica.

Aos colegas do laboratório de Biogênese Mitocondrial do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, onde realizei a maior parte dos experimentos. Raquel, Bruno, Janaína, Ana, Carolina, Claudia Caetano, Claudia Barros, Felipe e Vittoria, obrigada por tudo que me ensinaram, pela amizade, pela parceria, pelas discussões científicas, pelos desabafos, pelas palavras de motivação, pela companhia.

Aos amigos do Grupo de Engenharia de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP, onde tudo começou. Profa. Beatriz, Prof. Aldo, Prof. Adriano, Prof. Pedro, Pedro Henrique, Fernanda, Orlinda, Andrea, Tião, Maira, Luís, Kelly, Bruno Oishi, Rafael Ferraz, Rafael Gama, Larissa, Sarah, Luiz Castel, Wesley, Bianca, Felipe Lino, obrigada pela alegria que foi conviver e aprender com vocês.

Aos amigos do Laboratório de Bioprodutos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Edmar, Aline, Amanda, Gabriela, Thatiane, Thandara, obrigada por toda ajuda, enisamentos, companhia, amizade e pizzas nas noites de cultivo.

A todos os amigos de laboratórios vizinhos por tantas ajudas, que vão desde emprestar o shaker a oferecer uma xícara de café. Obrigada também por abrirem meus horizontes com discussões sobre outras pesquisas.

Ao CNPq e à CAPES pelo auxílio financeiro para a pesquisa. À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado direto (processo 2013/26238-3).

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

(Carl Sagan)

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

(Guimarães Rosa)

RESUMO

Este trabalho iniciou-se com o objetivo de superexpressar proteínas com atividade ATPase, como tentativa de alterar a conservação de energia livre na levedura *S. cerevisiae*, de maneira a aumentar o rendimento da fermentação alcoólica. Para isso, duas ATPases nativas de *S. cerevisiae*, as chaperonas codificadas pelos genes *HSP104* e *CDC48*, foram superexpressas, individualmente, sob o controle de quatro promotores de diferentes forças, provocando diferentes gastos energéticos na levedura. Entretanto, não foi possível obter aumento no rendimento em etanol. Em seguida, foi feito um estudo que visou comparar essas linhagens em situação de estresse térmico, ácido ou osmótico, tipicamente encontrados no processo brasileiro de produção de etanol. A 40 °C, uma linhagem superexpressando *CDC48* apresentou velocidade específica máxima de crescimento 17 % maior que a linhagem de referência, indicando maior tolerância ao estresse térmico. Finalmente, avaliou-se Hsp104 e Cdc48 em um contexto fisiológico no qual as atividades dessas proteínas pudessem ser mais requeridas. Como as chaperonas moleculares são conhecidas por agirem como primeira linha de defesa contra a formação de proteínas incorretamente enoveladas e agregados proteicos, estudaram-se a morfologia e a fisiologia da superexpressão de *HSP104* e *CDC48* em linhagens com desarranjo no controle de qualidade de proteínas intracelulares, causado por mutações no proteassomo 20S. A superexpressão de *CDC48* ou *HSP104* reverteu em parte a morfologia alterada de alguns desses mutantes de proteassomo.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. *CDC48*. *HSP104*. Fermentação alcoólica. Velocidade específica máxima de crescimento

ABSTRACT

The initial goal of this work was to overexpress proteins with ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae*, as an attempt to alter the conservation of free energy in this yeast, in order to increase alcoholic fermentation yield. Therefore, two native *S. cerevisiae* ATPases, the chaperones encoded by *HSP104* and *CDC48*, were individually overexpressed under the control of four promoters with different strengths, in order to provoke different levels of energy expenditure. Increments in the ethanol yield could not be observed in any of the constructed strains. Subsequently, a study was carried out to compare these mutant strains with reference strains under heat, acid or osmotic stress, which are typically found in the industrial fuel ethanol production in Brazil. At 40 °C a strain overexpressing *CDC48* displayed a maximum specific growth rate 17 % higher than that of the reference strain, indicating a greater tolerance to heat stress. Finally, Hsp104 and Cdc48 were evaluated in a physiological context in which the activity of these proteins would be required in a higher level. Since molecular chaperones are known to act as the first defense line against the formation of misfolded proteins and aggregates, the physiological and morphological effects of *HSP104* or *CDC48* overexpression were analyzed in strains with protein quality control disarrangements caused by mutations in proteasome 20S. The overexpression of either *CDC48* or *HSP104* partially reversed the altered morphology of some of these proteasome mutants.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. *CDC48*. *HSP104*. Alcoholic Fermentation. Maximum specific growth rate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Fluxo do açúcar em uma situação normal e em uma situação com gasto extra de ATP. As espessuras das setas são ilustrativas do fluxo de carbono pelas diferentes rotas metabólicas.25
- Figura 2. Plasmídeos com o gene HSP104. Plasmídeo Ylp352- P_{CYC1} -HSP104, com o promotor P_{CYC1} e o gene HSP104. Plasmídeo Ylp352- P_{ADH1} -HSP104, com o promotor P_{ADH1} e o gene HSP104. Plasmídeo Ylp352- P_{TEF} -HSP104, com o promotor P_{TEF} e o gene HSP104. Plasmídeo Ylp352- P_{GPD} -HSP104, com o promotor P_{GPD} e o gene HSP104. AMP^R é o gene de resistência à ampicilina para seleção em *E. coli*. $URA3$ é o gene que permite a seleção por meio de complementação de auxotrofia em *S. cerevisiae*. *E. coli ori* é a origem de replicação em *E. coli*. T_{CYC1} é o terminador do gene $CYC1$39
- Figura 3. Plasmídeos com o gene CDC48. Plasmídeo Ylp352- P_{CYC1} -CDC48, com o promotor P_{CYC1} e o gene CDC48. Plasmídeo Ylp352- P_{ADH1} -CDC48, com o promotor P_{ADH1} e o gene CDC48. Plasmídeo Ylp352- P_{TEF} -CDC48, com o promotor P_{TEF} e o gene CDC48. Plasmídeo Ylp352- P_{GPD} -CDC48, com o promotor P_{GPD} e o gene CDC48. AMP^R é o gene de resistência à ampicilina para seleção em *E. coli*. $URA3$ é o gene que permite a seleção por meio de complementação de auxotrofia em *S. cerevisiae*. *E. coli ori* é a origem de replicação em *E. coli*. T_{CYC1} é o terminador do gene $CYC1$40
- Figura 4. Plasmídeo episomal YEp352- P_{GPD} -CDC48, com o promotor P_{GPD} e o gene CDC48. AMP^R é o gene de resistência à ampicilina para seleção em *E. coli*. $URA3$ é o gene que permite a seleção por meio de complementação de auxotrofia em *S. cerevisiae*. *E. coli ori* é a origem de replicação em *E. coli*. 2 micron ori é a origem de replicação em *S. cerevisiae*.41
- Figura 5. Sistema experimental para cultivos em frasco agitado conforme Siqueira; Castelhana e Gombert (2013).43
- Figura 6. Análise de restrição para confirmar as construções de plasmídeos, eletroforese em gel 1,2% de agarose. 1- Ylp352- P_{CYC1} -CDC484 com *EcoRI*; 2- Ylp352- P_{CYC1} -CDC484 com *StuI*; 3- Ylp352- P_{ADH1} -CDC484 com *EcoRI*; 4- Ylp352- P_{ADH1} -CDC484 com *StuI*; 5- Ylp352- P_{TEF} -CDC484 com *EcoRI*; 6- Ylp352- P_{TEF} -CDC484 com *StuI*; 7- Ylp352- P_{CYC1} -HSP104 com *SacI* e *BglII*; 8- Ylp352- P_{CYC1} -HSP104 com *EcoRI*; 9- Ylp352- P_{ADH1} -HSP104 com *SacI* e *BglII*; 10- Ylp352- P_{ADH1} -HSP104 com *EcoRV*; 11- Ylp352- P_{TEF} -HSP104 com *SacI* e *BglII*. PM - padrão de peso molecular em pares de base (pb).45
- Figura 7. Simulação *in silico* das digestões para confirmar as construções de plasmídeos feitas no Software Serial Cloner. Ver também legenda da Figura 6.45
- Figura 8. Análise eletroforética (gel 1,2% de agarose) da PCR de colônia para confirmar integração de plasmídeos. 1- Ylp352- P_{CYC1} -CDC48; 2- Ylp352- P_{ADH1} -CDC48; 3- Ylp352- P_{TEF} -CDC48; 4- Ylp352- P_{CYC1} -HSP104; 5- Ylp352-

P _{ADH1} -HSP104; 6- YIp352-P _{TEF} -HSP104. PM - padrão de peso molecular em pb.	47
Figura 9. Simulação in silico da PCR para confirmar integração de plasmídeos contendo os genes CDC48 e HSP104. Para o CDC48, o amplicon tem 2969 pares de base e para o HSP104, o amplicon tem 3188 pb.	47
Figura 10. Análise eletroforética (gel de agarose 1,2%) da PCR de colônia para confirmar integração do plasmídeo YIp352. PM - padrão de peso molecular em pb.	48
Figura 11. Simulação in silico da PCR para confirmar integração de plasmídeos YIp352, para construção da linhagem CTR com plasmídeo vazio. O amplicon tem 1438 pares de base.	48
Figura 12. SDS-PAGE 12% de acrilamida seguida de imunodeteção para Hsp104. A quantidade de extrato proteico carregada nos géis foi de 40 µg em cada poço. A imunodeteção das proteínas foi feita através da ligação de um anticorpo anti-HA para o epítipo HA fusionado no gene HSP104.	49
Figura 13. Ensaio de diluição seriada para as linhagens CTR, AUX, LV-CH, LV-AH e LV-TH, LV-CC, LV-AC e LV-TC em placas com meio YPD, incubadas a 30 °C e a 37 °C. Fotos de cada placa foram tiradas depois de 2 dias de incubação.	50
Figura 14. Velocidades específicas máximas de crescimento para as linhagens CTR, AUX, LV-CH, LV-AH, LV-TH, LV-CC, LV-AC e LV-TC. Dois asteriscos (**) indicam valores de $\mu_{\text{máx}}$ estatisticamente diferentes do $\mu_{\text{máx}}$ da linhagem CTR com um nível de significância de 0,01.	52
Figura 15. Cruzamento W303-1B (MAT α) com a LV-GH [p ⁻] (MATa) em meio sólido YPD. Após 2 dias de incubação a 30 °C, réplica em meio YNB. Após 2 dias de incubação a 30 °C, réplica em meio YPEG.	60
Figura 16. Ensaio de diluição seriada das linhagens WT, LV-GH [p ⁻], LV-GC, LV-EpGC e CTR-Ep a 30°C e 37°C em meio sólido YPD após dois dias de incubação.	60
Figura 17. Parâmetros fisiológicos para cultivos em frasco agitado em triplicata com meio YPD com 20 g/L iniciais de glicose para as linhagens WT, WT[p ⁻], LV-GH e LV-GH[p ⁻]. Os valores de cada replicata podem ser encontrados na Tabela 7. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes do com um nível de significância de 0,01 e um asterisco (*), com nível de significância de 0,05.	64
Figura 18. Curvas de crescimento (absorbância a 600 nm em função do tempo) em cada condição de estresse.	77
Figura 19. Velocidades específicas máximas de crescimento para a linhagem WT na condição padrão (YPD 30°C, barra hachurada) e nas condições de estresse. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01. Asteriscos nas linhas conectando as barras	

indicam diferenças entre essas barras. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação à condição padrão.78

Figura 20. Velocidades específicas máximas de crescimento para a médias de todas as linhagens na condição padrão (YPD 30°C, barra hachurada) e nas condições de estresse. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01. Asteriscos nas linhas conectando as barras indicam diferenças entre essas mesmas barras. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação à condição padrão.81

Figura 21. Velocidades específicas máximas de crescimento para cada linhagem na condição padrão (YPD 30°C). Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01 e um asterisco (*), com nível de significância de 0,05. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. As cores azul e laranja indicam linhagens com superexpressão de CDC48 e HSP104, respectivamente. Quanto mais escura a tonalidade do azul ou do laranja, maior é a força do promotor utilizado.82

Figura 22. Velocidades específicas máximas de crescimento para cada linhagem em pH 3,0. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01 e um asterisco (*), com nível de significância de 0,05. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. As cores azul e laranja indicam linhagens com superexpressão de CDC48 e HSP104, respectivamente. Quanto mais escura a tonalidade do azul ou do laranja, maior é a força do promotor utilizado.83

Figura 23. Velocidades específicas máximas de crescimento para cada linhagem em NaCl 0,5 M. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,1. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. As cores azul e laranja indicam linhagens com superexpressão de CDC48 e HSP104, respectivamente. Quanto mais escura a tonalidade do azul ou do laranja, maior é a força do promotor utilizado.84

Figura 24. Velocidades específicas máximas de crescimento para cada linhagem em NaCl 1,0 M. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. As cores azul e laranja indicam linhagens com superexpressão de CDC48 e HSP104, respectivamente. Quanto mais escura a tonalidade do azul ou do laranja, maior é a força do promotor utilizado.85

Figura 25. Velocidades específicas máximas de crescimento para cada linhagem a 40°C. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. As cores azul e laranja indicam linhagens com superexpressão de CDC48 e HSP104, respectivamente. Quanto mais

escura a tonalidade do azul ou do laranja, maior é a força do promotor utilizado.....	86
Figura 26. Velocidades específicas máximas de crescimento para as linhagens WT, LV-TH e LV-CC durante cultivos em meio YPD a 40°C em frasco agitado. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. Dois asteriscos (**) indicam quando os valores $\mu_{\text{máx}}$ foram estatisticamente diferentes do $\mu_{\text{máx}}$ da linhagem WT com um nível de significância de 0,01.	88
Figura 27. Comparação entre as velocidades específicas máximas de crescimento para as linhagens WT, LV-TH e LV-CC a 40°C em frasco agitado e placa de poços. Asteriscos nas linhas conectando as barras indicam diferenças entre essas mesmas barras. Dois asteriscos (**) indicam quando os valores são estatisticamente com um nível de significância de 0,01 e um asterisco (*), com nível de significância de 0,05.	89
Figura 28. Fatores de conversão de glicose a biomassa para as linhagens WT, LV-TH e LV-CC a 40 °C em meio YPD em frasco agitado.	90
Figura 29. Fatores de conversão de glicose a etanol de cada linhagem a 40°C em meio YPD em frasco agitado. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. Um asterisco (*) indica que os valores são estatisticamente diferentes em relação a WT com um nível de significância de 0,05.	90
Figura 30. Fatores de conversão de glicose a glicerol para as linhagens WT, LV-TH e LV-CC a 40°C em meio YPD em frasco agitado. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. Dois asteriscos (**) indicam que os valores são estatisticamente diferentes em relação a WT com um nível de significância de 0,01.....	91
Figura 31. Ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD para as linhagens C76S/2-GC, C76S/2-GH, C76S/2, C221S/2-GH e C221S/2. As placas foram incubadas a 30 °C e fotografias foram tiradas depois de 2 dias de incubação.	106
Figura 32. Ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD para as linhagens C76S/2/ Δ mca1-GC C76S/2-GC e C76S/2/ Δ mca1. As placas foram incubadas a 30 °C e fotografias foram tiradas depois de 1 dia e 2 dias de incubação.....	106
Figura 33. Ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD para as linhagens C76S/2/ Δ mca1-GH e C76S/2/ Δ mca1. A placa foi incubada a 30 °C e foi tirada uma fotografia depois e 2 dias de incubação.	107
Figura 34. Ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD para as linhagens C76S/2/ Δ mca1-AH, C76S/2/ Δ mca1-GH, C76S/2-GH, C76S/2/ Δ mca1 e C76S/2. As placas foram incubadas a 30 °C e fotografias foram tiradas depois de 1 dia e 2 dias de incubação.	107
Figura 35. Ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD para as linhagens C221S/2/ Δ mca1-GH, C221S/2/ Δ mca1-AH, C221S/2-GH, C221S/2-AH,	

	C221S/2/ Δ mca1 e C221S/2. As placas foram incubadas a 30 °C e fotografias foram tiradas depois de 1 dia e 2 dias de incubação.....	108
Figura 36.	Foto de microscópio com aumento de 400X para as linhagens parentais RJD11441144, W303-1B e BY4741/ Δ mca1.....	109
Figura 37.	Foto de microscópio com aumento de 400X para as linhagens C76S/2, C76S/2-GH e C76S/2-GC.	110
Figura 38.	Foto de microscópio com aumento de 400X para as linhagens C76S/2/ Δ mca1 e com C76S/2/ Δ mca1-AH e C76S/2/ Δ mca1-GH.....	111
Figura 39.	Foto de microscópio com aumento de 400X para a linhagem C76S/2/ Δ mca1-GC.....	112
Figura 40.	Foto de microscópio com aumento de 400X para as linhagens C221S/2, C221S/2-AH, C221S/2-GH.....	113
Figura 41.	Foto de microscópio com aumento de 400X para as linhagens C221S/2/ Δ mca1 e com C221S/2/ Δ mca1-AH e C221S/2/ Δ mca1-GH.....	114
Figura 42.	Velocidade específica máxima de crescimento para as linhagens mutantes de proteassomo e metacaspase. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes com um nível de significância de 0,01 em relação a linhagem RJD1144. Em bege são mostrados os dados para as variantes PUP2 ^{C76S} . Em lilás são mostrados os dados para as variantes PUP2 ^{C76S} / Δ mca1. Em azul são mostrados os dados para as variantes PUP2 ^{C221S} . Em verde são mostrados os dados para as variantes PUP2 ^{C221S} / Δ mca1.	116
Figura 43.	Velocidade específica máxima de crescimento para as linhagens mutantes de proteassomo e metacaspase. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes com um nível de significância de 0,01 entre linhagens e um asterisco (*), com nível de significância de 0,05. Em bege são mostrados os dados para as variantes PUP2 ^{C76S} . Em lilás são mostrados os dados para as variantes PUP2 ^{C76S} / Δ mca1. Em azul são mostrados os dados para as variantes PUP2 ^{C221S} . Em verde são mostrados os dados para as variantes PUP2 ^{C221S} / Δ mca1.	118
Figura 44.	Fluxograma para construção das linhagens de levedura.	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas no Capítulo 2 e no Capítulo 3 desta tese.	36
Tabela 2. Lista de plasmídeos utilizados nesta tese. Em todos eles a marca de seleção em levedura é o gene <i>URA3</i> , e em bactéria, o gene que confere resistência à ampicilina.	37
Tabela 3. Linhagens de levedura utilizadas no Capítulo 2 e no Capítulo 3 desta tese com respectivos plasmídeos que foram integrados.	42
Tabela 4. Valores da média e do desvio padrão de $\mu_{\text{máx}}$ para cultivos em frasco agitado das linhagens CTR, AUX, LV-CH, LV-AH, LV-TH, LV-CC, LV-AC e LV-TC. Os cultivos foram realizados em meio Verduyn, a 30 °C com 5 g/L iniciais de glicose em duplicata.	52
Tabela 5. Parâmetros fisiológicos obtidos para as linhagens CTR, LV-TC, WT, AUX e LV-AH em cultivo em frasco agitado com meio Verduyn com 5 g/L ou 10 g/L de glicose.	57
Tabela 6. Parâmetros fisiológicos obtidos para as linhagens WT, LV-GC, LV-EpGC, LV-GH[ρ] em cultivo em frasco agitado com meio Verduyn com 10 g/L de glicose.	62
Tabela 7. Parâmetros fisiológicos para cultivos em frasco agitado com meio YPD com 20 g/L iniciais de glicose para as linhagens WT, WT[ρ], LV-GH e LV-GH[ρ].	63
Tabela 8. Resumo dos experimentos com diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i> em placas de micropoços, com número de replicatas por condição de cultivo.	76
Tabela 9. Parâmetros fisiológicos obtidos para as linhagens WT, LV-TH e LV-CC em cultivo em frasco agitado em meio YPD a 40°C.	88
Tabela 10. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas no Capítulo 4 dessa tese.	103
Tabela 11. Linhagens de levedura construídas no Capítulo 4 desta tese com respectivos plasmídeos que foram integrados.	105
Tabela 12. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ (média da triplicada e desvio padrão) obtidos para as linhagens mutantes de proteassomo e metacaspase em cultivos realizados em meio YPD em placa de micropoços a 30°C.	115
Tabela 13. Lista de iniciadores utilizados neste trabalho	123

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

20SPT	Proteassomo 20S
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular
ρ^0	Linhagem com perda total de DNA mitocondrial
ρ^-	Linhagem com perda parcial de DNA mitocondrial
A	Ampère
AAA ⁺	ATPases associadas a diversas atividades celulares
Abs	Absorbância
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
°C	Graus Celsius
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Etanol
g	Grama
GLY	Glicerol
gMS/L	Grama de massa seca por litro
h	Hora
HSP	Proteínas de choque térmico
HA	Epítipo da Hemaglutinina A
k_{cat}	Número de renovação (<i>turnover number</i>)
K_M	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
ln	Logaritmo neperiano
M	Mol/L
m	Metro
min	Minuto
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo – estado oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo – estado reduzido

NBD	Domínio de ligação de nucleotídeo
PROALCOOL	Programa Nacional do Álcool
P_{ADH1}	Promotor do gene <i>ADH1</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P_{CYC1}	Promotor do gene <i>CYC1</i>
P_{GPD}	Promotor do gene <i>GPD</i>
Pi	Fosfato inorgânico
PM	Padrão de peso molecular
P_{TEF}	Promotor do gene <i>TEF2</i>
rpm	Rotações por minuto
S	Substrato, no caso, glicose
UPS	Sistema Ubiquitina Proteassomo
V	Volt
YE _p	Plasmídeo epissomal de levedura
YI _p	Plasmídeo integrativo de levedura
Y _{E/S}	Fator de conversão de substrato a etanol ou rendimento em etanol
Y _{GLY/S}	Fator de conversão de substrato a glicerol ou rendimento em glicerol
YNB	Base para cultivo de leveduras com fonte de nitrogênio
YPD	Extrato de levedura, peptona e dextrose
YPEG	Extrato de levedura, peptona, etanol e glicerol
Y _{X/S}	Fator de conversão de substrato a biomassa ou rendimento em biomassa
X	Biomassa
W	Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	20
2	FISIOLOGIA DE LINHAGENS DE <i>S. CEREVISIAE</i> SUPEREXPRESSANDO ATPASES.....	23
2.1	RESUMO.....	23
2.2	INTRODUÇÃO.....	24
2.3	BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	26
2.4	CONSERVAÇÃO DE ENERGIA LIVRE DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM <i>S. CEREVISIAE</i>	27
2.5	ESTRATÉGIA PARA ESCOLHA E SUPEREXPRESSÃO DE ATPASES.....	29
2.6	ATPASES	31
2.7	<i>HSP104</i>	32
2.8	<i>CDC48</i>	33
2.9	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.9.1	Linhagens	35
2.9.2	Plasmídeos.....	37
2.9.3	Construção de plasmídeos	37
2.9.4	Obtenção de leveduras geneticamente modificadas	41
2.9.5	Cultivos em frasco agitado	42
2.9.6	Determinação da concentração de metabólitos extracelulares	43
2.9.7	Determinação da massa seca de células	44
2.10	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
2.10.1	Confirmação das construções dos plasmídeos	44
2.10.2	Integração dos plasmídeos em levedura	46
2.10.3	Avaliação da expressão de <i>HSP104</i>	48
2.10.4	Considerações sobre auxotrofia	49
2.10.5	Ensaio de diluição seriada em placa.....	50
2.10.6	Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$).....	51
2.10.7	Relação entre aumento do rendimento em etanol e a redução de biomassa	53
2.10.8	Rendimentos em biomassa, etanol e glicerol	55
2.10.9	Linhagens com maior potencial de expressão de ATPases e mutantes <i>petites</i>	58

2.11	CONCLUSÕES.....	66
3	FISIOLOGIA DE LINHAGENS SUPEREXPRESSANDO AS CHAPERONAS HSP104 E CDC48, SUBMETIDAS A FATORES DE ESTRESSE PRESENTES NO PROCESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL	68
3.1	RESUMO	68
3.2	INTRODUÇÃO.....	69
3.3	BREVE HISTÓRICO DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE ETANOL.....	70
3.4	PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL.....	71
3.5	FATORES DE ESTRESSE PARA LEVEDURAS DURANTE A PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL	73
3.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.6.1	Cultivos em placas de micropoços	75
3.6.2	Cultivos em frasco agitado	87
3.7	CONCLUSÕES.....	92
4	EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DE HSP104 E CDC48 EM LINHAGENS DE S. CEREVISIAE COM MUTAÇÃO NO PROTEASSOMO	94
4.1	RESUMO	94
4.2	INTRODUÇÃO.....	95
4.3	PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO COMO POTENCIAIS ALVOS PARA ESTRATÉGIAS DE PROTEÇÃO EM NEURODEGENERAÇÃO.....	96
4.4	PROTEASSOMO.....	98
4.5	LINHAGENS MUTANTES C221S E C76S	99
4.6	METACASPASE.....	100
4.7	MATERIAIS E MÉTODOS	102
4.7.1	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	102
4.7.2	Construção de linhagens de levedura	104
4.8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
4.8.1	Ensaio de diluição seriada.....	106
4.8.2	Análise microscópica	109
4.8.3	Cinética em placa de poços.....	115

4.9	CONCLUSÕES.....	119
5	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	121
6	DEMAIS MATERIAIS E MÉTODOS.....	123
6.1	INICIADORES	123
6.2	MEIOS DE CULTIVO.....	124
6.3	CULTIVOS.....	124
6.4	ESTERILIZAÇÃO	125
6.5	CÁLCULO DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	125
6.6	ENSAIOS DE DILUIÇÃO SERIADA EM PLACA	126
6.7	CULTIVOS EM PLACAS DE MICROPOÇOS	126
6.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	126
6.9	ESQUEMA PARA CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS DE LEVEDURA	127
6.10	CONFIRMAÇÃO DE CONSTRUÇÃO DE VETOR E CONFIRMAÇÃO DE INTREGRAÇÃO DO VETOR NO GENOMA DE LEVEDURA	128
6.11	MÉTODOS GERAIS PARA MANIPULAÇÃO DE DNA.....	128
6.12	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA POSTERIOR ENSAIO DE <i>IMMUNOBLOT</i>	131
6.13	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	132
6.14	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÃO DESNATURANTE (SDS-PAGE) E <i>IMMUNOBLOT</i>	132
7	REFERÊNCIAS.....	134
8	APÊNDICE A	145
9	APÊNDICE B	148
10	APÊNDICE C	150
11	APÊNDICE D	157
12	APÊNDICE E.....	160
13	APÊNDICE F	169

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular de grande importância biotecnológica e científica. Na indústria alimentícia, é utilizada para produzir bebidas alcoólicas e fermento de pão. Outra importante aplicação de *S. cerevisiae* é na produção de etanol combustível. Na indústria farmacêutica, essa levedura é utilizada na produção de drogas, probióticos etc. Um exemplo de produto relevante é o ácido artemisínico, precursor da droga para tratamento de malária, que é produzido em levedura geneticamente modificada (RO *et al.*, 2006).

Além destas aplicações biotecnológicas, *S. cerevisiae* é um organismo modelo em estudos de biologia molecular para a compreensão do funcionamento da célula eucariótica (SHERMAN, 1998) e foi o primeiro organismo eucariótico com o genoma completamente sequenciado (DUJON, 1996; GOFFEAU *et al.*, 1996). A facilidade de manipulação genética dessa levedura permite a sua utilização para analisar tanto os genes desse próprio organismo como de outros eucariotos.

Devido a essa grande versatilidade de *S. cerevisiae*, esta tese compreende dois assuntos que inicialmente parecem muito diversos: etanol combustível e agregação proteica. A possibilidade de pesquisar, dentro de uma mesma tese, temas distintos, só ressalta o fato desta levedura ser um organismo de grande interesse e que desperta tanta curiosidade científica.

Esse trabalho iniciou-se com o objetivo de superexpressar proteínas com atividade ATPase como tentativa de alterar a conservação de energia livre em *S. cerevisiae*, de maneira a aumentar o rendimento da fermentação alcoólica. As chaperonas Hsp104 e Cdc48 foram escolhidas para esse fim. Essa tentativa está reportada na tese, como registro para futuras pesquisas nesse tema. Entretanto, os desdobramentos dos resultados obtidos fizeram com que o trabalho também tomasse outros rumos. Foi feito um estudo da fisiologia das linhagens com superexpressão das chaperonas frente a fatores de estresse da produção industrial de etanol. Além disso, foi feito um estudo dos efeitos fisiológicos e morfológicos da superexpressão dessas chaperonas em linhagens mutantes de proteassomo, com desarranjo no controle de qualidade de proteínas intracelulares e maior tendência à agregação proteica.

A tese está dividida em quatro partes principais.

A primeira parte, intitulada “Fisiologia de linhagens de *S. cerevisiae* superexpressando ATPases”, teve os seguintes objetivos:

- a. Discutir uma estratégia para aumento do rendimento da fermentação alcoólica;
- b. Superexpressar em *S. cerevisiae* os genes nativos que codificam as seguintes chaperonas com atividade ATPase: *HSP104* e *CDC48*;
- c. Obter diferentes níveis de expressão destas ATPases, utilizando-se promotores de *S. cerevisiae* com diferentes forças;
- d. Calcular, analisar e comparar os parâmetros fisiológicos, como velocidade específica máxima de crescimento e fatores de conversão, apresentados pelas linhagens geradas durante o trabalho;
- e. Verificar se houve aumento no rendimento em etanol.

A segunda parte, intitulada “Fisiologia de linhagens superexpressando as chaperonas Hsp104 e Cdc48, submetidas a fatores de estresse presentes no processo brasileiro de produção de etanol combustível”, teve como objetivos:

- a. Discutir os fatores de estresse aos quais são submetidas as leveduras na produção industrial de etanol brasileira;
- b. Cultivar as linhagens que superexpressam as chaperonas em condições de estresse típicas da produção industrial de etanol;
- c. Calcular, analisar e comparar velocidade específica máxima de crescimento, nessas condições de estresse, para diferentes linhagens geradas neste trabalho;
- d. Verificar se alguma das linhagens construídas apresenta maior tolerância aos fatores de estresse, obtendo maiores valores de velocidades específicas máximas de crescimento em relação à linhagem selvagem em determinada condição de estresse.

A terceira parte, intitulada “Efeitos da superexpressão de *HSP104* e *CDC48* em linhagens de *S. cerevisiae* com mutação no proteassomo”, teve como objetivos:

- a. Discutir funções do proteassomo e implicações da agregação proteica, inclusive em doenças neurodegenerativas;
- b. Superexpressar as chaperonas Hsp104 e Cdc48 em linhagens de *S. cerevisiae* com mutações sítio-específicas no gene *PUP2*, constituinte principal da subunidade 20S do proteassomo;
- c. Superexpressar as chaperonas em linhagens de *S. cerevisiae* em duplo mutante (mutações sítio-específicas no gene *PUP2* e inativação da metacaspase *MCA1*).
- d. Comparar a morfologia das linhagens por análise microscópica;
- e. Calcular, analisar e comparar velocidades específicas máximas de crescimento;
- f. Verificar se a superexpressão de *HSP104* ou *CDC48* é capaz de reverter morfologias alteradas dos mutantes de proteassomo e metacaspase.

Finalmente, na quarta parte, estão os Demais Materiais e Métodos. Cada capítulo contém uma parte com metodologias específicas, porém os materiais e métodos comuns a todos os capítulos estão apresentados ao fim.

2 FISILOGIA DE LINHAGENS DE *S. CEREVISIAE* SUPEREXPRESSANDO ATPASES

2.1 RESUMO

O etanol é um biocombustível produzido em larga escala e utilizado em vários países como substituto ou como aditivo à gasolina, sendo principalmente obtido pela fermentação de açúcares com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse processo industrial, o rendimento de etanol sobre açúcares é o parâmetro mais importante, já que a maior parte do custo de produção do etanol deve-se ao custo da matéria-prima. É possível aumentar a conversão de açúcares em etanol alterando-se a conservação de energia livre em *S. cerevisiae*. Com um menor rendimento de ATP por açúcar consumido, uma maior fração de açúcar (fonte de carbono e de energia) é convertida em etanol e, conseqüentemente, menos açúcar é convertido em biomassa, já que as formações de ATP e etanol estão intrinsicamente ligadas durante o metabolismo fermentativo em *S. cerevisiae*. O objetivo desta etapa do trabalho era introduzir em *S. cerevisiae* um mecanismo que resultasse em gasto energético, de maneira que a conservação de energia livre fosse diminuída e, conseqüentemente, o rendimento de etanol sobre açúcar fosse maior. Para isso, duas ATPases (enzimas que hidrolisam ATP) nativas de *S. cerevisiae*, codificadas pelos genes *HSP104* e *CDC48*, foram superexpressas, sob o controle de diferentes promotores: P_{CYC1} (fraco), P_{ADH1} (força intermediária), P_{TEF} (forte) ou P_{GPD} (muito forte). Com isto, pretendeu-se modular os níveis de expressão das ATPases, provocando diferentes gastos energéticos. Cultivos com as leveduras geneticamente modificadas foram realizados a 30 °C e 150 rpm, em incubador rotativo, durante os quais foram determinadas a absorbância e as concentrações de glicose, etanol e glicerol. Não foi possível obter aumento no rendimento em etanol, mesmo utilizando dois diferentes tipos de ATPases e vários níveis de expressão com promotores de diferentes forças.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Etanol. Fermentação alcoólica. Conservação de energia-livre. ATPase. *CDC48*. *HSP104*.

2.2 INTRODUÇÃO

O etanol é um produto naturalmente obtido durante a fermentação de açúcares por *S. cerevisiae*. Especialmente no Brasil, o etanol combustível tem grande importância. Na safra 2015/2016 foram produzidos cerca de 30,2 bilhões de litros de etanol (UNICA, 2016). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, atrás apenas dos EUA (RFA, 2014). O etanol brasileiro é produzido utilizando-se cana de açúcar (caldo e/ou melaço) como matéria prima. Com o bagaço da cana de açúcar gera-se eletricidade que, juntamente com o etanol, representam 15,7% da matriz energética do Brasil, que é uma fração maior que os 11,5% provenientes de hidrelétricas (EPE, 2015).

Nos cultivos de *S. cerevisiae* em açúcares, a fonte de carbono (que também serve como fonte de energia) é principalmente convertida em: etanol, CO₂, glicerol e biomassa (células de levedura). Em metabolismo fermentativo, *S. cerevisiae* usa a glicólise clássica para conservar energia livre na forma de adenosina trifosfato (ATP), necessária para a biossíntese e para a manutenção celular (BASSO *et al.*, 2011). A glicólise é seguida pela fermentação alcoólica, que tem a principal função de reoxidar a coenzima NADH a NAD⁺, de forma que a glicólise possa seguir operando nas células. Neste processo, é gerado e excretado o etanol (NELSON; COX, 2010). Em anaerobiose, a única rota metabólica existente em *S. cerevisiae* para produzir ATP é a fermentação alcoólica, que gera etanol. Ou seja, produzir ATP implica em produzir etanol, nestas condições.

As leveduras utilizam os açúcares da cana como fonte de carbono (para biossíntese de macromoléculas celulares) e como fonte de energia (para produção de ATP). No contexto da produção industrial de etanol combustível, deseja-se que o máximo possível dos açúcares oriundos da cana sejam convertidos a etanol e, portanto, que o mínimo possível desses açúcares seja utilizado pelas leveduras na biossíntese. Uma forma de se obter esse efeito é diminuindo o rendimento de ATP por açúcar consumido, ou seja, alterando-se o balanço de energia livre dentro das células, conforme exemplificado por Basso *et al.* (2011).

No presente projeto visou-se superexpressar, em *S. cerevisiae*, enzimas ATPases que hidrolisam ATP. O objetivo disso era diminuir o saldo energético líquido do

metabolismo anaeróbio em levedura, ou seja, menor geração de ATP por açúcar consumido. No caso de uma célula com menor rendimento de ATP, uma maior parcela do açúcar seria desviada para ser usada como fonte de energia e, conseqüentemente, produção de etanol e uma menor parcela estaria naturalmente disponível para os processos de biossíntese, como exemplificado na Figura 1. Como as células regulam o fluxo na via glicolítica para manter constante a concentração de ATP (NELSON; COX, 2010), havendo menor rendimento de ATP, é necessário consumir mais açúcar para a sua produção.

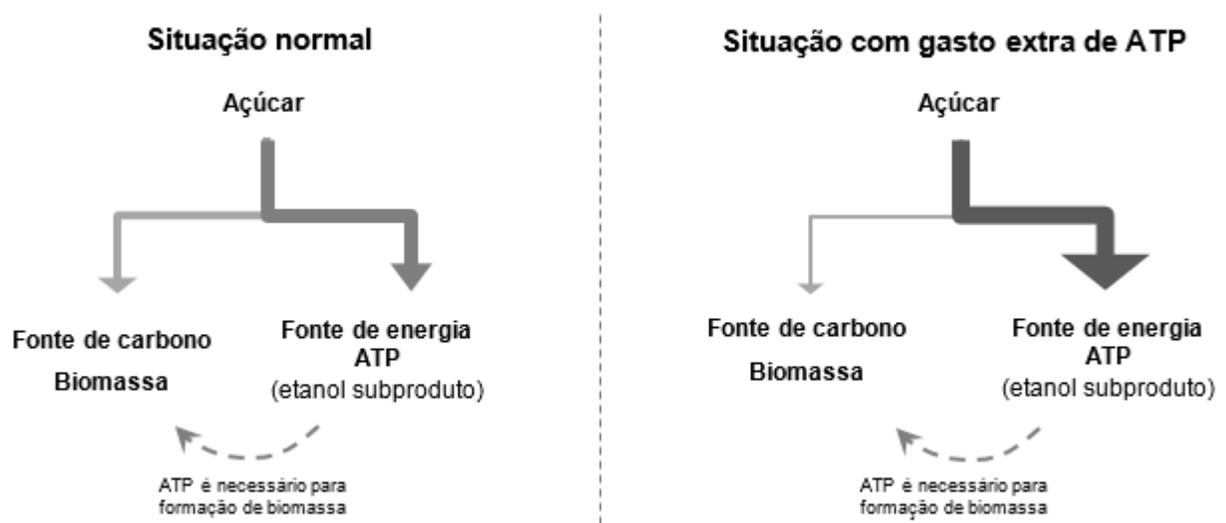


Figura 1. Fluxo do açúcar em uma situação normal e em uma situação com gasto extra de ATP. As espessuras das setas são ilustrativas do fluxo de carbono pelas diferentes rotas metabólicas.

Assim, para o consumo de uma mesma quantidade de açúcares da cana, a produção de etanol seria maior. Isso é muito interessante e desejável, já que mais da metade do custo final de produção do etanol combustível é representado pelo custo da cana de açúcar. Qualquer incremento no rendimento da fermentação alcoólica representaria grandes ganhos econômicos, dada a produção anual de bilhões de litros (GOMBERT; VAN MARIS, 2015). Como exemplo, se houvesse um aumento de apenas 1% neste parâmetro de processo, cerca de 300 milhões de litros adicionais seriam produzidos anualmente, a partir da mesma área plantada de cana de açúcar, no Brasil.

2.3 BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Fermentação é a denominação geral para a degradação anaeróbia (e sem um aceptor externo de elétrons) da glicose ou outros nutrientes orgânicos para gerar energia e conservá-la como ATP. ATP tem diversas funções na célula sendo frequentemente requerida em processos que demandam energia. A energia química armazenada nas ligações fosfodiéster da molécula de ATP é liberada na sua hidrólise e consequente quebra da ligação fosfodiéster, conforme a reação: $ATP \rightarrow ADP + P_i$ (MADIGAN *et al.*, 2016).

Primeiramente ocorre a glicólise (por exemplo, via glicolítica de Embden–Meyerhof–Parnas): a partir de uma molécula de seis átomos de carbono de glicose, ocorre uma sequência de dez reações catalisadas por enzimas, em que são geradas duas moléculas de piruvato, cada uma com três átomos de carbono. Na glicólise, parte da energia livre presente na glicose é conservada como ATP e NADH. Depois, ocorre de fato a fermentação alcoólica, processo no qual cada piruvato gerado é convertido anaerobicamente a uma molécula de etanol e uma de CO_2 , em duas reações. O papel da fermentação é justamente reoxidar a coenzima NADH (gerada na glicólise) a NAD^+ . As células possuem quantidades limitadas de NAD^+ , assim é necessário que esse cofator seja continuamente regenerado para que a glicólise possa continuar ativa (WALKER, 1998, NELSON; COX, 2010).

Quando Pasteur realizou seus estudos pioneiros sobre fermentações, ele constatou que tanto a velocidade de consumo de glicose quanto a quantidade total de glicose consumida são muito maiores sob condições anaeróbias que aeróbias, fato que ficou conhecido como “efeito Pasteur”. Atualmente, sabe-se que a fermentação tem um rendimento de 2 ATP por glicose consumida ao passo que a respiração aeróbia tem um rendimento muito maior, cerca de 36 ATP por glicose, sendo, portanto, necessário consumir muito mais glicose para produzir a mesma quantidade de ATP sob condições fermentativas (NELSON; COX, 2010).

A glicose é usada como fonte de carbono e também como fonte de energia. É relativamente rica em energia, sendo um ótimo combustível. Parte da energia livre liberada da quebra de glicose é conservada na forma de ATP. A glicose é precursora de

intermediários metabólicos usados na biossíntese. Como um exemplo, a partir da glicose, a bactéria *E. coli* pode obter os esqueletos carbônicos para todos os seus aminoácidos, nucleotídeos, coenzimas, ácidos graxos e outros intermediários metabólicos utilizados no seu crescimento (NELSON; COX, 2010).

2.4 CONSERVAÇÃO DE ENERGIA LIVRE DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM *S. CEREVISIAE*

Como já foi discutido, caso haja uma diminuição no rendimento de ATP por glicose consumida, uma maior fração de glicose é convertida em etanol e uma menor fração de biomassa é gerada (BASSO *et al.*, 2011). Em outras palavras, como para cada molécula de glicose consumida haverá uma menor quantidade de ATP, mais glicose tem que seguir para a via glicolítica e fermentação alcoólica para que mais ATP possa ser gerada. Conseqüentemente, sobra menos glicose para ser usada como fonte de carbono na biossíntese. Pode-se dizer que a fermentação alcoólica precisa ocorrer mais intensamente e, portanto, há uma maior produção de etanol. Assim, diminuindo-se a conservação de energia-livre em *S. cerevisiae* é possível aumentar o rendimento da fermentação alcoólica.

Como evidência da aplicação desse raciocínio, pode-se citar o trabalho de Basso *et al.* (2011). Existem dois tipos de metabolismo do dissacarídeo sacarose em *S. cerevisiae*. O primeiro e predominante em linhagens selvagens é a hidrólise extracelular pela enzima invertase. Nesse caso, o que entra nas células, por difusão facilitada, são os monossacarídeos glicose e frutose. O segundo é o transporte ativo da sacarose via simporte com prótons. Neste segundo caso, a sacarose é que entra na célula, sendo somente depois hidrolisada a glicose e frutose pelas invertases intracelulares. Para manter a homeostase intracelular de pH, a célula precisa expulsar os prótons que foram co-transportados com a sacarose. Para isso, ocorre gasto de ATP. Para tornar esta estratégia possível, Basso *et al.* (2011) modificaram geneticamente o promotor e o gene *SUC2* que codifica a invertase, de forma que praticamente toda atividade de invertase permanecesse no citosol. Nesta situação, as células da linhagem modificada se viram forçadas a um gasto adicional de ATP, chegando-se a uma linhagem com um rendimento

menor de ATP por açúcar consumido. Com isso, foi possível aumentar em 4% o fator de conversão de açúcar em etanol. Posteriormente, para aumentar a afinidade do transportador de sacarose, realizou-se engenharia evolutiva, chegando-se a uma conversão final de açúcar em etanol 11% maior, em relação à linhagem referência.

Navas; Cerdan e Gancedo (1993) publicaram um interessante trabalho, no qual forçaram a ocorrência de gliconeogênese em leveduras crescendo em glicose, gerando ciclos fúteis, para investigar a relevância fisiológica da repressão catabólica e inativação catabólica das enzimas gliconeogênicas. Para isso, eles construíram um plasmídeo multicópias com os genes que codificam as enzimas gliconeogênicas frutose-1,6-bisfosfatase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase, sob o controle do promotor do gene *ADH1*, que não é reprimido pela glicose, como são os promotores nativos dos genes codificadores das enzimas gliconeogênicas. A operação simultânea dos pares antagônicos fosfofrutoquinase / frutose-1,6-bisfosfatase e piruvato quinase / fosfoenolpiruvato carboxiquinase gera ciclos fúteis. Assim, Navas; Cerdan e Gancedo (1993) observaram 30% de diminuição do rendimento em biomassa. Mas não houve aumento no fator de conversão de açúcar em etanol. Navas; Cerdan e Gancedo (1993) sugerem que podem ter ocorrido alterações no metabolismo de glicose. Detectou-se apenas a presença de etanol e pouca formação de glicerol, indicando que possivelmente as alterações no metabolismo da glicose tenham levado a um aumento da formação de metabólitos intracelulares finais.

Trabalhos anteriores evidenciam que a superexpressão de ATPases leva a um aumento da hidrólise de ATP. Holm *et al.* (2010) buscavam observar as respostas metabólicas a perturbações nos cofatores NADH e ATP em *E. coli*. Para isso, eles superexpressaram NADH oxidase e a parcela solúvel F_1 da F_1 - F_0 -ATPase. Conseguiram, assim, reduzir os níveis de NADH e de ATP na bactéria.

Semkiv *et al.* (2014) construíram plasmídeos que codificam versões intactas ou truncadas de fosfatases alcalinas *PHO8* de vacúolo e citosólica de *S. cerevisiae*, sob o controle do promotor do gene *ADH1*. Na linhagem com a fosfatase alcalina de vacúolo, obteve-se concentração de ATP intracelular e produção de biomassa menores e aumento de 13% no rendimento em etanol, em relação à linhagem referência. Na linhagem com a fosfatase alcalina citosólica obteve-se uma fase lag (fase de adaptação) mais prolongada,

acúmulo de biomassa menor, porém menor produção de etanol em relação à linhagem referência.

2.5 ESTRATÉGIA PARA ESCOLHA E SUPEREXPRESSIONO DE ATPASES

Assim como Holm *et al.* (2010) optaram por superexpressar a parcela F₁ nativa de *E. coli* na própria *E. coli* (conforme descrito no Item 2.4), também se optou, neste trabalho, por não utilizar proteínas heterólogas, mas sim ATPases nativas de *S. cerevisiae*, de forma a aumentar as chances de haver de fato a expressão do gene e síntese da proteína ativa. Assim, é possível evitar problemas frequentes em expressão heteróloga, como modificações pós-traducionais inadequadas, códons raros etc.

Baseando-se no trabalho de Holm *et al.* (2010), a princípio, a ideia era utilizar a parcela solúvel F₁ da F₁-F₀-ATPase de *S. cerevisiae*. Entretanto, em levedura, ela se localiza nas mitocôndrias e o ATP produzido na fermentação se encontra no citoplasma. A F₁-F₀-ATPase de *S. cerevisiae* contém 13 subunidades, incluindo uma parcela insolúvel que fica ancorada na membrana da mitocôndria, além de várias chaperonas e proteínas associadas para sua montagem (VELOURS *et al.*, 2000). O mesmo vale para as H⁺-ATPases de membrana citoplasmática e as V-ATPases de membrana de vacúolo, que também são compostas por diversas subunidades e apresentam parcelas insolúveis.

De fato, a F-ATPase de *E. coli* também contém várias subunidades. Holm *et al.* (2010) optaram por superexpressar três genes que correspondem à parcela solúvel: subunidades α , β e γ da parcela F₁. Por se tratar de bactéria, eles puderam usar o sistema de *operon* para superexpressar os três genes conjuntamente, sob o controle do mesmo promotor, em um único plasmídeo, obtido por Koebmann *et al.* (2002). A clonagem em levedura seria mais complicada, por não ser possível lançar mão de um sistema de *operon*. Mas a maior dificuldade é que mesmo superexpressando as subunidades solúveis da F₁-F₀-ATPase de *S. cerevisiae* no citoplasma, as chaperonas necessárias à montagem da estrutura estão na mitocôndria e não no citoplasma. Assim, seria necessário expressar os genes que correspondem à parcela solúvel F₁ mais alguns genes referentes às chaperonas, todos eles sem a sequência de endereçamento

mitocondrial. Sendo assim, pensamos em alternativas mais simples, que poderiam levar à prova de conceito desejada.

A partir desse ponto, o foco foi procurar ATPases codificadas por apenas um gene (sem várias subunidades provenientes de diferentes genes). Para isso, foi feita uma busca no *Saccharomyces Genome Database (SGD)*. Nessa base de dados, foram encontrados, na ocasião da busca, mais de 80 genes com função ATPase (SGD, 2014). Então, procurou-se, uma a uma, ATPases que já atuassem no citoplasma de *S. cerevisiae*, pois é neste compartimento celular que o ATP é gerado na fermentação. É importante mencionar que as ATPases hidrolisam ATP para fornecer energia para o desempenho de algumas funções na célula. Assim, foi realizada uma triagem das ATPases de citoplasma que causariam menos dano à célula quando superexpressas. Por fim, levando-se em consideração todos esses critérios, foram escolhidas as ATPases codificadas pelos genes *HSP104* e *CDC48*.

Na situação prática deste trabalho, poderia existir uma separação tênue entre a célula de levedura tornar-se inviável ou manter-se viável produzindo mais etanol se comparada a uma célula selvagem. O que se almeja, portanto, é provocar nas células de levedura uma hidrólise adicional de ATP, porém a célula ainda assim deve ser capaz de gerar ATP em quantidade maior do que hidrolisar ATP, em um certo intervalo de tempo, para que ela permaneça viável. Para contornar este eventual problema, optou-se por expressar *HSP104* e *CDC48* sob o controle de promotores com diferentes forças, de forma a se obter diferentes níveis de expressão.

Mumberg; Müller e Funk (1995) desenvolveram justamente uma forma de variar os níveis de expressão de proteínas em levedura, através do uso de diferentes promotores. O sistema de expressão baseou-se no uso de quatro promotores: o promotor fraco P_{CYC1} (do gene *CYC1*, citocromo c isoforma 1), o promotor de força intermediária P_{ADH1} (do gene *ADH1*, álcool desidrogenase), o promotor forte P_{TEF} (do gene *TEF2*, fator de alongação de tradução) e o promotor com força ainda maior P_{GPD} (do gene *GPD*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Baseando-nos em Mumberg; Müller e Funk (1995), neste trabalho escolheu-se utilizar os promotores dos genes *CYC1*, *ADH1*, *TEF*, *GPD*. O promotor P_{CYC1} contém 287 nucleotídeos a montante do códon inicial ATG do gene *CYC1*. Para P_{TEF} são 402

nucleotídeos, para P_{ADH1} são 1500 nucleotídeos e para P_{GDP} são 608 nucleotídeos a montante do códon inicial ATG.

2.6 ATPASES

Como já mencionado, as ATPases são enzimas que catalisam a hidrólise de ATP em ADP e fosfato inorgânico. Essa desfosforilação libera energia, que é usada para que as células possam desempenhar alguma função. Os principais tipos de ATPases são: P-ATPases, que são transportadores de íons em bactérias e eucariotos através da membrana plasmática, em que a fosforilação por ATP causa uma mudança conformacional na ATPase que é essencial para o movimento do íon; V-ATPases, primariamente encontradas em vacúolos de eucariotos, são bombas de prótons geralmente responsáveis por acidificar compartimentos intracelulares, como lisossomos e endossomos; F-ATPases, localizadas em mitocôndrias e cloroplastos de eucariotos e na membrana plasmática de bactérias, apresentam reação reversível, podendo tanto hidrolisar, como sintetizar ATP, dependendo do gradiente de prótons na fosforilação oxidativa ou fotofosforilação; A-ATPases, encontradas em *Archaea* e similares às F-ATPases. (NELSON; COX, 2010).

Neste trabalho, foram empregadas duas AAA⁺ ATPases. As AAA⁺ ATPases são ATPases associadas a diversas atividades celulares e estão presentes em todos os domínios da vida. Essas proteínas funcionam como máquinas macromoleculares, que usam a energia liberada da hidrólise de ATP para remodelar seus substratos-alvo de diferentes maneiras. Elas estão envolvidas em processos celulares como replicação de DNA, degradação de proteínas, biogênese de organelas, regulação do ciclo celular etc (PATEL; LATTERICH, 1998).

Os domínios ATPase estão geralmente localizados na porção C-terminal da proteína e são homólogos entre si. Em contrapartida, outras regiões dessas proteínas apresentam pouca similaridade em suas sequências. As AAA⁺ ATPases apresentam a seguinte estrutura comum: oligômeros que têm aparência de anel hexamérico, com uma cavidade central. Nos casos em que possuem dois domínios ATPase, possuem a aparência de dois anéis hexaméricos empilhados (OGURA; WILKINSON, 2001).

O domínio ATPase conservado contém cerca de 200 a 250 aminoácidos, incluindo motivo Walker, importante para a ligação de ATP e para a atividade ATPase. Estas proteínas também compartilham alguns motivos que não estão diretamente relacionados à atividade ATPase, como por exemplo o N-linker, que transfere a energia liberada pela hidrólise do ATP para outras regiões da proteína (WHITE; LAURING, 2007).

No que se refere às funções biológicas, a maioria das AAA⁺ ATPases: remodela complexos proteicos, dissociando a proteína alvo de complexos maiores, caracterizando uma espécie de reciclagem; desmonta/desenovela proteínas danificadas ou agregadas (WHITE; LAURING, 2007).

2.7 HSP104

HSP104 é uma chaperona molecular da classe das AAA⁺ ATPases de *S. cerevisiae* que desagrega proteínas (SCHAUPP *et al.*, 2007). Possui 102 kDa e está presente principalmente no citoplasma, mas também pode ser encontrada no núcleo (SGD, 2014). É uma proteína hexamérica, com dois sítios ATPase por protômero: NBD1 e NBD2. Embora a hidrólise de ATP no NBD2 seja mais lenta, a atividade ATPase no NBD1 é muito alta ($k_{cat} = 76 \text{ min}^{-1}$ e $K_m = 170 \text{ }\mu\text{M}$), suprimindo a energia necessária para Hsp104 realizar sua atividade desagregadora (HATTENDORF; LINDQUIST, 2002)

Hsp104 foi inicialmente identificada como um potente fator de tolerância ao estresse em levedura (SANCHEZ; LINDQUIST, 1990). Trata-se de uma *Heat Shock Protein* da família das proteínas Hsp100p (PARSELL *et al.*, 1993). Sabe-se que o promotor do gene *HSP104* contém vários elementos que são induzidos sob condições de estresse (GRABLY *et al.*, 2002). A expressão de *HSP104* é induzida não só sob estresse térmico, mas também sob outros fatores de estresse, como altas concentrações de etanol, metais e drogas (PARSELL *et al.*, 1993, VIANNA *et al.*, 2008). Além de ter sua expressão aumentada sob condições de estresse, *HSP104* tem uma expressão basal em condições fisiológicas de crescimento (GHAEMMAGHAMI *et al.*, 2003).

In vivo, além de desagregar proteínas resultando em “limpeza” de agregados proteicos, Hsp104 também fragmenta príons e amilóides, resultando na propagação de príons (GRIMMINGER-MARQUARDT; LASHUEL, 2009). Amiloides são agregados

proteicos insolúveis, que surgem do enovelamento incorreto de polipeptídios (RAMÍREZ-ALVARADO; MERKEL; REGAN, 2000). Em certos casos, estas conformações são transmissíveis/infecciosas, sendo chamadas de príons (NIZHNIKOV *et al.*, 2016).

Assim, o gene *HSP104* vem sendo muito estudado, pois várias doenças degenerativas em humanos são causadas por enovelamento incorreto de proteínas e acúmulo de agregados proteicos tóxicos. Algumas dessas doenças são Alzheimer, Parkinson, Diabetes tipo II e Creutzfeldt-Jakob (GRIMMINGER-MARQUARDT; LASHUEL, 2009).

Como possíveis substratos dessa enzima estão os polipeptídios desenovelados, agregados amorfos de várias proteínas e estruturas amilóides resistentes a proteases (GRIMMINGER-MARQUARDT; LASHUEL, 2009). Hsp104 pode trabalhar conjuntamente com Hsp70 e Hsp40, mas também funciona de forma autônoma (SCHAUPP *et al.*, 2007).

Chiva *et al.* (2012) superexpressaram HSP104 em um estudo de termotolerância sobre produção de vinho a baixas temperaturas. Eles obtiveram uma levedura *S. cerevisiae* viável e com maiores taxas de fermentação em baixas temperaturas.

O mecanismo dessa chaperona é complexo e ainda não foi totalmente compreendido. O modelo proposto é que Hsp104 extrai as cadeias de polipeptídios dos agregados proteicos através de seu processamento pelo canal central do hexâmero com ciclos assimétricos de hidrólise de ATP.

É importante notar que Hsp104 faz a propagação de príons mas não é capaz de formar príons a partir de proteína solúveis. Além disso, quanto menores os níveis de Hsp104 *in vivo*, maior o tamanho dos agregados de príons (WEGRZYN *et al.*, 2001).

2.8 CDC48

Assim como *HSP104*, *CDC48* também pertence à família das AAA⁺ ATPases. É uma proteína abundante na célula e que desempenha papel fundamental em funções regulatórias de vários processos celulares. Em resumo, Cdc48 utiliza sua atividade de ATPase para separar polipeptídeos de estruturas imóveis (membrana de organelas, por exemplo) ou para desmontar complexos proteicos, liberando esses polipeptídeos para que possam ser degradados pelo proteassomo (XIA; TANG; YE, 2015).

Muito conservada na evolução, Cdc48 é uma ATPase essencial para a sobrevivência e para o crescimento celular, fato esse que foi demonstrado tanto em levedura como em camundongo. Possui estrutura hexamérica, com dois domínios ATPase por protômero (BAEK *et al.*, 2013). Tem 92 kDa e está presente no citoplasma e também no núcleo e nas mitocôndrias da célula (SGD, 2014).

Cdc48 participa de diversos eventos biológicos como: regulação do ciclo celular, degradação de proteínas, fusão de membrana, replicação de DNA, expressão gênica, reparo de DNA, apoptose e autofagia (BAEK *et al.*, 2013). Quase todos os eventos biológicos regulados por *CDC48* envolvem ubiquitina (BUCHBERGER, 2013; DAI; LI, 2001). A ubiquitina é uma pequena proteína (~8 kDa), bem conservada durante a evolução, que atua como um sinalizador que marca proteínas para que sejam degradadas pelo proteassomo (BAEK *et al.*, 2013).

A função mais bem caracterizada de Cdc48 é no processo de Degradação Proteica Associada ao Retículo Endoplasmático (ERAD). Cerca de um terço das proteínas passam pelo retículo endoplasmático, que acaba funcionando como um controle de qualidade. Apenas as proteínas que foram corretamente enoveladas seguem então para desempenhar suas funções em outras partes da célula. As proteínas mal formadas são degradadas. Elas são ubiquitinadas e ejetadas para o citosol para serem degradadas pelo proteassomo celular (BAEK *et al.*, 2013). Cdc48 tem função de extrair as proteínas deformadas para fora da membrana do retículo endoplasmático para que sejam degradadas. Esse transporte requer energia que é suprida pela atividade ATPase da Cdc48, através da hidrólise de ATP (YE; MEYER; RAPOPORT, 2001).

Cdc48 também pode liberar produtos de tradução defeituosos ligados aos ribossomos, em um processo chamado degradação associada ao ribossomo. Aparentemente, só após essa segregação, esses polipeptídios aberrantes podem ser degradados eficientemente no proteassomo. Além da função de “segregase”, pode ser que Cdc48 desempenhe um papel de transportar esses polipeptídios aberrantes para o proteassomo para degradação. Essa função parece ser particularmente importante na degradação de certas proteínas mal enoveladas que apresentam propensão à agregação (GALLAGHER *et al.*, 2014).

Cdc48 com sua atividade ATPase também está envolvido na extração de polipeptídios da membrana externa das mitocôndrias para facilitar a degradação associada à mitocôndria (HEMION *et al.*, 2014).

2.9 MATERIAIS E MÉTODOS

2.9.1 Linhagens

2.9.1.1 Linhagem de *Escherichia coli*

Utilizou-se a *E. coli* RR1 (HANAHAN, 1983), cujo genótipo está descrito abaixo:

RR1: $\Delta(gpt-proA)62, leuB6, thi-1, lacY1, hsd_B20, rpsL20 (Str^r), ara-14, galK2, xyl-5, mtl-1, supE44, mcrB_B$.

2.9.1.2 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas estão descritas na Tabela 1.

Para facilitar, a nomenclatura das linhagens que superexpressam ATPases foi feita da seguinte forma: após “LV”, vem a letra referente ao promotor e depois vem a letra referente ao gene. Por exemplo: LV-CH – promotor de *CYC1* e gene *HSP104*. A linhagem com plasmídeo epissomal foi nomeada de LV-EpGC (“Ep” de epissomal, promotor de *GPD* e gene *CDC48*). A linhagem auxotrófica para uracila CEN.PK113-5D foi chamada de AUX. A linhagem controle com plasmídeo integrativo vazio (CEN.PK113-5D/YIp352) foi chamada de CTR. A linhagem controle com plasmídeo epissomal vazio (CEN.PK113-5D/YEp352) foi chamada de CTR-Ep. E a linhagem prototrófica foi chamada de WT (*wild type*).

Tabela 1. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no Capítulo 2 e no Capítulo 3 desta tese.

Linhagem	Genótipo relevante	Procedência
W303-1 A	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	R. Rothstein, Columbia University
W303-1 B	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	R. Rothstein, Columbia University
KL14	<i>MATa, his-, val-</i>	A. Tzagoloff, Columbia University
CEN.PK113-7D (chamada de WT nessa tese)	<i>MATa</i>	P. Kötter. GoEe Universität Frankfurt
CEN.PK113-7D [ρ-] (chamada de WT [ρ-] nessa tese)	<i>MATa [ρ-]</i>	Este trabalho
CEN.PK113-5D (chamada de AUX nessa tese)	<i>MATa ura3-52</i>	P. Kötter. GoEe Universität Frankfurt
CTR	<i>MATa ura3-52::YIp352 URA3</i>	Este trabalho
CTR-Ep	<i>MATa ura3-52::YEp352 URA3</i>	Este trabalho
LV-CH	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{CYC1}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho
LV-AH	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{ADH1}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho
LV-TH	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{TEF}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho
LV-CC	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{CYC1}-CDC48 URA3</i>	Este trabalho
LV-AC	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{ADH1}-CDC48 URA3</i>	Este trabalho
LV-TC	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{TEF}-CDC48 URA3</i>	Este trabalho
LV-GH	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{GPD}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho
LV-GH [ρ]	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{GPD}-HSP104 URA3 [ρ]</i>	Este trabalho
LV-GC	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{GPD}-CDC484 URA3</i>	Este trabalho
LV-EpGC	<i>MATa ura3-52 YEp352-P_{GPD}-CDC484 URA3</i>	Este trabalho
LV-CH-HA ^(a)	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{CYC1}-HSP104-HA URA3</i>	Este trabalho
LV-GH-HA ^(a)	<i>MATa ura3-52::YIp352-P_{GPD}-HSP104-HA URA3</i>	Este trabalho

(a) Linhagens que contém o epítipo da hemaglutinina (HA) fusionados ao gene *HSP104*.

2.9.2 Plasmídeos

Os plasmídeos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Lista de plasmídeos utilizados nesta tese. Em todos eles a marca de seleção em levedura é o gene *URA3*, e em bactéria, o gene que confere resistência à ampicilina.

Nome	Tipo	Promotor levedura	Gene	Plasmídeo base	Procedência
Ylp352	Integrativo	-	-	-	Hill <i>et al.</i> , 1986
Ylp352-P _{CYC1} -CDC48	Integrativo	P _{CYC1}	<i>CDC48</i>	Ylp352	Esse trabalho
Ylp352-P _{ADH1} -CDC48	Integrativo	P _{ADH1}	<i>CDC48</i>	Ylp352	Esse trabalho
Ylp352-P _{TEF} -CDC48	Integrativo	P _{TEF}	<i>CDC48</i>	Ylp352	Esse trabalho
Ylp352-P _{CYC1} -HSP104	Integrativo	P _{CYC1}	<i>HSP104</i>	Ylp352	Esse trabalho
Ylp352-P _{ADH1} -HSP104	Integrativo	P _{ADH1}	<i>HSP104</i>	Ylp352	Esse trabalho
Ylp352-P _{TEF} -HSP104	Integrativo	P _{TEF}	<i>HSP104</i>	Ylp352	Esse trabalho
Ylp352-P _{GPD} -HSP104	Integrativo	P _{GPD}	<i>HSP104</i>	Ylp352	Esse trabalho
Ylp352-P _{GPD} -CDC48	Integrativo	P _{GPD}	<i>CDC48</i>	Ylp352	Esse trabalho
YEp352	Epissomal 2 micron	-	-	-	Hill <i>et al.</i> , 1986
YEp352-P _{GPD} -CDC48	Epissomal 2 micron	P _{GPD}	<i>CDC48</i>	YEp352	Esse trabalho
Ylp352-P _{CYC1} -HSP104-HA ^(a)	Integrativo	P _{CYC1}	<i>HSP104</i>	Ylp352	Esse trabalho
Ylp352-P _{GPD} -HSP104-HA ^(a)	Integrativo	P _{GPD}	<i>HSP104</i>	Ylp352	Esse trabalho
YEp352-P _{GPD} -HSP104	Epissomal 2 micron	P _{GPD}	<i>HSP104</i>	YEp352	Esse trabalho

(a) Plasmídeos que contém o epítipo da hemaglutinina (HA) fusionados ao gene *HSP104*.

2.9.3 Construção de plasmídeos

Como base para as construções, foi utilizado o vetor Ylp352 (HILL *et al.*, 1986; ROTHSTEIN, 1983). Esse vetor possui as seguintes propriedades: é um vetor ponte de *E. coli* / *S. cerevisiae*; replica-se de forma autônoma em *E. coli*; possui o gene que confere a *E. coli* resistência à ampicilina; possui região múltipla de clonagem com os sítios de restrição únicos de *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SalI*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*; contém o gene *URA3* de *S. cerevisiae*, permitindo a seleção por meio de

complementação de auxotrofia; é integrativo, sendo usado para integrar sequências no DNA cromossomal de *S. cerevisiae* (SHERMAN, 1998).

Foram amplificados os promotores dos genes *CYC1* e *ADH1*, os genes *HSP104* e *CDC48* e o terminador do gene *CYC1*, a partir do DNA de *S. cerevisiae* W303, com os iniciadores apresentados na *Tabela 13*, de forma a inserir os sítios de restrição desejados para realizar as clonagens. O promotor do gene *TEF2* e o promotor do gene *GPD* foram retirados de plasmídeos disponíveis no laboratório (ZAMPOL, 2011), com as enzimas de restrição *SacI* e *BamHI*.

O terminador de *CYC1* foi clonado no vetor Ylp352 no sítio de *HindIII*. Os promotores P_{CYC1} , P_{ADH1} e P_{TEF} foram clonados entre os sítios de *SacI* e *BamHI*. Os genes *HSP104* e *CDC48* foram clonados entre os sítios de *BamHI* e *PstI*.

Foi utilizado o Software Serial Cloner 2.6.1 (Serial Basics) para desenhar os mapas dos plasmídeos, conforme a *Figura 2* e a *Figura 3*.

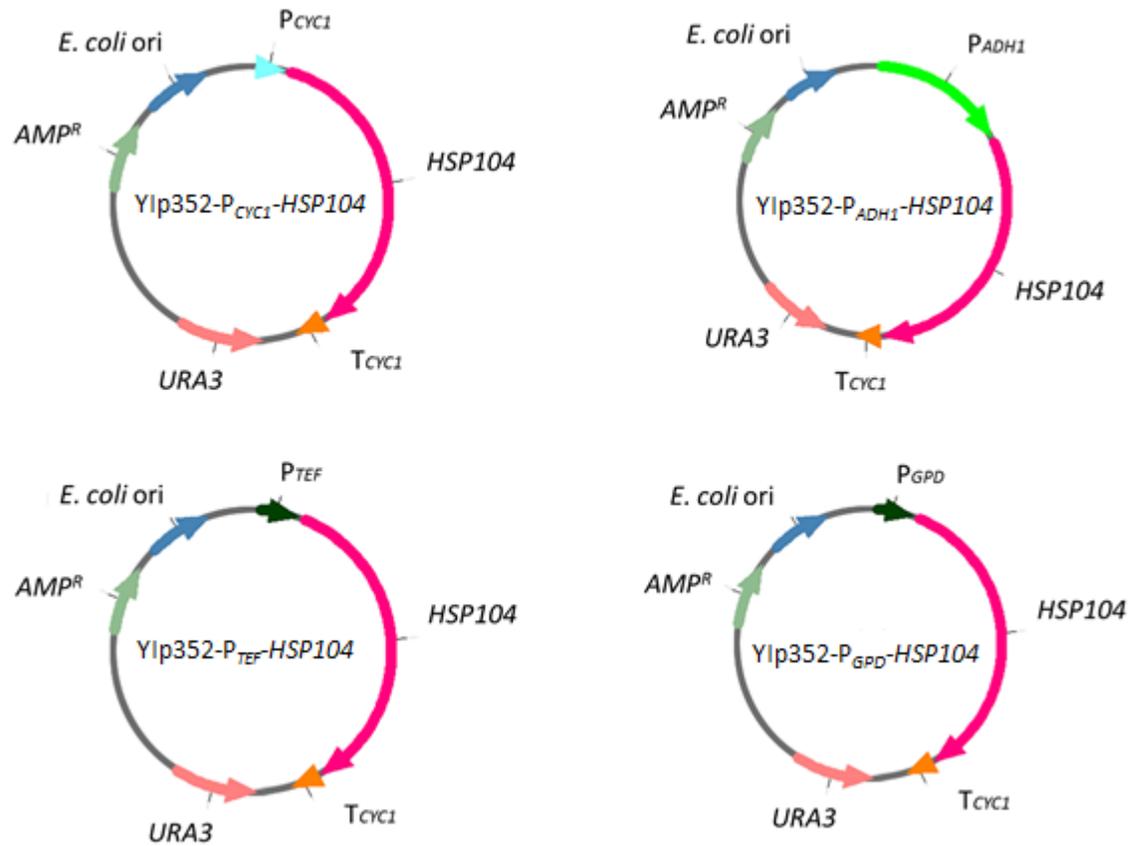


Figura 2. Plasmídeos com o gene *HSP104*. Plasmídeo *Ylp352-P_{CYC1}-HSP104*, com o promotor P_{CYC1} e o gene *HSP104*. Plasmídeo *Ylp352-P_{ADH1}-HSP104*, com o promotor P_{ADH1} e o gene *HSP104*. Plasmídeo *Ylp352-P_{TEF}-HSP104*, com o promotor P_{TEF} e o gene *HSP104*. Plasmídeo *Ylp352-P_{GPD}-HSP104*, com o promotor P_{GPD} e o gene *HSP104*. AMP^R é o gene de resistência à ampicilina para seleção em *E. coli*. *URA3* é o gene que permite a seleção por meio de complementação de auxotrofia em *S. cerevisiae*. *E. coli ori* é a origem de replicação em *E. coli*. T_{CYC1} é o terminador do gene *CYC1*.

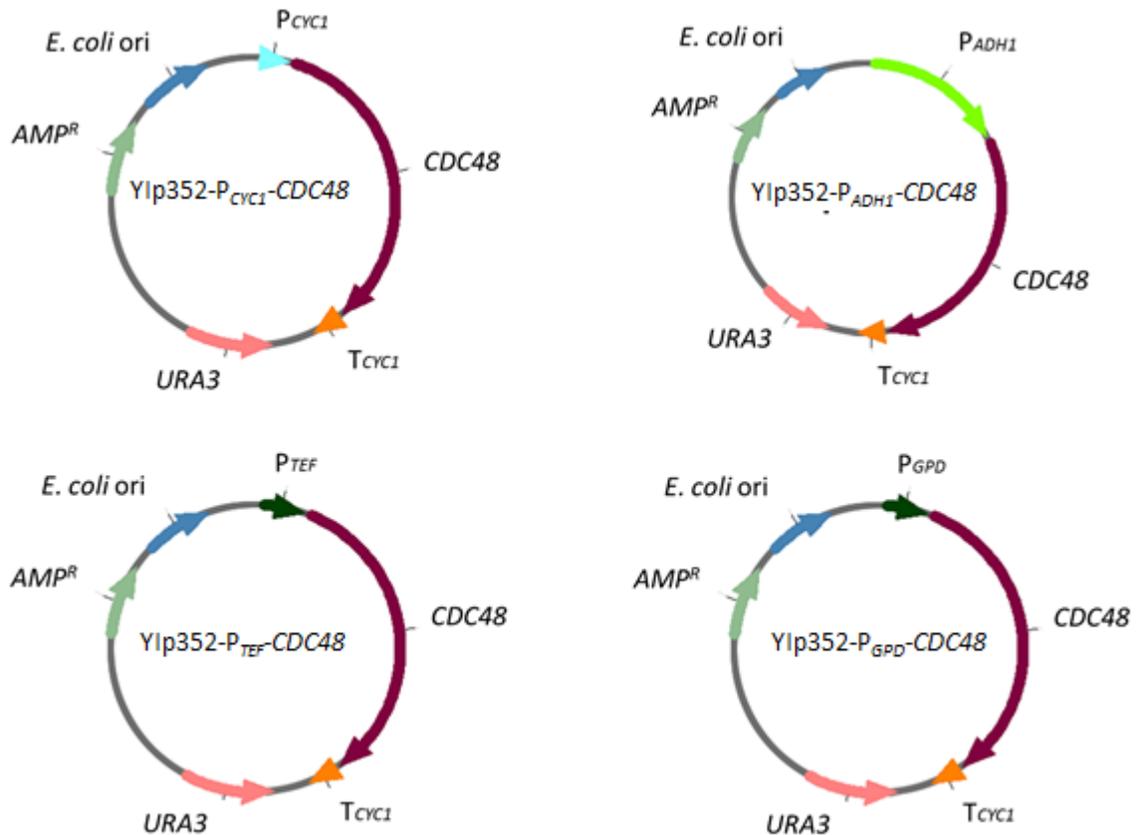


Figura 3. Plasmídeos com o gene *CDC48*. Plasmídeo Ylp352- P_{CYC1} -*CDC48*, com o promotor P_{CYC1} e o gene *CDC48*. Plasmídeo Ylp352- P_{ADH1} -*CDC48*, com o promotor P_{ADH1} e o gene *CDC48*. Plasmídeo Ylp352- P_{TEF} -*CDC48*, com o promotor P_{TEF} e o gene *CDC48*. Plasmídeo Ylp352- P_{GPD} -*CDC48*, com o promotor P_{GPD} e o gene *CDC48*. AMP^R é o gene de resistência à ampicilina para seleção em *E. coli*. *URA3* é o gene que permite a seleção por meio de complementação de auxotrofia em *S. cerevisiae*. *E. coli* ori é a origem de replicação em *E. coli*. T_{CYC1} é o terminador do gene *CYC1*.

Além disso, foi construído um plasmídeo epissomal com gene *CDC48* sob o controle do promotor forte P_{GPD} (Figura 4). Como base para a construção, foi utilizado o vetor epissomal YEp352 (HILL *et al.*, 1986; ROTHSTEIN, 1983). Esse vetor é similar ao Ylp352, porém contém uma origem de replicação em levedura (2 micron). O promotor P_{GPD} foi clonado entre os sítios de restrição *SacI* e *BamHI* e o gene *CDC48* foi clonado entre os sítios de *BamHI* e *PstI*.

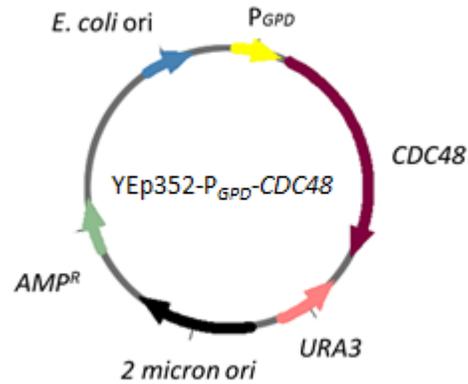


Figura 4. Plasmídeo epissomal YEp352- P_{GPD} -*CDC48*, com o promotor P_{GPD} e o gene *CDC48*. AMP^R é o gene de resistência à ampicilina para seleção em *E. coli*. *URA3* é o gene que permite a seleção por meio de complementação de auxotrofia em *S. cerevisiae*. *E. coli ori* é a origem de replicação em *E. coli*. 2 micron ori é a origem de replicação em *S. cerevisiae*.

Também foi construído um plasmídeo epissomal com promotor P_{GPD} e gene *HSP104*, mas não se obteve sucesso ao transformar levedura. Uma hipótese para esse resultado negativo seria o nível de superexpressão do gene *HSP104* atingido com essa construção ser letal à célula.

2.9.4 Obtenção de leveduras geneticamente modificadas

Nesse trabalho, os plasmídeos integrativos recombinantes foram digeridos na região do gene *URA3* para que fossem linearizados (com as respectivas enzimas de restrição indicadas na Tabela 3). Assim, a recombinação homóloga aconteceu justamente com o locus *URA3* do genoma da levedura. A linhagem base utilizadas nesse trabalho é auxotrófica para uracila por possuir o alelo *ura3* não-funcional em seu genoma. Depois da integração, a linhagem passa a ter um alelo recessivo *ura3* não funcional e um alelo *URA3* funcional. Entre eles, está o plasmídeo que foi integrado, com o gene e o promotor de interesse. As células transformantes são, portanto, prototróficas para uracila

e assim são capazes de formar colônias em meio seletivo sem uracila. A Tabela 3 mostra os plasmídeos usados para construir cada linhagem.

Tabela 3. Linhagens de levedura utilizadas no Capítulo 2 e no Capítulo 3 desta tese com respectivos plasmídeos que foram integrados.

Linhagem construída	Plasmídeo usado	Linhagem base	Tipo de plasmídeo	Enzima para linearização
CTR ^(a)	YIp352	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NcoI</i>
LV-CH	YIp352-P _{CYC1} -HSP104	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NcoI</i>
LV-AH	YIp352-P _{ADH1} -HSP104	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NcoI</i>
LV-TH	YIp352-P _{TEF} -HSP104	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NcoI</i>
LV-CC	YIp352-P _{CYC1} -CDC484	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>ApaI</i>
LV-AC	YIp352-P _{ADH1} -CDC484	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NdeI</i>
LV-TC	YIp352-P _{TEF} -CDC484	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NdeI</i>
LV-GC	YIp352-P _{GPD} -CDC48	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NdeI</i>
LV-GH	YIp352-P _{GPD} -HSP104	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NcoI</i>
LV-CH-HA ^(b)	YIp352-P _{CYC1} -HSP104-HA	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NcoI</i>
LV-GH-HA ^(b)	YIp352-P _{GPD} -HSP104-HA	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NcoI</i>
LV-GH [p] ^(c)	YIp352-P _{GPD} -HSP104	CEN.PK113-5D	integrativo	<i>NcoI</i>
LV-EpGC	YE _p 352-P _{GPD} -CDC48	CEN.PK113-5D	epissomal	-
CRT-Ep ^(d)	YE _p 352	CEN.PK113-5D	epissomal	-

(a) CTR = linhagem controle com plasmídeo vazio integrativo. (b) Plasmídeos que contém o epítipo da hemaglutinina (HA) fusionados ao gene *HSP104*. (c) [p] = linhagem petite. (d) CTR-Ep = linhagem controle com plasmídeo vazio epissomal.

2.9.5 Cultivos em frasco agitado

Os cultivos para estudo de cinética de *S. cerevisiae* foram feitos em frasco agitado tipo Erlenmeyer de 500 mL, contendo 300 mL de meio líquido. O sistema experimental utilizado tenta se aproximar de uma condição de anaerobiose. Para isto, a vedação do sistema foi feita com uma rolha de silicone, conforme experimentos de

Siqueira; Castelhana e Gombert (2013). Pela rolha, passam duas agulhas, uma permite a retirada de amostras com uma mangueira e a outra permite a saída de CO₂ para evitar pressurização do frasco (Figura 5). Na ponta da agulha da saída de CO₂ foi colocado algodão para manutenção de assepsia. Células provenientes do inóculo (*overnight*, 200 rpm, 30 °C, frasco com rolha de algodão, mesmo meio do cultivo) foram centrifugadas e lavadas com água estéril. Os cultivos, ajustados para começar com absorbância a 600 nm em torno de 0,2, foram incubados a 150 rpm e 30°C, em meio YPD ou meio definido Verduyn (meios descritos no Item 6.2).

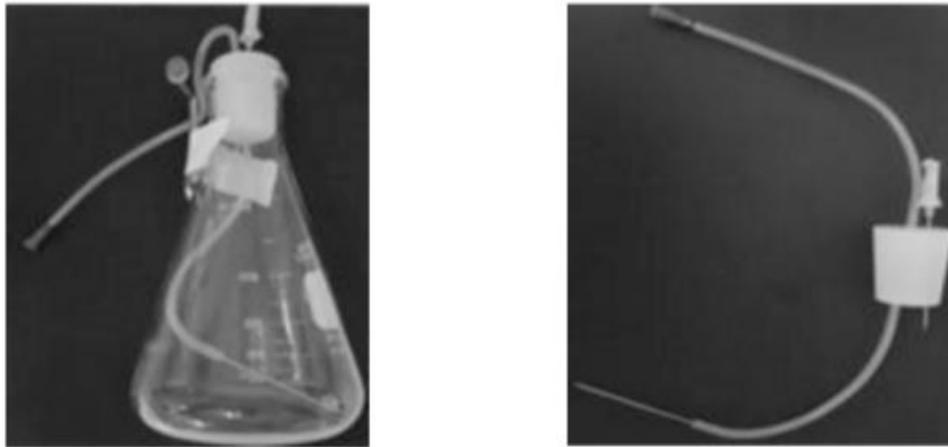


Figura 5. Sistema experimental para cultivos em frasco agitado conforme Siqueira; Castelhana e Gombert (2013).

Amostras de aproximadamente 3 mL foram retiradas a cada hora. De cada amostra, filtrou-se 1 mL para remoção das células (filtros Millex 0,22 µm, Millipore), sendo parte do filtrado congelada para análise posterior por cromatografia líquida. Também foram feitas medições de absorbância a 600 nm (espectrofotômetro Eppendorfe, modelo Biophotometer) e de pH (pHmetro Gehaka modelo PG2000) com o restante da amostra.

2.9.6 Determinação da concentração de metabólitos extracelulares

A determinação da concentração de metabólitos extracelulares (glicose, etanol e glicerol) foi feita por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Foi utilizado HPLC Shimadzu nas seguintes condições: coluna de exclusão iônica Bio-Rad, modelo

Aminex HPX-87H, temperatura da coluna de 65 °C, fluxo de fase móvel de H₂SO₄ 5 mM 0,6 mL/min e a detecção foi realizada por índice de refração.

2.9.7 Determinação da massa seca de células

A determinação da concentração celular, em termos da massa seca de células, foi feita conforme Olsson e Nielsen (1997). Primeiro, as membranas com poro de diâmetro 0,22 µm eram secas, deixando-as *overnight* em estufa a 80°C. Após retiradas da estufa, eram imediatamente pesadas em balança analítica. Para obter a massa seca, 10 mL de amostra eram filtrados a vácuo nestas membranas, que depois eram aquecidas em forno de microondas com potência 360 W por 20 min, para eliminação completa da umidade. Pesava-se novamente a membrana. A diferença entre as massas obtidas é igual a massa de células secas retida na membrana que, dividida pelo volume filtrado, corresponde à concentração celular em gramas de massa seca por litro (gMS/L). As determinações foram realizadas em duplicata.

2.10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.10.1 Confirmação das construções dos plasmídeos

A correta construção dos plasmídeos foi confirmada digerindo-se os mesmos com enzimas de restrição. Um exemplo dessa análise de restrição é mostrado na Figura 6. No *Software Serial Cloner*, foram feitas simulações das digestões para obter o padrão de bandas esperado (Figura 7).

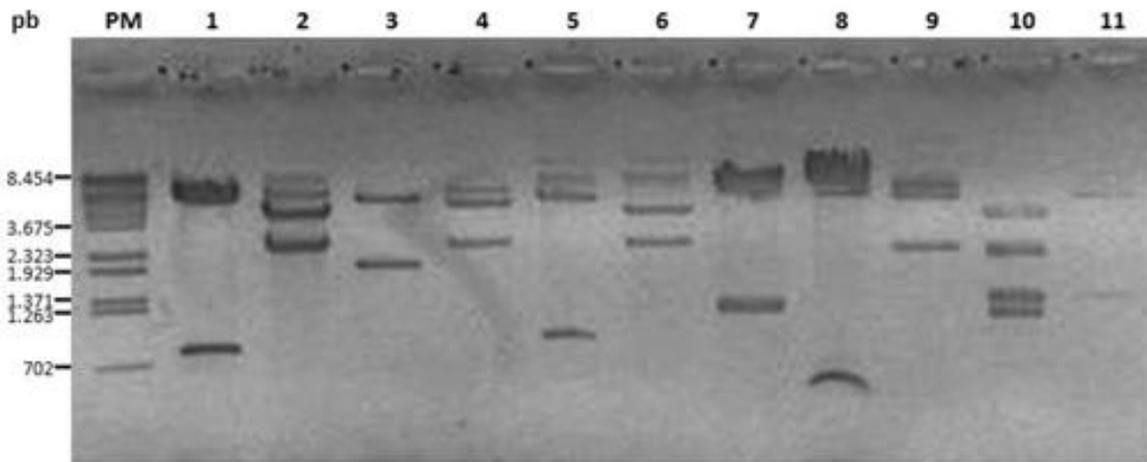


Figura 6. Análise de restrição para confirmar as construções de plasmídeos, eletroforese em gel 1,2% de agarose. 1- Ylp352- P_{CYC1} -CDC484 com *EcoRI*; 2- Ylp352- P_{CYC1} -CDC484 com *StuI*; 3- Ylp352- P_{ADH1} -CDC484 com *EcoRI*; 4- Ylp352- P_{ADH1} -CDC484 com *StuI*; 5- Ylp352- P_{TEF} -CDC484 com *EcoRI*; 6- Ylp352- P_{TEF} -CDC484 com *StuI*; 7- Ylp352- P_{CYC1} -HSP104 com *SacI* e *BglII*; 8- Ylp352- P_{CYC1} -HSP104 com *EcoRI*; 9- Ylp352- P_{ADH1} -HSP104 com *SacI* e *BglII*; 10- Ylp352- P_{ADH1} -HSP104 com *EcoRV*; 11- Ylp352- P_{TEF} -HSP104 com *SacI* e *BglII*. PM - padrão de peso molecular em pares de base (pb).

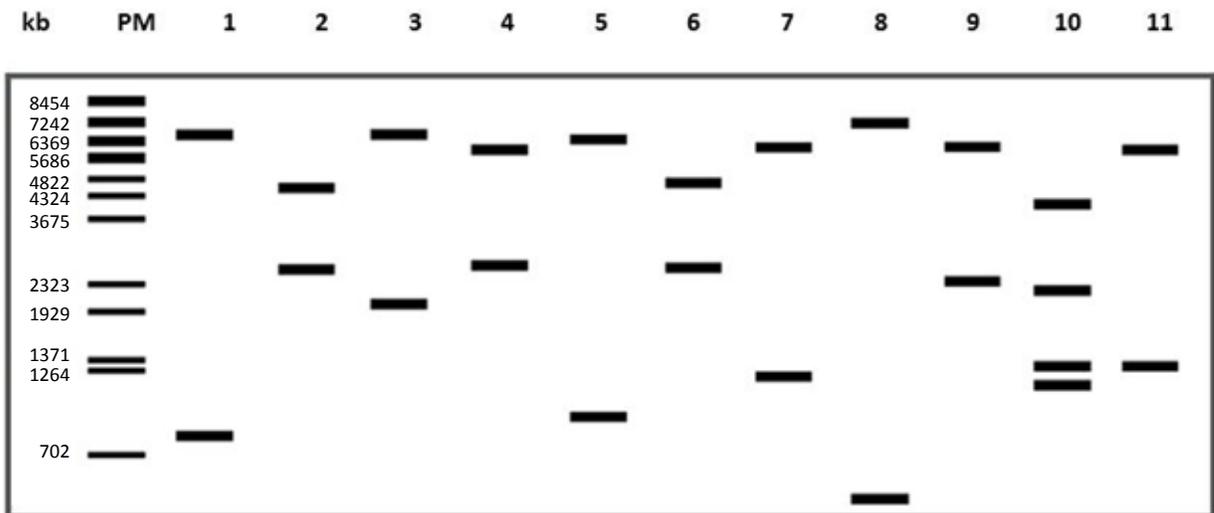


Figura 7. Simulação *in silico* das digestões para confirmar as construções de plasmídeos feitas no *Software Serial Cloner*. Ver também legenda da Figura 6.

Assim, foi possível comparar as simulações *in silico* com a eletroforese das digestões e verificar que estavam compatíveis com o resultado esperado. Isto significa que todos os plasmídeos foram corretamente construídos. Vale ressaltar que, após estas análises de restrição, também foram realizados sequenciamentos de DNA (método Sanger), confirmando a natureza das construções. Foi sequenciado o inserto a partir de iniciadores que flanqueiam a região de clonagem do vetor original. Pelo sequenciamento foi possível verificar a correta fusão dos genes com os promotores e terminadores de interesse

2.10.2 Integração dos plasmídeos em levedura

A verificação da integração dos plasmídeos no DNA cromossomal de *S. cerevisiae*, foi feita por PCR de colônia com temperatura de hidridização de 58 °C e demais condições conforme o Item 6.11. Para verificação da integração do gene *HSP104*, foram utilizados os iniciadores Hsp104-1 (*forward*) e Yep351-R (*reverse*). Para verificação da integração do gene *CDC48*, foram utilizados os iniciadores Cdc48-1 (*forward*) e Yep351-R (*reverse*). Os iniciadores Hsp104-1 e Cdc48-1 se hibridizam no início da sequência dos genes *HSP104* e *CDC48*, respectivamente, e o iniciador Yep351-R se hibridiza próximo ao final do sítio múltiplo de clonagem do vetor recombinante Ylp352. Todos os iniciadores encontram-se descritos na Tabela 13. A Figura 8 mostra algumas das confirmações realizadas. No *Software Serial Cloner*, foram feitas simulações das PCR para obter o tamanho dos fragmentos amplificados (Figura 9).

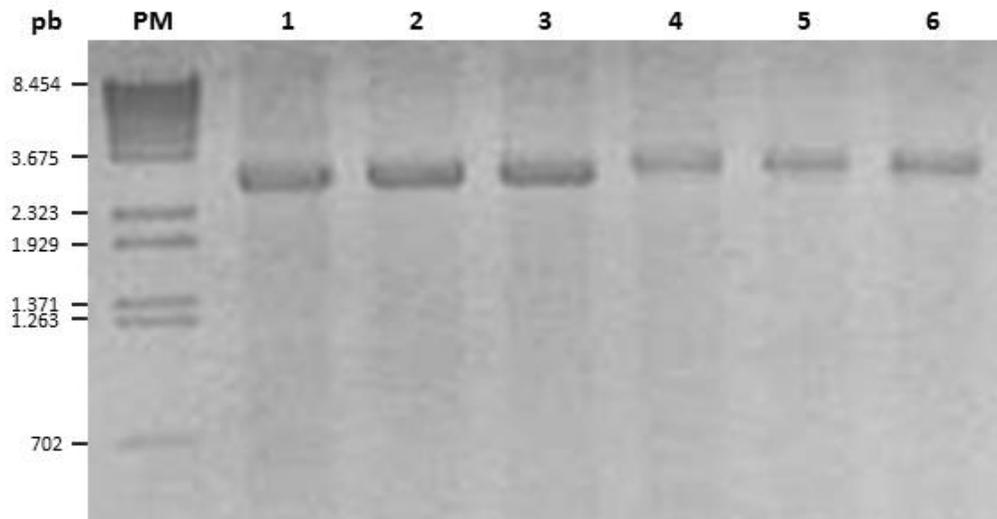


Figura 8. Análise eletroforética (gel 1,2% de agarose) da PCR de colônia para confirmar integração de plasmídeos. 1- Ylp352- P_{CYC1} -CDC48; 2- Ylp352- P_{ADH1} -CDC48; 3- Ylp352- P_{TEF} -CDC48; 4- Ylp352- P_{CYC1} -HSP104; 5- Ylp352- P_{ADH1} -HSP104; 6- Ylp352- P_{TEF} -HSP104. PM - padrão de peso molecular em pb.



Figura 9. Simulação *in silico* da PCR para confirmar integração de plasmídeos contendo os genes *CDC48* e *HSP104*. Para o *CDC48*, o *amplicon* tem 2969 pares de base e para o *HSP104*, o *amplicon* tem 3188 pb.

O gene *HSP104* tem 219 pares de bases a mais que o *CDC48* (Figura 9), assim é coerente que as bandas correspondentes apareçam ligeiramente acima no gel de eletroforese.

Para a linhagem controle CTR (transformada com o plasmídeo vazio), a PCR para confirmar a integração do plasmídeo Ylp352 foi realizada com temperatura de hibridização de 52°C e demais condições conforme o Item 6.11. Foram utilizados os iniciadores Yep351-F (*forward*) e Ura3-F (*reverse*). O iniciador Ura3-F se hibridiza a uma região do promotor do gene *URA3* e o iniciador Yep351-F se hibridiza próximo ao início

do sítio múltiplo de clonagem do vetor YIp352. O *amplicon* é mostrado na Figura 10 e a simulação *in silico* do *amplicon*, na Figura 11.

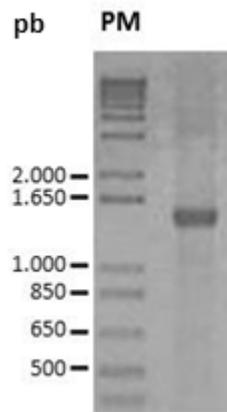


Figura 10. Análise eletroforética (gel de agarose 1,2%) da PCR de colônia para confirmar integração do plasmídeo YIp352. PM - padrão de peso molecular em pb.

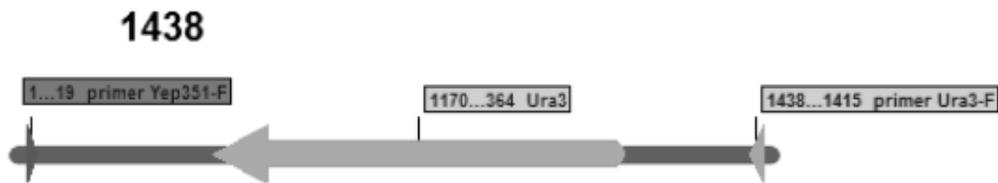


Figura 11. Simulação *in silico* da PCR para confirmar integração de plasmídeos YIp352, para construção da linhagem CTR com plasmídeo vazio. O *amplicon* tem 1438 pares de base.

Essas PCR tratam-se de confirmações moleculares. Além disso, há a evidência de fenótipo. As linhagens passaram a crescer em placa com meio seletivo YNB sem uracila (já que receberam o alelo selvagem *URA3* do plasmídeo YIp352), capacidade que não tinham antes da transformação, devido à auxotrofia.

2.10.3 Avaliação da expressão de HSP104

Para verificar se as proteínas estavam sendo expressas, realizou-se ensaio de *immunoblot*, conforme descrito no Item 6.14. Fusionou-se o epítipo constituído de 9 resíduos antigênicos da hemaglutinina A (HA) ao gene *HSP104* nos plasmídeos com promotores P_{GPD} e P_{CYC1} , obtendo-se, assim, os plasmídeos YIp352- P_{GPD} -*HSP104*-HA e

Ylp352- P_{CYC1} -*HSP104*-HA. Esses plasmídeos foram transformados em *S. cerevisiae*. Realizou-se extração e quantificação de proteínas dessas linhagens, conforme Itens 6.12 e 6.13. A imunodeteção das proteínas foi feita através da ligação de um anticorpo anti-HA.

Como pode ser observado na Figura 12, com o promotor mais forte P_{GPD} , foi possível observar uma banda forte e com o promotor P_{CYC1} , uma banda mais fraca, ambas correspondentes à proteína Hsp104, comprovando-se a superexpressão de *HSP104*.



Figura 12. SDS-PAGE 12% de acrilamida seguida de imunodeteção para Hsp104. A quantidade de extrato proteico carregada nos géis foi de 40 μ g em cada poço. A imunodeteção das proteínas foi feita através da ligação de um anticorpo anti-HA para o epítipo HA fusionado no gene *HSP104*.

Não foi realizado ensaio de immunoblot com Cdc48 devido a uma dificuldade técnica: não foi possível obter *CDC48* fusionado ao epítipo HA por PCR, mesmo após várias tentativas.

2.10.4 Considerações sobre auxotrofia

Construiu-se a linhagem CTR, que é a linhagem parental CEN.PK113-5D, auxotrófica para uracila (AUX), transformada com o plasmídeo vazio Ylp352, que contém o gene *URA3*, de forma que a prototrofia para uracila é reconstituída. Essa linhagem controle ficou, então, com o mesmo *background* genético das demais linhagens construídas, que também foram transformadas a partir da CEN.PK113-5D e transformadas com plasmídeos derivados do Ylp352, com a diferença que as outras linhagens possuem também o gene *CDC48* ou o gene *HSP104* e os promotores.

Optou-se por usar essa linhagem e não apenas a linhagem base auxotrófica CEN.PK113-5D a partir das quais as outras linhagens foram construídas, justamente para

contornar os problemas relacionados a auxotrofias. Pronk (2002) cita um caso da literatura em que a questão da auxotrofia levou a uma interpretação incorreta dos resultados: inicialmente foi reportado que a inativação do gene *ATH1* (codifica a trealase ácida vacuolar) resultava em maior conversão de glicose a biomassa (KIM *et al.*, 1996). Depois, foi demonstrado que a maior conversão ocorria em decorrência da introdução do alelo selvagem *URA3* no mutante nulo *ath1* (CHOPRA; SHARMA. GANESAN, 1999). As proteínas têm múltiplas funções no metabolismo e na regulação. Alterando-se conjuntos de metabólitos, cofatores e efetores, podem ocorrer mudanças na expressão de proteínas, que podem repercutir na rede metabólica. Assim, é importante minimizar a confusão que pode surgir da comparação de dados quantitativos de diferentes *backgrounds* genéticos (PRONK, 2002).

2.10.5 Ensaios de diluição seriada em placa

Inicialmente, foram construídas as seguintes linhagens: CTR, AUX, LV-CH, LV-AH e LV-TH, LV-CC, LV-AC e LV-TC.

Para avaliar a viabilidade celular e a capacidade de crescimento das diferentes linhagens, de forma qualitativa, realizou-se o ensaio de diluição seriada em placa (conforme Item 6.6), cujos resultados encontram-se apresentados na Figura 13.

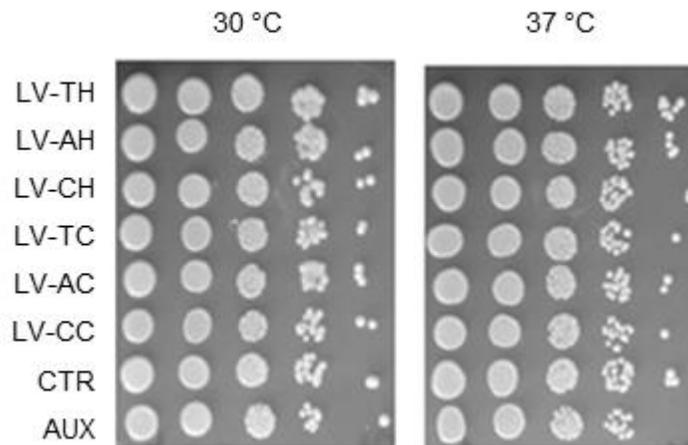


Figura 13. Ensaio de diluição seriada para as linhagens CTR, AUX, LV-CH, LV-AH e LV-TH, LV-CC, LV-AC e LV-TC em placas com meio YPD, incubadas a 30 °C e a 37 °C. Fotos de cada placa foram tiradas depois de 2 dias de incubação.

Todas as linhagens apresentaram crescimento similar em placa com meio YPD, tanto a 30 °C, quanto a 37 °C. Isso mostra que, mesmo após as modificações genéticas, todas as linhagens construídas continuaram viáveis. Ou seja, mesmo sob controle do promotor mais forte empregado até este ponto do trabalho (P_{TEF}), a superexpressão de uma ATPase não levou à morte celular. Qualitativamente, nesse teste em placa, não houve diferença de crescimento entre as linhagens.

Além da temperatura padrão de 30 °C, o ensaio também foi feito a 37 °C para avaliar se o estresse térmico mostraria alguma diferença entre as linhagens (lembrando que Hsp104 é uma *Heat Shock Protein*), o que não aconteceu.

2.10.6 Velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)

Depois do ensaio de diluição seriada, foram feitos cultivos dessas primeiras linhagens construídas (CTR, AUX, LV-CH, LV-AH e LV-TH, LV-CC, LV-AC, LV-TC) em frasco agitado (conforme o Item 2.9.5) a 30 °C em meio definido Verduyn com 5 g/L iniciais de glicose. As curvas do logaritmo neperiano da absorbância em função do tempo para as duplicatas experimentais de cada linhagem estão apresentadas no APÊNDICE A. Na Tabela 4 estão apresentados os valores das velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para essas linhagens. Cálculos de $\mu_{\text{máx}}$ estão explicados no Item 6.5. A Figura 14 apresenta o gráfico de barras com estatística para esses mesmos dados.

Tabela 4. Valores da média e do desvio padrão de $\mu_{\text{máx}}$ para cultivos em frasco agitado das linhagens CTR, AUX, LV-CH, LV-AH, LV-TH, LV-CC, LV-AC e LV-TC. Os cultivos foram realizados em meio Verduyn, a 30 °C com 5 g/L iniciais de glicose em duplicata.

Linhagem	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})
CTR	0,35 \pm 0,00
AUX	0,36 \pm 0,01
LV-CC	0,34 \pm 0,00
LV-AC	0,33 \pm 0,00
LV-TC	0,32 \pm 0,01
LV-CH	0,33 \pm 0,01
LV-AH	0,32 \pm 0,00
LV-TH	0,31 \pm 0,01

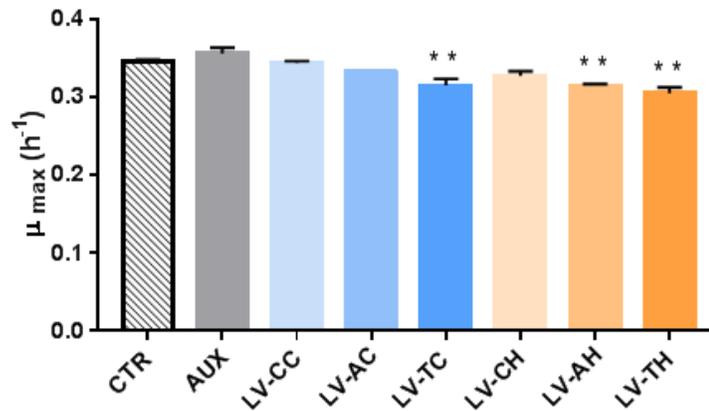


Figura 14. Velocidades específicas máximas de crescimento para as linhagens CTR, AUX, LV-CH, LV-AH, LV-TH, LV-CC, LV-AC e LV-TC. Dois asteriscos (**) indicam valores de $\mu_{\text{máx}}$ estatisticamente diferentes do $\mu_{\text{máx}}$ da linhagem CTR com um nível de significância de 0,01.

Analisando-se a Figura 14, pode-se observar que:

- As linhagens LV-TC, LV-AH e LV-TH foram estatisticamente diferentes de CTR, em termos do valor de $\mu_{\text{máx}}$;
- Para as linhagens superexpressando *CDC48*, a maior redução de $\mu_{\text{máx}}$ em relação ao controle foi de 9%, na linhagem LV-TC;

- Para as linhagens superexpressando *HSP104*, a maior redução de $\mu_{\text{máx}}$ em relação a CTR foi de 12%, na linhagem LV-TH.
- Nesse caso, não houve diferença estatisticamente significativa entre a linhagem prototrófica CTR e a auxotrófica AUX.
- Para ambas as ATPases, com o promotor mais forte P_{TEF} , maior foi o impacto negativo no $\mu_{\text{máx}}$.

Também foi realizado um cultivo com a linhagem prototrófica WT (CEN.PK113-7D), que resultou em $\mu_{\text{máx}}$ de $0,36 \text{ h}^{-1}$. Como para a linhagem prototrófica CTR (CEN.PK113-5D transformada com o plasmídeo vazio) obteve-se $0,35 \text{ h}^{-1}$, esses resultados reforçam que WT e CTR são equivalentes. A partir desse ponto, as demais comparações foram feitas com a linhagem WT. Pronk (2002) apresenta as curvas de crescimento da linhagem prototrófica CEN.PK113-7D e a da congênica CEN.PK113-16B (*leu2-3*) transformada com o vetor multicópias YEplac181 (GIETZ; SUGINO, 1988), que possui o alelo *LEU2* selvagem. As duas linhagens foram cultivadas nas mesmas condições em meio definido, chegando a $\mu_{\text{máx}}$ semelhantes: $0,40 \text{ h}^{-1}$ e $0,39 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Ou seja, quando a linhagem auxotrófica é transformada com o alelo selvagem do gene afetado, ela parece equivaler à linhagem prototrófica em termos de fisiologia. Essa hipótese é bem razoável, já que, de fato, a prototrofia é restaurada.

Della-Bianca e Gombert (2013) realizaram cultivos em frasco agitado com a mesma linhagem WT (prototrófica, *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D), também em meio definido Verduyn, mas com 20 g/L iniciais de glicose e obtiveram $\mu_{\text{máx}}$ de $0,35 \text{ h}^{-1}$. Como foi dito, nessa tese obteve-se para a linhagem WT com 5 g/L iniciais de glicose $\mu_{\text{máx}}$ de $0,36 \text{ h}^{-1}$, resultado que parece ser coerente com a referência mencionada.

2.10.7 Relação entre aumento do rendimento em etanol e a redução de biomassa

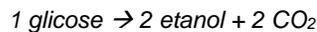
A equação 1 mostra a estequiometria em mmol para a formação de 100 g (ou 1000 mmol) de biomassa de *S. cerevisiae* a partir de glicose em anaerobiose, proposta por Verduyn *et al.* (1990). É importante mencionar que essa equação é válida para uma dada condição fisiológica (composição do meio de cultivo, velocidade específica de

crescimento) e pode mudar, caso a condição fisiológica mude. Verduyn *et al.* (1990) fizeram o estudo para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 em quimiostato anaeróbio limitado por glicose (meio definido, a 30°C, volume de 1 L, agitação de 600 rpm, pH mantido em 5 pela adição automática de KOH, taxa de diluição de 0,1 h⁻¹). No presente trabalho, apesar dos cultivos terem sido feitos em frasco, essa equação será usada para desenvolver um raciocínio teórico, pois o objetivo é fazer apenas uma estimativa de quanto seria necessário observar de redução de biomassa para ter um determinado aumento no fator de conversão de glicose a etanol.



Equação 1

A estequiometria da produção de etanol por fermentação é:



Equação 2

Separando o CO₂ entre uma parcela que vem da fermentação e uma parcela que vem da biossíntese, a equação fica:



Equação 3

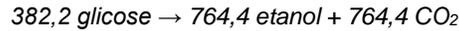
Para fechar o balanço redox de forma a viabilizar as reações de biossíntese, a levedura sintetiza glicerol durante o crescimento anaeróbio (GANCEDO; GANCEDO; SOLSA, 1968). Verduyn *et al.* (1990) demonstraram que são necessários 1274 mmol de glicose para a produção de 100 g de biomassa, conforme a equação abaixo.



Equação 4

Ou seja, para a formação de 100 g de biomassa em condições anaeróbias, são necessários 1274 mmol de glicose. Supondo que com as estratégias de engenharia

metabólica implementadas no presente trabalho houvesse uma redução de 30% de formação de biomassa (o que implicaria em menor consumo de NH_3 e menor formação de glicerol), sobriariam 382,2 mmol de glicose para a fermentação. A equação da fermentação:



Equação 5

Ou seja, para a mesma quantidade de glicose inicial (5394 mmol), haveria um aumento de 764,4 mmol de etanol. Assim, uma redução de 30% da biomassa, possibilitaria um aumento de 9,3% em etanol ($764,4 \div 8240 = 0,093$), resultado em 9,3% de aumento no fator de conversão de glicose em etanol. Com isso, a proporção entre diminuição de biomassa e aumento no fator de conversão de glicose a etanol é de 3,2:1,0. Basso *et al.* (2011), com sua estratégia de aumento de rendimento de etanol baseada na realocação da invertase, como já mencionado, obtiveram experimentalmente 30% de redução no rendimento em biomassa e 11% de aumento no rendimento em etanol, obtendo uma proporção entre diminuição de biomassa e aumento no fator de conversão de glicose a etanol de 2,7:1,0. Pode-se dizer que a proporção calculada acima é bastante próxima da proporção obtida experimentalmente por Basso *et al.* (2011).

É interessante conhecer essa relação, pois só a partir dos dados de biomassa (curva de crescimento e cálculo de massa seca) é possível avaliar se a linhagem pode ser promissora para gerar um aumento no fator de conversão de glicose a etanol. Ou seja, se uma dada linhagem que superexpressa uma ATPase, numa dada condição, não apresentar diminuição no $Y_{X/S}$, muito provavelmente não apresentará aumento no $Y_{E/S}$. Já o inverso não é necessariamente verdadeiro, ou seja, uma linhagem que apresenta diminuição no $Y_{X/S}$ pode, mas não obrigatoriamente vai apresentar aumento no $Y_{E/S}$.

2.10.8 Rendimentos em biomassa, etanol e glicerol

Foram realizados cultivos com retirada de amostras para quantificação de glicose e dos metabólitos extracelulares etanol e glicerol por análises de cromatografia líquida para cálculos de rendimentos (conforme item 6.5).

Uma observação importante a ser feita neste ponto é que, inicialmente, foram coletadas amostras de todos os cultivos, que foram analisadas por cromatografia líquida. Infelizmente, cerca de 8 meses depois das análises, fomos informados de que havia um problema no cromatógrafo e que os dados não eram confiáveis. Assim, as amostras que estavam guardadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram reinjetadas e os resultados mostraram que elas estavam degradadas. Todos os experimentos teriam que ser refeitos para avaliar as concentrações de glicose e metabólitos extracelulares. Como não havia tempo hábil para isso, foram escolhidas apenas algumas linhagens para esses experimentos.

As curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm por tempo, as curvas de concentração de etanol em função da concentração de glicose, as curvas de concentração de glicerol por concentração de glicose e as curvas de concentração de biomassa (massa seca) por concentração de glicose para as duplicatas da linhagem WT e para as duplicatas da linhagem LV-TC estão apresentadas no APÊNDICE B. O $Y_{E/S}$ da linhagem WT foi 0,36 e da linhagem LV-TC foi 0,37. Como se observa, não houve a diferença esperada no fator de conversão de glicose a etanol.

Como outra tentativa, foram realizados cultivos em meio Verduyn com maior concentração inicial de glicose, de forma a se garantir o fenômeno de repressão por glicose (GANCEDO, 1998). Foram utilizados 10 g/L iniciais de glicose em meio Verduyn para cultivos com as linhagens CTR, AUX, LV-TC e WT, todas cultivadas em duplicata. A linhagem LV-AH foi cultivada apenas uma vez. As curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm por tempo e as curvas de concentração de etanol em função da concentração de glicose, glicerol em função de glicose e biomassa em função de glicose para a linhagem CTR, LV-TC, WT, AUX e LV-AH estão no APÊNDICE C.

A Tabela 5 resume os dados de replicatas de parâmetros fisiológicos obtidos para as linhagens CTR, LV-TC, WT, AUX e LV-AH em meio Verduyn com 5 g/L ou 10 g/L.

Tabela 5. Parâmetros fisiológicos obtidos para as linhagens CTR, LV-TC, WT, AUX e LV-AH em cultivo em frasco agitado com meio Verduyn com 5 g/L ou 10 g/L de glicose.

Linhagem	Glicose inicial (g/L)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)		$Y_{X/S}$ (g/g)		$Y_{E/S}$ (g/g)		$Y_{GLY/S}$ (g/g)	
		Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 2
WT	5	0,37		0,16		0,36		0,04	
LV-TC	5	0,36		0,17		0,37		0,04	
WT	10	0,39	0,37	0,11	0,10	0,40	0,41	0,05	0,05
LV-TC	10	0,34	0,35	0,12	0,12	0,40	0,40	0,05	0,04
CTR	10	0,36	0,37	0,11	0,11	0,40	0,40	0,05	0,05
AUX	10	0,37	0,36	0,12	0,11	0,40	0,41	0,05	0,04
LV-AH	10	0,38		0,17		0,38		0,03	

Como pode ser observado pelos dados apresentados na Tabela 5, não se observaram aumentos nos valores de $Y_{E/S}$ em comparação às linhagens WT ou AUX. Em todos os cultivos com 10 g/L de glicose, o valor atingido foi o mesmo, $Y_{E/S}$ de cerca de 0,40 g/g. Basso (2011) cultivou a linhagem AUX em frasco agitado com 100 mL de meio Verduyn porém com 20 g/L de glicose e obteve $Y_{E/S}$ de 0,45 g/g. Della-Bianca (2013) cultivou a linhagem WT no mesmo *setup* experimental de Basso (2011) e obteve $Y_{E/S}$ de cerca de 0,35 g/g. Para os demais parâmetros fisiológicos ($Y_{X/S}$ e $Y_{GLY/S}$) também não se pôde observar diferenças importantes. No caso da linhagem LV-AH, para a qual somente uma replicata de cultivo foi realizada, também não se observou o resultado esperado, que seria um aumento em $Y_{E/S}$ em função da superexpressão de uma ATPase. Para esta linhagem, o $Y_{X/S}$ foi maior e o $Y_{E/S}$ ligeiramente menor, em relação às linhagens de referência.

Comparando os cultivos com diferentes concentrações iniciais de glicose (linhagens WT e LV-TC), pode-se notar que $Y_{X/S}$ foi maior e $Y_{E/S}$ foi menor em cultivos com 5 g/L de glicose do que nos cultivos com 10 g/L. Provavelmente o maior rendimento em biomassa nesses cultivos com menos glicose ocorreu pois houve maior favorecimento de metabolismo réspiro-fermentativo. A respiração resulta em maior rendimento em biomassa do que a fermentação alcoólica, que é acompanhada do

acúmulo de metabólitos, como o etanol, por exemplo (VERDUYN, 1991). Por mais que o sistema experimental utilizado tente se aproximar de uma situação *quasi-anaeróbia*, ainda há entrada de oxigênio. Com 5 g/L de glicose ficou claro que houve menor repressão catabólica por glicose do que com 10 g/L, desfavorecendo o metabolismo fermentativo. Nessas circunstâncias, mais carbono foi desviado para a produção de biomassa e conseqüentemente houve menor formação de etanol, resultando também em uma menor conversão de glicose a etanol.

A partir desse ponto, os demais cultivos foram realizados com no mínimo 10 g/L de glicose, para privilegiar o metabolismo fermentativo, essencial para a estratégia elaborada de aumento de rendimento em etanol, já que é na fermentação que produzir ATP implica em produzir etanol.

2.10.9 Linhagens com maior potencial de expressão de ATPases e mutantes *petites*

Como não houve diferença na fisiologia das linhagens que superexpressam as ATPases Hsp104 ou Cdc48, em relação à linhagem WT, sobretudo em relação a $Y_{E/S}$, decidiu-se construir linhagens com um promotor ainda mais forte P_{GPD} (MUMBERG; MÜLLER; FUNK, 1995), resultando nas linhagens LV-GH e LV-GC, de forma a se obter uma expressão maior do gene codificador da ATPase e, possivelmente, interferir na conservação de energia-livre na levedura, forçando-a a desviar um fluxo maior de carbono para a formação de etanol. Além disso, também foi construída uma linhagem com vetor episomal YEp352 (HILL *et al.*, 1986), no qual foi inserido o gene *CDC48* e o promotor mais forte P_{GPD} , obtendo-se a linhagem LV-EpGC.

Os dados apresentados no presente Item mostram, além da linhagem LV-GH, a variante *petite* da linhagem LV-GH, que foi nomeada de LV-GH [ρ^-], que perdeu a capacidade respiratória. No início, não se sabia que se tratava de variante *petite*. Entretanto, essa linhagem apresentou colônias menores e parâmetros fisiológicos inesperados em relação à linhagem WT: rendimento em etanol igual, porém com menor rendimento em biomassa e maior rendimento em glicerol. Assim, a possibilidade da condição *petite* espontânea ser a responsável pelo acúmulo de glicerol foi investigada

pois esses mutantes são incapazes de metabolizar o glicerol como fonte energética. Perdendo a capacidade respiratória, o glicerol excretado não é consumido, o que leva a um maior fator de conversão de glicose a glicerol.

Para confirmar a condição *petite* da variante da linhagem LV-GH, foram feitos alguns testes genéticos de cruzamento em meio de cultivo sólido. Primeiramente, foi feito um cruzamento da linhagem LV-GH [ρ^-] (*MATa*) com a KI14 [ρ^0] (*MAT α*), que não possui DNA mitocondrial. Em YPD, as duas linhagens haplóides e o diplóide resultante do cruzamento cresceram, porém após replicação em meio não fermentável YPEG (com etanol e glicerol), nada cresceu (dados não mostrados). Ou seja, não houve complementação de DNA mitocondrial no diplóide, mostrando que a LV-GH [ρ^-] não possui o seu DNA mitocondrial íntegro.

Depois, como mostrado na Figura 15, cruzou-se a linhagem W303-1B [ρ^+] (*MAT α*) com a LV-GH [ρ^-] (*MATa*) em meio YPD. Após 2 dias de incubação a 30 °C, a placa foi replicada em meio definido YNB e também incubada por 2 dias. A linhagem W303-1B não cresceu, pois apresenta auxotrofias. A linhagem prototrófica LV-GH [ρ^-] cresceu moderadamente e as células diploides (*MATa/ α*) resultantes do cruzamento cresceram ainda mais, pois as auxotrofias da W303-1B foram complementadas. Então essa placa foi replicada em YPEG e incubada por 2 dias. A linhagem LV-GH [ρ^-] não cresceu e as células diplóides cresceram, mostrando que o cruzamento restabeleceu a capacidade respiratória. Com isso, confirmou-se que se estava trabalhando com uma linhagem *petite*.

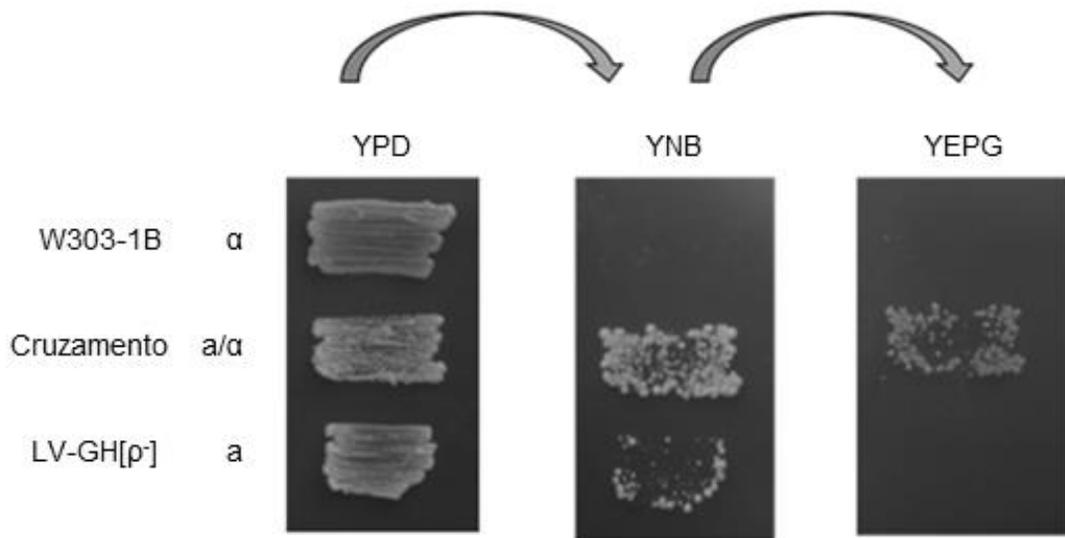


Figura 15. Cruzamento W303-1B ($MAT\alpha$) com a LV-GH [p^+] ($MATa$) em meio sólido YPD. Após 2 dias de incubação a 30 °C, réplica em meio YNB. Após 2 dias de incubação a 30 °C, réplica em meio YPEG.

A Figura 16 apresenta o ensaio de diluição seriada para as linhagens WT, LV-GH [p^+], LV-GC, LV-EpGC e CTR-Ep. Todas as linhagens apresentaram crescimento similar, com exceção da linhagem LV-GH [p^+], que claramente apresentou menor crescimento. Essa deficiência de crescimento é acentuada a 37 °C. Esse resultado está coerente já que é uma variante *petite*, formando colônias menores.

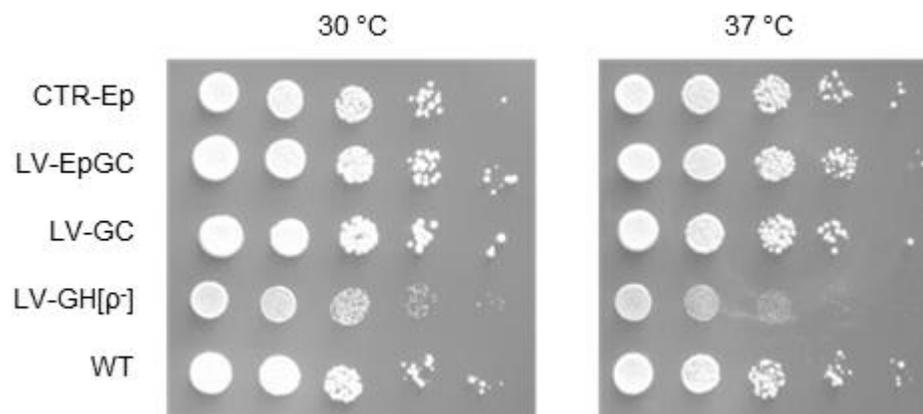


Figura 16. Ensaio de diluição seriada das linhagens WT, LV-GH [p^+], LV-GC, LV-EpGC e CTR-Ep a 30°C e 37°C em meio sólido YPD após dois dias de incubação.

A primeira menção às colônias *petites* foi feita pelo francês P. P. Slominski, denominando-as de *petites* (que em francês significa “pequenas”) pois eram menores que as colônias selvagens. As colônias *petites* apresentam bloqueio na cadeia respiratória aeróbica, muitas vezes uma incapacidade de sintetizar componentes da cadeia de transporte de elétrons, não podendo gerar ATP pela fosforilação oxidativa. As leveduras *petites* não crescem em fontes de carbono não fermentáveis e formam colônias menores anaeróbicas quando cultivadas na presença de fontes de carbono fermentáveis como a glicose. Esse fenótipo *petite* é causado por mutações no genoma mitocondrial, perda de parte ou de todo o DNA mitocondrial ou mutações em genes nucleares envolvidos na respiração (DAY, 2013).

Tanto colônias selvagens quanto colônias *petites* apresentam o mesmo tamanho quando cultivadas em anaerobiose pois ambas utilizam a fermentação para obter energia nesse caso (FOURY, 1989). Williamson; Maioudas e Wilkie (1971) mostraram que o defeito na respiração reduzia substancialmente o rendimento em ATP em mutantes *petites*, reduzindo, portanto, o rendimento em biomassa, já que menos ATP estaria disponível para as reações de biossíntese. Verduyn (1991) mostrou que a eficiência da geração de energia pela mitocôndria tem um forte efeito sobre a geração de biomassa. Rodrigues *et al.* (2001) mostraram que o rendimento em biomassa em anaerobiose equivale a 83% do rendimento em biomassa em aerobiose. Esses dados corroboram com a ideia de que mutantes *petites* (metabolismo exclusivamente fermentativo) tenham menor rendimento em biomassa e formem, portanto, colônias menores que colônias selvagens em aerobiose (metabolismo réspiro-fermentativo).

Foram realizados cultivos em frasco agitado a 30 °C em meio Verduyn com 10 g/L para as linhagens LV-GC, LV-EpGC e LV-GH [p⁻], para análises quantitativas através de cálculos de parâmetros fisiológicos. Por serem experimentos exploratórios para verificar se haveria aumento do fator de conversão de glicose a etanol, não foram feitas duplicatas. Os gráficos de logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm por tempo, concentração de etanol por concentração de glicose, concentração de glicerol por concentração de glicose, concentração de biomassa por concentração de glicose para as linhagens LV-GC, LV-EpGC, LV-GH[p⁻] em meio Verduyn com 10 g/L de glicose estão no APÊNDICE D. Os valores de parâmetros fisiológicos obtidos encontram-se reunidos

na Tabela 6. Foram incluídos os parâmetros da WT em meio Verduyn 10 g/L glicose, que já haviam sido mostrados na Tabela 5, para comparação.

Tabela 6. Parâmetros fisiológicos obtidos para as linhagens WT, LV-GC, LV-EpGC, LV-GH[ρ^-] em cultivo em frasco agitado com meio Verduyn com 10 g/L de glicose.

Linhagem	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})		$Y_{X/S}$ (g/g)		$Y_{E/S}$ (g/g)		$Y_{\text{GLY}/S}$ (g/g)	
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 2
WT	0,39	0,37	0,11	0,10	0,40	0,41	0,05	0,05
LV-GC	0,35		0,15		0,40		0,04	
LV-EpGC	0,35		0,17		0,36		0,03	
LV-GH [ρ^-]	0,21		0,07		0,38		0,11	

Como pode ser observado na Tabela 6, não houve aumento do rendimento em etanol para as linhagens LV-GC e LV-EpGC, em relação à linhagem WT. Inclusive, no caso da linhagem LV-EpGC, observou-se o contrário do almejado: menor rendimento em etanol e maior rendimento em biomassa, em relação à WT, indicando que carbono foi desviado da formação de etanol para a formação de biomassa.

Como já mencionado, a linhagem LV-GH [ρ^-] apresentou grandes diferenças em relação a WT: $Y_{X/S}$ 62% menor, $Y_{\text{GLY}/S}$ 120% maior e $\mu_{\text{máx}}$ 45% menor. Como já discutido, essas diferenças são justificadas pelo fato da linhagem ser *petite*.

Para uma comparação mais coerente, foi feita uma nova transformação e foi escolhido um novo isolado [ρ^+] da linhagem LV-GH. Como curiosidade, gerou-se uma variante *petite* da linhagem WT (nomeada de WT[ρ^-]) pela adição de brometo de etídeo para forçar a perda do DNA mitocondrial para comparar com LV-GH [ρ^-].

Para explorar essas diferenças, foram feitos cultivos em meio complexo YPD com 20 g/L de glicose com as linhagens WT, WT [ρ^-], LV-GH e LV-GH [ρ^-]. Os gráficos de logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm por tempo, concentração de etanol por concentração de glicose, concentração de glicerol por concentração de glicose, concentração de biomassa por concentração de glicose para as linhagens WT, WT[ρ^-], LV-GH e LV-GH[ρ^-] em meio YPD 20 g/L de glicose em triplicata estão no APÊNDICE E. Os parâmetros fisiológicos obtidos encontram-se resumidos na Tabela 7 e na Figura 17.

Tabela 7. Parâmetros fisiológicos para cultivos em frasco agitado com meio YPD com 20 g/L iniciais de glicose para as linhagens WT, WT[ρ-], LV-GH e LV-GH[ρ-].

Linhagem	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)			$Y_{X/S}$ (g/g)			$Y_{E/S}$ (g/g)			$Y_{GLY/S}$ (g/g)		
	Replicata			Replicata			Replicata			Replicata		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
WT	0,41	0,42	0,41	0,12	0,12	0,12	0,44	0,43	0,44			
WT [ρ-]	0,34	0,35	0,36	0,11	0,10	0,09	0,44	0,41	0,43	0,06	0,05	0,06
LV-GH	0,43	0,43	0,42	0,15	0,15	0,15	0,45	0,44	0,42			
LV-GH [ρ-]	0,35	0,36	0,35	0,12	0,11	0,10	0,44	0,44	0,44	0,06	0,06	0,06

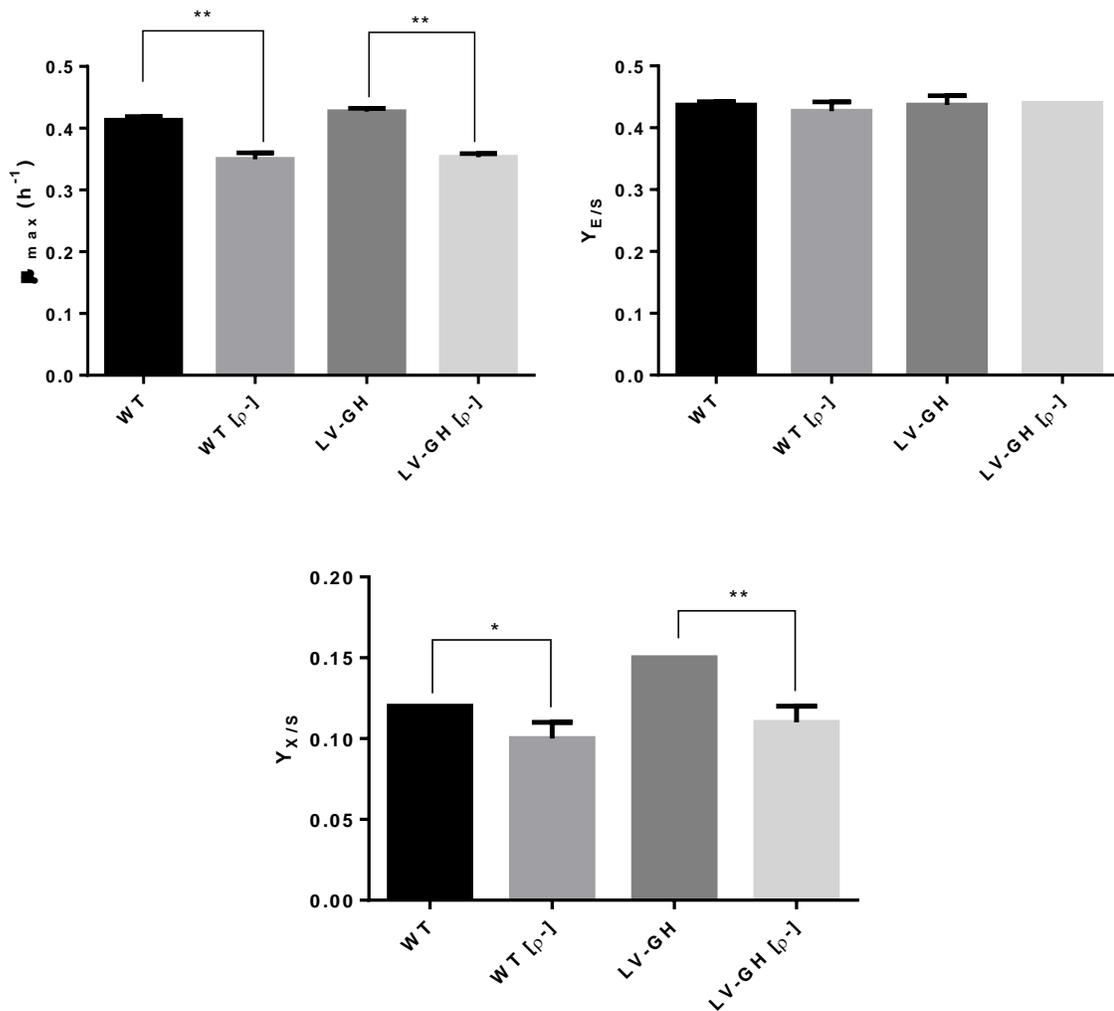


Figura 17. Parâmetros fisiológicos para cultivos em frasco agitado em triplicata com meio YPD com 20 g/L iniciais de glicose para as linhagens WT, WT[p^-], LV-GH e LV-GH[p^-]. Os valores de cada replicata podem ser encontrados na Tabela 7. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes do com um nível de significância de 0,01 e um asterisco (*), com nível de significância de 0,05.

Na Figura 17 foram comparadas as linhagens WT e LV-GH com suas variantes *petites*, as linhagens WT[p^-] e LV-GH[p^-]. Como esperado, as diferenças apareceram justamente por serem ou não *petites* e não pela superexpressão do gene *HSP104*. Há grandes diferenças entre WT e WT[p^-] e entre LV-GH e LV-GH[p^-]. Entretanto, não há muita diferença entre WT e LV-GH e o par *petite* WT[p^-] e LV-GH[p^-].

Assim como mencionado anteriormente, no caso das *petites*, há menor rendimento em biomassa e maior rendimento em glicerol e menores valores de μ_{max} .

Quanto ao rendimento em etanol, a linhagem WT levou a um $Y_{E/S}$ de 0,44 e não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de $Y_{E/S}$ das outras linhagens.

O $\mu_{\text{máx}}$ de WT foi de $0,41 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ e o de WT[ρ^-] foi 15% menor. Não houve diferença estatisticamente significativa entre $\mu_{\text{máx}}$ de WT e LV-GH e também não houve diferença entre os valores de $\mu_{\text{máx}}$ entre WT[ρ^-] e LV-GH[ρ^-]. O $\mu_{\text{máx}}$ de LV-GH [ρ^-] foi 17% menor que LV-GH.

O $Y_{X/S}$ de WT foi de $0,12 \pm 0,00 \text{ g/g}$, sendo que o $Y_{X/S}$ de WT[ρ^-] foi 17% menor. O $Y_{X/S}$ de LV-GH[ρ^-] foi 27% menor que o de LV-GH. Não houve diferença estatisticamente significativa de $\mu_{\text{máx}}$ entre WT[ρ^-] e LV-GH[ρ^-]. Diferentemente dos outros parâmetros, houve diferença significativa de valor $Y_{X/S}$ entre WT e LV-GH, sendo que se obteve um valor maior para LV-GH.

As duas linhagens petite WT[ρ^-] e LV-GH[ρ^-] tiveram $Y_{\text{GLY}/S}$ de cerca de 0,6 g/g. Não foi possível obter $Y_{\text{GLY}/S}$ para WT e LV-GH, pois os pontos de concentração de glicerol por concentração de glicose não se ajustaram à uma reta, como pode ser visto no Apêndice E.

Considerando-se a linhagem WT, obteve-se rendimento em etanol ligeiramente maior quando cultivada em meio YPD 20 g/L de glicose do que em meio Verduyn 10 g/L de glicose. Isso provavelmente se deveu ao fato de mais glicose estar disponível no primeiro caso, favorecendo a repressão catabólica, como já mencionado.

Vale notar que as diferenças de $Y_{X/S}$ entre WT e LV-GH[ρ^-] foram mais acentuadas em meio Verduyn com 10 g/L de glicose do que nesse caso, com meio YPD 20 g/L de glicose. Entretanto, a diferença não deve ter ocorrido pelo fato de os meios serem diferentes, mas sim pelas diferentes concentrações iniciais de glicose empregadas em cada um. Com 10 g/L glicose a repressão catabólica estaria menos favorecida do que com 20 g/L de glicose. Assim, com 10 g/L de glicose, WT apresentaria o diferencial de um metabolismo respiro-fermentativo e a LV-GH[ρ^-] apenas fermentativo. Já com 20 g/L de glicose, os metabolismos das duas linhagens seriam mais semelhantes.

2.11 CONCLUSÕES

- Foi possível construir 11 plasmídeos nesse trabalho: 4 plasmídeos integrativos de superexpressão do gene *HSP104*, utilizando os promotores P_{CYC1} , P_{ADH1} , P_{TEF} e P_{GPD} e 2 plasmídeos com fusão de epítipo HA a *HSP104*; e 5 plasmídeos de superexpressão de *CDC48*, um epissomal com o promotor P_{GPD} e 4 integrativos com os promotores P_{CYC1} , P_{ADH1} , P_{TEF} e P_{GPD} . A confirmação da construção dos plasmídeos foi feita por análise de restrição e eletroforese e também por sequenciamento.
- A linhagem CEN.PK113-5D (linhagem auxotrófica para uracila) foi transformada com cada um desses 11 plasmídeos, culminando em 11 diferentes linhagens. A confirmação da integração dos plasmídeos foi feita por PCR de colônia e pela capacidade de crescer em meio YNB sem uracila. Também foram obtidas linhagens controle com a transformação de plasmídeos (integrativo e epissomal) vazios. Ao total foram obtidas 13 linhagens de *S. cerevisie*.
- O ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD não mostrou diferença visível de crescimento entre as linhagens construídas e as linhagens de referência.
- Nos cultivos em frasco agitado em meio definido Verduyn com 5 g/L iniciais de glicose pôde-se observar que não houve diferença significativa no valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ entre a linhagem prototrófica CTR, auxotrófica AUX e prototrófica WT, contrariando, nessas condições e para esse único parâmetro fisiológico, a ideia de que marcas auxotróficas podem causar grandes diferenças fisiológicas.
- Comparando os cultivos em meio definido Verduyn com diferentes concentrações iniciais de glicose, 5 g/L ou 10 g/L para as linhagens WT e LV-TC pode-se notar que $Y_{X/S}$ foi maior e $Y_{E/S}$ foi menor em cultivos com 5 g/L de glicose do que nos cultivos com 10 g/L. Acreditamos que com 5 g/L de glicose houve menor repressão catabólica por glicose do que com 10 g/L, intensificando o metabolismo réspiro-fermentativo nesta última condição.

- Concluiu-se que havia uma variante *petite*, a linhagem LV-GH[ρ^-], o que foi confirmado por cruzamentos genéticos. Em relação à linhagem WT, a *petite* apresentou rendimento em etanol igual, porém com menor rendimento em biomassa e maior rendimento em glicerol. As linhagens *petite*, que só fermentam, possuem de fato menor rendimento em biomassa. O maior fator de conversão de glicose a glicerol se deve, provavelmente, ao fato de que o glicerol excretado não ser consumido na ausência da respiração.
- A expressão de *HSP104* foi comprovada através de ensaio de *immunoblot*.
- Nenhuma das linhagens construídas apresentou maior fator de conversão de glicose a etanol, em relação às linhagens parentais de referência.

3 FISILOGIA DE LINHAGENS SUPEREXPRESSANDO AS CHAPERONAS HSP104 E CDC48, SUBMETIDAS A FATORES DE ESTRESSE PRESENTES NO PROCESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL

3.1 RESUMO

O ambiente industrial das usinas de produção de etanol é muito distinto de condições controladas de laboratório. Nas usinas, as leveduras passam por várias formas de estresse. Nesta etapa do trabalho visou-se comparar, em termos da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), as linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas com a superexpressão de *HSP104* ou *CDC48*, em situação de estresse térmico, ácido ou osmótico, tipicamente encontrados no processo brasileiro de produção de etanol. O cultivo padrão usado nas comparações foi realizado 30 °C em meio YPD. Para estudar estresse osmótico, adicionou-se 1 M ou 0,5 M de NaCl ao meio YPD. Para estudar estresse ácido, adicionou-se ácido sulfúrico no meio YPD para obter cultivos a pH 3 ou pH 2,5. Para estudar estresse térmico, foram feitos cultivos a 40 °C. Os cultivos foram realizados em placas de 96 poços, em leitor de placas, nomeadamente um espectrofotômetro Synergy H1 (Biotek, USA), com 150 uL de meio em cada poço. As condições que mais afetaram negativamente o crescimento foram NaCl 1 M e pH 2,5. A diferença do perfil de crescimento é mais sutil entre os cultivos na condição padrão (YPD 30 °C) e os cultivos em pH 3,0, mas há uma diferença muito relevante entre pH 3,0 e pH 2,5, indicando que algum fenômeno importante ocorre entre esses valores de pH. A 40 °C, a *S. cerevisiae* LV-EpGC (superexpressão do gene *CDC48* em vetor multicópias e promotor forte P_{GPD}) apresentou $\mu_{\text{máx}}$ 17% maior que a linhagem WT (referência), indicando uma maior tolerância dessa linhagem ao estresse térmico. Em todas as condições de cultivo, as linhagens com promotor fraco P_{CYC1} , LV-CC e LV-CH, apresentaram valores de $\mu_{\text{máx}}$ menores que para WT. Ao contrário do esperado, não se observou valores de $\mu_{\text{máx}}$ maiores para linhagens superexpressando *HSP104* (gene relacionado à tolerância ao estresse térmico), em relação à linhagem referência.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, *HSP104*, *CDC48*, processo industrial de produção de etanol, fatores de estresse.

3.2 INTRODUÇÃO

Nas usinas de produção de etanol, as leveduras passam por várias formas de estresse, dentre eles: térmico, osmótico, etanólico e ácido. Estudar o comportamento de linhagens de *S. cerevisiae* frente a estes fatores de estresse, tanto individualmente, como em conjunto, é interessante por alguns motivos. Primeiro, pode-se com isto entender mais sobre como estes microrganismos reagem a estas situações adversas. Segundo, pode-se também avaliar se determinadas linhagens possuem ou não características que permitiriam seu emprego neste processo industrial (BEATO *et al.*, 2016; DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013).

As linhagens mais bem adaptadas ao processo industrial acabam persistindo durante a safra. Como o processo não é asséptico, as linhagens inicialmente inoculadas, acabam sendo substituídas por linhagens selvagens. Basso *et al.* (2008) demonstraram que, em 70 usinas diferentes, as linhagens inoculadas eram substituídas por leveduras selvagens cerca de 20 a 60 dias após o início do ciclo de células. Segundo Atfield (1997), uma linhagem adequada para o processo deve ser robusta o suficiente frente a esses estresses industriais, sem que isso afete suas características fermentativas.

Nessa segunda etapa do trabalho, estudaram-se as linhagens de superexpressão de *HSP104* e *CDC48* (geradas na primeira etapa, Capítulo 1) frente a estresses típicos da produção brasileira de etanol. *Hsp104* é reconhecida como uma das principais chaperonas que contribuem para a tolerância a vários tipos de estresse em levedura, atuando como uma desagregase, resultando em limpeza de agregados proteicos (GHAEMMAGHAMI *et al.*, 2003). Como *Cdc48* é uma chaperona responsável por desmontar complexos proteicos e está envolvida no processo de degradação proteica (BAEK *et al.*, 2013, também pode ser interessante estudá-la nesse contexto de estresse celular.

Assim, os principais objetivos dessa etapa foram comparar, em termos de velocidade específica máxima de crescimento, as linhagens e os diferentes fatores de estresse e verificar se alguma linhagem de superexpressão de *HSP104* ou *CDC48* é mais tolerante a fatores de estresse, ou seja, se apresenta maior valor de velocidade específica

máxima de crescimento em relação à linhagem selvagem em determinada condição de estresse.

3.3 BREVE HISTÓRICO DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE ETANOL

A cana de açúcar (*Saccharum spp.*) está intimamente ligada à história do Brasil. Ela foi introduzida em nosso país pelos colonizadores portugueses, no início do século XVI. Com o objetivo de produzir açúcar para consumidores da Europa, as primeiras usinas de produção de açúcar de cana foram criadas por volta do ano 1530 no Brasil (AMORIM; LEÃO, 2005). Os portugueses já tinham experiência com a produção de açúcar de cana, pois já o produziam em outras colônias, como na Ilha da Madeira (GALLOWAY, 1989).

O conhecimento do Brasil na produção de etanol a partir da cana também começou a ser desenvolvido no período colonial, com a produção de cachaça. Mas foi a partir do início do século XX que o Brasil começou a usar etanol como combustível (BASSO; ROSA, 2010). Em 1925, a Estação Experimental de Combustíveis e Minérios, atualmente Instituto Nacional de Tecnologia, testou o primeiro automóvel adaptado para usar etanol hidratado como combustível (INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA, 2016)

A produção de etanol combustível em larga escala no Brasil foi impulsionada pela crise do Petróleo dos anos 70, devido ao embargo feito pelos países árabes da Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP) e também pelos baixos preços do açúcar no mercado internacional, na mesma época. Para enfrentar estas crises, em 1975, o país criou o PROALCOOL (Programa Nacional do Alcool), para estimular a produção de etanol combustível em grande escala. Algumas medidas do programa foram: adaptar motores de carro para que funcionassem com etanol, empréstimos a juros baixos para a construção de novas usinas e aumento no preço da gasolina para o etanol se tornar mais competitivo (ANDRIETTA *et al.*, 2007). O PROALCOOL fez com que o Brasil tivesse grande experiência em etanol combustível cerca de 30 anos antes dos outros países.

3.4 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL

Primeiramente, é feita a colheita da cana de açúcar, que pode ser manual ou mecânica. O transporte da cana da plantação para usina é usualmente realizado por caminhão, trator ou reboque. A cana chega com sujeiras, então muitas vezes há uma etapa de lavagem quando a cana chega à usina. Segue-se então o processo de moagem, para extrair o caldo da cana. A moagem geralmente é realizada com facas giratórias, trituradores e moinhos (HUGOT, 1969; MENEZES, 1980). O caldo de cana contém de 8 a 20% de sacarose e 0,3 a 2,5% de glicose mais frutose (OECD, 2011).

Como subproduto da moagem, gera-se o bagaço da cana, que é usado na geração de vapor. O vapor é usado para mover moendas, para aquecimento, na destilação e também para a cogeração de energia elétrica, sendo possível gerar até 120 kWh por tonelada de bagaço. O bagaço é muito importante, pois torna as usinas autossuficientes e até exportadoras de energia elétrica (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

O caldo é tratado para retirar impurezas, como partículas de bagaço, ceras etc. As partículas maiores são separadas por peneiramento. O caldo resultante dessa etapa segue para clarificação, operação que varia de usina para usina, mas pode conter as seguintes etapas: caleação (eliminação de ácidos orgânicos, já que os sais de cal são insolúveis), sulfitação (mais utilizado na produção de açúcar branco, pois elimina corantes), fosfatação (ajuda a precipitar a cal, precipita coloides e elimina corantes). O caldo passa também por aquecimento, que contribui para a redução da carga de microrganismos contaminantes (HUGOT, 1969; MENEZES, 1980).

Depois, há o preparo do mosto, que pode ser feito a partir de caldo de cana, de melaço ou de uma mistura de ambos. O melaço é um subproduto da produção de açúcar. Tradicionalmente, a produção de etanol era acoplada à indústria de açúcar no Brasil, de forma a se utilizar o melaço, gerado como subproduto da produção de açúcar, para a fermentação alcoólica (BASSO; ROSA, 2010). Nesse caso, após a clarificação, o caldo passa por evaporação até que haja cristalização da sacarose. Os cristais de sacarose são separados por centrifugação, gerando uma fase viscosa saturada de sacarose, o melaço, que contém de 45 a 60% (m/m) de sacarose e 5 a 20% (m/m) de frutose e glicose (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Na preparação do mosto de fermentação, o melaço é

diluído com água, para fornecer uma concentração de açúcar de 14 a 18% (MENEZES, 1980).

A partir da década de 80, houve maior demanda por etanol, assim, muitas unidades industriais, as chamadas destilarias autônomas, começaram a ser dedicadas apenas à produção de etanol. Nesse caso, o mosto é proveniente do caldo de cana somente.

Ao longo do tempo, foram feitos investimentos adicionais nesta indústria, que permitiram maior flexibilidade nas usinas, permitindo direcionar sua produção para açúcar e/ou etanol (dependendo das mudanças na demanda do mercado). Atualmente, a maioria das usinas brasileiras utiliza na preparação do mosto uma mistura de caldo e melaço, em diferentes proporções. O caldo isoladamente possui algumas deficiências nutricionais. Por outro lado, o melaço contém muitos nutrientes, mas também possui compostos inibitórios para as leveduras. Assim, considera-se que o melhor substrato para a fermentação é a mistura de ambos (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Depois há a principal etapa, a fermentação, em que as leveduras *S. cerevisiae* convertem açúcares em etanol (a bioquímica da fermentação está descrita no Item 2.3). A fermentação, que é tipicamente conduzida em modo batelada-alimentada (ou processo descontínuo-alimentado), inicia-se a adição de mosto, que contém 18 a 22% (m/m) de açúcares redutores totais, a uma suspensão de levedura previamente transferida para a dorna de fermentação, o biorreator. Esta suspensão (cerca de 30% de células de levedura, em base úmida) preenche 25 a 30% do volume total de fermentação, que é realizada em dornas de 300 a 3.000 m³. Cerca de 75% das usinas brasileiras operam com batelada alimentada, num processo também conhecido como Melle-Boinot. As demais empregam o processo contínuo com dornas em série. Em todos os casos, usa-se o reciclo de células. Para isto, ao fim da fermentação, as células são centrifugadas, submetidas a um tratamento ácido e utilizadas no próximo ciclo de fermentação. Até 90 a 95% das células são recicladas. A principal vantagem do reciclo de células é reduzir a necessidade de propagação de células para gerar o inóculo em cada ciclo fermentativo, diminuindo significativamente a quantidade de açúcares necessários ao crescimento da população de leveduras. Estima-se que a biomassa de levedura aumenta 5 a 10% (em relação à biomassa inicial) durante um ciclo de fermentação, o que é suficiente para

substituir as células de levedura perdidas na centrifugação (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

O tempo de alimentação de mosto na dorna de fermentação normalmente é de 4 a 6 horas e cada ciclo de fermentação dura entre 6 e 10 horas, ou seja, terminada a alimentação, aguarda-se algumas horas para a conclusão da fermentação. Há uma leve agitação na dorna, normalmente provocada pela entrada tangencial do mosto e pela liberação de CO₂, que evita que as células decantem no fundo da dorna. Quando a fermentação acaba, as células são separadas por centrifugação, gerando o “creme” de levedura, com concentração de 60 a 70% (massa úmida de células/volume). O creme de levedura é diluído com água (1:1) e tratado com ácido sulfúrico durante 2 horas, de forma a reduzir a contaminação bacteriana, antes de ser usado como inóculo em um novo ciclo fermentativo (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

O vinho fermentado contém 8 a 12% (v/v) de etanol. Para separar este composto do vinho, é feita a destilação. Nas colunas de destilação, a mistura é aquecida até a ebulição do etanol, que ocorre a uma temperatura menor que a ebulição da água. O etanol é então condensado nas colunas. Assim, obtém-se o álcool hidratado, usado como etanol combustível, com grau alcoólico em torno de 96%. Também é possível obter etanol anidro, em que o etanol é separado da água por destilação fracionada. O etanol anidro possui pelo menos 99,6% de etanol e é comumente adicionado à gasolina. (NOVA CANA, 2016).

3.5 FATORES DE ESTRESSE PARA LEVEDURAS DURANTE A PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL

Abaixo são descritos os principais tipos de estresse:

- **Estresse osmótico** – Os principais causadores de estresse osmótico são os sais presentes em altas concentrações no melaço. Em resposta ao estresse osmótico, as leveduras produzem mais glicerol (ALVES, 2000). Maior produção de glicerol é indesejável, pois isso faz com que o rendimento em etanol seja menor, já que

uma fração dos açúcares presentes no mosto passa a ser usada para formar glicerol e não etanol. Basso; Basso e Rocha (2011) afirmam que o estresse osmótico causado por açúcares pode ser praticamente desconsiderado na operação em batelada alimentada, já que, como a alimentação acontece continuamente durante 4-6 h, a concentração de açúcares na dorna dificilmente ultrapassa 5 a 7% (m/m).

- **Estresse etanólico** – Como já mencionado, a concentração de etanol chega a 8 a 12% (v/v) na dorna de fermentação. O etanol tem um efeito nocivo sobre a membrana plasmática das células de levedura, alterando sua composição e sua permeabilidade a alguns íons, especialmente H^+ , podendo levar à diminuição do pH intracelular. Isto pode levar à inibição do crescimento e inativação enzimática, diminuindo a viabilidade celular (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).
- **Estresse ácido** – Na etapa de reciclo de células, o creme de levedura passa por um tratamento com ácido sulfúrico por cerca de 2 horas, visando reduzir a contaminação bacteriana. Nesse tratamento, o pH atinge valores entre 1,8 e 2,5. Nesses valores de pH, a fisiologia das leveduras sofre distúrbios. Ocorre perda de alguns elementos (N, P, K, Mg), pois ocorre translocação de íons pela membrana plasmática. Também ocorre uma diminuição nos níveis de trealose, em paralelo com uma diminuição da viabilidade celular (FERREIRA; AMORIM; BASSO, 1999). Além do ácido sulfúrico na etapa de reciclo, há outros elementos que abaixam o pH no ambiente das usinas, como ácidos orgânicos fracos presentes no substrato ou produzidos pelas bactérias contaminantes, e também o sulfito usado na etapa de clarificação do caldo de cana (ALVES, 2000; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).
- **Estresse térmico** – Com o processo de reciclo de células, a carga de leveduras nas dornas é alta, o que faz com que cada ciclo de fermentação seja curto (6 a 10 horas no processo brasileiro, comparado a 40 a 50 horas nos ciclos fermentativos com milho nos EUA, em que não há reciclo). Normalmente, a

temperatura de fermentação é mantida de 32 a 35 °C (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Mas, como cada ciclo é curto, muitas vezes o sistema de refrigeração não é capaz de retirar todo o calor necessário, fazendo com que a temperatura chegue até 40 °C, principalmente no verão brasileiro (AMORIM; BASSO; LOPES, 2004).

É importante mencionar que ao longo das últimas décadas, estudos de dinâmica populacional de leveduras nas dornas de fermentação industrial levaram à seleção de algumas linhagens bem adaptadas ao processo industrial (como por exemplo PE-2 e CAT-1) e que causam menos problemas operacionais, como formação de espuma ou floculação (BASSO *et al.*, 2008).

3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.6.1 Cultivos em placas de micropoços

Para fazer uma caracterização das linhagens superexpressando as chaperonas Hsp104 ou Cdc48 e as linhagens controle, sob estresse, foram escolhidos 3 fatores de estresse clássicos no estudo de leveduras e também relevantes no contexto da produção brasileira de etanol combustível: estresse osmótico, térmico e ácido. O cultivo padrão usado nas comparações foi realizado a 30 °C em meio YPD (pH inicial em torno de 6,0). Para estudar estresse osmótico, adicionou-se 1 M ou 0,5 M de NaCl ao meio YPD. Para estudar estresse ácido, adicionou-se ácido sulfúrico no meio YPD para obter cultivos com pH 3 ou pH 2,5. Para estudar estresse térmico, foram feitos cultivos a 40 °C. Essas condições não são uma representação exata dos estresses do processo industrial de produção de etanol. Nas usinas, há uma combinação de vários tipos de estresse que ocorrem simultaneamente. Porém, para obter resultados mais claros sobre o efeito de cada estresse, eles foram estudados individualmente, conforme sugerido por Ivorra; Pérez-Ortín e Del Olmo (1999) e também reportado por Della-Bianca e Gombert (2013).

Os cultivos foram realizados em meio líquido em placa de 96 micropoços, com medidas de absorbância a 600 nm a cada 15 min, conforme o Item 6.7. A

Tabela 8 apresenta um resumo dos cultivos realizados, com a quantidade de replicatas feitas para cada linhagem, em cada condição. Ao todo foram feitas 161 curvas de crescimento.

Tabela 8. Resumo dos experimentos com diferentes linhagens de *S. cerevisiae* em placas de micropoços, com número de replicatas por condição de cultivo.

Linhagem*	Condição de cultivo					
	30 °C	pH 3,0	pH 2,5	NaCl 0,5 M	NaCl 1,0 M	40°C
WT	2	2	2	2	2	3
CTR	2	2	2	2	2	3
AUX	2	2	2	2	2	3
CTR-Ep	2	2	2	2	2	3
LV-CC	2	2	2	2	2	3
LV-AC	2	2	2	2	2	3
LV-TC	2	2	2	2	2	3
LV-GC	2	2	2	2	2	3
LV-EpGC	3	3	3	3	3	3
LV-CH	2	2	2	2	2	3
LV-AH	2	2	2	2	2	3
LV-TH	2	2	2	2	2	3

*para esclarecimento sobre as linhagens, ver Tabela 3.

Na Figura 18, observam-se as curvas de crescimento para todas as linhagens, em cada condição de cultivo. A intenção desta Figura é apenas mostrar a tendência do perfil, em cada condição, sem discriminação individual das linhagens. Comparações detalhadas entre linhagens em cada condição de estresse estão discutidas mais adiante. Entretanto, é interessante primeiramente visualizar esses perfis de crescimento, para uma interpretação qualitativa. É possível fazer algumas observações:

- As condições que mais afetam negativamente o crescimento são, sem dúvida, NaCl 1 M e pH 2,5, dentre as condições investigadas neste estudo;

- A diferença do perfil de crescimento é mais sutil entre os cultivos na condição padrão (YPD 30 °C) e os cultivos em pH 3,0, mas há uma diferença muito relevante entre pH 3,0 e pH 2,5.

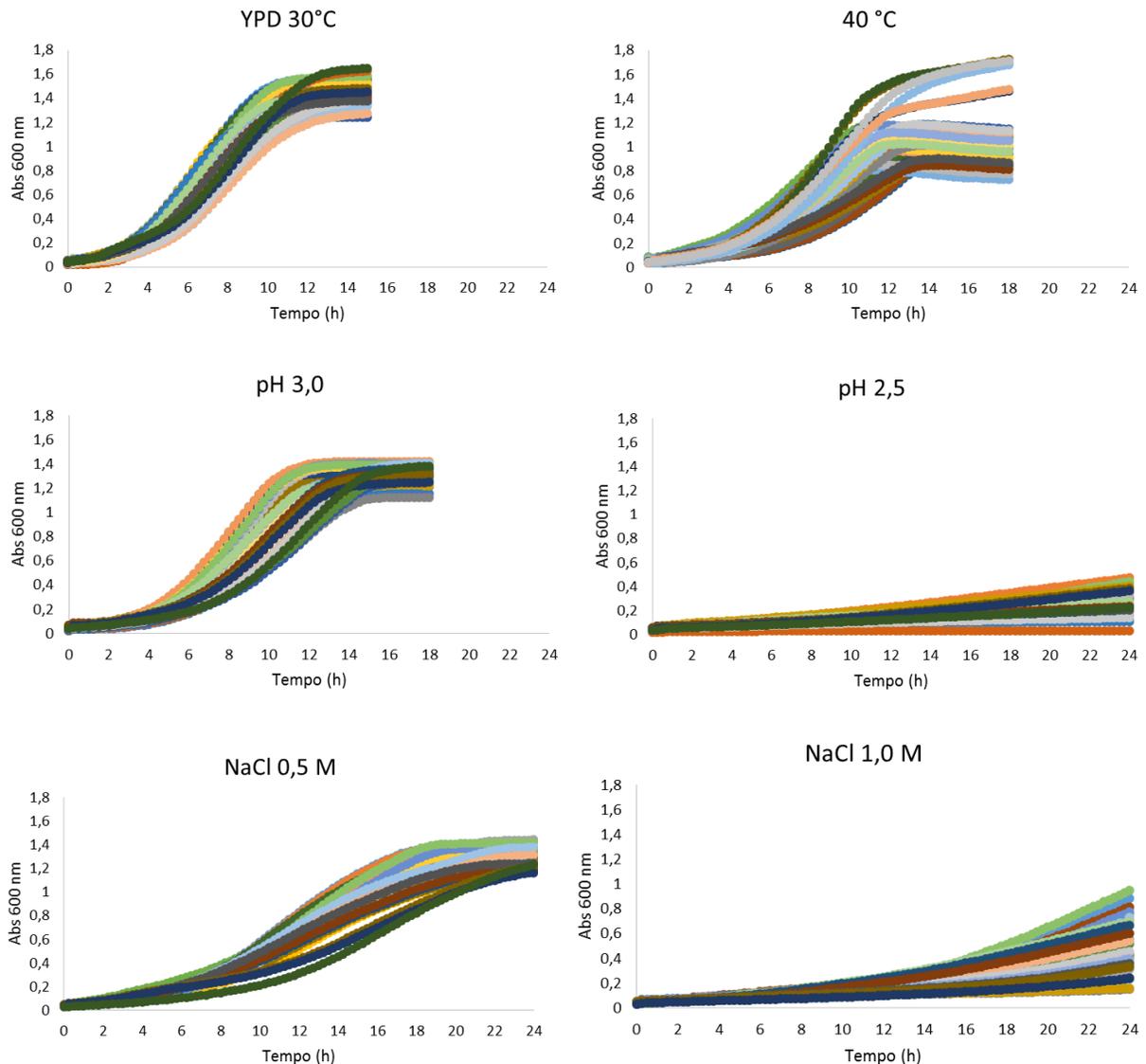


Figura 18. Curvas de crescimento (absorbância a 600 nm em função do tempo) em cada condição de estresse.

Para uma análise quantitativa, foram calculadas as velocidades específicas máximas de crescimento de cada linhagem, em cada condição de cultivo. Em pH 2,5, houve apenas um discreto crescimento celular e não foi possível calcular $\mu_{\text{máx}}$, pois não houve fase exponencial de crescimento.

Na Figura 19, estão apresentados os dados de $\mu_{\text{máx}}$ apenas da linhagem WT, para cada condição de cultivo.

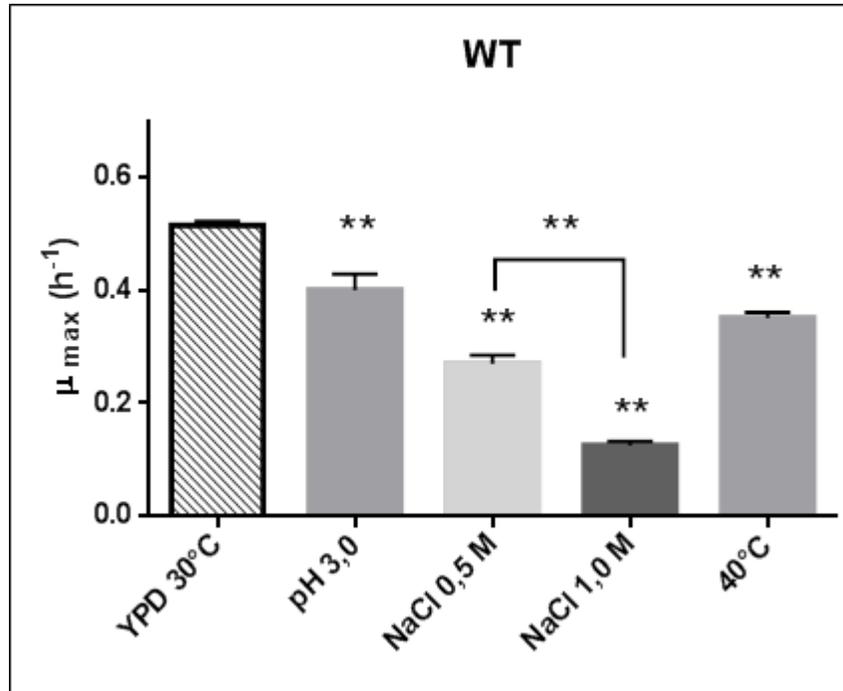


Figura 19. Velocidades específicas máximas de crescimento para a linhagem WT na condição padrão (YPD 30°C, barra hachurada) e nas condições de estresse. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01. Asteriscos nas linhas conectando as barras indicam diferenças entre essas barras. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação à condição padrão.

Na condição padrão (YPD 30°C) o $\mu_{\text{máx}}$ da linhagem WT foi de $0,52 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. Albers e Larsson (2009) também realizaram cultivos em placa de 96 micropoços em meio YPD e obtiveram $\mu_{\text{máx}}$ de $0,50 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ para essa linhagem, mostrando que o dado obtido nessa tese está compatível. A diferença é que Albers e Larsson (2009) usaram 350 μL de meio em cada poço e nessa tese foram usados 150 μL .

Nas condições de estresse, houve redução estatisticamente significativa de $\mu_{\text{máx}}$. Em pH 3,0, o $\mu_{\text{máx}}$ foi 22 % menor. Como já mencionado, em pH 2,5 as células nem chegaram a atingir uma fase exponencial de crescimento. Bianca e Gombert (2013) realizaram cultivos em meio YPD sólido para avaliar estresse por ácido sulfúrico com a linhagem WT. Estes autores prepararam placas com pH 4,0 e 3,0, nas quais observou-

se diminuição no tamanho das colônias, mas não no número de colônias. Em placas com pH 2,0 e pH 2,5, nenhum crescimento foi observado, mesmo após 144 horas. Analisando-se conjuntamente os dados de Della-Bianca e Gombert (2013) e os dados desta tese, parece haver um valor entre pH 3,0 e pH 2,5, em que algum fenômeno importante ocorre, causando grande impacto negativo no crescimento celular. Albers e Larsson (2009) cultivaram a linhagem WT em placa de micropoços em YPD em pH 7,0, pH 6,0, pH 5,0, pH 4,0 e pH 3,0. Albers e Larsson (2009) mencionam que não houve nenhuma diferença nos valores de $\mu_{\text{máx}}$ para pH 7,0, pH 6,0, pH 5,0, pH 4,0 e que para pH 3,0, há uma redução, porém sutil, de $\mu_{\text{máx}}$.

Em NaCl 0,5 M, o $\mu_{\text{máx}}$ $0,27 \pm 0,01$, que é 48 % menor que na condição padrão. Em NaCl 1 M $\mu_{\text{máx}}$ foi 76 % menor que na condição padrão. O valor de $\mu_{\text{máx}}$ para WT com NaCl 1 M foi muito baixo, $0,13 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. Albers e Larsson (2009) também realizaram cultivos em placa de 96 micropoços com YPD e 60 g/L de NaCl (cerca de 1 M) e obtiveram valores de $\mu_{\text{máx}}$ inferiores a $0,1 \text{ h}^{-1}$, estando compatível com o obtido nessa tese. Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ em NaCl 0,5 M e NaCl 1,0 M também foram estatisticamente diferentes entre si: em NaCl 1,0 M o $\mu_{\text{máx}}$ foi 54% menor que em NaCl 0,5 M. Conforme explicado por Daran-Lapujade *et al.* (2009), a linhagem CEN.PK113-7D (denominada de linhagem WT nessa tese) tem uma hipersensibilidade a íons de sódio. Enquanto a linhagem de laboratório S288c possui 5 genes *ENA*, que codificam Na^+ -ATPase, as linhagens CEN.PK contém um único e atípico gene, o *ENA6*, levando a uma hipersensibilidade a íons Na^+ . Della-Bianca e Gombert (2013) realizaram cultivos em meio YPD sólido para avaliar estresse por NaCl com a linhagem WT. Em placa com NaCl 0,5 M, a linhagem WT cresceu menos do que na condição padrão sem o sal. Em placas com NaCl 1 M, NaCl 1,5 M e NaCl 2,0 M não houve nenhum crescimento após 48 horas. Diferentemente do resultado obtido por Della-Bianca e Gombert (2013) que não observou nenhum crescimento em NaCl 1M, nesta tese houve crescimento (mesmo que bem reduzido). Talvez essa diferença tenha surgido pois Della-Bianca e Gombert (2013) realizou cultivo em meio sólido e nessa tese em meio líquido.

A 40°C , o $\mu_{\text{máx}}$ da linhagem WT foi $0,35 \pm 0,01$, que é 32 % menor que na condição padrão a 30°C . Della-Bianca e Gombert (2013) realizaram cultivos com esta linhagem com meio Verduyn em frasco agitado e a 37°C . Estes autores observaram

diminuição de $\mu_{\text{máx}}$ nessa condição de estresse térmico, em relação à condição de 30 °C. Della-Bianca e Gombert (2013) também verificaram que o fator de conversão de substrato a biomassa é menor a 37°C do que a 30°C, o que pode ser explicado pelo fato de que o crescimento celular se torna mais dispendioso, já que mais carbono é necessário para neutralizar os efeitos do estresse (MENSONIDES *et al.*, 2002).

Na Figura 20, estão apresentados os dados das médias de $\mu_{\text{máx}}$ de todas as linhagens, para cada condição de cultivo. É possível notar que o comportamento dos valores de $\mu_{\text{máx}}$ nesta figura é muito parecido ao comportamento dos valores de $\mu_{\text{máx}}$ observados para a linhagem WT (conforme Figura 19). Além disso, em todas as condições de estresse houve redução estatisticamente significativa de $\mu_{\text{máx}}$. Na condição padrão (YPD e 30°C), o $\mu_{\text{máx}}$ médio de todas as linhagens foi de $0,47 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$. Em pH 3,0, o $\mu_{\text{máx}}$ foi 24 % menor, em NaCl 0,5 M foi 46 % menor, em NaCl 1 M foi 77 % menor e a 40°C foi 31 % menor, em relação ao valor médio na condição padrão. Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ em NaCl 0,5 M e NaCl 1,0 M também foram estatisticamente diferentes: em NaCl 1,0 M o $\mu_{\text{máx}}$ foi 57 % menor que em NaCl 0,5 M.

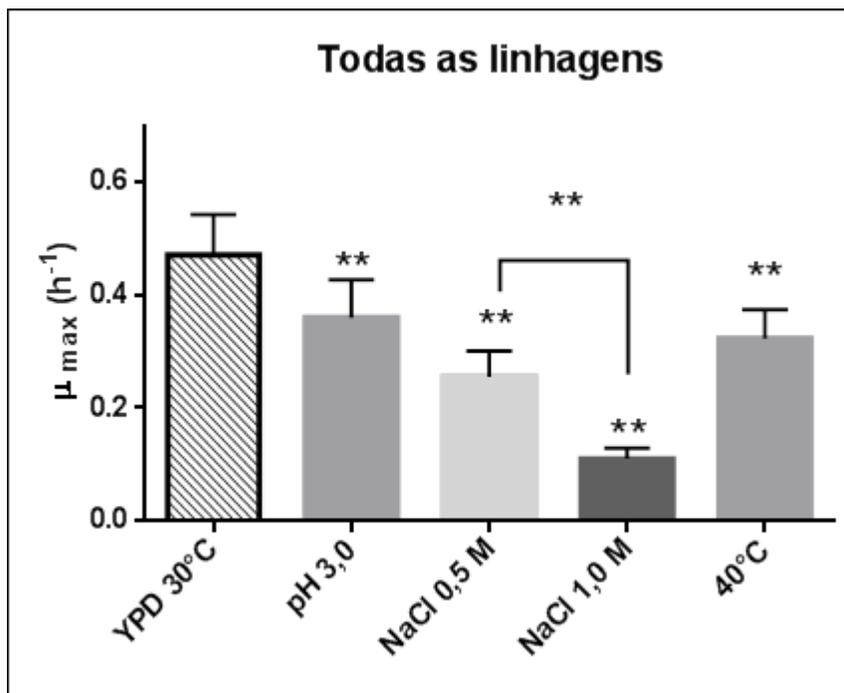


Figura 20. Velocidades específicas máximas de crescimento para a médias de todas as linhagens na condição padrão (YPD 30°C, barra hachurada) e nas condições de estresse. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01. Asteriscos nas linhas conectando as barras indicam diferenças entre essas mesmas barras. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação à condição padrão.

Na Figura 21, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ de todas as linhagens, quando cultivadas na condição padrão (meio YPD a 30°), são apresentados. Como já mencionado, a linhagem WT teve $\mu_{\text{máx}}$ de $0,52 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. As linhagens que tiveram $\mu_{\text{máx}}$ estatisticamente diferentes da linhagem WT foram: AUX, LV-CH e LV-CC. A linhagem AUX (auxotrófica para uracila) apresentou $\mu_{\text{máx}}$ 18 % menor. Ao contrário do que foi observado no Capítulo 2, em que não houve diferença de $\mu_{\text{máx}}$ entre as linhagens WT e AUX em cultivo em frasco agitado em meio Verduyn, nos cultivos realizados em placa de micropoços em meio YPD realizados neste Capítulo 3, houve diferença de $\mu_{\text{máx}}$ entre essas linhagens. Tratam-se de meios de cultivo e sistemas experimentais distintos, mas essa diferença entre as linhagens pode ter ocorrido porque no caso dos cultivos em meio mineral Verduyn, houve suplementação de uracila (150 mg/L), o que não ocorreu em meio complexo YPD.

Em relação a WT, a linhagem LV-CH apresentou $\mu_{\text{máx}}$ 22 % menor e a linhagem LV-CC apresentou $\mu_{\text{máx}}$ 41 % menor. Parece *HSP104* e *CDC48* não afetam esse parâmetro fisiológico da levedura quando expressos sob o comando dos promotores mais fortes. Porém, com o promotor mais fraco utilizado, P_{CYC1} , houve diferença em relação a WT.

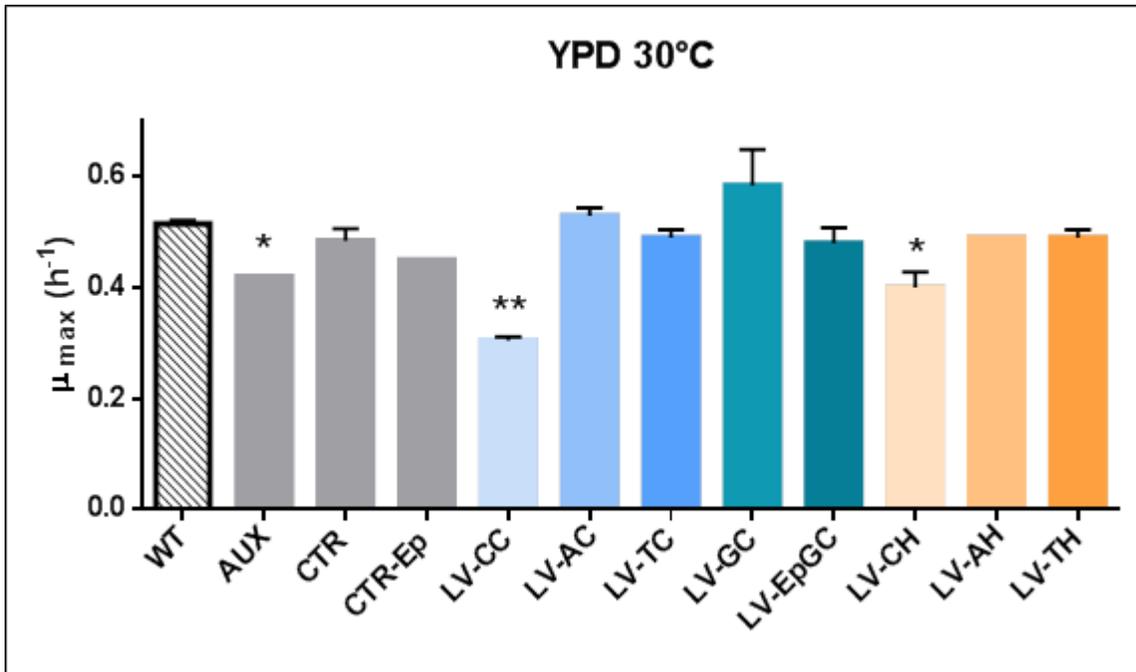


Figura 21. Velocidades específicas máximas de crescimento para cada linhagem na condição padrão (YPD 30°C). Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01 e um asterisco (*), com nível de significância de 0,05. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. As cores azul e laranja indicam linhagens com superexpressão de *CDC48* e *HSP104*, respectivamente. Quanto mais escura a tonalidade do azul ou do laranja, maior é a força do promotor utilizado.

Na Figura 22, são apresentados os valores de $\mu_{\text{máx}}$ para todas as linhagens, quando cultivadas em pH 3,0. A linhagem WT apresentou $\mu_{\text{máx}}$ de $0,40 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$. Assim como ocorreu na condição padrão, as linhagens AUX, LV-CH e LV-CC apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ estatisticamente menores que WT. Para AUX o $\mu_{\text{máx}}$ foi 28 %, para LV-CH 29% e para LV-CC 38 % menor que WT.

Além disso, as duas linhagens com plasmídeo multicópias apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ estatisticamente menores que WT. Provavelmente isso se deve ao fato desses múltiplos plasmídeos poderem representar um fardo metabólico para as células nessa condição de estresse. Para a linhagem CTR-Ep (linhagem controle com plasmídeo multicópias vazio), o $\mu_{\text{máx}}$ foi 28 % menor que WT e para a linhagem LV-EpGC, o $\mu_{\text{máx}}$ foi 16 % menor que WT. Não houve diferença estatisticamente significativa entre essas duas linhagens.

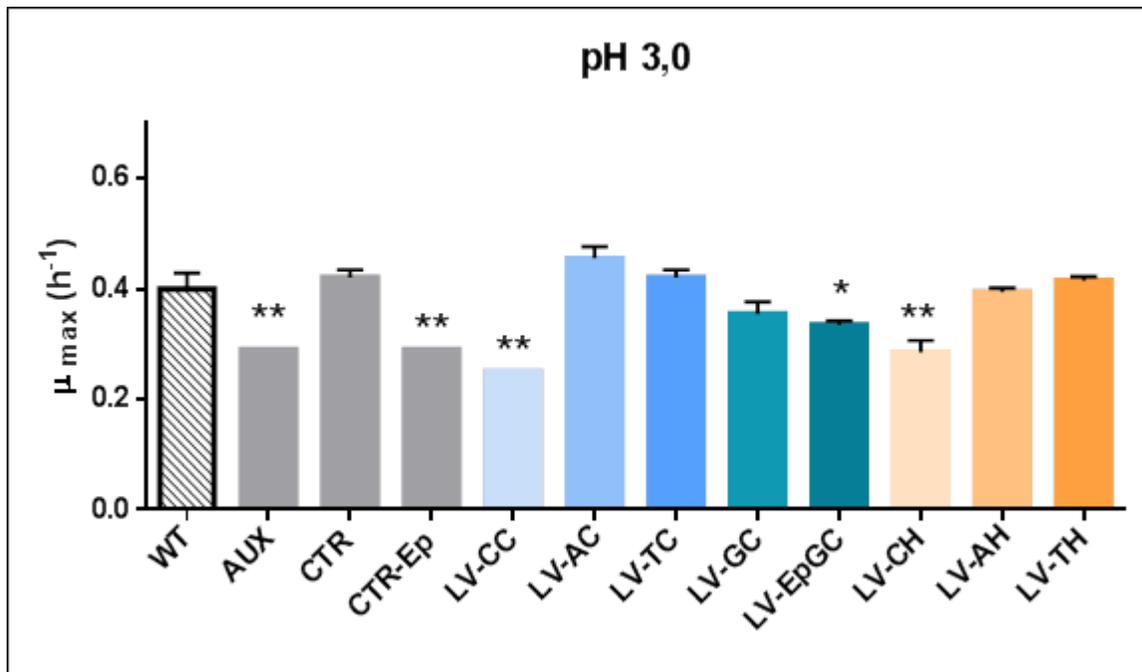


Figura 22. Velocidades específicas máximas de crescimento para cada linhagem em pH 3,0. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01 e um asterisco (*), com nível de significância de 0,05. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. As cores azul e laranja indicam linhagens com superexpressão de *CDC48* e *HSP104*, respectivamente. Quanto mais escura a tonalidade do azul ou do laranja, maior é a força do promotor utilizado.

Na Figura 23, todas as linhagens foram cultivadas em NaCl 0,5 M. A linhagem WT teve μ_{max} de $0,27 \pm 0,01 h^{-1}$. A linhagem LV-CC foi a única que apresentou μ_{max} estatisticamente diferente da linhagem WT: μ_{max} de AUX foi 56 % menor que de WT.

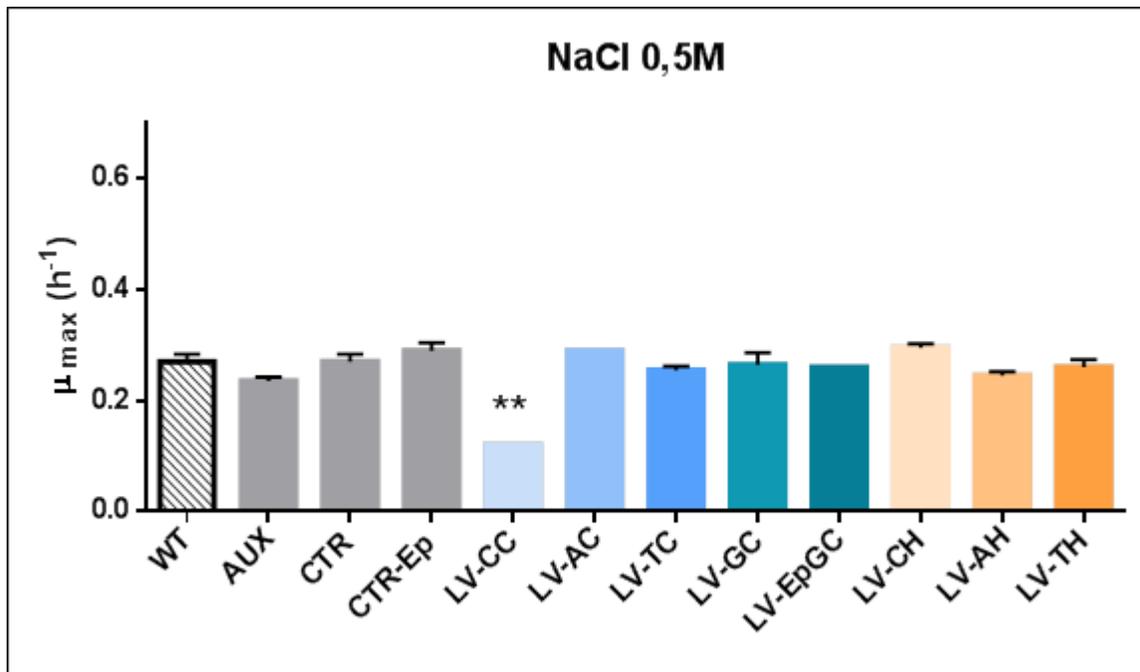


Figura 23. Velocidades específicas máximas de crescimento para cada linhagem em NaCl 0,5 M. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,1. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. As cores azul e laranja indicam linhagens com superexpressão de *CDC48* e *HSP104*, respectivamente. Quanto mais escura a tonalidade do azul ou do laranja, maior é a força do promotor utilizado.

Na Figura 24, todas as linhagens foram cultivadas em NaCl 1,0 M. A linhagem WT apresentou $\mu_{\text{máx}}$ de $0,13 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. LV-CH apresentou $\mu_{\text{máx}}$ de $0,08 \pm 0,00$ e LV-CC apresentou $\mu_{\text{máx}}$ de $0,09 \pm 0,00$, ambos foram estatisticamente menores que WT. Nesse caso, também houve redução estatisticamente significativa de $\mu_{\text{máx}}$ para as duas linhagens com maior expressão teórica de *CDC48*: LV-GC e LV-EpGC, que apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ de $0,08 \pm 0,00$ e $0,09 \pm 0,01$, respectivamente. Importante mencionar que mesmo no caso do plasmídeo multicópias, essa redução se deve ao *CDC48* e não ao vetor em si. A CTR-Ep, linhagem controle com vetor multicópias vazio, apresentou $\mu_{\text{máx}}$ estatisticamente igual a WT e $\mu_{\text{máx}}$ estatisticamente diferente de LV-EpGC.

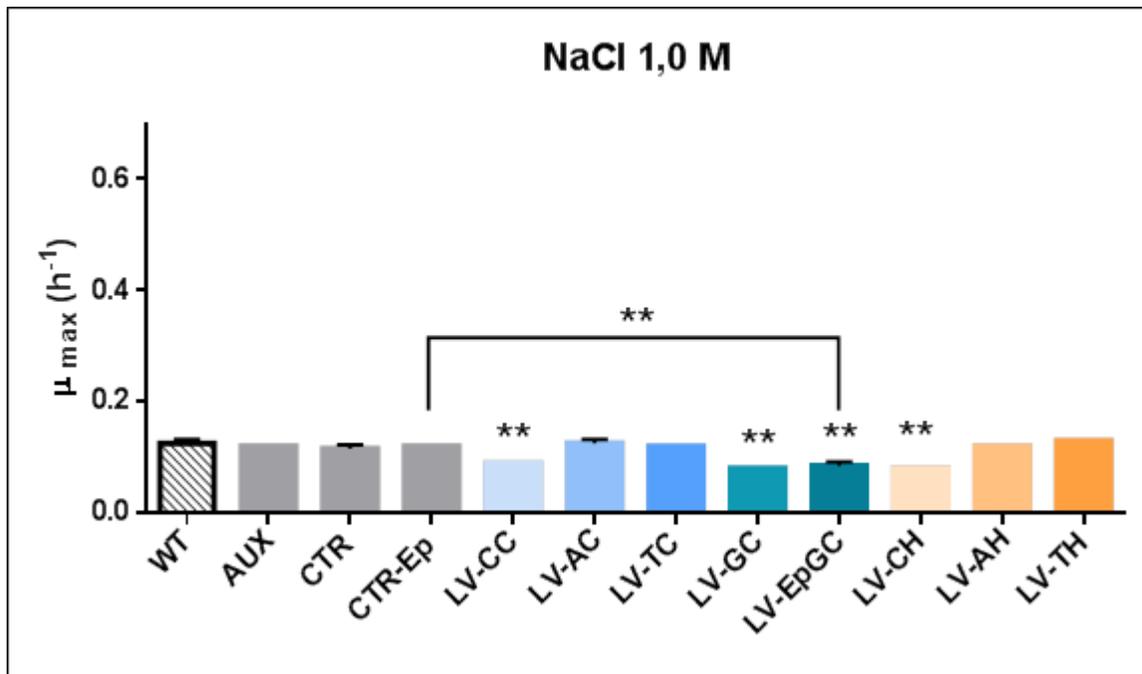


Figura 24. Velocidades específicas máximas de crescimento para cada linhagem em NaCl 1,0 M. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. As cores azul e laranja indicam linhagens com superexpressão de *CDC48* e *HSP104*, respectivamente. Quanto mais escura a tonalidade do azul ou do laranja, maior é a força do promotor utilizado.

Na Figura 25, as linhagens foram cultivadas a 40 °C.

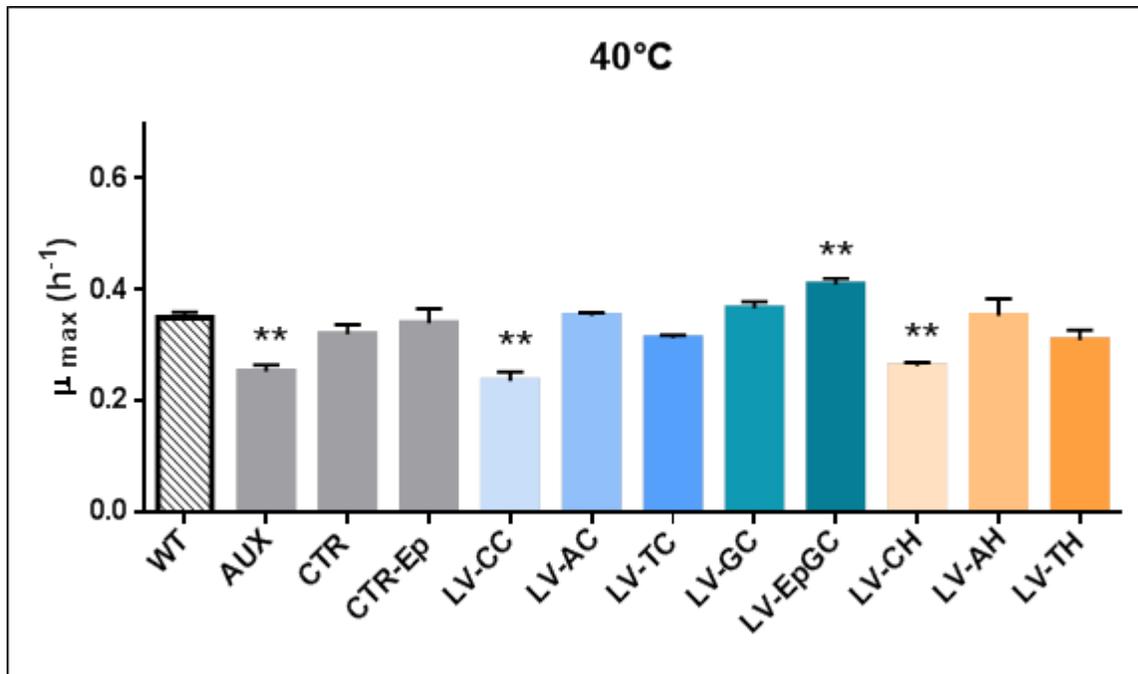


Figura 25. Velocidades específicas máximas de crescimento para cada linhagem a 40°C. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes, com um nível de significância de 0,01. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. As cores azul e laranja indicam linhagens com superexpressão de *CDC48* e *HSP104*, respectivamente. Quanto mais escura a tonalidade do azul ou do laranja, maior é a força do promotor utilizado.

Assim como aconteceu a 30°C, as linhagens AUX, LV-CH e LV-CC tiveram $\mu_{\text{máx}}$ estatisticamente menores que a linhagem WT. LV-CH apresentou $\mu_{\text{máx}}$ de $0,26 \pm 0,01$, 25 % menor que WT (similar a redução de 22% a 30 °C). LV-CC apresentou $\mu_{\text{máx}}$ de $0,24 \pm 0,02$, 32 % menor que WT (menor do que a redução de 41 % observada a 30°C). Quanto à linhagem AUX, enquanto a 30°C a redução de $\mu_{\text{máx}}$ foi de 18 % em relação a WT, a 40°C foi maior, de 28%. O estresse térmico ressalta ainda mais a diferença fisiológica entre a linhagem prototrófica e a auxotrófica. Uma hipótese é que a captação de uracila do meio fique prejudicada a 40 °C.

O resultado mais promissor foi obtido para LV-EpGC, que apresentou ter apresentado $\mu_{\text{máx}}$ 17 % maior que a linhagem WT e também 17 % maior que o controle CTR-Ep. Aparentemente, essa maior expressão de *CDC48* em plasmídeo episossomal e com promotor forte P_{GPD} , é benéfica sob essa condição de estresse térmico, tornando

essa linhagem mais resistente à temperatura de 40°C. Uma possível explicação para o efeito positivo de *CDC48* frente ao estresse térmico foi encontrada na literatura: Hsieh e Chen (2011) mostraram que Cdc48 é importante na progressão da G1 (da intérfase) durante o estresse térmico através da manutenção da integridade de parede celular em *S. cerevisiae*. Hsieh e Chen (2011) mencionam que embora Cdc48 tenha sido originalmente associada ao ciclo celular de *S. cerevisiae*, suas funções do ciclo celular não foram bem compreendidas. Eles descobriram que o mutante sensível a temperatura *cdc48-3* fica atrasado na progressão da G1 a 38,5 °C e que Cdc48 é importante para a manutenção da integridade da parede celular para que haja crescimento celular e divisão normais.

Já as linhagens com superexpressão de *HSP104*, que codifica uma *Heat Shock Protein* e sabidamente contribui para manutenção da linhagem frente a estresse térmico, não apresentou $\mu_{\text{máx}}$ maiores.

Em todos as condições de cultivo, as linhagens LV-CC e LV-CH apresentaram valores de $\mu_{\text{máx}}$ menores que para WT. Como o P_{CYC1} é promotor mais fraco utilizado, não se sabe explicar porque acontecem reduções de $\mu_{\text{máx}}$ quando *CDC48* e *HSP104* estão expressos sob o controle do promotor fraco P_{CYC1} , mas não de P_{ADH1} e P_{TEF} , promotores mais fortes.

3.6.2 Cultivos em frasco agitado

Como a 40°C apareceram diferenças interessantes entre os valores de $\mu_{\text{máx}}$ das diferentes linhagens, foram escolhidas algumas linhagens para a realização de cultivos em frasco agitado (mesmo sistema experimental do item 2.9.5), com meio YPD líquido 20 g/L iniciais de glicose a 40°C, em duplicata.

No APÊNDICE F são apresentadas as curvas de logaritmo neperiano de absorbância a 600 nm por tempo, concentração de etanol por concentração de glicose, concentração de glicerol por concentração de glicose e concentração de biomassa por concentração de glicose, para as linhagens LV-CC, LV-TH e WT. A Tabela 9 mostra um resumo dos dados obtidos. Também foram realizados cultivos com a linhagem AUX, mas

as replicatas ficaram muito diferentes (dados não mostrados). Uma possível explicação pode ser que em condições subletais (como 40 °C), mesmo células geneticamente idênticas podem exibir heterogeneidade fenotípica (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013; SUMNER; AVERY, 2002).

Tabela 9. Parâmetros fisiológicos obtidos para as linhagens WT, LV-TH e LV-CC em cultivo em frasco agitado em meio YPD a 40°C.

Linhagem	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)		$Y_{X/S}$ (g/g)		$Y_{E/S}$ (g/g)		$Y_{GLY/S}$ (g/g)	
	replicata 1	replicata 2	replicata 1	replicata 2	replicata 1	replicata 2	replicata 1	replicata 2
WT	0,51	0,49	0,12	0,13	0,43	0,44	0,05	0,05
LV-TH	0,47	0,45	0,12	0,10	0,44	0,42	0,04	0,04
LV-CC	0,32	0,29	0,11	0,10	0,40	0,41	0,06	0,06

Na Figura 26 são apresentados os dados de $\mu_{\text{máx}}$ para as linhagens cultivadas em frascos agitado a 40°C, em meio YPD. A linhagem WT apresentou $\mu_{\text{máx}}$ de $0,50 \pm 0,01$ h⁻¹. Em relação à WT, a linhagem LV-CC foi estatisticamente diferentes. LV-CC apresentou $\mu_{\text{máx}}$ 39 % menor que WT em frasco agitado e 32 % menor em placa de poços, valores coerentes. A linhagem LV-TH não apresentou diferença significativa de $\mu_{\text{máx}}$ em relação à linhagem WT, o que também foi observado nos cultivos em micropoços.

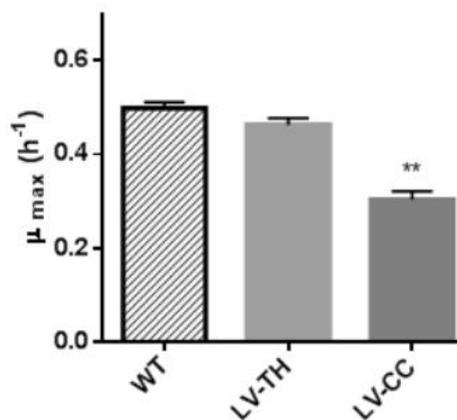


Figura 26. Velocidades específicas máximas de crescimento para as linhagens WT, LV-TH e LV-CC durante cultivos em meio YPD a 40°C em frasco agitado. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. Dois asteriscos (**) indicam quando os valores $\mu_{\text{máx}}$ foram estatisticamente diferentes do $\mu_{\text{máx}}$ da linhagem WT com um nível de significância de 0,01.

Entretanto, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ para cada linhagem foram menores nos cultivos em placa de poços do que em frasco agitado, como pode ser observado na Figura 27. Para as linhagens WT, LV-CC e LV-TH, houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de $\mu_{\text{máx}}$ de cultivo nessas duas diferentes formas de cultivo. Isso mostra que os dados de $\mu_{\text{máx}}$ fazem mais sentido quando analisados dentro de um mesmo conjunto de experimentos (comparação entre $\mu_{\text{máx}}$ de uma linhagem com outra nas mesmas condições experimentais), do que como valores absolutos. Frasco agitado e placa de poços são sistemas experimentais bastante diferentes. Uma grande diferença se deve à aeração e à agitação: enquanto no frasco a agitação é contínua, nos cultivos em placa de poços a agitação acontece antes de cada medida (agitação orbital de 30 segundos a cada 15 min). No entanto, mesmo com estas diferenças de $\mu_{\text{máx}}$, em termos absolutos, pode-se notar que a tendência é a mesma.

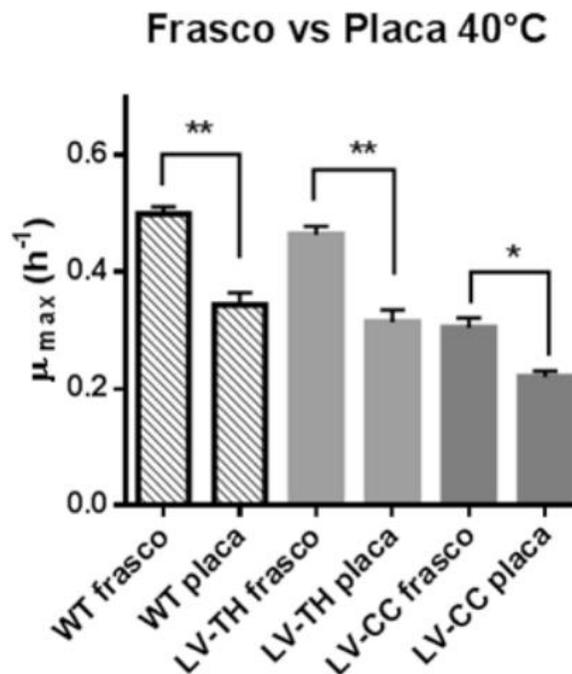


Figura 27. Comparação entre as velocidades específicas máximas de crescimento para as linhagens WT, LV-TH e LV-CC a 40°C em frasco agitado e placa de poços. Asteriscos nas linhas conectando as barras indicam diferenças entre essas mesmas barras. Dois asteriscos (**) indicam quando os valores são estatisticamente com um nível de significância de 0,01 e um asterisco (*), com nível de significância de 0,05.

Na Figura 28 apresentam-se os fatores de conversão de glicose a biomassa para cada linhagem, durante os cultivos em frasco agitado, em meio YPD, a 40 °C. Não houve diferença significativa entre linhagens.

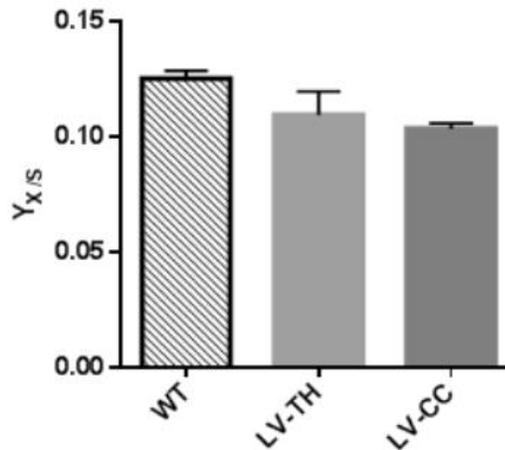


Figura 28. Fatores de conversão de glicose a biomassa para as linhagens WT, LV-TH e LV-CC a 40 °C em meio YPD em frasco agitado.

A Figura 29 apresenta os fatores de conversão de glicose a etanol para cada linhagem nessas condições. Para a linhagem WT, o $Y_{E/S}$ foi de 0,44 g/g e única linhagem que apresentou diferença estatisticamente significativa foi LV-CC, em que o $Y_{E/S}$ foi 9% menor que o de WT. Os valores de $Y_{E/S}$ entre linhagens não foram estatisticamente diferentes.

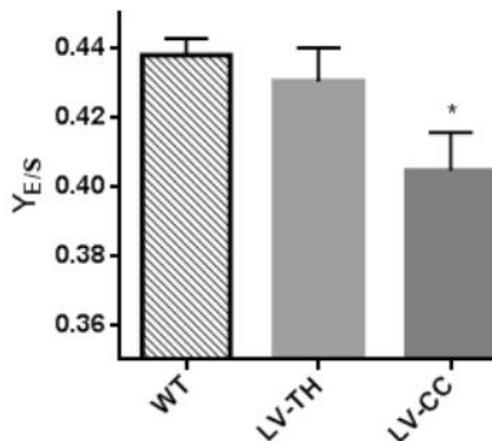


Figura 29. Fatores de conversão de glicose a etanol de cada linhagem a 40°C em meio YPD em frasco agitado. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. Um asterisco (*) indica que os valores são estatisticamente diferentes em relação a WT com um nível de significância de 0,05.

A Figura 30 apresenta os fatores de conversão de glicose a glicerol para cada linhagem nessas condições. A linhagem LV-CC apresentou $Y_{GLY/S}$ 35% maior que WT. Parece que no caso da linhagem LV-CC, houve desvio de carbono da formação de etanol para a formação de glicerol.

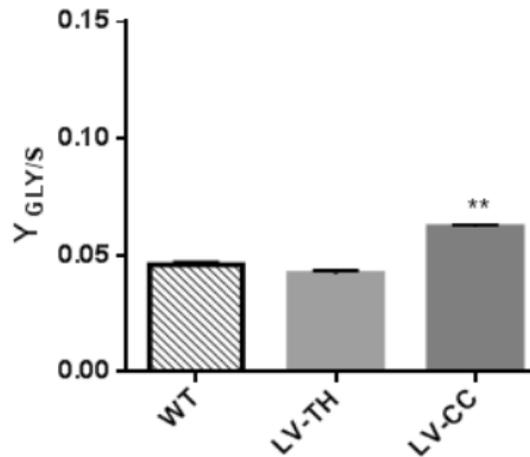


Figura 30. Fatores de conversão de glicose a glicerol para as linhagens WT, LV-TH e LV-CC a 40°C em meio YPD em frasco agitado. Asteriscos em cima das barras indicam diferença em relação a WT. Dois asteriscos (**) indicam que os valores são estatisticamente diferentes em relação a WT com um nível de significância de 0,01.

3.7 CONCLUSÕES

- As condições que mais afetaram negativamente o crescimento, dentre aquelas estudadas neste trabalho, foram NaCl 1,0 M e pH 2,5. Não foi possível calcular μ_{\max} para pH 2,5, pois se observou apenas discreto crescimento celular, porém não houve uma fase exponencial de crescimento.
- A diferença entre o crescimento de uma linhagem, entre o cultivo padrão (pH ~6,0) e o cultivo em pH 3,0 é mais sutil do que a enorme diferença observada entre pH 3,0 e pH 2,5. Isso indica que algum fenômeno importante ocorre entre esses valores de pH.
- O estresse osmótico levou a diferenças significativas entre valores de μ_{\max} de uma mesma linhagem. A linhagem WT, por exemplo, apresentou μ_{\max} 48 % menor em NaCl 0,5 M, do que na condição padrão (sem NaCl). Em NaCl 1,0 M, μ_{\max} foi 76 % menor.
- Ao contrário do esperado, não se observaram valores de μ_{\max} maiores para linhagens superexpressando *HSP104* (gene relacionado à tolerância a estresses variados, sobretudo térmico), em relação à linhagem referência.
- A 40 °C, a linhagem LV-EpGC (superexpressão do gene *CDC48* em vetor multicópias e promotor forte *P_{GPD}*) apresentou μ_{\max} 17 % maior que a linhagem WT, indicando uma possível maior tolerância dessa linhagem ao estresse térmico, o que pode ser promissor industrialmente.
- Quanto à linhagem AUX, houve diferença no valor de μ_{\max} em relação a WT na condição padrão (30 °C), a 40 °C e em pH 3,0, mas não em estresse osmótico com NaCl. A 30°C, a redução de μ_{\max} foi de 18 % em relação a WT e a 40°C o decréscimo foi maior, de 28%. O estresse térmico ressalta a diferença fisiológica

entre a linhagem prototrófica e a auxotrófica para uracila. A maior temperatura parece afetar ainda mais a captação de uracila do meio de cultivo.

- Assim como esperado, as linhagens prototróficas WT e a CTR não apresentam diferença significativa de $\mu_{\text{máx}}$ para nenhuma das condições estudadas.
- Em todos as condições de cultivo, as linhagens LV-CC e LV-CH apresentaram valores de $\mu_{\text{máx}}$ menores que para WT. Como o P_{CYC1} é promotor mais fraco utilizado, não se sabe explicar porque acontecem reduções de $\mu_{\text{máx}}$ quando *CDC48* e *HSP104* são expressos sob o controle do promotor fraco P_{CYC1} , mas não de P_{ADH1} e P_{TEF} , promotores mais fortes.
- Em cultivo em frasco agitado a 40°C, confirmou-se a diferença de $\mu_{\text{máx}}$ entre WT e LV-CC. Além disso, em frasco agitado a 40°C, $Y_{\text{E/S}}$ de LV-CC foi 9% menor que o de WT e $Y_{\text{GLY/S}}$ foi 35% maior que WT. Não houve diferença em termos de $Y_{\text{X/S}}$.
- Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ para cada linhagem foram menores nos cultivos em placa de poços do que em frasco agitado. Isso mostra que os dados de $\mu_{\text{máx}}$ fazem mais sentido quando analisados dentro de um mesmo conjunto de experimentos (comparação entre $\mu_{\text{máx}}$ de uma linhagem com outra nas mesmas condições experimentais), do que como valores absolutos.

4 EFEITOS DA SUPEREXPRESSION DE *HSP104* E *CDC48* EM LINHAGENS DE *S. CEREVISIAE* COM MUTAÇÃO NO PROTEASSOMO

4.1 RESUMO

Proteínas que se apresentam mal enoveladas podem resultar na formação de agregados proteicos extremamente relevantes no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. As chaperonas moleculares são conhecidas por agirem como a primeira linha de defesa contra a formação de proteínas mal enoveladas e agregados proteotóxicos. Os complexos de chaperonas selecionam essas proteínas deformadas para a degradação, que é feita, na maioria dos casos, pelo proteassomo ou pelo processo de autofagia. Nessa etapa do projeto, visou-se estudar Hsp104 e Csd48 em um contexto fisiológico no qual a atividade dessas chaperonas fossem mais requeridas em virtude do desarranjo no controle de qualidade de proteínas intracelulares exercida por mutações no proteassomo 20S. Previamente, foram construídas por Leme (2016) duas linhagens com mutações sítio-específicas no proteassomo 20SPT: as linhagens C76S e C221S, ambas linhagens com maior formação de agregados proteicos que a linhagem referência. A partir dessas linhagens, construíram-se também duplos mutantes com a inativação de *MCA1*, a metacaspase de levedura. Metacaspases são proteases multifuncionais, relacionadas a processos de apoptose e ao controle de qualidade de proteínas. A inativação de *MCA1* é reportado por causar acúmulo de agregados proteicos em condições fisiológicas de crescimento. Assim, foi avaliada a velocidade específica máxima de crescimento e a morfologia celular por análise microscópica das linhagens com superexpressão de *HSP104* e *CDC48* nos mutantes de proteassomo e metacaspase. O principal resultado obtido é que a superexpressão de *CDC48* e de *HSP104* reverteu em parte a morfologia alterada de alguns desses mutantes.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. *HSP104*. *CDC48*. Chaperonas. Proteassomo. Metacaspase.

4.2 INTRODUÇÃO

Como explicado nos capítulos anteriores, *HSP104* e *CDC48* codificam proteínas da família das AAA⁺ ATPases, com papel fundamental em diversos processos celulares, entre os quais se destaca o controle de qualidade de proteínas. Proteínas mal enoveladas podem ficar com superfícies hidrofóbicas expostas que podem se agregar a outras superfícies hidrofóbicas de outras proteínas resultando na formação de agregados proteicos extremamente relevantes no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (CHITI; DOBSON, 2006; FINK, 1998).

As chaperonas moleculares agem como a primeira linha de defesa contra a formação de proteínas mal enoveladas e agregados proteotóxicos. Elas contribuem para o dobramento correto de proteínas recém-sintetizadas, evitando assim a sua associação e/ou agregação com outras proteínas. Além disso, se em algum momento do metabolismo as proteínas forem danificadas, as chaperonas agem como nanomáquinas que usam a energia proveniente da hidrólise de ATP para desmontar essas proteínas com problemas conformacionais (MATTOO; GOLOUBINOFF, 2014).

Quando isso não acontece, os complexos de chaperonas selecionam tais proteínas para a degradação por interação com mecanismos das vias de degradação. (DING; YIN, 2008). A proteólise intracelular possui dois importantes objetivos: o controle de qualidade, degradando proteínas mal formadas ou que tenham sido danificadas em algum ponto do metabolismo; a regulação, para auxiliar a manter concentrações apropriadas de diferentes proteínas (KUBOTA, 2009).

O Sistema Ubiquitina-Proteassomo (UPS) é responsável pela degradação de 80 a 90% das proteínas intracelulares em eucariotos, incluindo proteínas regulatórias, de curta duração, anormais, desnaturadas ou em geral, proteínas danificadas (ROCK *et al.*, 1994). Há também o sistema de autofagia, degradando proteínas de longa duração, agregados proteicos grandes, organelas celulares e organismos infecciosos, no lisossomo, que contém várias proteases. Quando a concentração de proteínas deformadas é muito alta, pequenos agregados são recolhidos em grandes agregados, para poderem ser degradados por autofagia (IWATA *et al.*, 2005).

O UPS é dependente de ATP e ubiquitina, uma pequena proteína de 76 aminoácidos muito conservada na evolução. A degradação proteica pelo UPS inicia-se com a ligação de ubiquitina às proteínas alvo. Depois, as proteínas poliubiquitinadas são reconhecidas e degradadas pelo proteassomo, onde o substrato é clivado em pequenos peptídeos (VILCHEZ; SAEZ; DILLIN, 2014).

A formação de agregados e a diminuição da atividade do sistema de controle de qualidade proteico, pode ser tanto causa como consequência nas doenças neurodegenerativas. Ao passo que o declínio na função no controle de qualidade proteico com o envelhecimento é um dos maiores causadores de agregação proteica, outros fatores também podem levar ao acúmulo de proteínas deformadas e agregados (estresse, oxidação proteica, mutações no DNA que geram proteínas aberrantes e instáveis), fazendo com que o sistema de qualidade proteico fique sobrecarregado. Além disso, é importante mencionar que os agregados podem ser tóxicos, mas também podem agir como parte de um mecanismo de armazenamento de proteção (KAMPINGA; BERGINIK, 2016).

Devido à relevância das chaperonas moleculares na proteostase celular e de sua relação com o Sistema Ubiquitina Proteassomo, nessa etapa do trabalho, o principal objetivo foi verificar se a superexpressão de *HSP104* e *CDC48* poderia ser benéfica, revertendo morfologias alteradas em linhagens com desarranjo no controle de qualidade de proteínas intracelulares exercida por mutações no proteassomo e metacaspase, uma protease.

4.3 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO COMO POTENCIAIS ALVOS PARA ESTRATÉGIAS DE PROTEÇÃO EM NEURODEGENERAÇÃO

As proteínas de choque térmico (HSPs) desempenham um papel central na regulação do controle de qualidade de proteínas. Assim, as HSPs são alvos interessantes para estudo de doenças neurodegenerativas e para o desenvolvimento de drogas que visam reduzir agregados proteotóxicos relacionados ao desenvolvimento dessas doenças (KAPINGA; BERGINIK, 2016).

In vitro, a agregação de α -sinucleína, responsável pela doença de Parkinson, pode ser inibida por chaperonas como as da família HSP70. A superexpressão dessas HSPs reduziu agregação de α -sinucleína em alguns modelos de doença de Parkinson (KAKKAR *et al.*, 2014; KLUCKEN *et al.*, 2004).

Os mais bem caracterizados sistemas de desagregases são a chaperonina ClpB em bactéria e a chaperona Hsp104 em levedura, que colabora com as HSP70 (DOYLE; WICKNER, 2009; PARSELL *et al.*, 1994). *HSP104* e seus ortólogos em bactérias, protozoários e fungos são altamente conservados e conferem grande vantagem na tolerância a estresses, tendo alta e rápida capacidade de desagregação de agregados proteicos e amiloides. A expressão de HPS104 de levedura em células de mamíferos foi capaz de reduzir a carga de agregados em vários modelos de doenças, inclusive modelo de Huntington em camundongo. (SHORTER, 2008; VACHER; GARCIA-OROZ, RUBINSZTEIN, 2005). Entretanto, Hsp104 pode afetar complexos proteicos funcionais e importantes para a célula, pois além da capacidade de desagregação de agregados tóxicos, também tem função de desmontar complexos proteicos (KAPINGA; BERGINK, 2016).

Metazoários não possuem *HSP104*. Um estudo de 2013 justamente questiona como metazoários fazem a desagregação de agregados proteicos e amiloides sem *HSP104*. A maquinaria de desagregação desses organismos compreende interações entre Hsp70, Hsp40 e Hsp110, que dissolvem alguns tipos de agregados, mas não são capazes de solubilizar rapidamente amiloides. Curiosamente, Hsp104 de levedura é capaz de interagir com Hsp110, Hsp70 e Hsp40 de metazoário e rapidamente solubiliza amiloides, mostrando que a proteostase de metazoários é receptiva a desagregases exógenas, o que abre uma série de oportunidades terapêuticas (TORRENTE; SHORTER, 2013).

Outro modo de proteção contra agregados proteicos tóxicos é compartimentalização/depósitos, que é mover agregados tóxicos para compartimentos celulares onde possam causar menos problemas para a célula. A primeira evidência disso foi a descoberta de proteínas mal enoveladas acumuladas em estruturas que foram chamadas de *agressomes* (JOHNSTON; WARD; KOPITO, 1998), que organizam as proteínas deformadas em uma única localização. Um exemplo ocorre quando as

proteínas nucleares ficam parcialmente desenoveladas por estresse térmico, acumulando-se na periferia do nucléolo para que sejam remodeladas por Hsp70 quando a temperatura volta normal (NOLLEN *et al.*, 2001). Além disso, há a compartimentalização de proteínas mal enoveladas em IPODS (depósitos de proteínas insolúveis). Estudos em levedura mostram que a formação desses compartimentos depende de HSPs (MILLER; MOGK; BUKAU, 2015).

Outra abordagem são pesquisas que buscam drogas que aumentem a capacidade de enovelamento de proteínas. Geralmente, buscam-se drogas ativadoras do fator de transcrição HSF1 (fator de transcrição de choque térmico 1) e no consequente aumento de expressão de HSPs reguladas por HSF1. HSF1 é a peça chave na expressão de chaperonas, HSPs e outros componentes do mecanismo de controle de qualidade de proteínas e um fator de transcrição central na proteção ao estresse que é ativado em resposta ao enovelamento incorreto de proteínas (TRINKLEIN *et al.*, 2004). Portanto, HSF1 representa um alvo promissor para a intervenção farmacológica nas doenças neurodegenerativas (NEEF; TURSKI; THIELE, 2010). Geldanamicina e derivados tiveram efeitos positivos em alguns modelos de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica, mas não foram muito eficientes em modelo de Huntington em camundongo (LABBADIA *et al.*, 2011).

Outras pesquisas buscam encontrar drogas capazes de aumentar a atividade ATPase de Hsp70. Até agora foram encontrados ativadores fracos, como por exemplo 15-deoxiapergualina (ASSIMON *et al.*, 2013).

4.4 PROTEASSOMO

O proteassomo é um complexo multiprotéico responsável pela degradação de proteínas. O proteassomo degrada as proteínas em pequenos peptídeos que posteriormente podem ser clivados pelas peptidases intracelulares (REINSTEIN; CIECHANOVER, 2006).

A forma ativa do proteassomo para a degradação de proteínas poliubiquitinadas é constituída pela interação da unidade central, o proteassomo 20S (20SPT) onde estão

os sítios proteolíticos, com unidades regulatórias. O 20SPT é geralmente encontrado em um estado inativo/fechado e exige a ligação de ativadores para degradar proteínas.

O complexo regulatório mais abundante do 20SPT é o 19S, que tem as seguintes funções: reconhecer os substratos poliubiquitinados, remover as porções de ubiquitina, promover o desdobramento das proteínas alvo e translocar os substratos para o interior da câmara proteolítica do 20SPT (VILCHEZ; SAEZ; DILLIN, 2014). Esse complexo que inclui a unidade catalítica 20S e as unidades regulatórias 19S é denominado proteassomo 26S.

O Proteassomo 20S (20SPT), de cerca de 700 kDa, tem formato cilíndrico, formado pelo empilhamento de quatro anéis, sendo dois anéis heptaméricos externos do tipo α e dois anéis heptaméricos internos do tipo β , resultando em uma configuração α - β - β - α (TANAKA, 2009). Os sítios catalíticos encontram-se nos anéis internos β . Os anéis α , embora cataliticamente inativos possuem importante função, já que são responsáveis pela abertura da câmara catalítica para entrada de substrato (KOPP *et al.*, 1997).

Outra forma de regulação do 20SPT é por modificações pós-traducionais, entre as quais está a S-glutathionilação, que é a adição de glutathiona aos resíduos de cisteína de proteínas. A glutathiona é um tri-peptídeo (γ -GluCysGly) encontrado em algumas eubactérias e em todos os eucariotos e é um tiol com papel antioxidante (SIES, 1999). Silva *et al.* (2012) mostraram que a glutathionilação influencia o acesso à câmara catalítica no 20SPT. *In vivo*, foram encontrados dois resíduos de Cys glutathionilados: Cys76 e Cys221, ambos na subunidade α 5 no 20SPT (SILVA *et al.*, 2012).

4.5 LINHAGENS MUTANTES C221S E C76S

Leme (2016) construiu linhagens com mutações sítio-específicas pela substituição de cisteínas por serinas (C221S e C76S) da subunidade α 5 do 20SPT, de forma que não aconteça glutathionilação nesses resíduos. A subunidade α 5 é codificada pelo gene *PUP2*. Assim, primeiramente foi feita a inativação do alelo nativo *PUP2*. Então foram construídos os alelos mutantes *PUP2*^{C221S} ou *PUP2*^{C76S} e clonados em *S. cerevisiae*.

Leme (2016) observou que o mutante C221S apresentou aumento na atividade preteolítica. A população de proteassomos isolados dessa linhagem apresentou maior proporção da forma aberta da câmara catalítica. Resultados opostos foram observados com a linhagem mutante C76S, com prevalência da forma fechada da câmara catalítica. Além disso, Leme (2016) menciona que o mutante C76S teve menor crescimento (em termos de menores valores de absorbância a 600 nm), o que pode ser um indicativo da importância deste resíduo, já que Cys76 é um resíduo altamente conservado.

Ohara (2015) continuou as caracterizações com os mutantes C221S e C76S. Essa autora observou que o C76S teve queda na expectativa de vida, tanto cronológica, quanto replicativa. Também se confirmou a maior frequência de abertura da câmara proteolítica no C221S, com aumento da atividade proteolítica. Sua hipótese é que a glutationilação do resíduo C221S seja uma regulação negativa da abertura da câmara, de forma que a mutação resulta em uma estrutura mais eficiente para a proteólise. Tanto para C221S e para C76S, foi observada maior formação de agregados proteicos do que na linhagem referência, com maior formação de agregados em C221S do que em C76S. Ohara (2015) cita que a maior formação de agregados proteicos parece não condizer com a maior expectativa de vida da linhagem C221S, mas pode ser que os agregados estejam envolvidos no sequestro de proteínas potencialmente prejudiciais.

4.6 METACASPASE

Metacaspases são proteases multifuncionais dependentes de cisteína, presentes em protozoários, fungos e plantas. Elas têm relação distante com as caspases dos metazoários. As metacaspases clivam seus substratos após resíduos Arg e Lys e não tem a especificidade para Asp como as demais caspases. *S. cerevisiae* possui uma única metacaspase, codificada pelo gene *MCA1*. Assim como as demais caspases, *MCA1* está envolvido em processos de apoptose. *MCA1* é um regulador positivo de morte celular relacionada a estresse oxidativo e senescência - processo natural de envelhecimento - em *S. cerevisiae*. (TSIATSIANI *et al.*, 2011)

Bettiga *et al.* (2004) observaram relação entre *MCA1* e o Sistema Ubiquitina Proteassomo no processo de morte celular programada. A inativação de *UBP10*, gene

codificador de uma enzima que desubiquitina proteínas, gera fenótipos complexos com subpopulações celulares exibindo marcadores típicos de apoptose. A inativação de *MCA1* suprime esse fenótipo do mutante Δ ubp10 e a superexpressão de *MCA1* prejudica o crescimento e a viabilidade de Δ ubp10.

Além disso, existem estudos que indicam que *MCA1* desempenha outras funções, por exemplo, relacionadas ao controle de qualidade proteico. A inativação de *MCA1* causou o acúmulo de agregados proteicos em condições fisiológicas de crescimento, assim como maior concentração de peptidases vacuolares e chaperonas relacionadas à resposta a estresse. Esse acúmulo de agregados induziu maior atividade na via de autofagia. Em ensaios de colocalização com *GFP*, observou-se que *Mca1* colocaliza com *Hsp104*, que é considerado um marcador de agregação proteica (LEE et al, 2010).

Hill et al (2014) fizeram muitas observações importantes sobre *MCA1*, entre elas: durante estresse térmico, *MCA1* mostrou-se necessário para manter a célula filha livre dos agregados da célula mãe; *MCA1* interagiu negativamente com *CDC48* em análises de SGA (*genome-wide synthetic genetic array*); a superexpressão de *MCA1* diminui os níveis de um substrato mal enovelado de proteassomo (Δ ssCL) e o oposto foi observado para Δ mca1, sugerindo que *MCA1* é necessário para a remoção eficiente de proteínas deformadas.

Hill et al (2014) realizaram ensaio de tempo de vida replicativo e chegaram aos seguintes resultados: a inativação de *MCA1* não teve implicações sobre o tempo de vida replicativo; a superexpressão de *MCA1* estendeu em 46-56% o tempo de vida replicativo, mas não foi observada diferença quando a superexpressão de *MCA1* era concomitante com a inativação de *HSP104* ou com a redução dos níveis de proteassomo através da inativação de *RPN4* (um regulador de proteassomo). Portanto, remoção de proteínas mal enoveladas e agregados proteicos é fundamental para as funções de *MCA1* relacionadas ao ciclo de vida.

Como *MCA1* está relacionado à morte celular programada na senescência, o fato de *MCA1* ter um papel protetor, de fato estendendo o tempo de vida, parece controverso. Hill e Nyström (2015) em seu trabalho intitulado “*The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger*” sugerem que as metacaspases tem efeitos

positivos para a vida da célula e que só induzem morte celular em situações em que morte de parte da população seria benéfico, como em casos em que há limitações ao crescimento celular. Hill *et al.* (2014) fazem uma hipótese de que as caspases/metacaspases evoluíram originalmente como fatores citoprotetores relacionados ao controle de qualidade proteico e que só depois foram adotados na morte celular programada, talvez devido à sua alta expressão em condições severas de estresse. Hill *et al.* (2014) também citam que essa aparente antítese entre controle de qualidade proteico e morte celular programada poderia ajudar a elucidar como são feitas decisões relativas a sobrevivência, em termos de uma única célula ou de uma população de células.

4.7 MATERIAIS E MÉTODOS

4.7.1 Linhagens de *S. cerevisiae*

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas estão descritas na Tabela 10 .

Tabela 10. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no Capítulo 4 dessa tese.

Linhagem	Genótipo	Procedência
BY4741/ Δ mca1	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Δmca1</i>	Euroscarf
RJD1144	<i>MATa, his3_200, leu2-3,112, lys2-801, trp1_63, ura3-52, PRE1 FH ::Ylplac211 URA3</i>	R. Deshaies, Caltech, Pasadena, CA-EUA
C221S	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C221S}</i>	Leme 2016
C76S	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C76S}</i>	Leme 2016
C221S/2	<i>MATα, ura3, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C221S}</i>	M. H. Barros, derivada de Leme 2016
C76S/2	<i>MATα, ura3, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C76S}</i>	M. H. Barros, derivada de Leme 2016
C221S/2/ Δ mca1	<i>MATα, ura3, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C221S}, mca1::kanMX</i>	M. H. Barros
C76S/2/ Δ mca1	<i>MATα, ura3, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C76S}, mca1::kanMX</i>	M. H. Barros
C76S/2-GC	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C76S}, ura3::Ylp532-P_{GPD}-CDC48 URA3</i>	Este trabalho
C76S/2-GH	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C76S}, ura3::Ylp532-P_{GPD}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho
C221S/2-GH	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C221S}, ura3::Ylp532-P_{GPD}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho
C221S/2-AH	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C221S}, ura3::Ylp532-P_{ADH}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho
C76S/2/ Δ mca1-GH	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C76S}, mca1::kanMX, ura3::Ylp532-P_{GPD}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho
C76S/2/ Δ mca1-AH	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C76S}, mca1::kanMX, ura3::Ylp532-P_{ADH}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho
C76S/2/ Δ mca1-GC	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C76S}, mca1::kanMX, ura3::Ylp532-P_{GPD}-CDC48 URA3</i>	Este trabalho
C221S/2/ Δ mca1-GH	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C221S}, mca1::kanMX ura3::Ylp532-P_{GPD}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho
C221S/2/ Δ mca1-AH	<i>MATα, pup2::HIS3, TRP1::PUP2^{C221S}, mca1::kanMX ura3::Ylp532-P_{ADH}-HSP104 URA3</i>	Este trabalho

4.7.2 Construção de linhagens de levedura

4.7.2.1 Linhagens construídas previamente

Conforme descrito por Leme (2016), o mutante *pup2* foi construído através da inserção do gene repórter *HIS3* (*pup2::HIS3*) respectivamente complementado pelos mutantes de ponto C76S e C221S. Os alelos *PUP2*^{C221S} e *PUP2*^{C76S} complementam o alelo nulo *pup2* permitindo a sobrevivência do mutante e são expressos a partir da sua integração com o gene *TRP1* no genoma da linhagem *pup2::HIS3*. As linhagens construídas por Leme (2016) têm um background misto de RJD1144 e W303-1B.

O Prof. Mario Barros construiu os duplos mutantes *PUP2*^{C221S}/*mca1* e *PUP2*^{C76S}/*mca1* (gerando linhagens aqui nomeadas C221S/2/ Δ *mca1* e C76S/2/ Δ *mca1*, respectivamente) que foram obtidos através de cruzamentos entre mutantes simples do tipo sexual “ α ” *PUP2*^{C221S} ou *PUP2*^{C76S} com levedura do tipo sexual “a” resistente ao antibiótico canamicina através da inativação do gene *mca1* (*mca1::kanMX*) obtido da coleção da Euroscarf BY4741, gentilmente cedida pelo Dr. Luis E.S.Netto (IB-USP) .

Assim, dois diplóides heterozigotos para *PUP2* e *MCA1* foram selecionados: a/ α *PUP2* / *PUP2*^{C221S} / *MCA1* / *mca1* e a/ α *PUP2* / *PUP2*^{C76S} / *MCA1* / *mca1*. Os diplóides isolados foram incubados em meio de cultura contendo acetato de potássio e após três dias observou-se a geração de abundantes tétrades de esporos derivadas do processo de meiose. A tétrades foram dissecadas por micromanipulação e esporos que germinaram e eram prototróficos para histidina, triptofano, auxotróficas para uracila e resistentes a canamicina foram selecionados. Esses esporos continham as marcas genéticas passíveis de seleção esperadas na constituição dos duplos mutantes.

A partir desse cruzamento, Prof. Mario Barros também selecionou esporos do mutante simples *PUP2*^{C221S} ou *PUP2*^{C76S} que fossem auxotróficos para uracila. Isso foi fundamental para que as linhagens pudessem ser transformadas com os plasmídeos de superexpressão de *HSP104* e *CDC48* que contém a marca *URA3*. As linhagens originais por Leme (2016) C221S e C76S não são auxotróficas para uracila. As variantes auxotróficas para uracila obtidas pelo Prof. Mario H. Barros foram denominadas C221S/2 e C76S/2.

As linhagens construídas pelo Prof. Mario Barros possuem assim um background misto de RJD11441144, W303 e BY4741.

4.7.2.2 Linhagens construídas durante este trabalho

Foram usados os plasmídeos de superexpressão dos genes *HSP104* e *CDC48* (descritos na Tabela 2) para transformar as linhagens C76S/2 e C221S/2 e os duplos mutantes C76S/2/ Δ mca1 e C221S/2/ Δ mca1, obtendo-se as linhagens descritas na Tabela 11.

Tabela 11. Linhagens de levedura construídas no Capítulo 4 desta tese com respectivos plasmídeos que foram integrados.

Linhagem	Linhagem base	Plasmídeo	Gene	Promotor	Enzima de restrição
C76S/2-GH	C76S/2	<i>Ylp532-P_{GPD}-HSP104</i>	<i>HSP104</i>	P _{GPD}	<i>NcoI</i>
C76S/2-GC	C76S/2	<i>Ylp532-P_{GPD}-CDC48</i>	<i>CDC48</i>	P _{GPD}	<i>NdeI</i>
C76S/2/ Δ mca1-GH	C76S/2/ Δ mca1	<i>Ylp532-P_{GPD}-HSP104</i>	<i>HSP104</i>	P _{GPD}	<i>NcoI</i>
C76S/2/ Δ mca1-AH	C76S/2/ Δ mca1	<i>Ylp532-P_{ADH1}-HSP104</i>	<i>HSP104</i>	P _{ADH1}	<i>NcoI</i>
C76S/2/ Δ mca1-GC	C76S/2/ Δ mca1	<i>Ylp532-P_{GPD}-CDC48</i>	<i>CDC48</i>	P _{GPD}	<i>NdeI</i>
C221S/2-GH	C221S/2	<i>Ylp532-P_{GPD}-HSP104</i>	<i>HSP104</i>	P _{GPD}	<i>NcoI</i>
C221S/2-AH	C221S/2	<i>Ylp532-P_{ADH1}-HSP104</i>	<i>HSP104</i>	P _{ADH1}	<i>NcoI</i>
C221S/2/ Δ mca1-GH	C221S/2/ Δ mca1	<i>Ylp532-P_{GPD}-HSP104</i>	<i>HSP104</i>	P _{GPD}	<i>NcoI</i>
C221S/2/ Δ mca1-AH	C221S/2/ Δ mca1	<i>Ylp532-P_{ADH1}-HSP104</i>	<i>HSP104</i>	P _{ADH1}	<i>NcoI</i>

4.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.8.1 Ensaio de diluição seriada

Para avaliar a viabilidade celular de forma qualitativa, realizou-se o ensaio de diluição seriada em placa. Todas as linhagens da Figura 31 e da Figura 32 apresentaram crescimento similar em placa com meio YPD a 30 °C. Qualitativamente nesse teste em placa, não houve diferença de crescimento entre as linhagens.



Figura 31. Ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD para as linhagens C76S/2-GC, C76S/2-GH, C76S/2, C221S/2-GH e C221S/2. As placas foram incubadas a 30 °C e fotografias foram tiradas depois de 2 dias de incubação.



Figura 32. Ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD para as linhagens C76S/2/Δmca1-GC C76S/2-GC e C76S/2/Δmca1. As placas foram incubadas a 30 °C e fotografias foram tiradas depois de 1 dia e 2 dias de incubação.

Entretanto, é possível observar diferenças na Figura 33. Comparando as linhagens C76S/2/Δmca1 e a C76S/2/Δmca1-GH, é possível observar que C76S/2/Δmca1 apresentou colônias maiores e em maior quantidade do que C76S/2/Δmca1-GH.

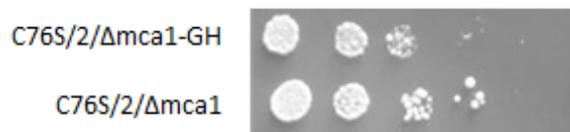


Figura 33. Ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD para as linhagens C76S/2/Δmca1-GH e C76S/2/Δmca1. A placa foi incubada a 30 °C e foi tirada uma fotografia depois e 2 dias de incubação.

Na Figura 34 são analisadas diferentes linhagens com mutação $PUP2^{C76S}$. Comparando-se o duplo mutante C76S/2/Δmca1, pode-se notar que superexpressar o gene *HSP104* com promotor forte P_{GPD} (linhagem C76S/2/Δmca1-GH) leva à formação de menos colônias ao passo que superexpressar esse mesmo gene com um promotor intermediário P_{AHD1} (linhagem C76S/2/Δmca1-AH) não afeta negativamente o crescimento celular. Também é possível notar que o duplo mutante C76S/2/Δmca1 parece formar colônias maiores que as colônias de C76S/2.

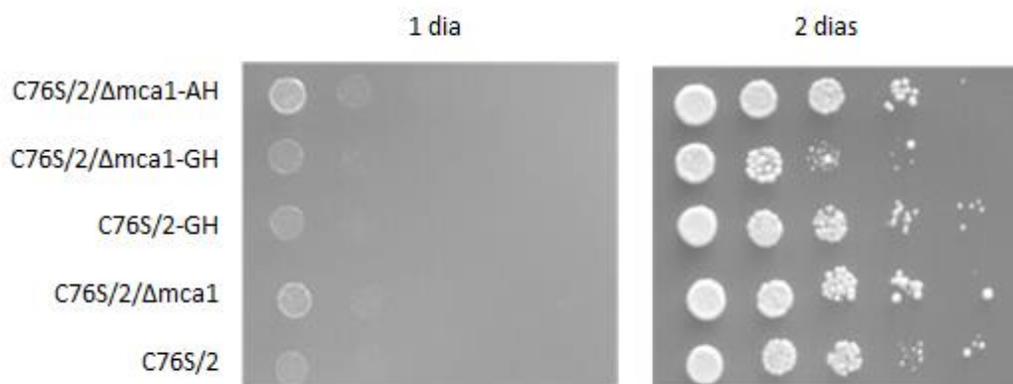


Figura 34. Ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD para as linhagens C76S/2/Δmca1-AH, C76S/2/Δmca1-GH, C76S/2-GH, C76S/2/Δmca1 e C76S/2. As placas foram incubadas a 30 °C e fotografias foram tiradas depois de 1 dia e 2 dias de incubação.

Na Figura 35, comparam-se as diferentes linhagens com mutação $PUP2^{C221S}$. As diferenças são sutis, mas podem ser observadas. Comparando-se o duplo mutante C221S/2/Δmca1, com apenas um dia de incubação, pode-se notar que superexpressar o gene *HSP104* com promotor intermediário P_{AHD1} (linhagem C76S/2/Δmca1-AH) leva à formação de mais colônias ao passo que não há diferença aparente com o promotor mais

forte P_{GPD} (linhagem C76S/2/ $\Delta mca1$ -GH). O mesmo acontece com o mutante simples C221S/2: superexpressar o gene *HSP104* com promotor intermediário P_{AHD1} (linhagem C221S/2-AH) leva à formação de mais colônias ao passo que não há diferença aparente com o promotor mais forte P_{GPD} (C221S/2-GH). Parece que o gene *HSP104*, quando superexpresso de forma intermediária, leva a um maior crescimento celular.

Comparando-se somente C221S/2/ $\Delta mca1$ com a C221S/2, há maior formação de colônias no caso do duplo mutante C221S/2/ $\Delta mca1$. Isso também foi observado para o caso do $PUP2^{C76S}$: há maior formação de colônias no caso do duplo mutante C76S/2/ $\Delta mca1$ do que C76S/2. Isso pode ser um indicativo de que a inativação da metacaspase já leve a um maior crescimento nos mutantes de proteassomo.

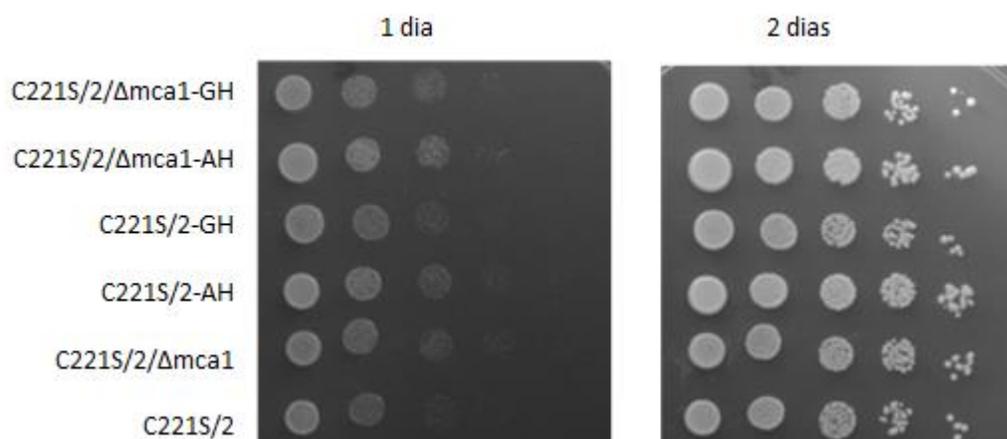


Figura 35. Ensaio de diluição seriada em meio sólido YPD para as linhagens C221S/2/ $\Delta mca1$ -GH, C221S/2/ $\Delta mca1$ -AH, C221S/2-GH, C221S/2-AH, C221S/2/ $\Delta mca1$ e C221S/2. As placas foram incubadas a 30 °C e fotografias foram tiradas depois de 1 dia e 2 dias de incubação.

Essas diferenças qualitativas sutis, principalmente as que são observadas com apenas 1 dia incubação podem ser causadas por diferenças nas velocidades específicas máximas de crescimento, por isso é interessante fazer experimentos quantitativos de cinética para obter esse parâmetro fisiológico. Além disso, como apareceram colônias maiores e menores, também é válido fazer uma análise microscópica para avaliar a morfologia celular.

4.8.2 Análise microscópica

Foi realizada uma comparação da morfologia das linhagens, por meio de análise no microscópio.

Como base de comparação, são mostradas na Figura 36 as análises microscópicas das linhagens parentais RJD11441144, W303-1B e BY4741/ Δ mca1. A linhagem RJD1144 apresenta células mais arredondadas e as linhagens BY4741/ Δ mca1 e W303, apresentam células mais ovais.

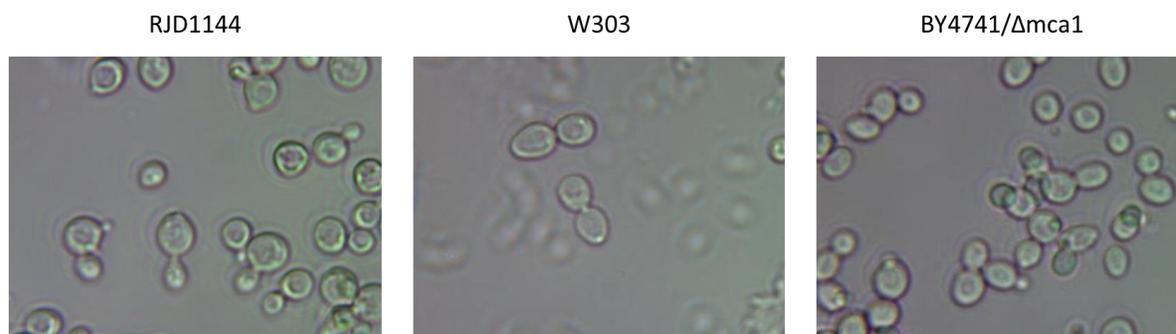


Figura 36. Foto de microscópio com aumento de 400X para as linhagens parentais RJD11441144, W303-1B e BY4741/ Δ mca1.

Na Figura 37, comparam-se as linhagens C76S/2, C76S/2-GH e C76S/2-GC. A linhagem C76S/2 apresenta células com aspecto mais alongado e apresenta uma tendência a ficarem juntas, aspecto de um “colar de contas”. A mutação C76S no proteassomo 20S resulta em uma morfologia alterada quando comparada à morfologia das linhagens parentais na Figura 36. Porém, com a superexpressão de *HSP104* (linhagem C76S/2-GH) e *CDC48* (linhagem C76S/2-GC), parece que essa morfologia anormal é em parte revertida: as células têm aspecto mais arredondado, e não se agregam tanto. A hipótese é que a superexpressão dessas chaperonas contribui para reverter a morfologia anormal causada pela mutação no proteassomo 20S.

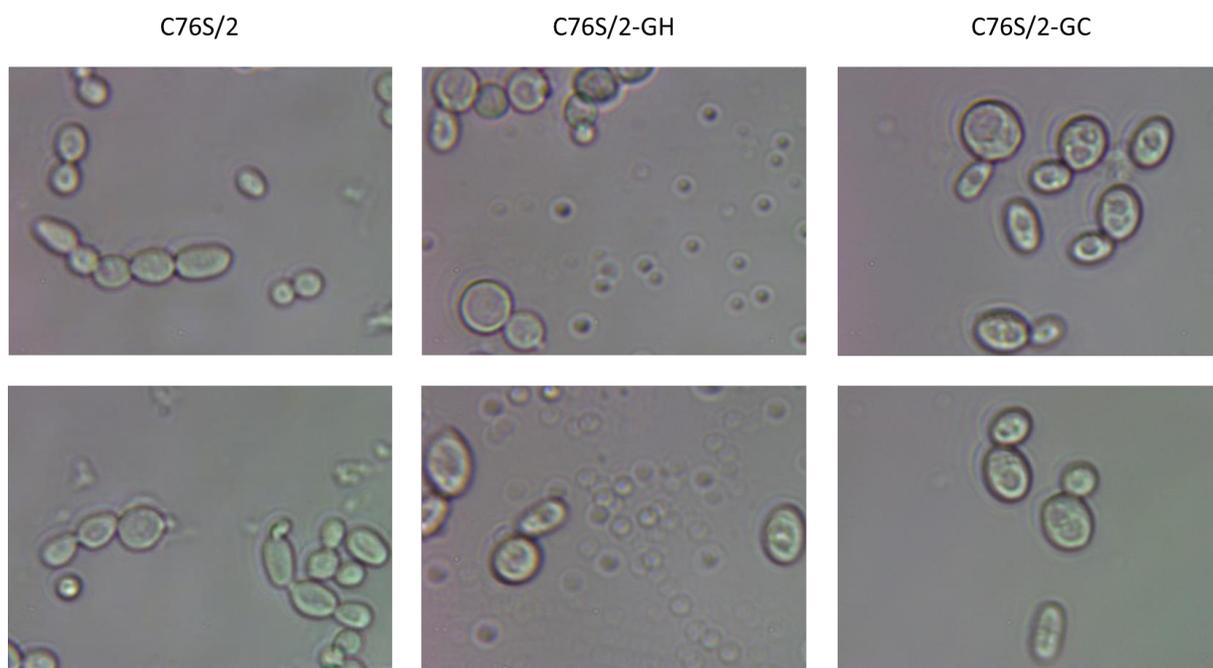


Figura 37. Foto de microscópio com aumento de 400X para as linhagens C76S/2, C76S/2-GH e C76S/2-GC.

Na Figura 38 comparam-se as linhagens C76S/2/ Δ mca1, C76S/2/ Δ mca1-AH e C76S/2/ Δ mca1-GH. O duplo mutante C76S/2/ Δ mca1 apresenta células com morfologia muito alterada e heterogênea. É possível observar células bem alongadas, que parecem em transição para pseudo-hifas; células grandes, células disformes e células com maior número de grânulos refringentes internos. Essa morfologia microscópica explica o maior tamanho das colônias de C76S/2/ Δ mca1 no ensaio de diluição seriada. Com a superexpressão de *HSP104*, obteve-se um resultado extremamente interessante: a morfologia alterada é em parte revertida. Aparentemente, a superexpressão desse gene consegue compensar parte dos efeitos deletérios causados pela combinação da inativação de *MCA1* e da mutação C76S no proteossomo 20S. Com o promotor de força intermediária P_{ADH1} (linhagem C76S/2/ Δ mca1-AH), ainda é possível visualizar algumas células com granulação refringente interna (porém menores), mas as células já apresentam um formato muito mais típico e arredondado. Com o promotor mais forte P_{GPD} , não foi observado formação dessas partículas dentro das células e o formato das células também é muito mais típico e arredondado, porém ainda há uma tendência das células

ficaram mais agregadas. De qualquer forma, a superexpressão de *HSP104* alterou a morfologia das células, talvez devido a sua atividade desagregadora.

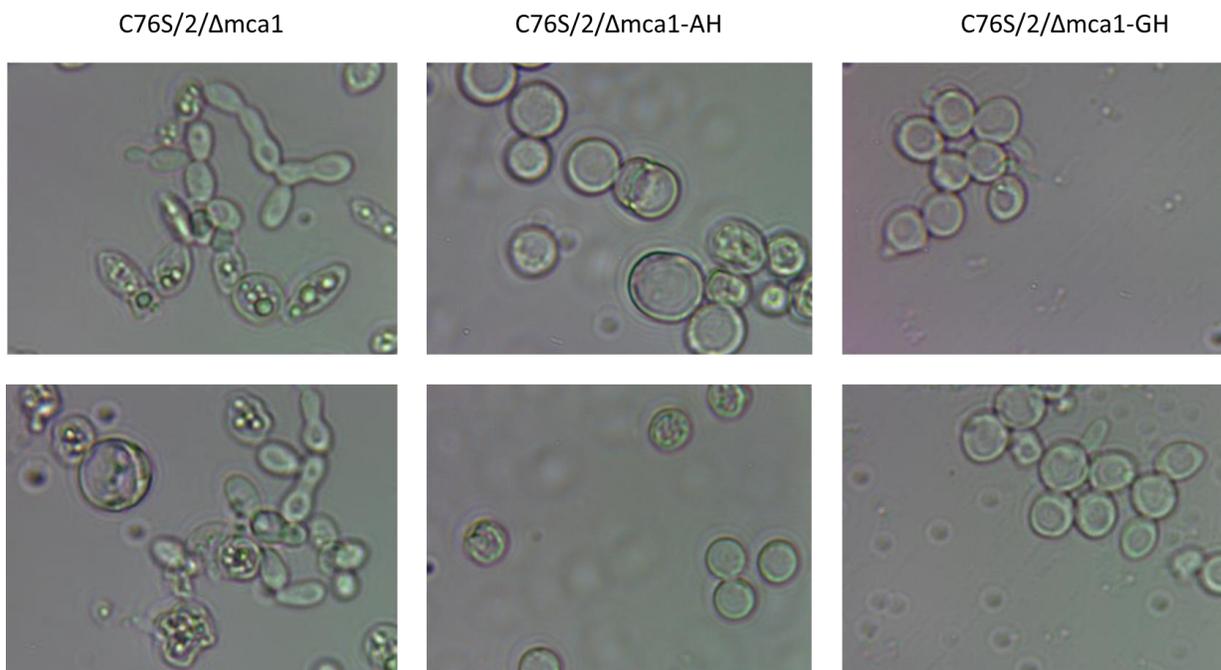


Figura 38. Foto de microscópio com aumento de 400X para as linhagens C76S/2/Δmca1 e com C76S/2/Δmca1-AH e C76S/2/Δmca1-GH.

A Figura 39 mostra a foto de microscópio da linhagem C76S/2/Δmca1-GC. É possível observar células alongadas, células grandes, células disformes, também observadas no duplo mutante C76S/2/Δmca1 na Figura 38. A superexpressão de *CDC48* no duplo mutante não reverteu essa morfologia disforme. Entretanto, diferentemente do que foi visto no duplo mutante, no caso de C76S/2/Δmca1-GC não foram observadas partículas refringentes no interior das células.

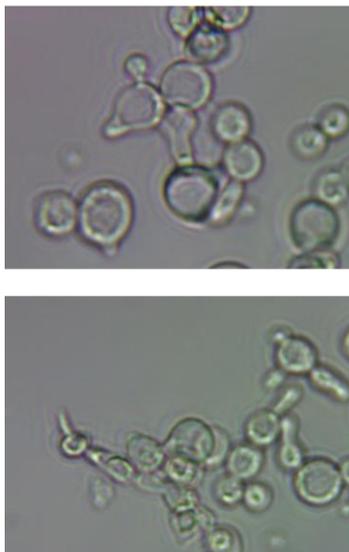
C76S/2/ Δ mca1-GC

Figura 39. Foto de microscópio com aumento de 400X para a linhagem C76S/2/ Δ mca1-GC.

Na Figura 40, comparam-se as linhagens C221S/2, C221S/2-AH e C221S/2-GH. A linhagem C221S/2 apresentou-se formando grandes aglomerados de células. A superexpressão de *HSP104* parece ter melhorado essa tendência. Com o promotor intermediário P_{ADH1} (linhagem C221S/2-AH), as células ainda se apresentam um pouco aglomeradas, porém muito menos que C221S/2. Também é possível observar estruturas alongadas. Com o promotor forte P_{GPD} (C221S/2-GH), as células apresentam uma morfologia muito mais usual, muito mais parecidas com as linhagens parentais.

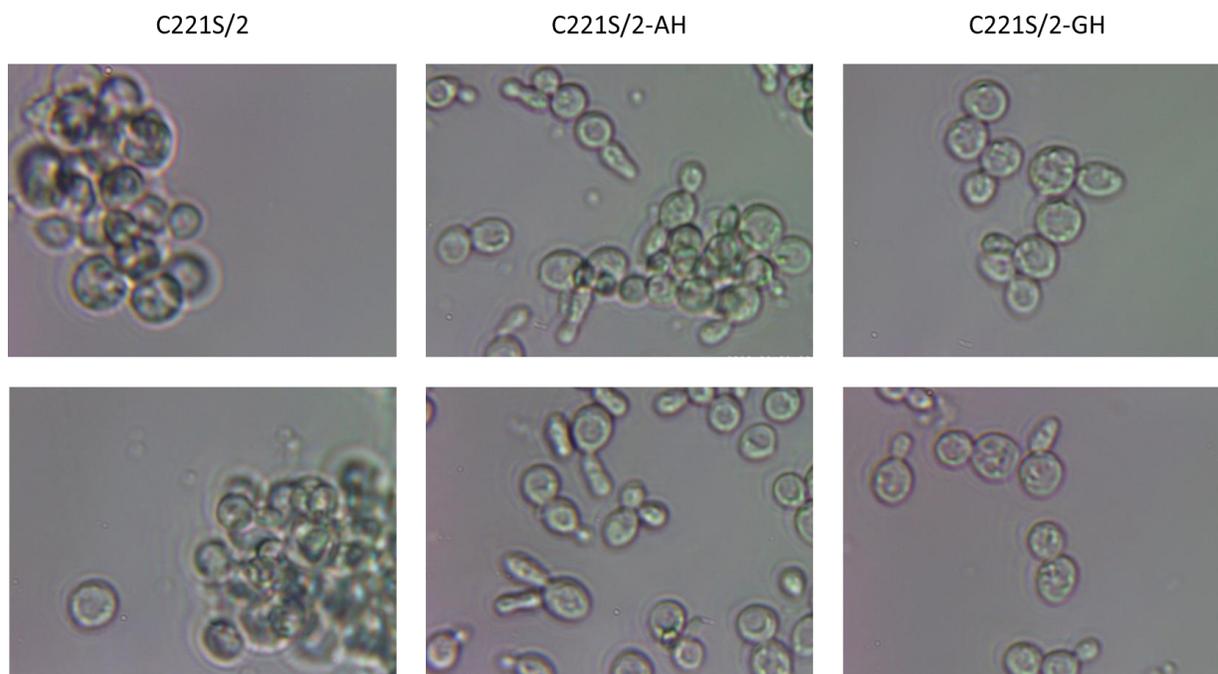


Figura 40. Foto de microscópio com aumento de 400X para as linhagens C221S/2, C221S/2-AH, C221S/2-GH.

A Figura 41 mostra o duplo mutante com a mutação de ponto $PUP2^{C221S}$. A primeira observação é que a inativação de *MCA1* já causa diferença grande: as morfologias de C221S/2 (Figura 40) e de C221S/2/ $\Delta mca1$ (Figura 41) são totalmente distintas. Enquanto C221S/2 se mostra totalmente aglomerada, C221S/2/ $\Delta mca1$ não apresenta essas grandes aglomerações, porém muitas das células apresentam 2 brotos simultaneamente. Antes de soltar um broto, já ocorre a formação de um segundo broto.

No caso de C76S/2 (células alongadas, parecidas com pseudo-hifas), a inativação de *MCA1* deixou as células com morfologia muito disforme e cheia de grânulos internos. Já no caso de C221S/2 (grandes aglomerados), a inativação de *MCA1* fez com que as células ficassem menos aderidas e aglomeradas. Como no caso de C221S/2 a câmara catalítica está mais aberta, favorecendo a atividade proteolítica do proteassomo, provavelmente não ter a metacaspase seja benéfico para que não haja ainda mais degradação proteica. Quanto à linhagem C76S/2, em que a atividade proteolítica é menor, já que a câmara catalítica está mais fechada, não ter a atividade protease da metacaspase deve ser prejudicial. Mas em ambos os casos, a superexpressão da

chaperona *HSP104* é benéfica em termos de morfologia, como pode ser observado na Figura 40 e na Figura 41.

A Figura 41 também apresenta fotos de microscopia das linhagens C221S/2/ Δ mca1-AH e C221S/2/ Δ mca1-GH, em que há superexpressão de *HSP104*. Com o promotor intermediário P_{ADH} , as células parecem maiores em tamanho que as células de C221S/2/ Δ mca1 e ainda é possível visualizar algumas com 2 brotos. Já com o promotor forte P_{GPD} , as células voltam a ter uma morfologia mais normal. Ou seja, o fenótipo anormal e aglomerado de C221S/2 é totalmente revertido com a inativação de *MCA1* simultaneamente com a superexpressão de *HSP104* sob controle de promotor forte. Vale notar que, ao passo que a inativação de *MCA1* contribuiu para menor aglomeração de células, a superexpressão de *HSP104* contribuiu para que não houvesse tendência a formação de mais de um broto ao mesmo tempo.

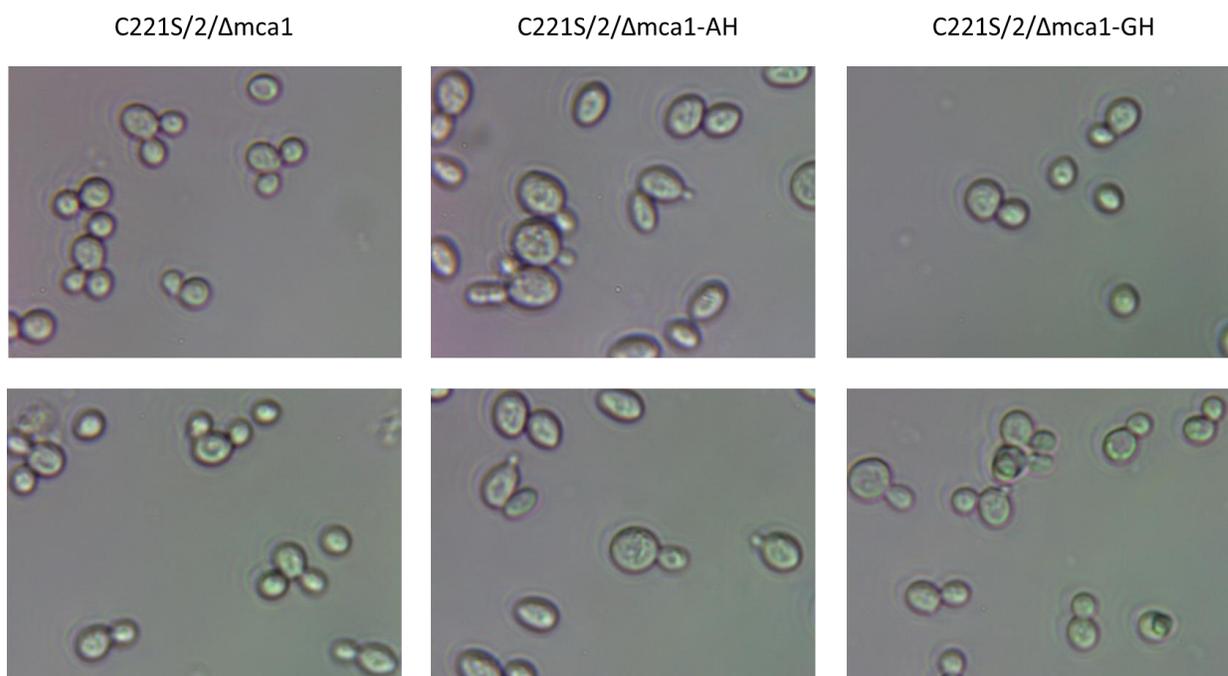


Figura 41. Foto de microscópio com aumento de 400X para as linhagens C221S/2/ Δ mca1 e com C221S/2/ Δ mca1-AH e C221S/2/ Δ mca1-GH.

4.8.3 Cinética em placa de poços

Os cultivos foram realizados em 150 μ L de meio líquido YPD a 30 °C em placa de 96 micropoços com medida de absorbância a 600 nm a cada 15 minutos em triplicata, conforme o Item 6.7. A Tabela 12 apresenta a média e o desvio padrão do $\mu_{\text{máx}}$ para cada linhagem. A Figura 42 e a Figura 43 apresentam gráfico de barras para esses mesmos dados, porém com indicações de diferenças estatísticas entre os valores de $\mu_{\text{máx}}$ das linhagens.

Tabela 12. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ (média da triplicada e desvio padrão) obtidos para as linhagens mutantes de proteassomo e metacaspase em cultivos realizados em meio YPD em placa de micropoços a 30°C.

Linhagem	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})
RJD1144	0,38 \pm 0,01
C76S/2	0,31 \pm 0,01
C76S/2-GH	0,32 \pm 0,01
C76S/2-GC	0,35 \pm 0,01
C76S/2/ Δ mca1	0,31 \pm 0,01
C76S/2/ Δ mca1-AH	0,34 \pm 0,02
C76S/2/ Δ mca1-GH	0,28 \pm 0,01
C76S/2/ Δ mca1-GC	0,31 \pm 0,01
C221S/2	0,37 \pm 0,01
C221S/2-AH	0,41 \pm 0,01
C221S/2-GH	0,37 \pm 0,01
C221S/2/ Δ mca1	0,42 \pm 0,01
C221S/2/ Δ mca1-AH	0,48 \pm 0,00
C221S/2/ Δ mca1-GH	0,42 \pm 0,01

A primeira análise que foi realizada é se houve diferença de $\mu_{\text{máx}}$ em relação a uma das linhagens parentais RJD1144, conforme a Figura 42. De fato, as linhagens são derivadas da RJD1144, mas não possuem o mesmo *background* genético que ela, pois são linhagens geradas por cruzamentos. Assim, a RJD1144 é apenas uma referência para comparação.

Todas as linhagens, com exceção de C221S/2, C221S/2-AH e C221S/2-GH apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ estatisticamente diferente de RJD1144. Todas as variantes $PUP2^{C76S}$ e $PUP2^{C76S}/\Delta mca1$ apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ menor que RJD1144 e as variantes $PUP2^{C221S}/\Delta mca1$ apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ maior que a RJD1144. De modo geral, em termos de $\mu_{\text{máx}}$, as linhagens com mutação $PUP2^{C221S}$ têm maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ que as linhagens com mutação $PUP2^{C221S}$. Leme (2016) observou maior crescimento para a linhagem C221S quando comparada a C76S e a RJD1144, indicando que o dado obtido nessa tese é compatível.

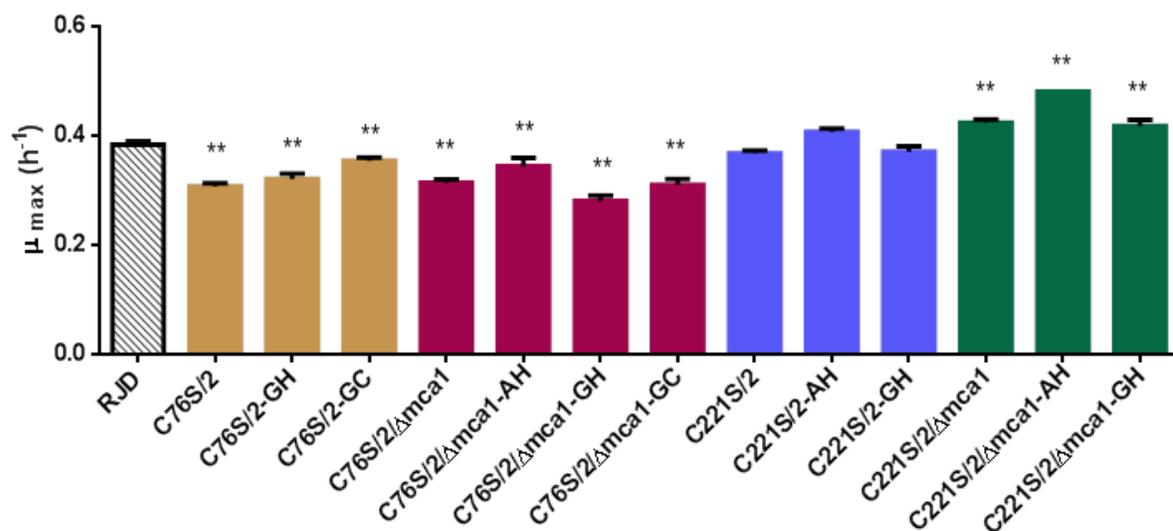


Figura 42. Velocidade específica máxima de crescimento para as linhagens mutantes de proteassomo e metacaspase. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes com um nível de significância de 0,01 em relação a linhagem RJD1144. Em bege são mostrados os dados para as variantes $PUP2^{C76S}$. Em lilás são mostrados os dados para as variantes $PUP2^{C76S}/\Delta mca1$. Em azul são mostrados os dados para as variantes $PUP2^{C221S}$. Em verde são mostrados os dados para as variantes $PUP2^{C221S}/\Delta mca1$.

Na Figura 43, analisam-se as diferenças entre linhagens em termos de $\mu_{\text{máx}}$. Não houve diferença entre os valores de $\mu_{\text{máx}}$ de C76S/2 e de C76S/2-GH, mas a linhagem C76S/2-GC apresentou $\mu_{\text{máx}}$ 13% maior que C76S/2, indicando que a superexpressão de *CDC48* (mas não de *HSP104*) causou aumento no $\mu_{\text{máx}}$. A análise microscópica também mostrou que a linhagem C76S/2-GC tem morfologia muito mais usual, de forma que a superexpressão de *CDC48* reverteu a morfologia alterada de C76S/2 (aspecto de um

“colar de contas”, células que não se soltam). Diferentemente do que ocorreu com C76S/2, a superexpressão de *CDC48* no duplo mutante C76S/2/ Δ mca1 não levou ao aumento de $\mu_{\text{máx}}$. Vale lembrar que, na análise microscópica, a linhagem C76S/2/ Δ mca1-GC apresentando morfologia muito alterada, com células disformes e grandes.

Não houve diferença significativa entre os valores de $\mu_{\text{máx}}$ de C76S/2 e C76S/2/ Δ mca1. Entre as variantes *PUP2*^{C76S}/ Δ mca1, apareceram as seguintes diferenças: com a superexpressão de *HSP104* com promotor de força intermediária P_{ADH} , o $\mu_{\text{máx}}$ foi 10% maior e com promotor forte P_{GPD} , o $\mu_{\text{máx}}$ foi 10% menor que em C76S/2/ Δ mca1. Esses dados são compatíveis com o que foi observado no ensaio de diluição seriada. Interessante frisar que *CDC48* causou aumento de $\mu_{\text{máx}}$ e melhora na morfologia de C76S/2 e que *HSP104* causou aumento de $\mu_{\text{máx}}$ e melhora na morfologia de C76S/2/ Δ mca1.

A linhagem C221S/S apresentou $\mu_{\text{máx}}$ 19% maior que C76S/2. E C221S/S/ Δ mca1 apresentou $\mu_{\text{máx}}$ 14% maior que C221S/S. De fato, já havia sido observado na análise microscópica que a deleção de *MCA1* melhorava o aspecto aglomerado da C221S/S. Também no ensaio de diluição seriada, houve maior formação de colônias no caso do duplo mutante C221S/2/ Δ mca1 do que C221S/S.

Quanto à superexpressão de *HSP104*, tanto para C221S/S quanto para o duplo mutante C221S/S/ Δ mca1, houve aumento de $\mu_{\text{máx}}$ com superexpressão de *HSP104* sob o comando o promotor intermediário P_{ADH} , mas não houve diferença significativa com o promotor P_{GPD} , o que também foi observado qualitativamente no ensaio de diluição seriada. Já a análise microscópica mostrou células com morfologias mais usuais com o promotor P_{GPD} do que para P_{ADH} , que apresenta células maiores e mais aglomeradas que no caso do P_{GPD} .

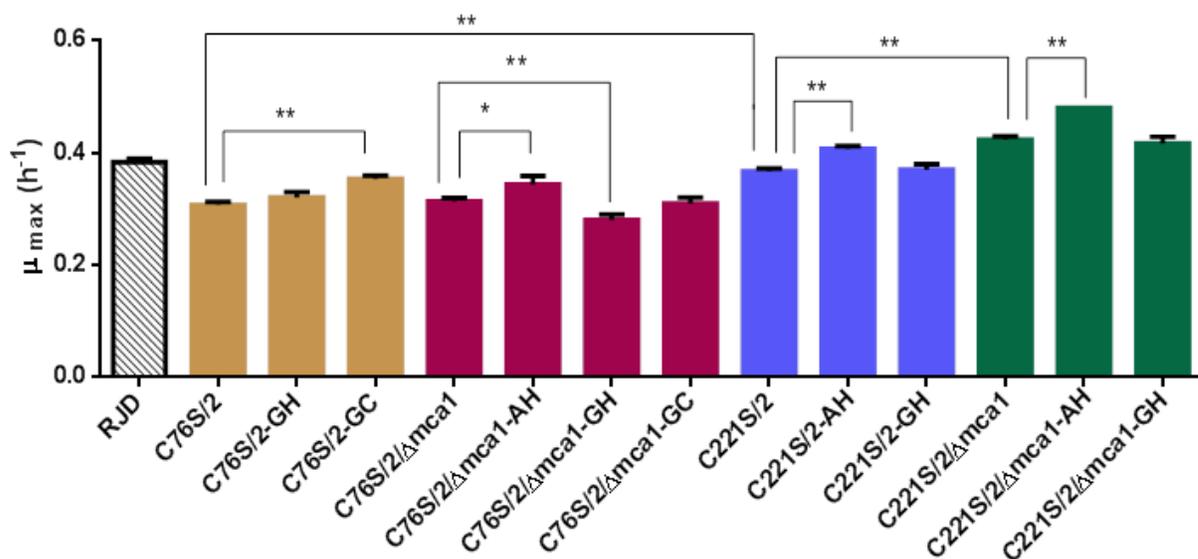


Figura 43. Velocidade específica máxima de crescimento para as linhagens mutantes de proteassomo e metacaspase. Dois asteriscos (**) indicam valores estatisticamente diferentes com um nível de significância de 0,01 entre linhagens e um asterisco (*), com nível de significância de 0,05. Em bege são mostrados os dados para as variantes PUP2^{C76S}. Em lilás são mostrados os dados para as variantes PUP2^{C76S/Δmca1}. Em azul são mostrados os dados para as variantes PUP2^{C221S}. Em verde são mostrados os dados para as variantes PUP2^{C221S/Δmca1}.

4.9 CONCLUSÕES

- A linhagem C76S/2 apresenta células com morfologia alterada, com aspecto mais alongado e com tendência a ficarem juntas, mostrando que mutação C76S no proteossomo 20S tem impacto sobre a morfologia celular.
- Com superexpressão de *HSP104* (linhagem C76S/2-GH) e *CDC48* (linhagem C76S/2-GC), parece que essa morfologia anormal é em parte revertida: as células têm aspecto mais arredondado e não se agregam tanto. Não houve diferença entre os $\mu_{\text{máx}}$ de C76S/2 e C76S/2-GH, mas a linhagem C76S/2-GC apresentou $\mu_{\text{máx}}$ 13% maior que C76S/2.
- O duplo mutante C76S/2/ Δ mca1 apresenta células com morfologia alterada e heterogênea, com células bem alongadas, que parecem pseudo-hifas; células grandes, células disformes e células com muitos grânulos refringentes internos
- A superexpressão de *HSP104* no duplo mutante C76S/2/ Δ mca1 reverteu em parte a morfologia anormal, provavelmente devido à atividade desagregadora de Hsp104.
- A superexpressão de *CDC48* não reverteu a morfologia alterada do duplo mutante C76S/2/ Δ mca1, nem causou aumento de $\mu_{\text{máx}}$.
- No caso de C76S/2, a inativação de *MCA1* deixou as células com morfologia muito disforme e com grânulos refringentes internos.
- Já no caso de C221S/2 (grandes aglomerados), a inativação de *MCA1* fez com que as células ficassem menos aderidas e aglomeradas. C221S/2/ Δ mca1 obteve $\mu_{\text{máx}}$ 14% maior que C221S/2.
- Todas as variantes *PUP2*^{C76S} e *PUP2*^{C76S}/ Δ mca1 apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ menor que a linhagem referência RJD1144 e as variantes *PUP2*^{C221S}/ Δ mca1 apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ maior que a RJD1144.
- As linhagens com mutação de ponto *PUP2*^{C221S} apresentam maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ que as linhagens com mutação *PUP2*^{C76S}.

- Quanto a diferenças de superexpressão de *HSP104* com diferentes promotores, observou-se que a superexpressão mais forte com promotor P_{GPD} resultou em células mais arredondadas, com uma aparente morfologia celular mais usual. Já em termo de $\mu_{m\acute{a}x}$, a superexpressão com promotor de força intermediária P_{ADH1} levou a maiores valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ do que com promotor P_{GPD} .
- Como algumas linhagens que contém superexpressão de *HSP104* e *CDC48* se mostraram positivas na reversão de alguns fenótipos das linhagens mutantes, isso corrobora para o fato de que os plasmídeos construídos geram proteínas ativas.

5 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Esse trabalho baseou-se em diferentes aspectos da superexpressão de *CDC48* e *HSP104*, chaperonas moleculares da classe das AAA⁺ ATPases na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para isso, foram construídos 4 plasmídeos integrativos de superexpressão do gene *HSP104*, utilizando os promotores P_{CYC1} , P_{ADH1} , P_{TEF} e P_{GPD} e 5 plasmídeos de superexpressão de *CDC48*, um epissomal com o promotor P_{GPD} e 4 integrativos com os promotores P_{CYC1} , P_{ADH1} , P_{TEF} e P_{GPD} .

Inicialmente esses plasmídeos foram transformados na linhagem CEN.PK113-5D como uma tentativa de alterar a conservação de energia livre em *S. cerevisiae*, através da superexpressão de ATPases, de forma a aumentar o rendimento da fermentação alcoólica. Entretanto, nenhuma das linhagens construídas apresentou maior rendimento em relação à linhagem referência. Apesar de ser um resultado negativo, trata-se de uma tentativa científica e pode ser útil como registro para futuras tentativas, com outras ATPases, por exemplo.

Na segunda etapa do trabalho, estudaram-se as linhagens geradas frente a alguns estresses típicos da produção brasileira de etanol, no caso, osmótico, ácido e térmico. Como Hsp104 é reconhecida como uma das principais chaperonas que contribuem para a tolerância a vários tipos de estresse em levedura e Cdc48 é uma chaperona responsável por desmontar complexos proteicos, envolvida no processo de degradação proteica, também poderia ser interessante estudá-las nesse contexto de estresse celular.

As condições que mais afetaram negativamente o crescimento para todas as linhagens foram NaCl 1 M e pH 2,5. Ao contrário do esperado, não se observou valores maiores de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) para linhagens superexpressando *HSP104*, uma *Heat Shock Protein*. A 40 °C, a *S. cerevisiae* LV-EpGC (superexpressão do gene *CDC48* em vetor multicópias e promotor forte P_{GPD}) apresentou $\mu_{m\acute{a}x}$ 17 % maior que a linhagem referência, indicando uma maior tolerância dessa linhagem ao estresse térmico. Essa característica pode ser muito vantajosa industrialmente, já que apenas as linhagens mais bem adaptadas ao processo industrial e seus estresses acabam persistindo durante a safra. Como trabalho futuro, seria

interessante cultivar essa linhagem em outras condições (por exemplo, 37°C, meio com sacarose como fonte de carbono, cultivo em biorreator) e também superexpressar *CDC48* em uma linhagem industrial.

Na terceira etapa do trabalho, estudou-se a superexpressão de *HSP104* e *CDC48* em linhagens com desarranjo no controle de qualidade de proteínas intracelulares, causado em linhagens mutantes de proteassomo e metacaspase. Tais mutantes apresentam células com morfologia bastante alterada. A superexpressão de *CDC48* ou *HSP104* mostrou-se positiva, revertendo em parte a morfologia alterada dos mutantes. Esse resultado parece coerente, já que as chaperonas moleculares são conhecidas por agirem como primeira linha de defesa contra a formação de proteínas incorretamente enoveladas e agregados proteicos.

Essa reversão de fenótipo indica que: (1) os plasmídeos gerados resultam em proteínas de fato ativas; (2) uma maior expressão dessas chaperonas parece compensar, pelo menos em parte, deficiências do proteassomo, constituinte da principal via de degradação de proteínas intracelulares em eucariotos. Como continuação, poderia ser interessante realizar outras caracterizações com as linhagens como, por exemplo, análise do tempo de vida cronológico e replicativo e análise de agregados proteicos.

6 DEMAIS MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 INICIADORES

Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Lista de iniciadores utilizados neste trabalho

Nome	Sequência (5' =>3')	Sítio de restrição	Finalidade
CYC1-1	ggcgagctcgttggttgga tcaag	SacI	Iniciador <i>forward</i> para amplificação do promotor de CYC1 de <i>S. cerevisiae</i> e inserção do sítio de restrição SacI
CYC1-2	ggcggatcctattaatttagt gtgtatt	BamHI	Iniciador <i>reverse</i> para amplificação do promotor de CYC1 de <i>S. cerevisiae</i> e inserção do sítio de restrição BamHI
CYC1-3	ggcaagcttacaggcccttt cctttgctc	HindIII	Iniciador <i>forward</i> para amplificação do terminador de CYC1 de <i>S. cerevisiae</i> e inserção do sítio de restrição HindIII
CYC1-4	gtgtaaactgcgaagcttgc a	HindIII	Iniciador <i>reverse</i> para amplificação do terminador de CYC1 de <i>S. cerevisiae</i> (já possui o sítio de restrição HindIII)
ADH1-1	ggcgagctctaaaacaagaa gagggtgact	SacI	Iniciador <i>forward</i> para amplificação do promotor de ADH1 de <i>S. cerevisiae</i> e inserção do sítio de restrição SacI
ADH1-2	ggcggatcctgtatatgagata gttgattgatgc	BamHI	Iniciador <i>reverse</i> para amplificação do promotor de ADH1 de <i>S. cerevisiae</i> e inserção do sítio de restrição BamHI
HSP104-1	ggcggatccatgaacgacca aacgcaattt	BamHI	Iniciador <i>forward</i> para amplificação do gene HSP104 de <i>S. cerevisiae</i> (mais 100 pb downstream) e inserção do sítio de restrição BamHI
HSP104-2	ggcctgcaggtgtcaagttca attaacaa	PstI	Iniciador <i>reverse</i> para amplificação do gene HSP104 de <i>S. cerevisiae</i> (mais 100 pb downstream) e inserção do sítio de restrição PstI
HSP104-2- HA	ggcctgcagtaacgctagtc tgggacgtcgatgggtaact aggatcatcatcaat	PstI	Iniciador <i>reverse</i> para amplificação do gene HSP104 de <i>S. cerevisiae</i> fusionada ao epítipo HA e inserção do sítio de restrição PstI
CDC48-1	ggcggatccatgggtgaaga acataaa	BamHI	Iniciador <i>forward</i> para amplificação do gene CDC48 de <i>S. cerevisiae</i> (mais 100 pb downstream) e inserção do sítio de restrição BamHI
CDC48-2	ggcctgcagatataaaaagg gccataa	PstI	Iniciador <i>reverse</i> para amplificação do gene HSP104 de <i>S. cerevisiae</i> (mais 100 pb downstream) e inserção do sítio de restrição PstI
YEP351-R	gggtaacgccagggtttccc	-	Iniciador utilizado para confirmar a integração dos plasmídeos construídos nesse trabalho em levedura
YEP351-F	ggaattgtgagcggataac	-	Iniciador utilizado para confirmar a integração do plasmídeo YIp352 em levedura
URA3-F	tttcaggatccataaagctttc a	-	Iniciador utilizado para confirmar a integração do plasmídeo YIp352 em levedura

6.2 MEIOS DE CULTIVO

O meio YPD é composto por 20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona e 10 g/L extrato de levedura. O meio LB (Luria-Bertani) é composto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl e 1 g/L de glicose. Para seleção de células de *E. coli* contendo plasmídeos, adicionou-se o antibiótico ampicilina 100 µg/mL ao meio LB. O meio YNB é composto por 6,7 g/L de *Yeast Nitrogen Base* sem aminoácidos (BD) e 20 g/L de glicose, suplementado, quando necessário, com os requerimentos auxotróficos: adenina e uracila 20 mg/L, histidina, triptofano e leucina 10 mg/L. O meio YPEG é composto por 20 g/L de peptona, 10 g/L extrato de levedura, 30 g/L de glicerol e 20 g/L de etanol. Para meio sólido, foram adicionados 20 g/L de ágar bacteriológico.

Para cultivos em frasco agitado, foi utilizado, além do meio YPD, o meio sintético Verduyn cuja composição é a descrita por Verduyn *et al.* (1992) e Luttk *et al.* (2000). Este meio contém, por litro: ureia, 2,3 g; KH₂PO₄, 3 g; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g; K₂SO₄, 6,6 g. Além desses nutrientes, o meio é suplementando com os seguintes elementos traço para conter, por litro: EDTA, 15 mg; ZnSO₄.7H₂O, 4,5 mg; CoCl₂.6H₂O, 0,3 mg; MnCl₂.4H₂O, 0,84 mg; CuSO₄.5H₂O, 0,3 mg; CaCl₂.2H₂O, 4,5 mg; FeSO₄.7H₂O, 3 mg; NaMoO₄.2H₂O, 0,4 mg; H₃BO₃, 1 mg; KI, 0,1 mg. Adicionaram-se também ao meio, as seguintes vitaminas para conter, por litro: biotina, 0,05 mg; pantotenato de cálcio, 1 mg; ácido nicotínico, 1 mg; inositol, 25 mg; tiamina-HCl, 1 mg; piridoxina-HCl, 1 mg; e ácido para-aminobenzóico, 0,2 mg. Por fim, adicionaram-se 5 g/L ou 10 g/L de glicose (fonte de carbono).

6.3 CULTIVOS

Para *E. coli*, os cultivos em meio sólido LB foram realizados a 37 °C *overnight*. Em meio líquido LB, os cultivos foram realizados a 37 °C por 2 horas sob agitação de 140 rpm. Para *S. cerevisiae*, os cultivos em meio sólido YPD ou YNB foram incubados a 30 °C por 2 dias.

Para cultivos de levedura em meio Verduyn ou YPD líquidos foi usado o sistema experimental descrito no Item 2.9.5. Não foram ajustados os valores iniciais de pH dos

meios. O meio Verduyn tem um pH inicial em torno de 5,0 e o meio YPD tem um pH inicial em torno de 6,0. Para o cultivo com a linhagem auxotrófica (AUX) em meio Verduyn, foram adicionados 150 mg/L de uracila.

6.4 ESTERILIZAÇÃO

Para os ensaios em placa e em frasco, todos os reagentes, meios de cultura e materiais foram esterilizados por calor úmido em autoclave, por 20 min a 121 °C, com exceção de YNB, suplementos auxotróficos e ampicilina, que foram esterilizados por filtração em membranas estéreis Millex 0,22 µm (Millipore). No caso do meio Verduyn, disselram-se os sais em 90% do volume final, que era autoclavado. A glicose, a ureia, as vitaminas e os elementos-traço eram dissolvidos em 10% do volume, que era filtrado em membrana, conforme indicado acima.

6.5 CÁLCULO DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Os parâmetros fisiológicos foram calculados conforme Schmidell *et al.*, 2001. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) corresponde ao coeficiente angular da reta ajustada ao trecho linear do gráfico do logaritmo neperiano da concentração celular (absorbância) em função do tempo. O fator de conversão de glicose a etanol ($Y_{E/S}$) é o módulo do coeficiente angular da reta do gráfico da concentração de etanol em função da concentração de glicose, somente considerando os pontos pertencentes à fase exponencial de crescimento. O fator de conversão de glicose a biomassa ($Y_{X/S}$) é o módulo do coeficiente angular da reta do gráfico da concentração de biomassa em função da concentração de glicose, somente considerando os pontos pertencentes à fase exponencial de crescimento. O fator de conversão de glicose a glicerol ($Y_{GLY/S}$) é o módulo do coeficiente angular da reta do gráfico da concentração de glicerol em função da concentração de glicose, somente considerando os pontos pertencentes à fase exponencial de crescimento. As equações das retas foram obtidas por regressão linear, usando o *software Microsoft Excel*.

6.6 ENSAIOS DE DILUIÇÃO SERIADA EM PLACA

Foram realizados ensaios de diluição seriada como feitos por Barros *et al.* (2011). Inocularam-se células de placa contendo meio YPD, com alça de platina, em 10 mL de meio YPD líquido, incubando os frascos a 30 °C e 150 rpm, *overnight*. Então, a suspensão celular foi centrifugada a 2500 rpm por 5 min, de forma a baixar as células, que foram lavadas com água destilada estéril. Ressuspenderam-se as células em água destilada estéril, de forma a se obter 1 mL de uma suspensão celular com absorbância a 600 nm igual a 1. A partir dessa suspensão, 4 diluições sucessivas (cada vez diluindo 10 vezes) foram realizadas em água destilada estéril.

Assim, a capacidade de crescimento em placa contendo meio YPD foi analisada plaqueando-se 3 µL de suspensão celular com valores de absorbância a 600 nm de 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001, de forma sequencial. As placas foram incubadas a 30 °C ou 37 °C.

6.7 CULTIVOS EM PLACAS DE MICROPOÇOS

Para fazer o inóculo, as linhagens foram cultivadas em frasco agitado *overnight* em 10 mL de meio YPD líquido a 30 °C. Depois, cada poço da placa recebia 150 µL de meio de cultura fresco e 5 µL da cultura diluída de forma a obter uma absorbância a 600 nm em torno de 0,15. A placa era então incubada na temperatura desejada no leitor de placas, um espectrofotômetro Synergy H1 (Biotek, USA). Foram utilizadas placas de 96 micropoços de fundo chato com tampa (modelo 655901) da Greiner (Oberösterreich, Austria). As leituras de absorbância a 600 nm foram realizadas a cada 15 min. A agitação foi orbital por 30 s, antes de cada medida de absorbância.

6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores dos parâmetros fisiológicos foram comparados estatisticamente usando Análise de Variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey com intervalo de

confiança de 95% ou 99% no *software Graphpad Prism* (GraphPad Software, Inc., California) para verificar se os valores apresentam diferenças estatisticamente significativas.

6.9 ESQUEMA PARA CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS DE LEVEDURA

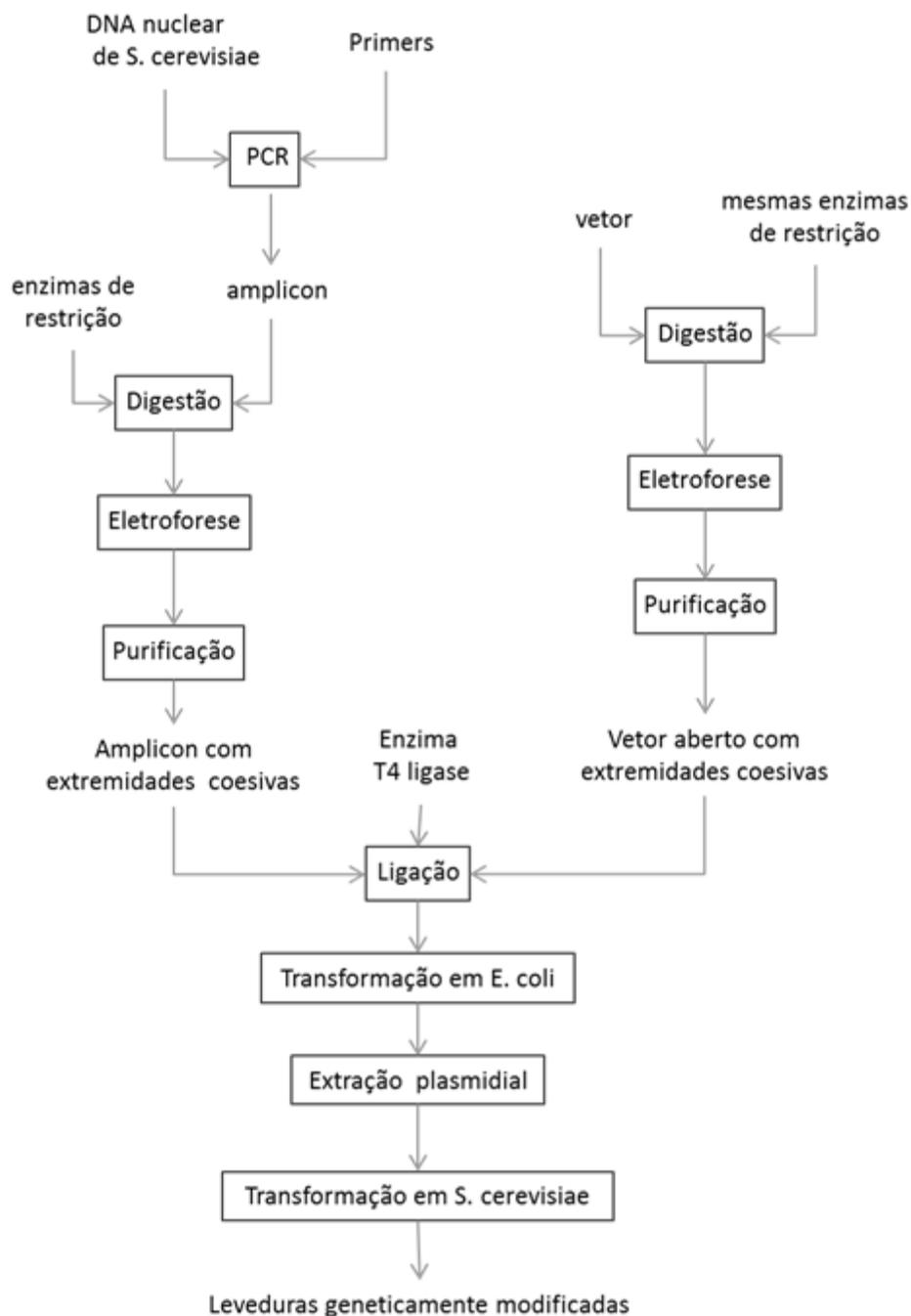


Figura 44. Fluxograma para construção das linhagens de levedura.

6.10 CONFIRMAÇÃO DE CONSTRUÇÃO DE VETOR E CONFIRMAÇÃO DE INTREGRAÇÃO DO VETOR NO GENOMA DE LEVEDURA

Para verificar se os promotores, genes e terminadores manipulados nesse trabalho encontravam-se de fato nas bactérias e leveduras, utilizou-se a seguinte estratégia: em *E. coli*, realizou-se extração de plasmídeos, que foram verificados com algumas digestões confirmatórias e enviados para sequenciamento (Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo); em *S. cerevisiae* foi feita PCR de colônia com iniciadores adequados e eletroforese para verificar o tamanho do *amplicon*.

Para PCR de colônia de levedura, foi utilizado o seguinte protocolo: diluiu-se a colônia em 10 µL de NaOH 0,02 M, incubou-se a 95 °C por 2 min, centrifugou-se por 1 minuto na velocidade máxima e adicionou-se 2 µL do sobrenadante à reação de PCR.

6.11 MÉTODOS GERAIS PARA MANIPULAÇÃO DE DNA

Transformação de *E. coli* com DNA exógeno, preparação de bactérias competentes pelo método de CaCl₂, recuperação de fragmentos de DNA de gel de agarose por eletroeluição e purificação de DNA (produto de PCR e de digestão) pelo método de fenol/clorofórmio foram realizadas conforme Sambrook *et al.* (2001) e estão descritas abaixo.

As eletroforeses para confirmação de PCR, para confirmar digestão e para separar fragmentos de DNA foram realizadas em gel de agarose (1,2%) com tampão de corrida TBE 1X (10,8 g/L de Tris base, 5,5 g/L de ácido bórico e 0,93 g/L de Na₂EDTA). As corridas foram realizadas a 120 mV por 15 min para fragmentos pequenos (menores de 700 pb) e 30-60 min para fragmentos maiores. Os fragmentos de DNA foram observados corando-se o gel com brometo de etídeo e visualizados sob radiação UV (253 nm).

A purificação de DNA (produto de PCR e de digestão) foi realizada pelo método de fenol/clorofórmio. Ao microtubo que continha o que se desejava purificar, adicionou-se 1 volume de fenol saturado, homogeneizando. Centrifugou-se a 16000 g por 3 min à

temperatura ambiente. Coletou-se a fase aquosa (fase superior), transferindo-a para um novo microtubo. Adicionou-se 1 volume de clorofórmio e álcool isoamílico 24:1, homogeneizando. Centrifugou-se a 16000 g por 3 min à temperatura ambiente. Coletou-se a fase aquosa (fase superior) e adicionou-se 1/20 volumes de NaCl 5 M, misturou-se e adicionou-se 2,5 volumes de etanol 100%, homogeneizando por inversão. O microtubo foi incubado por 5 min em gelo seco ou 30 min (no mínimo) a -20 °C. Centrifugou-se a 16000 g por 5 min à temperatura ambiente. Lavou-se o precipitado formado duas vezes com etanol 80%. Para eliminar o excesso de etanol, basta bater algumas vezes o microtubo em um papel absorvente. Centrifugou-se a vácuo por 10 min. Suspendeu-se em água ultrapura (20 µL para produto de PCR, 12 µL para transformação de bactérias, 7 µL para purificação de gel de agarose).

A purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose foi feita por eletroeluição. O fragmento de gel foi inserido dentro de uma membrana de diálise, na qual também se adicionou cerca de 100 µL de TBE 1/10, sem deixar que ficassem bolhas de ar. Aplicou-se uma diferença de potencial de 400 V por 10 min. Retirou-se o fragmento de gel e massageou-se a membrana para soltar o DNA. Transferiu-se o volume da membrana para um microtubo. Depois, foi feita a purificação por fenol/clorofórmio.

A extração de plasmídeos de *E. coli* foi feita com o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, EUA).

A amplificação do DNA para verificação das clonagens, assim como para a obtenção dos genes, promotores e terminadores de interesse com os sítios de restrição desejados foi realizada através de PCR. As reações de amplificação consistiram de 1 µL de Taq DNA polimerase (Promega Go Taq) com 20 µL do seu respectivo tampão 5X (que já continha MgCl₂), cerca de 20 ng de DNA molde, 8 µL de dNTPs 2,5 mM, 5 µL de cada iniciador 10 pmol/µL, e completou-se com água ultrapura para um volume final de 100 µL. A amplificação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguidos de 35 ciclos compostos por: desnaturação (1 minuto a 94°C), hibridização (1 minuto a 57 °C) e extensão (1 minuto por kb a 72 °C). Depois dos 35 ciclos, havia uma etapa final de extensão de 7 min a 72 °C.

As transformações em *E. coli* foram feitas com bactérias competentes. Para preparar as bactérias competentes, seguiu-se o seguinte procedimento: inoculou-se uma

alçada de *E. coli* RR1 de uma placa fresca em 100 mL de meio LB líquido; incubou-se a 37 °C por 2 horas com agitação de 150 rpm; transferiram-se as células para um tubo de 50 mL estéril; centrifugou-se a 4000 rpm por 10 min a 4°C; ressuspendeu-se gentilmente com a pipeta em 10 mL de CaCl₂ 10 mM gelado e estéril; centrifugou-se a 4000 rpm por 10 min a 4°C; ressuspendeu-se em 10 mL de solução de CaCl₂ 30 mM, Tris 10 mM pH 7,5 gelado e estéril; incubou-se em gelo por 30 min; centrifugou-se a 4000 rpm por 10 min a 4°C; ressuspendeu-se em 10 mL de solução de CaCl₂ 30 mM, Tris 10 mM pH 7,5 gelado e estéril. As bactérias competentes podiam ser mantidas no gelo até no máximo 4 horas.

Para transformar *E. coli*, transferiram-se 200 µL da suspensão de bactérias competentes ao microtubo que contém o plasmídeo ou a mistura de ligação. Incubou-se em gelo por 5-10 min. Promoveu-se, então, um choque térmico, incubando o microtubo a 42 °C por 2 min. Adicionou-se 1 mL de meio LB ao microtubo, homogeneizando por inversão. Incubou-se o microtubo a 37 °C por 15-30 min. Centrifugou-se a 16000 g por 5 min a temperatura ambiente e descartou-se o sobrenadante. Ressuspenderam-se as bactérias no resto de líquido que sobrou no microtubo e plaqueou-se com a alça de Drigalski em meio LB sólido com ampicilina. Incubou-se a placa a 37 °C *overnight*. O meio LB com ampicilina continha o antibiótico ampicilina, o que levaria as bactérias à morte. Entretanto, todos os plasmídeos utilizados nesse trabalho possuem o gene de resistência à ampicilina, conferindo às bactérias que os incorporarem a capacidade de sobreviver e se multiplicar. Para fazer uma varredura de clones positivos, realizou-se o seguinte procedimento: extração plasmidial, digestão do plasmídeo e eletroforese para verificar.

Transformações de levedura foram baseadas no procedimento descrito por Schiestl *et al.* (1989). Coletou-se uma alçada de leveduras (da placa fresca ou do estoque) e inoculou-se em 10 mL de meio YPD. Incubou-se a 30°C com agitação de 140 rpm *overnight*. Então, transferiu-se 500 µL dessa suspensão de leveduras para 10 mL de meio YPD fresco e incubou-se por 4 horas a 30 °C e agitação de 140 rpm. Transferiu-se essa suspensão de leveduras para um tubo de 15 mL estéril e centrifugou-se a 2500 rpm, 21 °C por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 5 mL de TEL (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, acetato de lítio 0,1 M), ressuspendendo as células. Centrifugou-se a 2500 rpm, 21°C, 5 min e descartou-se o sobrenadante, ressuspendendo as células em

0,2 mL de TEL. Aliquotaram-se 100 μ L dessa suspensão por microtubo. Em cada microtubo, adicionaram-se 5 μ L de DNA carreador de esperma de salmão desnaturado (10 mg/mL) na parede superior do tubo e, sobre essa gota, adicionaram-se 5 μ L do plasmídeo (1-10 ug). Deslocou-se a gota para o fundo do tubo, misturando a suspensão de células gentilmente. Incubou-se à temperatura ambiente por 15 min. Adicionaram-se 700 μ L de polietilenoglicol 40% (preparado em solução de TEL), pipetando com cuidado 2 vezes para homogeneizar, e incubou-se por 40 min à temperatura ambiente. Incubaram-se os microtubos a 42 °C por 10 min. Adicionaram-se 700 μ L de TE (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM) e centrifugou-se a 16000 g por 1 minuto à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendendo as células no resto de líquido que sobrou no tubo e plaqueou-se com a alça de Drigalski em meio YNB sólido. Incubou-se a placa a 30°C de 2 a 3 dias. Esse meio não continha uracila, o que levaria as linhagens de levedura usadas para transformação à morte, já que eram linhagens auxotrófica para uracila (ou seja, não eram capazes de sintetizar essa base nitrogenada). Entretanto, todos os plasmídeos utilizados nesse trabalho possuem o gene *URA3*, conferindo às leveduras que os incorporaram a capacidade de sintetizar uracila, sobreviver e se multiplicar.

As digestões foram feitas utilizando enzimas de restrição da *New England Biolabs* e incubadas a 37 °C por uma 1h. As ligações foram feitas com a enzima T4 DNA Ligase (fornecidas e produzidas por Alexander Tzagoloff, Columbia University) e incubadas à temperatura ambiente por uma hora.

6.12 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA POSTERIOR ENSAIO DE *IMMUNOBLOT*

A extração de proteínas foi baseada no método utilizado por Yonashiro *et al.*, 2016. Primeiramente, preparou-se o tampão de lise. 1 mL de tampão continha: 10 uL de Tris-HCl 1M pH7,5, 28 uL de NaCl 5M, 1,5 uL de MgCl₂ 1 M, 40 uL de inibidor de protease (1 comprimido de 50X da Roche diluído em 1 mL de água), 2 uL de NP40 10% e 918 uL de água.

Inocularam-se as leveduras em 10 mL de meio YPD líquido e incubou-se a 30°C em agitador rotativo *overnight*. Transferiu-se 0,5 mL dessa cultura para 10 mL de meio

YPD fresco, que ficou incubado em agitador rotativo a 30°C até que absorvência a 600 nm em torno de 0,8 fosse atingida. Centrifugou-se a 2500 rpm por 5 min à temperatura ambiente. O precipitado foi então ressuspenso em 200 uL de tampão de lise gelado. Essa mistura foi transferida para um microtubo contendo 200 uL de pérolas de vidro que foi submetido à agitação em vórtex por 15 min a 4 °C. Coletou-se o sobrenadante, que foi centrifugado a 2800 g a 4 °C por 5 min. O sobrenadante corresponde ao extrato proteico, que foi quantificado logo em seguida e depois armazenado a -80°C.

6.13 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951). Inicialmente, preparou-se a solução de cobre. Para 50 mL dessa solução, são adicionados: 0,5 mL de tartarato 2 %, 0,5 mL de CuSO₄ 1% e 49 mL de NaOH 0,1 M Na₂CO₃ 2%. Em cada tubo de ensaio, adicionaram-se 600 µL de água, 10 µL do extrato proteico e 3 mL de solução de cobre, misturando uma vez por inversão. Incubou-se à temperatura ambiente por 10 min. Adicionaram-se 300 uL de mistura Folin/água 1:1, misturando uma vez por inversão. Incubou-se a 90 °C por 2 min. A reação foi interrompida incubando-se os tubos em gelo. Mediram-se as absorvências a 750 nm. Como “branco”, adicionou-se tudo com exceção dos 10 uL de extrato proteico. As quantificações são feitas em duplicada. A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino.

6.14 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÃO DESNATURANTE (SDS-PAGE) E IMMUNOBLOT

As eletroforeses em gel de poliacrilamida em condição desnaturante foram realizadas conforme Laemmli (1970). As porcentagens de acrilamida dos géis de separação e de empacotamento foram de 12% e 6%, respectivamente. O gel de separação foi preparado com 3,75 mL de Tris-Cl 3M (pH 8.8), 12 mL de acrilamida-bis 30:0.8, 0.3 mL de SDS 10%, 0,1 mL de persulfato de amônio 10%, 25 µL TEMED e 13,8 mL de água, para um volume final de 30 mL. Para o gel de empacotamento, utilizaram-se 1,25 mL de Tris-Cl₃ M (pH 6,8); 2 mL de acrilamida-bis 30:0.8, 0,1 mL de SDS 10%,

0,05 mL de persulfato de amônio 10%, 15 µL TEMED e 6,6 mL de água, para um volume final de 10 mL.

200 µg de proteínas foram misturados com 12,5 µL de tampão 4xL (2 mL de Tris-HCl 1 M pH 6,8, 4 mL de SDS 10%, 4 mL de glicerol, 0,4 mL de mercaptoetanol; 0,01% e 0,01% de azul brilhante), 0,5 µL de PMSF 200 mM e água para um volume final de 50 µL. As eletroforeses são realizadas a 160 V em tampão 1X ETB (Tris 3,03%; glicina 14,4%; SDS1%).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o sistema de transferência semi-seco: colocou-se o gel de poliacrilamida em contato com uma membrana de nitrocelulose, colocando duas folhas de papel absorvente, um acima e um abaixo, embebidos em solução de WTB (glicina 1,437%, Tris 0,3%; metanol 20%). A transferência foi realizada em 100 mA por 30 min. Então, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução Ponceau (Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%, ácido sulfosalicílico 3%), sendo possível observar se as proteínas foram de fato transferidas. A membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado 5% durante por 1 h em agitador gangorra, seguida de incubação com o anticorpo primário (1:1000) por 1 hora no agitador. A membrana foi então lavada três vezes com solução de NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 0,1%, cada vez por 10 min em agitador e em seguida incubada com o anticorpo secundário (1:5000), *overnight* a 4 °C no agitador. Por fim, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com solução de NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 0,1%, cada vez por 10 min no agitador. Os complexos antígeno-anticorpo foram visualizados através da exposição da membrana em um filme fotográfico.

7 REFERÊNCIAS

ALBERS, E., Larsson, C. A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 36:1085–1091, 2009.

ALVES, D. M. G. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica.** 2000. 118 p. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista – Unesp, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2000.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C., LOPES, M. L. Evolution of Ethanol production in Brazil, in Distilled Spirits – Tradition and Innovation. **Nottingham Univ. Press**, UK, 1(1):143-148, 2004.

AMORIM, H. V., LEÃO, R. M. Fermentação Alcoólica – ciência e tecnologia. **Fermentec**, Piracicaba, 448p, ISBN 8599011-0104, 2005.

ANDRIETTA, M. G. S., ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – Brazil, 30 years of Proalcool. **Int Sugar J**, 109(1299):195-200, 2007.

ASSIMON, V. A., GILLIES, A. T., RAUCH, J. N., GESTWICKI, J. E. Hsp70 protein complexes as drug targets. **Curr Pharm Des**, 19: 404–417, 2013.

ATTFIELD, P. V. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**, 15(13):1351-1357, 1997.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in Molecular Biology.** Boston: Publishing Associates and Wiley-Interscience. Harvard Medical School, 1989.

BAEK, G. H.; CHENG, H.; CHOE, V.; BAO, X.; SHAO, J.; LUO, S.; RAO, H. *CDC48*: A Swiss Army Knife of Cell Biology. **Journal of Amino Acids**, Volume 2013, Article ID 183421, 2013.

BARROS, M. H., RAK, M., PAULELA, J. A., TZAGOLOFF, A. Characterization of Gtf1p, the connector subunit of yeast mitochondrial tRNA-dependent amidotransferase. **J. Biol. Chem.** 286, 32937–32947, 2011.

BASSO, L. C., AMORIM, H. V., OLIVEIRA, A. J., LOPES, M. L. Yeast selection for fuel Ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, 8(7):1155-63, 2008

BASSO, L. C., ROSA, C. A. **Sugar cane for potable and fuel Ethanol.** In: WorlMSide Distilled Spirits Conference - New Horizons: energy, environment and enlightenment. Walker GM and Hughes PS (eds). Nottingham: Nottingham University Press, p.1-7, 2010.

BASSO, L. C., BASSO, T. O., ROCHA, S. N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. **INTECH Open Access Publisher**, 5:85-100, 2011.

BASSO, T. O. **Melhoramento da fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva**. 2011. 137p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BASSO, T. O., DE KOK, S., DARIO, M., DO ESPIRITO-SANTO, J. C., MÜLLER, G., SCHLÖLG, P. S., SILVA, C. P., TONSO, A., DARAN, J. M., GOMBERT, A. K., VAN MARIS, A. J., PRONK, J. T., STAMBUK, B. U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *S. cerevisiae* for improved Ethanol yield. **Metabolic Engineering**, 13, 694-703, 2011.

BEATO, F. B., BERGDAHL, B., ROSA, C. A., FORSTER, J., GOMBERT, A. K. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Brazilian biomes: new insights into biodiversity and industrial applications. **Fems Yeast Res.**, 16(7), 2016.

BETTIGA, M., CALZARI, L., ORLANDI, I., ALBERGHINA, L., VAI, M. Involvement of the yeast metacaspase Yca1 in *ubp10Δ*-programmed cell death. **FEMS Yeast Res.**, 5(2):141-7, 2004.

BIRNBOIM, H. C.; DOLLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, 7(6), 1513-1523, 1979.

BUCHBERGER, A. Roles of *CDC48* in regulated protein degradation in yeast. **Subcellular Biochemistry**, 66, 195–222, 2013.

CHITI, F., DOBSON, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. **Annu Rev Biochem.**, 75:333-66, 2006.

CHIVA, R.; LÓPEZ-MALO, M.; SALVADÓ, Z.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Analysis of low temperature-induced genes (LTIG) in wine yeast during alcoholic fermentation. **FEMS**, 12 (7), 831-43, 2012.

CHOPRA, R., V. M. SHARMA, AND K. GANESAN. Elevated growth of *S. cerevisiae* null mutants on glucose is an artifact of nonmatching auxotrophies of mutant and reference strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 65, 2267–2268, 1999.

CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. John Wiley & Sons, Inc., 2008.

DAI, R. M.; LI, C. C. H. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin- proteasome degradation. **Nature Cell Biology**, 3(8), 740–744, 2001.

DARAN-LAPUJADE, P., DARAN, J. M., LUTTIK, M. A., ALMERING, M. J., PRONK, J. T., KÖTTER. P. An atypical *PMR2* locus is responsible for hypersensitivity to sodium and

lithium cations in the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D. **FEMS Yeast Res.**, 9(5):789-92, 2009.

VILCHEZ, D., SAEZ, I., DILLIN, A. The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. **Nat Commun.**, 5:5659, 2014.

DAY, M. Yeast petites and small colony variants: for everything there is a season. **Prion**, 7(6):457-63, 2013.

DELLA-BIANCA, B.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K.. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel Ethanol industry? **Appl Microbiol Biotechnol.** 97(3), 979-91, 2013.

DELLA-BIANCA, B.; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel Ethanol industry. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 104(6), 1083-95, 2013.

DING, W. X., YIN, X. M. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. **Autophagy**, 4(2):141-50, 2008.

DOYLE, S. M., WICKNER, S. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. **Trends Biochem Sci**, 34: 40–48, 2009.

DUJON, B. The yeast genome project: what did we learn? **Trends Genet.** 12, 263- 270, 1996.

EPE – EMPRESA DE PLANEJAMENTO ENERGÉTICO. Balanço Energético Nacional 2015. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2015.pdf> Acesso em: 19/10/2016.

FERREIRA, L. V., AMORIM, H. V., BASSO, L. C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 19(10): 29-32, 1999.

FINK, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. **Folding and Design**, 3(1):R9–R23, 1998.

FOURY, F. Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. **The Journal of Biological Chemistry**, 264, 20552–20560, 1989.

GALLAGHER, P.S., CLOWES CANDADAI, S.V., GARDNER, R.G. The requirement for Cdc48/p97 in nuclear protein quality control degradation depends on the substrate and correlates with substrate insolubility. **J. Cell Sci.**, 127, 1980–1991, 2014.

GALLOWAY, J. H. **The Sugar Cane Industry: An Historical Geography from Its Origins to 1914**. Cambridge University Press, 1989.

GANCEDO, C., GANCEDO, J., M. & SOLSA, A. Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. **European Journal of Biochemistry** 5, 165- 172, 1968.

GANCEDO, J. M. Yeast Carbon Catabolite Repression. **Microbiology and molecular biology reviews**, 334–361, 1998.

GHAEMMAGHAMI, S.; HUH, W. K.; BOWER, K.; HOWSON, R. W.; BELLE, A.; DEPHOURE, N.; O'SHEA, E. K.; WEISSMAN, J. S. Global analysis of protein expression in yeast. **Nature**, 425, 737–741, 2003.

GIETZ, R. D.; SUGINO, A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. **Gene**, 74, 527–534, 1988.

GOFFEAU, A., BARRELL, B. G., BUSSEY, H., DAVIS, R. W., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J. D., JACQ, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E. J., MEWES, H. W., MURAKAMI, Y., PHILIPPSSEN, P., TETTELIN, H., OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, 274, 546-567, 1996.

GOMBERT, A. K., VAN MARIS, A. J. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 33, 81-6, 2015.

GRABLY, M. R.; STANHILL, A.; TELL, O.; ENGELBERG, D. HSF and Msn2/4p can exclusively or cooperatively activate the yeast *HSP104* gene. **Mol Micro- biol**, 44, 21–35, 2002.

GRIMMINGER-MARQUARDT, V.; LASHUEL, H. Structure and Function of the Molecular Chaperone *HSP104* from Yeast. **Biopolymers**, 93(3), 252-276, 2009.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-560, 1983.

HATTENDORF, D. A., LINDQUIST, S. L. Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. **EMBO J.**, 21(1-2): 12–21, 2002.

HEMION, C., FLAMMER, J., NEUTZNER, A. Quality control of oxidatively damaged mitochondrial proteins is mediated by p97 and the proteasome. **Free Radic. Biol. Med.** 75, 121–128, 2014.

HILL, J. E.; MYERS, A. M.; KOERNER, T. J.; TZAGOLOFF, A. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. **Yeast**, 2(3):163-7, 1986.

HILL, S. M., HAO, X., LIU, B., NYSTRÖM, T. Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**, 344(6190):1389-92, 2014.

HILL, S. M., NYSTRÖM, T. The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger. **Bioessays**, 37(5):525-31, 2015.

HSIEH, M.T., CHEN, R. H. Cdc48 and cofactors Npl4-Ufd1 are important for G1 progression during heat stress by maintaining cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One.**, 6(4):e18988, 2011.

HUGOT, E. **Manual da Engenharia Açucareira**. V. 1. São Paulo: Editora Mestre Jou, 1969.

HOLM, A. K.; BLANK, L. M.; OLDIGES, M.; SCHMID, A.; SOLEM, C.; JENSEN, P. R.; VEMURI, G. N. Metabolic and Transcriptional Response to Cofactor Perturbations in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, 285 (23), 17498–17506, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA. Tecnologia e Inovação desde 1921. Disponível em: <http://www.int.gov.br/historico>. Acesso em: 01/03/2016.

IVORRA, C., PÉREZ-ORTÍN, J. E., DEL OLMO, M. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. **Biotechnol Bioeng.**, 64(6):698-708, 1999.

IWATA, A., RILEY, B. E., JOHNSTON, J. A., KOPITO, R. R. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. **J Biol Chem.**, 280(48):40282-92, 2005.

JOHNSTON, J. A., WARD, C. L., KOPITO, R. R. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. **J Cell Biol**, 143: 1883–1898, 1998.

KAKKAR, V., MEISTER-BROEKEMA, M., MINOIA, M., CARRA, S., KAMPINGA, H. H. Barcoding heat shock proteins to human diseases: looking beyond the heat shock response. **Dis Model Mech**, 7:421–434, 2014.

KAMPINGA, H. H., BERGINK, S. Heat shock proteins as potential targets for protective strategies in neurodegeneration. **Lancet Neurol.**, 15(7):748-59, 2016.

KIM, J., P. ALIZADEH, T. HARDING, A. HEFNER-GRAVINK, AND D. J. KLIONSKY. Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing, and Ethanol shock: potential commercial applications. **Appl. Environ. Microbiol.** 62,1563–1569, 1996.

KLUCKEN, J., SHIN, Y., MASLIAH, E., HYMAN, B. T., MCLEAN, P.J. Hsp70 reduces alpha-synuclein aggregation and toxicity. **J Biol Chem**, 279: 25497–25502, 2004.

KOEBMANN, B. J.; WESTERHOFF, V. H.; SNOEP, J. L.; NILSSON, D.; JENSEN, P. R. The Glycolytic Flux in *Escherichia coli* Is Controlled by the Demand for ATP. **Journal of Bacteriology**, 184 (14), 3909–3916, 2002.

KOPP, F., HENDIL, K. B., DAHLMANN, B., KRISTENSEN, P., SOBEK, A., UERKVITZ, W. Subunit arrangement in the human 20S proteasome. **Proc. Natl Acad Sci USA**, 94:2939-2944, 1997.

KUBOTA, H. Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival. **J Biochem**, 146: 609-616, 2009.

LABBADIA, J., CUNLIFFE, H., WEISS, A., KATSYUBA, E., SATHASIVAM, K., SEREDENINA, T., WOODMAN, B., MOUSSAOUI, S., FRENTZEL, S., LUTHI-CARTER, R., PAGANETTI, P., BATES, G. P. Altered chromatin architecture underlies progressive impairment of the heat shock response in mouse models of Huntington disease. **J Clin Invest**, 121: 3306–3319, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680–685, 1970.

LEE, R. E. C., BRUNETTE, S., PUENTE, L. G., MEGENEY, L. A. Metacaspase Yca1 is required for clearance of insoluble protein aggregates. **Proc Natl Acad Sci USA**, 107(30): 13348–13353, 2010

LEME, J. M. M. **Mutação sítio-específica de cisteínas glutationiladas na subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: implicações no metabolismo de proteínas oxidadas e na longevidade celular.** 2016. 133p.Tese (doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, 193(1):265-75, 1951.

LUTTIK, M. A. H., KÖTTER, P., SALOMONS, F. A., VAN DER KLEI, I. J., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T. The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. **J Bacteriol**, 182(24):7007–7013, 2000.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., BENDER, K. S., BUCKLEY, D. H., STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MATTOO, R. U., GOLOUBINOFF, P. Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. **Cell Mol Life Sci.**, 71(17):3311-25, 2014.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o Combustível do Brasil**. Ed. 3. Editora Agronômica Ceres Ltda., São Paulo, 1980.

MENSONIDES, F. I., SCHUURMANS, J. M., TEIXEIRA DE MATTOS, M. J., HELLINGWERF, K. J., BRUL, S. The metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to continuous heat stress. **Mol Biol Rep**, 29(1-2):103-6, 2002.

MILLER, S. B., MOGK, A., BUKAU, B. Spatially organized aggregation of misfolded proteins as cellular stress defense strategy. **J Mol Biol**, 427:1564–1574, 2015.

MUMBERG, D.; MÜLLER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, 156 (1), 119-122, 1995.

NAVAS, M. A.; CERDAN, S.; GANCEDO, J. M. Futile cycles in *S. cerevisiae* strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90, 1290-1294, 1993.

NEEF, D. W., TURSKI, M. L., THIELE, D. J. Modulation of heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target for small molecule intervention in neurodegenerative disease. **PLoS Biol.**, 8(1):e1000291, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Savier, 2010.

NIZHNIKOV, A. A., ANTONETS, K. S., BONDAREV, S. A., INGE-VECHTOMOV, S. G., DERKATCH, I. L. Prions, amyloids, and RNA: Pieces of a puzzle. **Prion**, 10(3):182-206, 2016.

NOLLEN, E. A., SALOMONS, F. A., BRUNSTING, J. F., VAN DER WANT, J. J., SIBON, O. C., KAMPINGA, H. H. Dynamic changes in the localization of thermally unfolded nuclear proteins associated with chaperone-dependent protection. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98: 12038–12043, 2001.

NOVA CANA. Disponível em: <https://www.novacana.com/etanol/fabricacao>. Acesso em: 25/02/16.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Consensus document on compositional considerations for new 1217 varieties of sugarcane (*Saccharum ssp. hybrids*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants**. OECD, Environment, health and safety publications. Series on the safety of novel foods and feeds N°23. 2011. Disponível em: <http://www.oecd.org/science/biotrack/48962816.pdf>. Acesso em: 24/10/16

OGURA, T., WILKINSON, A. J. AAA⁺ superfamily ATPases: common structure--diverse function. **Genes Cells**, 6(7):575-97, 2001.

OHARA, E. **Caracterização da tolerância ao estresse oxidativo, capacidade de remoção de proteínas oxidadas e a expectativa de vida de linhagens da levedura *S. cerevisiae* com mutações sítio-específicas na subunidade $\alpha 5$ do proteassomo 20S:**

Implicações na prevenção de agregação proteica. 2015. Dissertação (mestrado), Instituto de Ciências Biomédicas da São Paulo, São Paulo, 2015.

OLSSON, L.; NIELSEN J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **TIBTECH** v.15, p.517-522, 1997.

PATEL, S., LATTERICH, M. The AAA team: related ATPases with diverse functions. **Trends Cell Biol.**, 8(2):65-71, 1998.

PARSELL, D. A., KOWAL, A. S., SINGER, M. A., LINDQUIST, S. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. **Nature**, 372: 475–478, 1994.

PRONK, J. T. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. **Applied and environmental microbiology**, 68(5), 2095–2100, 2002.

RAMÍREZ-ALVARADO, M.; MERKEL, J; S.; REGAN, L. A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation *in vitro*. **PNAS**, 97 (16), 8979–8984, 2000.

REINSTEIN, E., CIECHANOVER, A. Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. **Ann Intern Med.**, 145(9):676-84, 2006.

RFA – RENEWABLE FUELS ASSOCIATION World Fuel Ethanol Production. Disponível em: <http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics>. Acesso em: 19/10/16.

RO, D. K., PARADISE, E. M., OUELLET, M., FISHER, K. J., NEWMAN, K. L., NDUNGU, J. M., HO, K. A., EACHUS, R. A., HAM, T. S., KIRBY, J., CHANG, M. C. Y., WITHERS, S. T., SHIBA, Y., SARPONG, R., KEASLING, J. D. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. **Nature**, 440, 940-943, 2006.

ROCK, K. L., GRAMM, C., ROTHSTEIN, L., CLARK, K., STEIN, R., DICK, L., HWANG, D., GOLDBERG, A. L. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. **Cell**, 78:761-77, 1994.

RODRIGUES, F.; CORTE-REAL, M.; LEO, C.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Oxygen requirements of the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in synthetic and complex media. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 2123–2128, 2001.

ROTHSTEIN, R. J. One step gene disruption in yeast. **Methods Enzymol.** 101, 202-211, 1983.

SGD. SACCHAROMYCES GENOME DATABASE. <http://www.yeastgenome.org/> acessado em 06/08/2014.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, Third Edition (3 Volume Set), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANCHEZ, Y.; LINDQUIST, S. L. *HSP104* required for induced thermotolerance. **Science**, 248, 1112–1115, 1990.

SCHAUPP, A.; MARCINOWSKI, M.; GRIMMINGER, V.; BÖSL, B.; WALTER, S. Processing of Proteins by the Molecular Chaperone *HSP104*. **J. Mol. Biol.** 370 (4), 674–686, 2007.

SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R.D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. **Curr Genet.** 16(5-6):339-46, 1989.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SEMKIV, M. V.; DMYTRUK, K. V.; ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Increased Ethanol accumulation from glucose via reduction of ATP level in a recombinant strain of *S. cerevisiae* overexpressing alkaline Phosphatase. **BMC Biotechnology**, 14(42), 2014.

SERIAL CLONER. Disponível em: http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html. Acesso em: 19/10/2016.

SHERMAN, F. (1998). *An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*, 1998.

SHORTER, J. Hsp104: a weapon to combat diverse neurodegenerative disorders. **Neurosignals**, 16: 63–74, 2008.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic Biol Med.**, 27(9-10):916-21, 1999.

SILVA, G. M., NETTO, L. E., SIMÕES, V., SANTOS, L. F., GOZZO, F. C., DEMASI, M. A., OLIVEIRA, C. L., BICEV, R. N., KLITZKE, C. F., SOGAYAR, M. C., DEMASI, M. Redox control of 20S proteasome gating. **Antioxid Redox Signal**, 16:1183-1194, 2012.

SIQUEIRA, G. A.; CASTELHANO, L. F.; GOMBERT, A. K. O oxigênio influi no crescimento de *S. cerevisiae* em glicose? **Anais do XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Foz do Iguaçu, Brasil, 2013.

SUMNER, E. R., AVERY, S. V. Phenotypic heterogeneity: differential stress resistance among individual cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, 148(2):345-51, 2002.

TANAKA, K. The proteasome: Overview of structure and functions. **Proc Jpn Acad, Ser B**, 85:12-36, 2009.

TORRENTE, M. P., SHORTER, J. (2006). The metazoan protein disaggregase and amyloid depolymerase system: Hsp110, Hsp70, Hsp40, and small heat shock proteins. **Ann Intern Med.**, 145(9):676-84, 2006.

TRINKLEIN, N. D., CHEN, W. C., KINGSTON, R. E., MYERS, R. M. Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation. **Cell Stress Chaperones**, 9(1):21-8, 2004.

TSIATSIANI, L., VAN BREUSEGEM, F., GALLOIS, P., ZAVIALOV, A., LAM, E., BOZHKOVA, P. V. Metacaspases. **Cell Death Differ.**, 18(8):1279-88, 2011.

UNICA. Histórico de produção e moagem. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br>. Acesso em: 19/10/16.

VACHER, C., GARCIA-OROZ, L., RUBINSZTEIN, D. C. Overexpression of yeast hsp104 reduces polyglutamine aggregation and prolongs survival of a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Hum Mol Genet**, 14: 3425–3433, 2005.

VELOURS, J.P.; SOUBANNIER, P.; SPANNAGEL, V.; SPANNAGEL, C.; VAILLIER, J.; ARSELIN, G.; GRAVES, P. V. Organisation of the yeast ATP synthase F₀: a study based on cysteine mutants, thiol modification and cross-linking reagents. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1458, 443-456, 2000.

VERDUYN, C., POSTMA, E., SCHEFFERS, W. A., VAN DIJKEN, J. P. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **J Gen Microbiol.**, 136(3):395-403, 1990.

VERDUYN, C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 60, 325–353, 1991.

VERDUYN, C., POSTMA, E., SCHEFFERS, W. A., VAN DIJKEN, J. P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, 8(7):501-17, 1992.

VIANNA, C.R.; SILVA, C.L.; NEVES, M.J.; ROSA, C.A. *S. cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and Ethanol resistance. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 93:205–217, 2008.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. John Willey & Sons Ltd - England, 1998.

WEGRZYN, R. D.; BAPAT, K.; NEWNAM, G. P.; ZINK, A. D.; CHERNOFF, Y. O. Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. **Mol Cell Biol.**, 21(14):4656-69, 2001.

WILLIAMSON, D. H.; MAIOUDAS, T. G.; WILKIE, D. Induction of the cytoplasmic petite mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by the antibacterial antibiotics erythromycin and chloramphenicol. **Molecular & General Genetics**, 111, 209–223, 1971.

WHITE, S. R.; LAURING, B. AAA+ ATPases: Achieving Diversity of Function with Conserved Machinery. **Traffic**, 8 (12): 1657–1667, 2007.

XIA, D., TANG, W. K., YE, Y. Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p. **Gene**, 583(1):64-77, 2016.

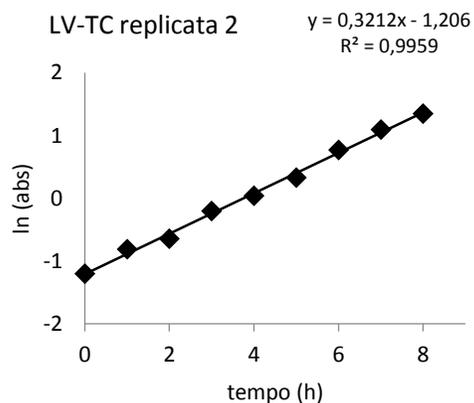
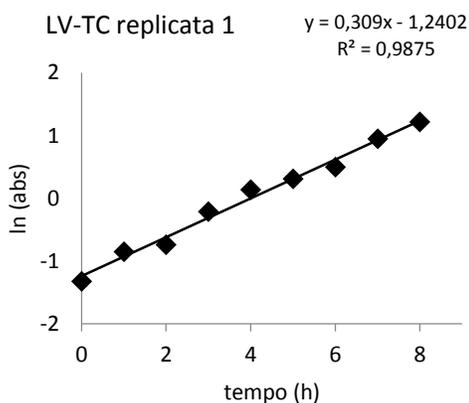
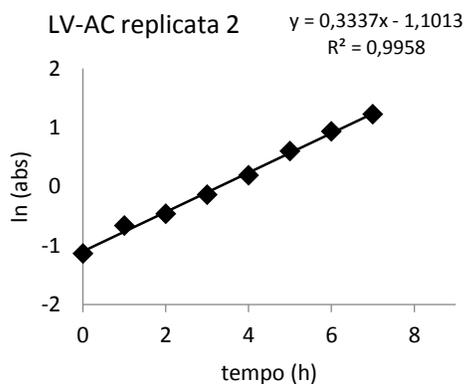
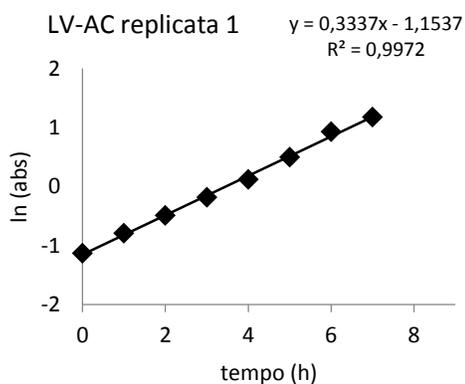
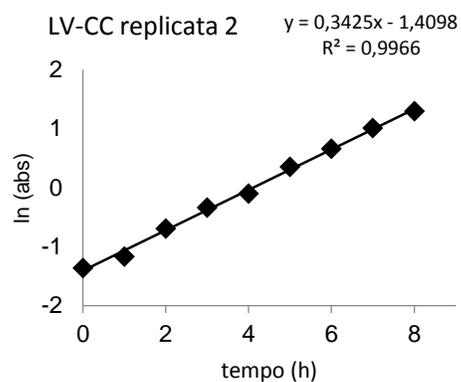
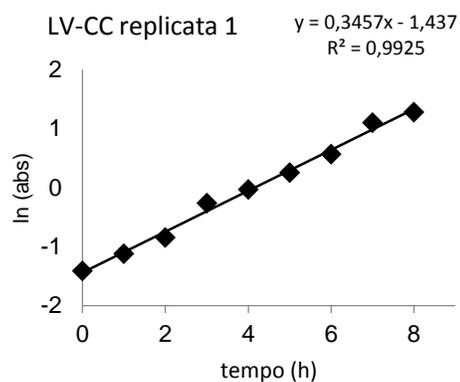
YE, Y.; MEYER, H. H.; RAPOPORT, T. A. The AAA ATPase *CDC48/p97* and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. **Nature**, 414(6864), 652–656, 2001.

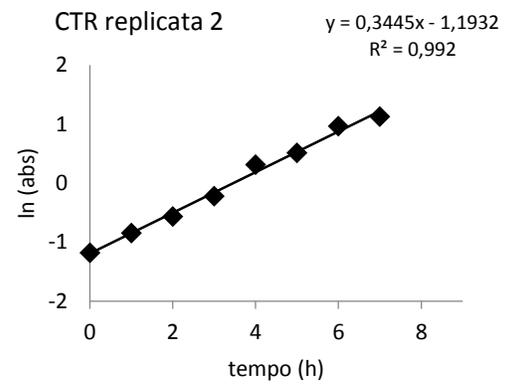
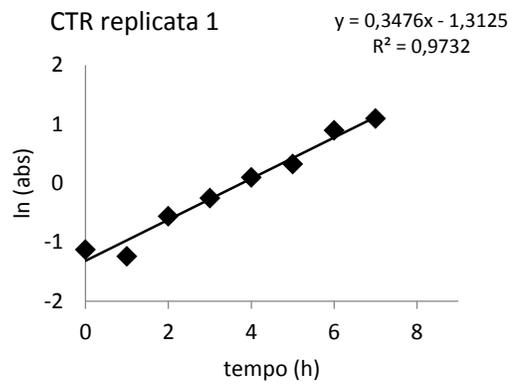
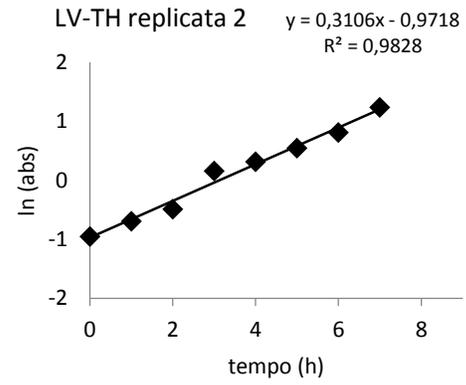
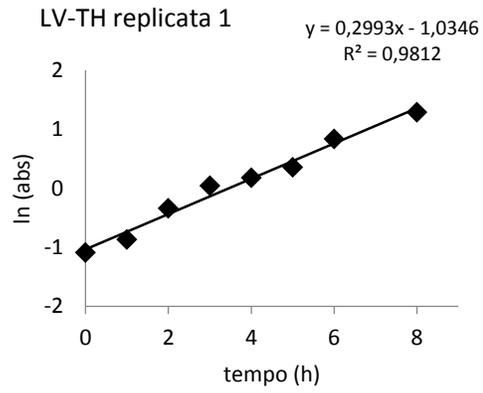
YONASHIRO, R., TAHARA, E. B., BENGTSON, M. H., KHOKHRINA, M., LORENZ, H., CHEN, K. C., KIGOSHI-TANSHO, Y., SAVAS, J. N., YATES, J. R., KAY, S. A., CRAIG, E. A., MOGK, A., BUKAU, B., JOAZEIRO, C. A. The Rqc2/Tae2 subunit of the ribosome-associated quality control (RQC) complex marks ribosome-stalled nascent polypeptide chains for aggregation. **Elife**, 5:e11794, 2016

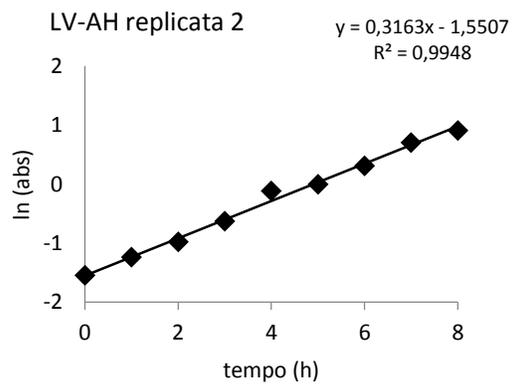
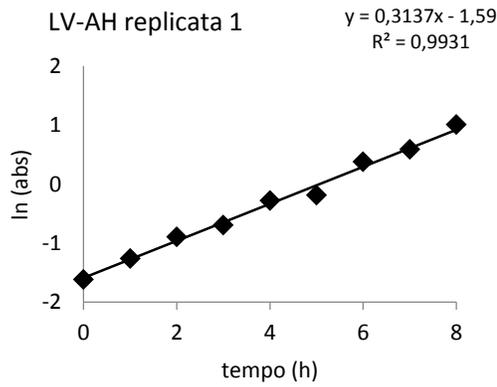
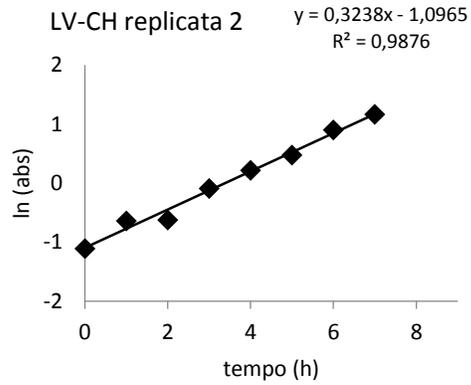
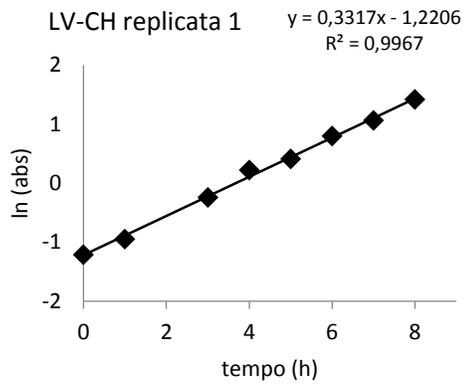
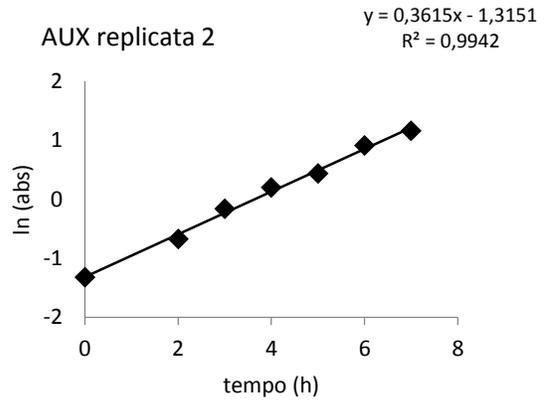
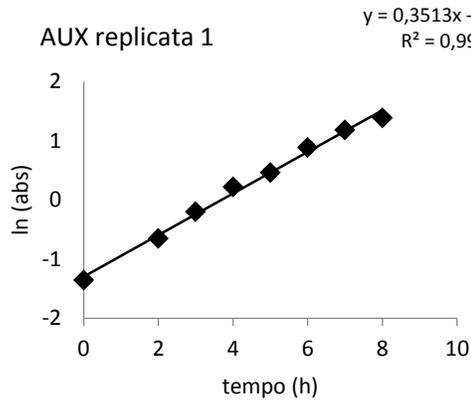
ZAMPOL, M. A., BUSSO, C., GOMES, F., FERREIRA-JUNIOR, J. R., TZAGOLOFF, A., BARROS, M. H. Over-expression of *coq10* in *saccharomyces cerevisiae* inhibits mitochondrial respiration. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 402, 82-87, 2010.

8 APÊNDICE A

Curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm em função do tempo para as linhagens LV-CC, LV-AC, LV-TC, LV-CH, LV-AH, LV-TH, CTR, AUX. Os cultivos foram realizados em duplicata, em frasco agitado a 30°C em meio Verduyn com 5 g/L iniciais de glicose.

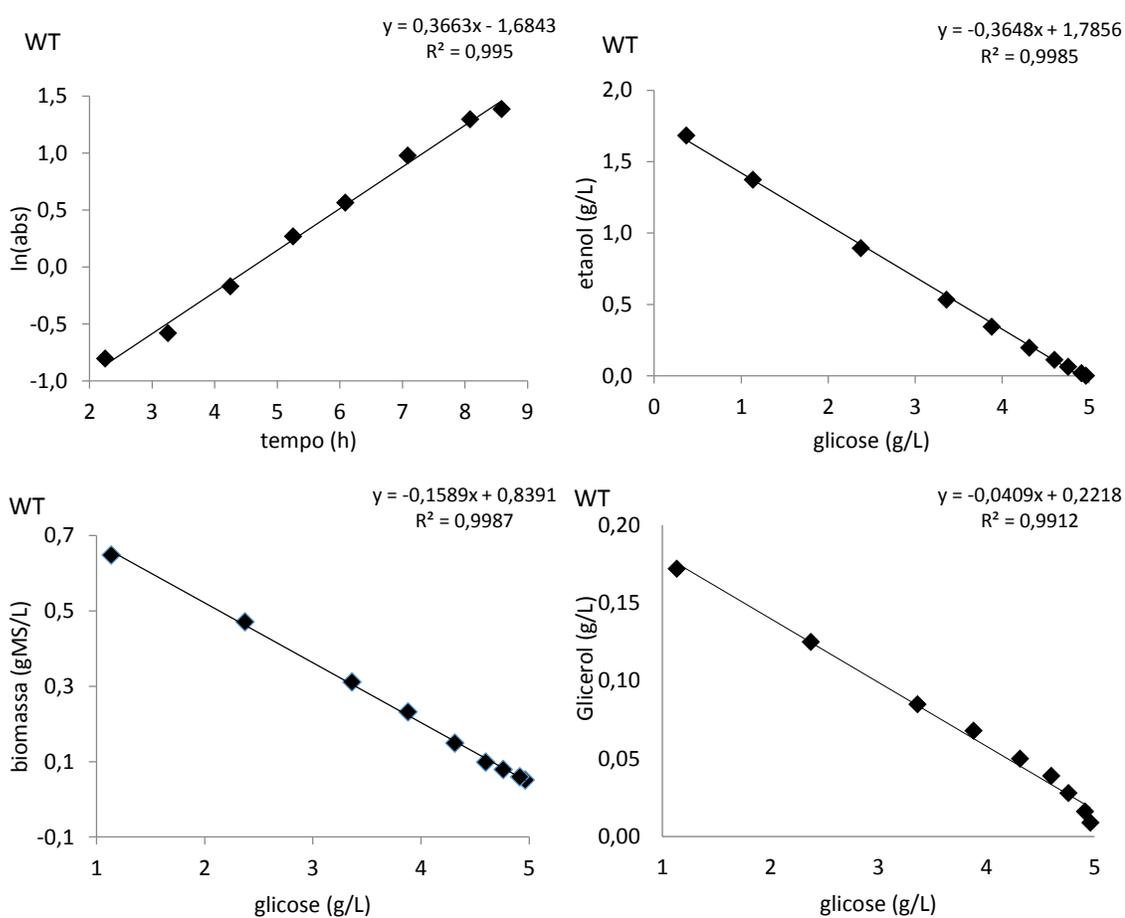


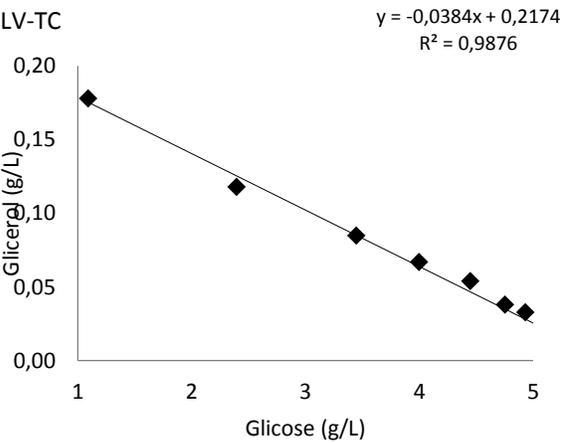
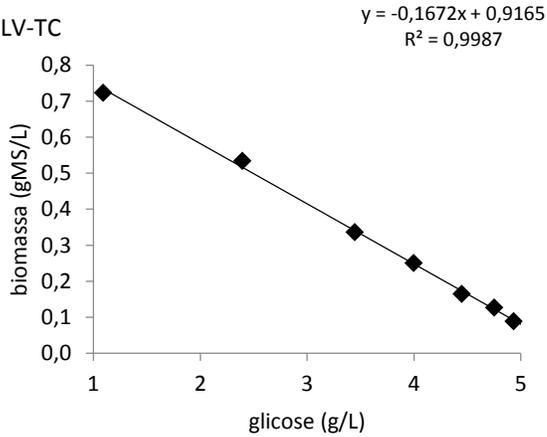
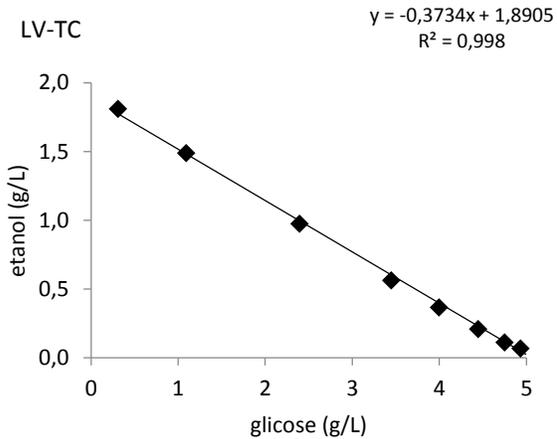
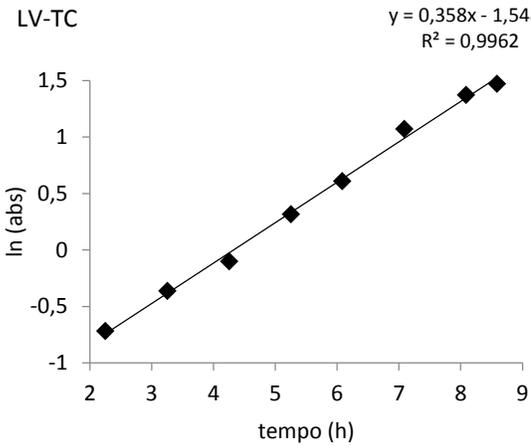




9 APÊNDICE B

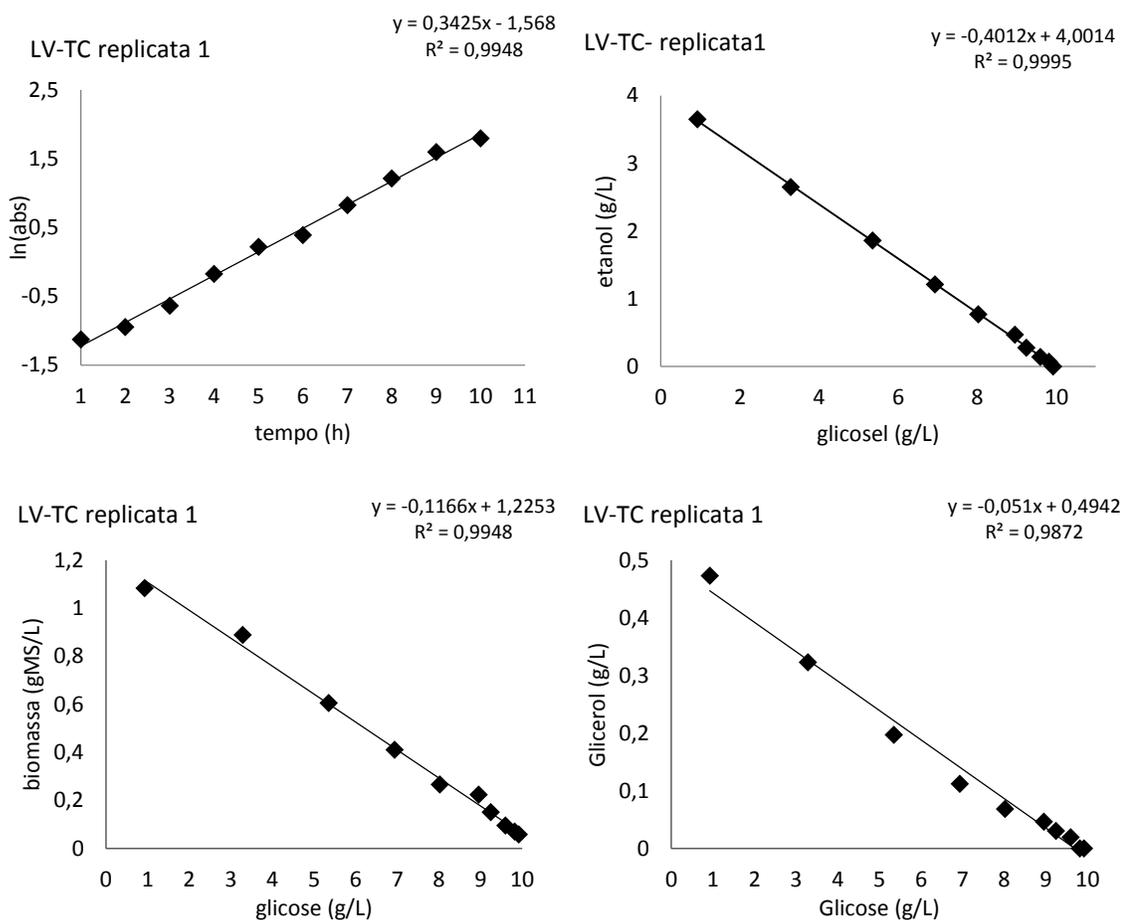
Curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm em função do tempo, curvas de concentração de etanol em função da concentração de glicose, curvas de concentração de glicerol em função da concentração de glicose e curvas de concentração de biomassa em função da concentração de glicose para as linhagens WT e LV-TC. Os cultivos foram realizados em frasco agitado a 30°C com 5 g/L iniciais de glicose, em meio definido Verduyn.

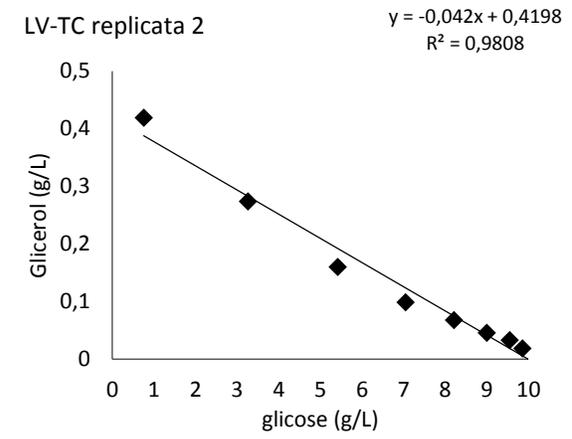
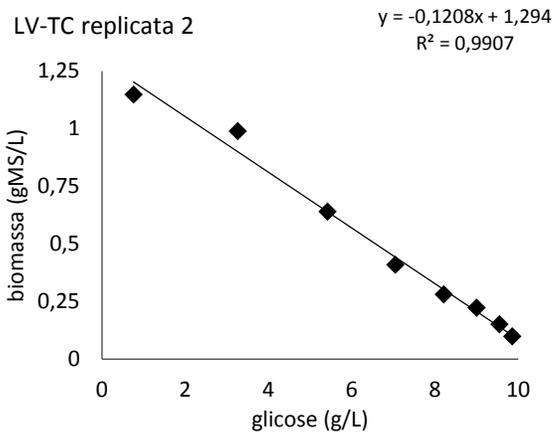
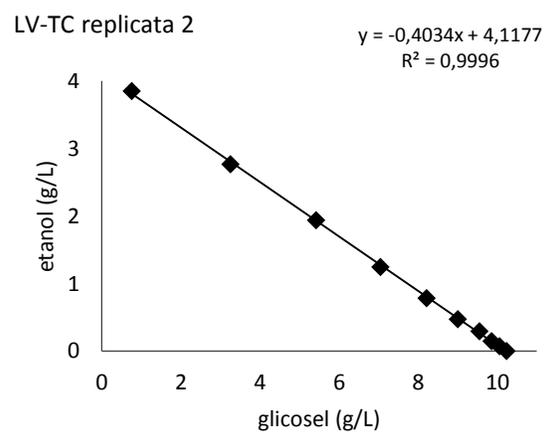
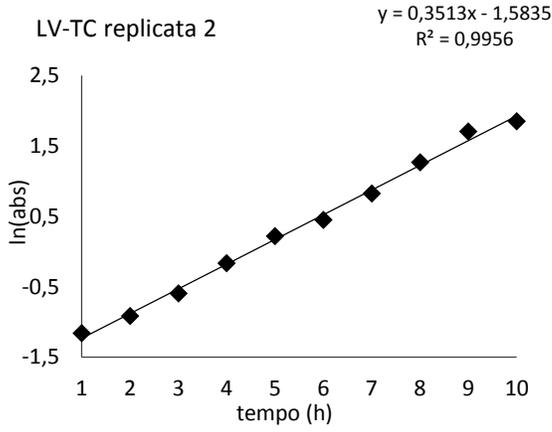


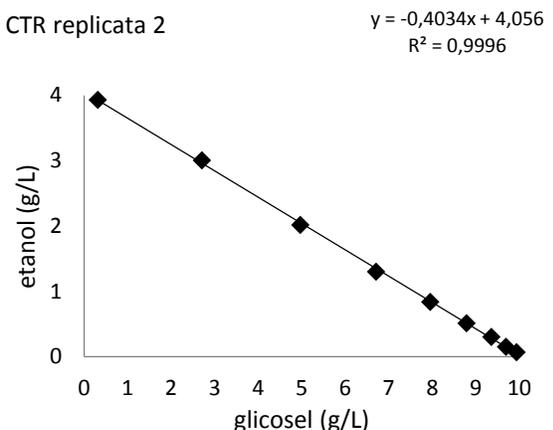
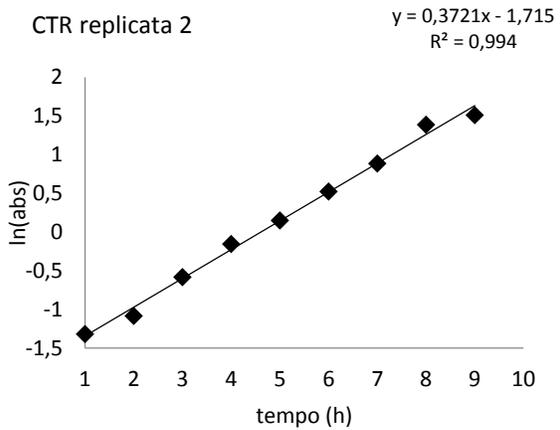
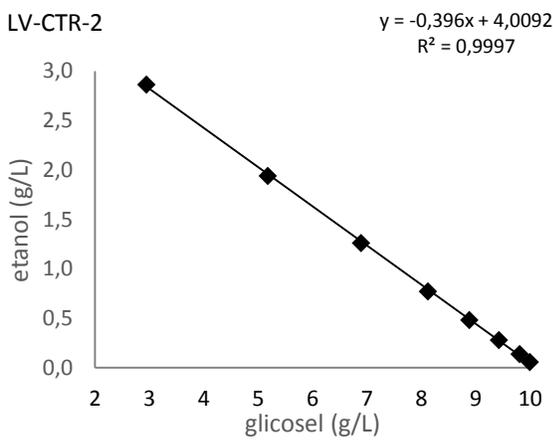
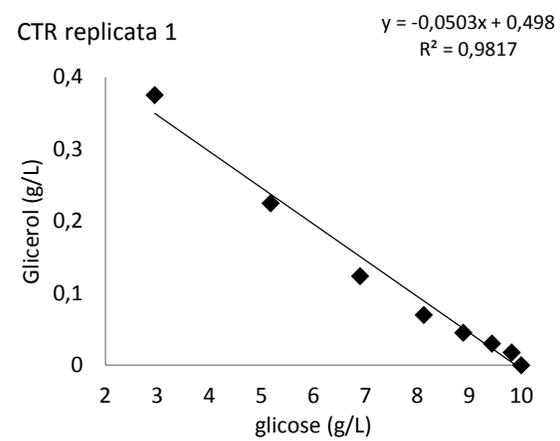
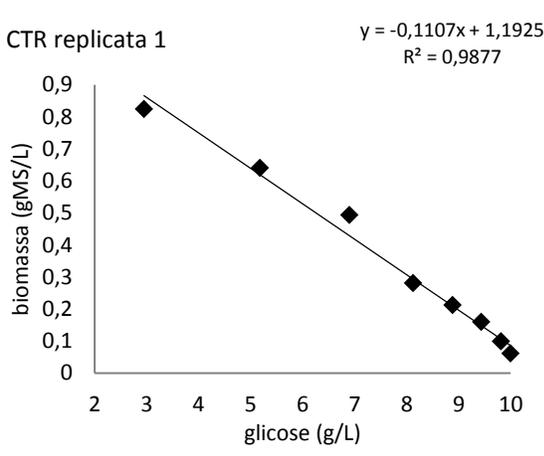
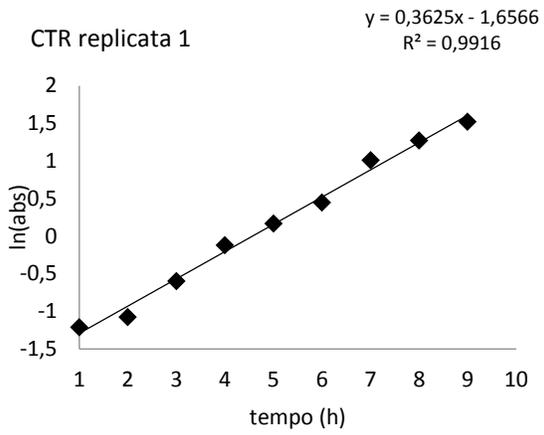


10 APÊNDICE C

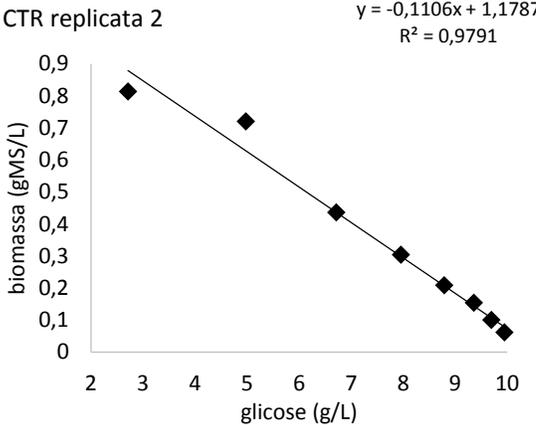
Curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm em função do tempo, curvas de concentração de etanol em função da concentração de glicose, curvas de concentração de glicerol em função da concentração de glicose e curvas de concentração de biomassa em função da concentração de glicose para as duplicatas das linhagens LV-TC, WT, AUX, CTR e de uma única replicata de LV-AH. Os cultivos foram realizados em frasco agitado a 30°C com 10 g/L iniciais de glicose, em meio definido Verduyn.



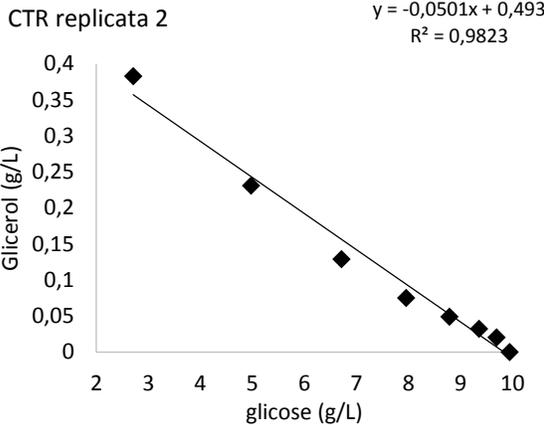




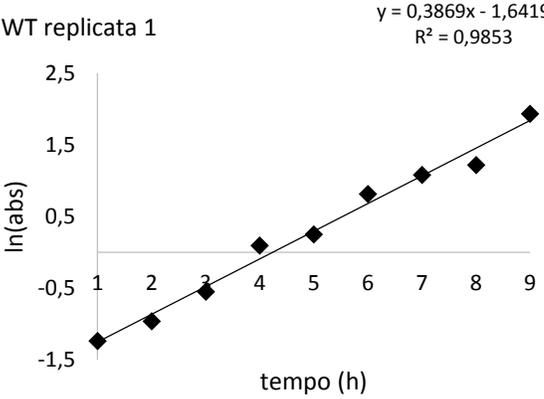
CTR replicata 2



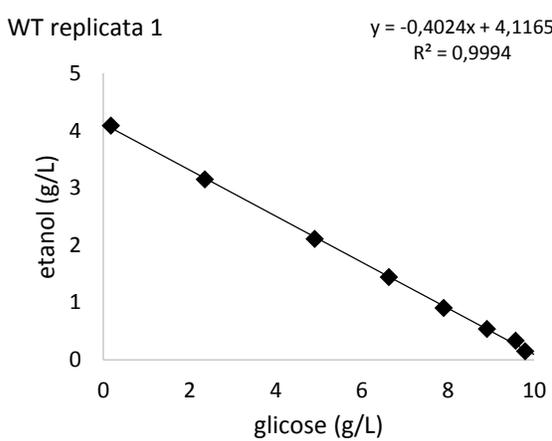
CTR replicata 2



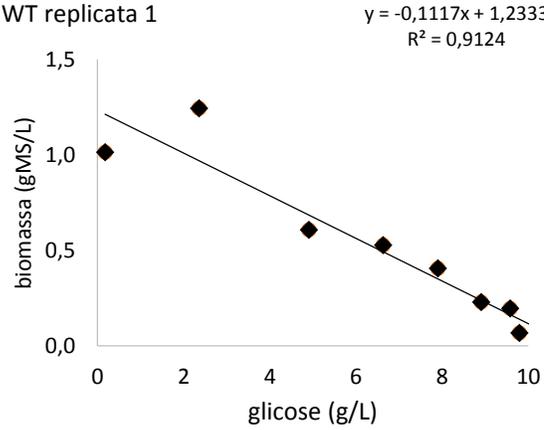
WT replicata 1



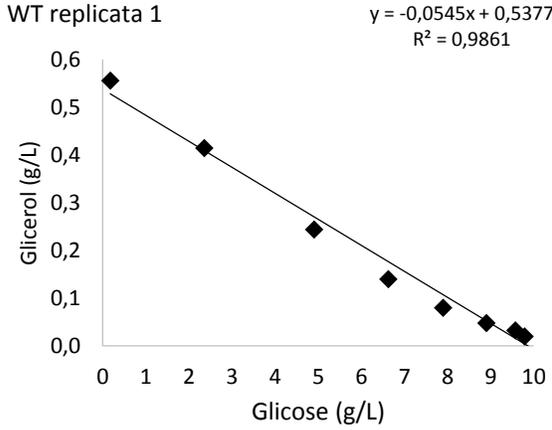
WT replicata 1



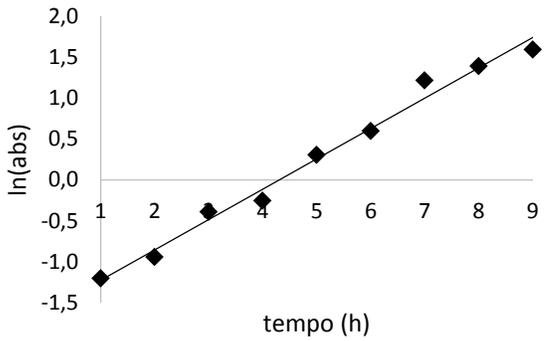
WT replicata 1



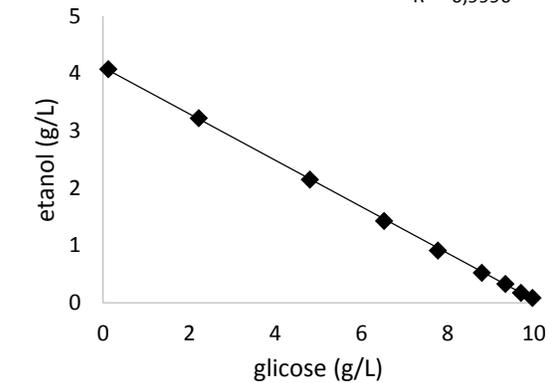
WT replicata 1



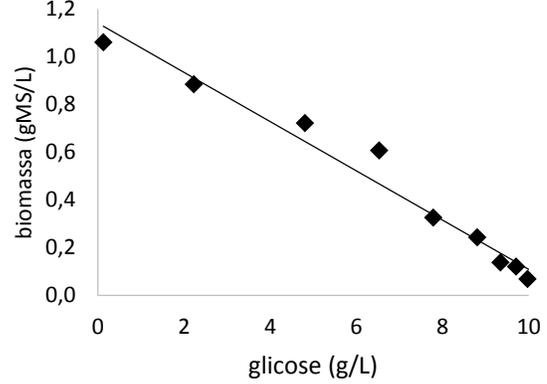
WT replicata 2



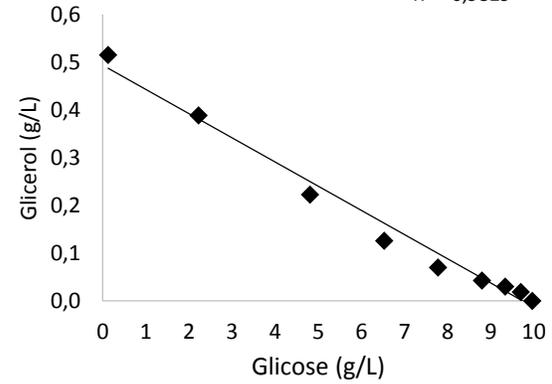
WT replicata 2



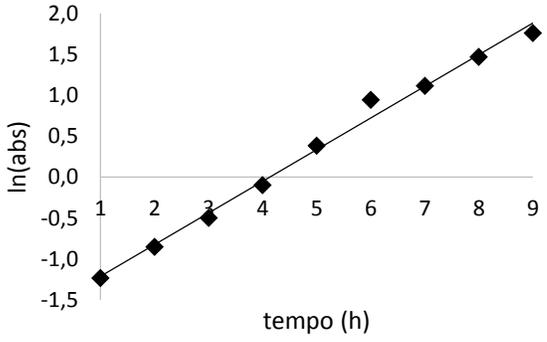
WT replicata 2



WT replicata 2



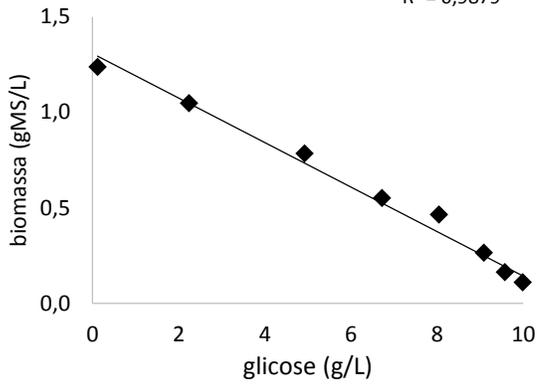
AUX replicata 1



AUX replicata 1



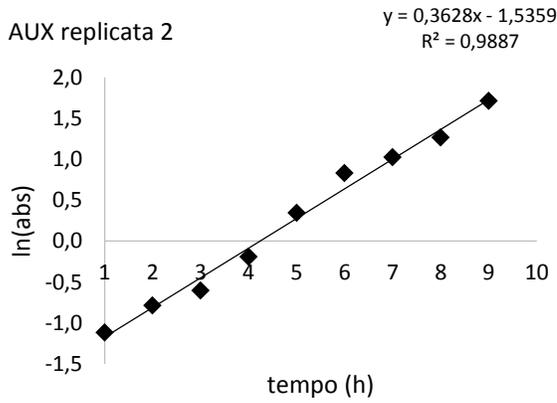
AUX replicata 1



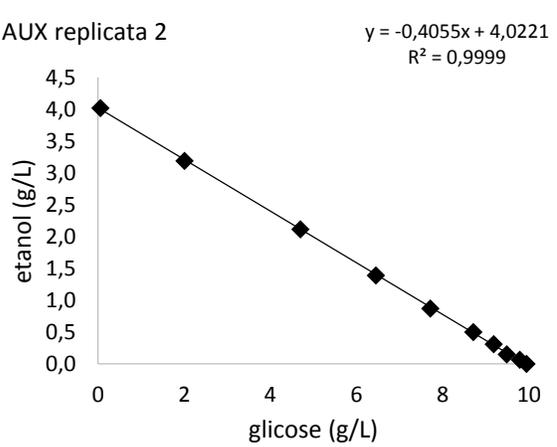
AUX replicata 1



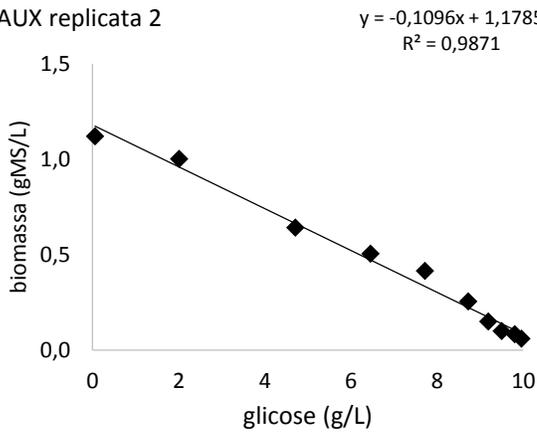
AUX replicata 2



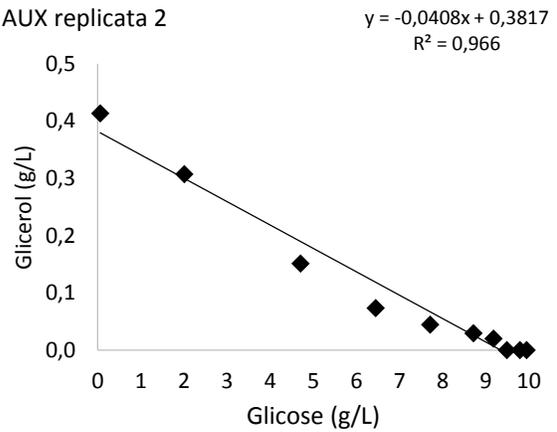
AUX replicata 2



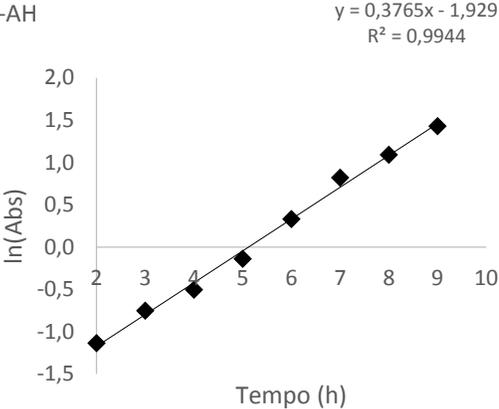
AUX replicata 2



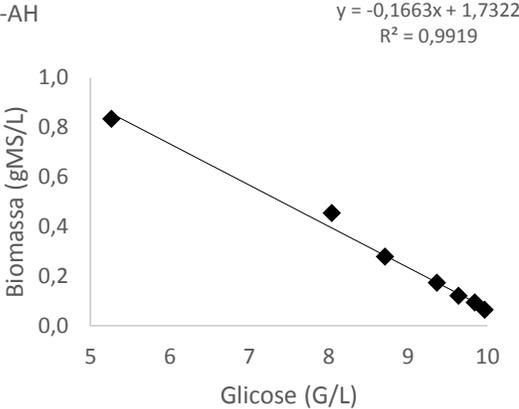
AUX replicata 2



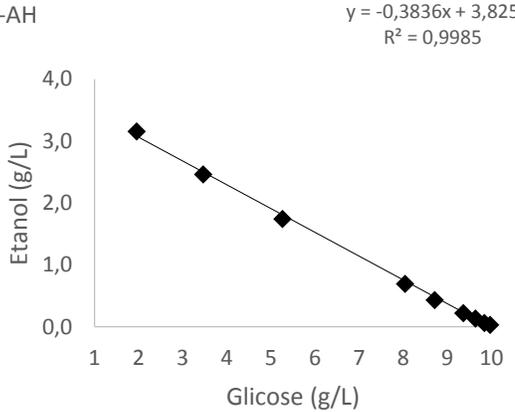
LV-AH



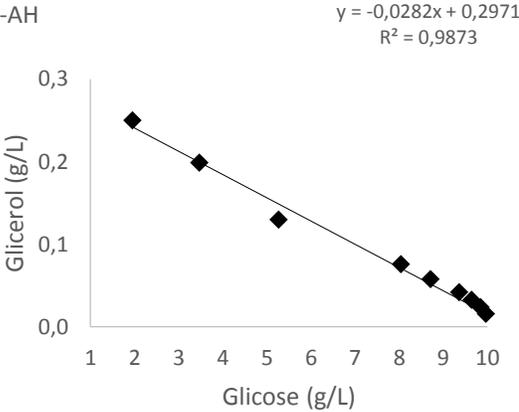
LV-AH



LV-AH

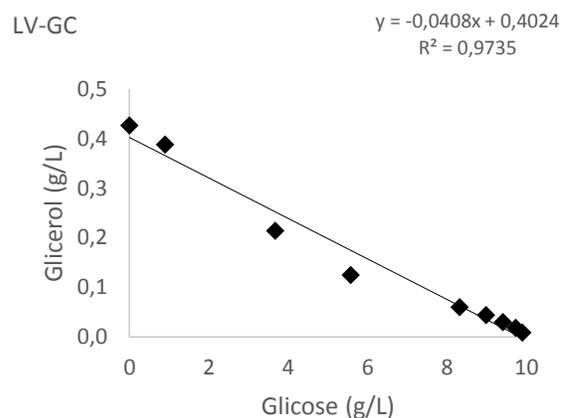
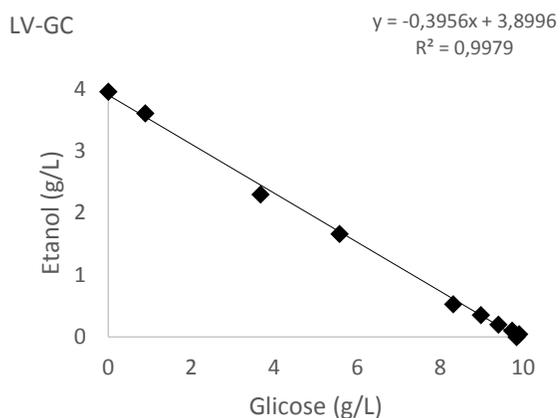
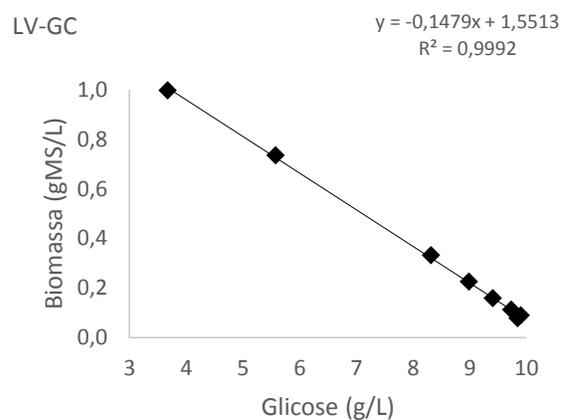
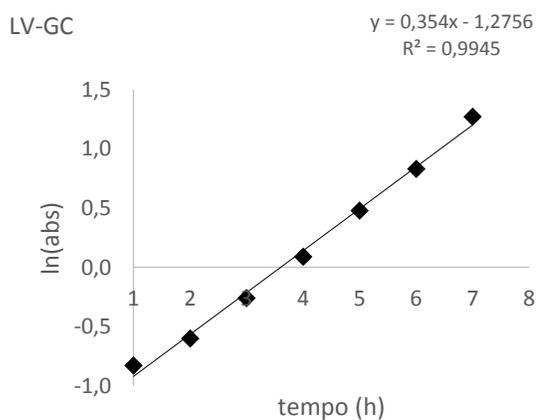


LV-AH



11 APÊNDICE D

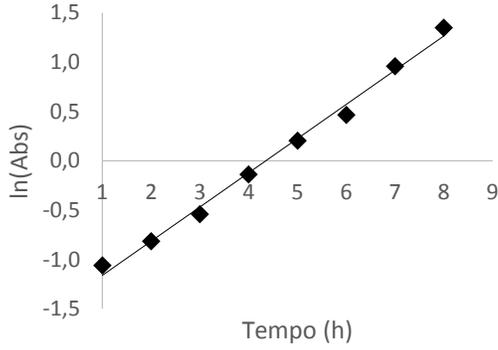
Curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm em função do tempo, curvas de concentração de etanol em função da concentração de glicose, curvas de concentração de glicerol em função da concentração de glicose e curvas de concentração de biomassa em função da concentração de glicose para uma única replicata das linhagens LV-GC, LV-EpGC, LV-GH[ρ]. Os cultivos foram realizados em frasco agitado a 30°C com 10 g/L iniciais de glicose, em meio definido Verduyn.



LV-EpGC

$$y = 0,3462x - 1,5051$$

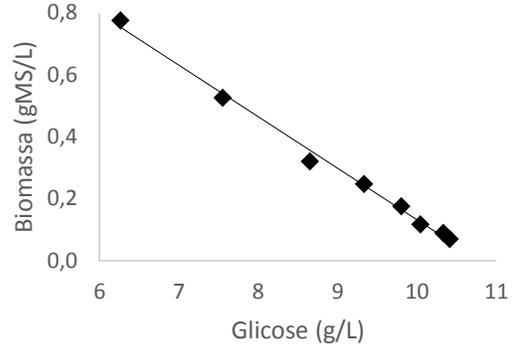
$$R^2 = 0,9928$$



LV-EpGC

$$y = -0,1665x + 1,7962$$

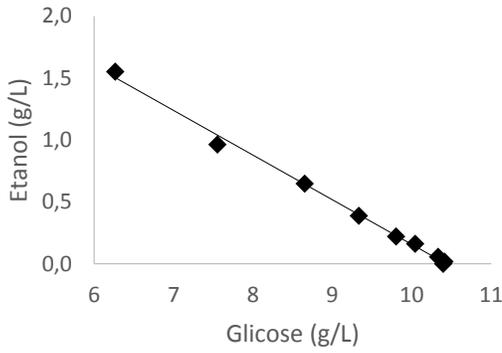
$$R^2 = 0,9946$$



LV-EpGC

$$y = -0,3601x + 3,7586$$

$$R^2 = 0,9958$$



LV-EpGC

$$y = -0,0304x + 0,3302$$

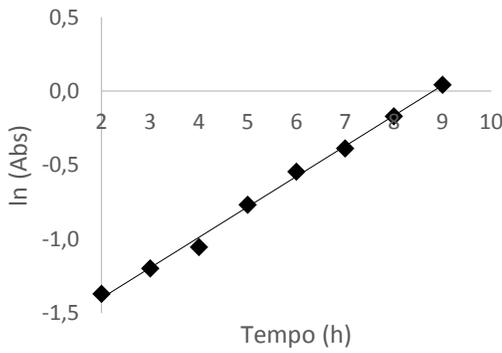
$$R^2 = 0,9905$$



LV-GH [p-]

$$y = 0,2053x - 1,8089$$

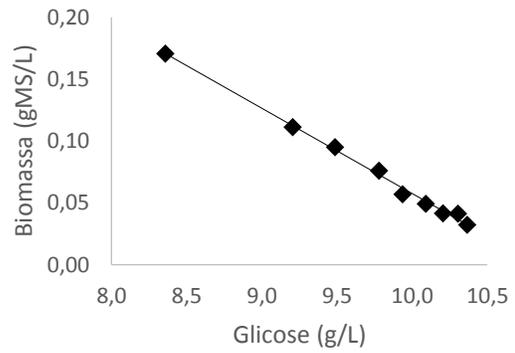
$$R^2 = 0,9962$$

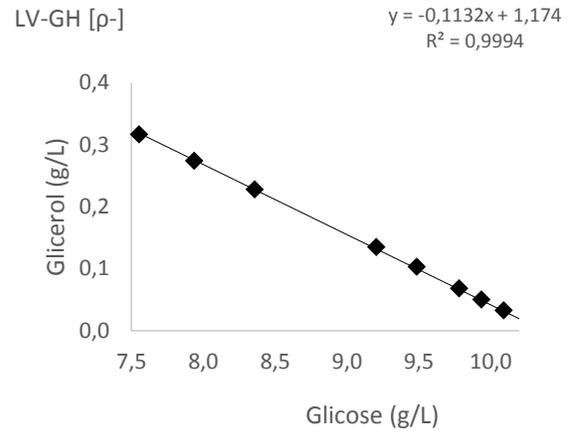
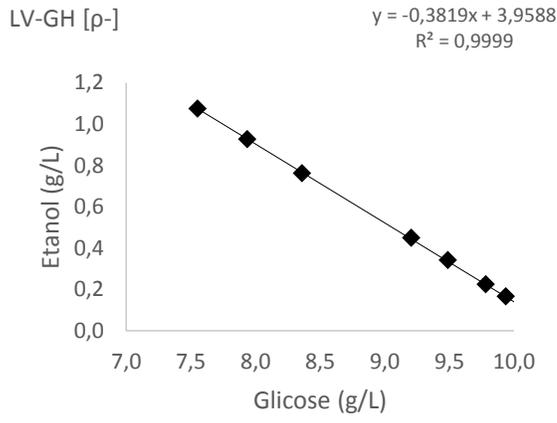


LV-GH [p-]

$$y = -0,0687x + 0,7451$$

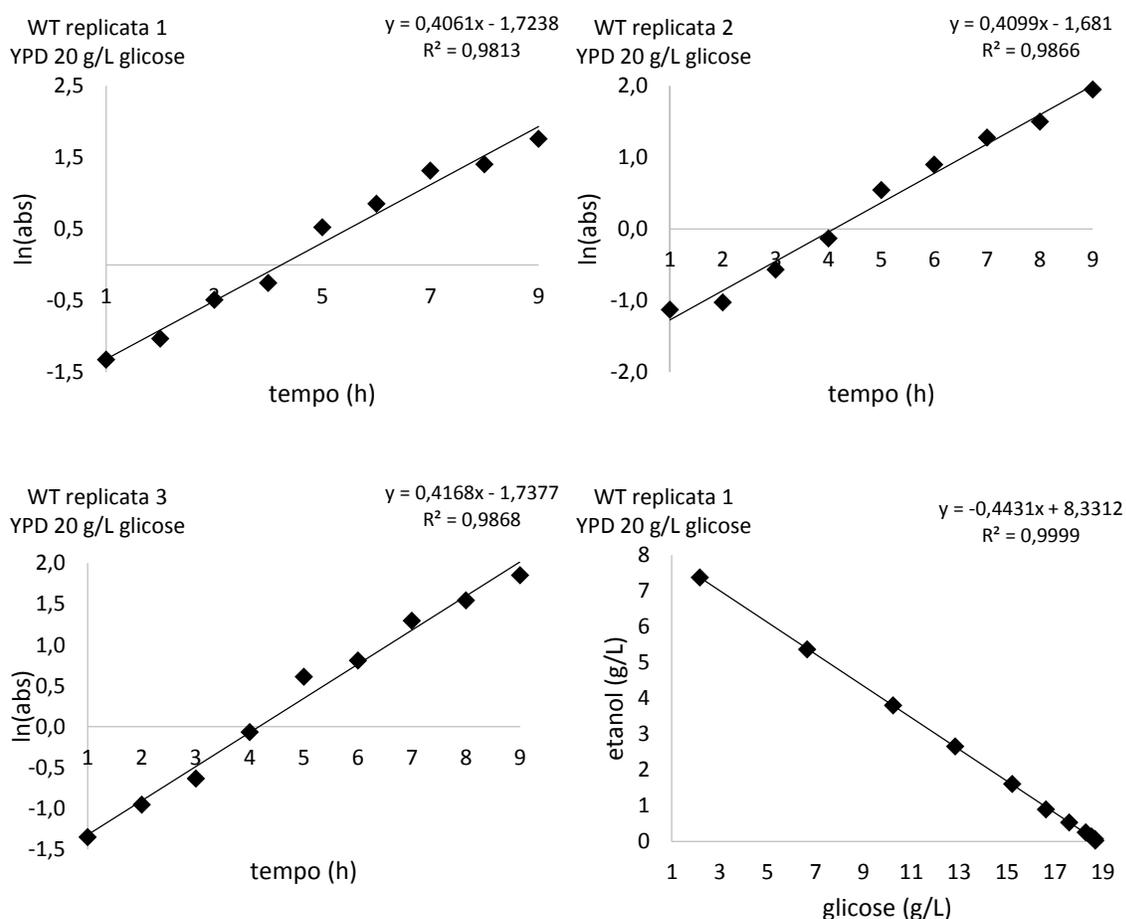
$$R^2 = 0,9954$$

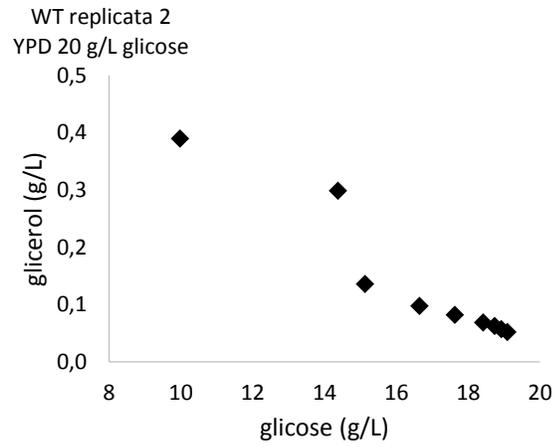
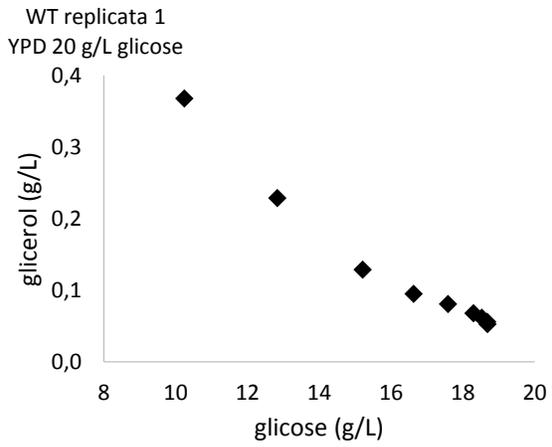
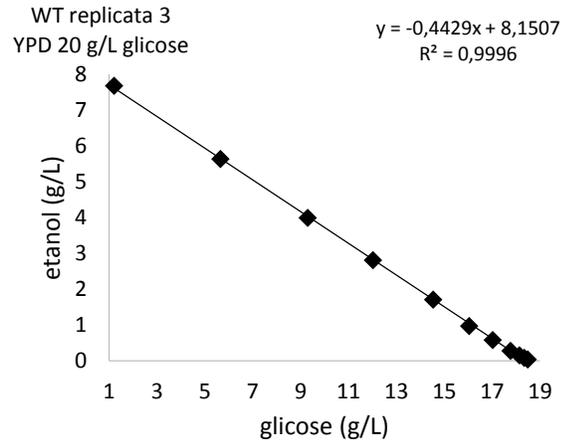
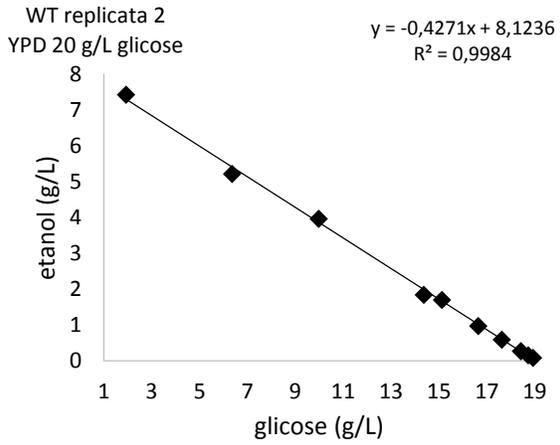


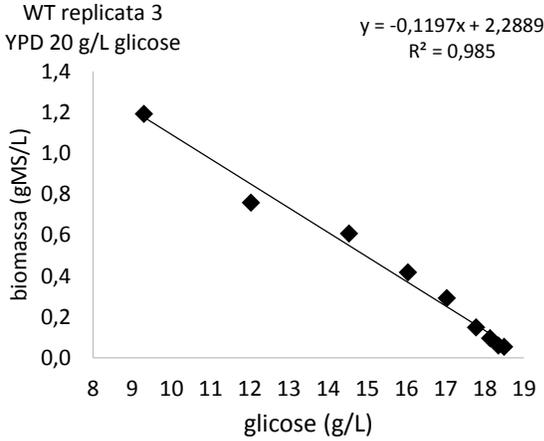
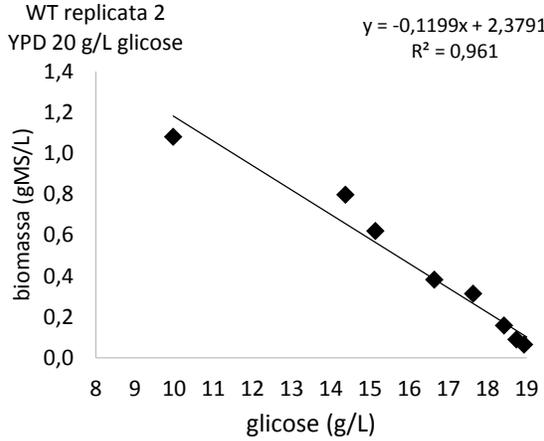
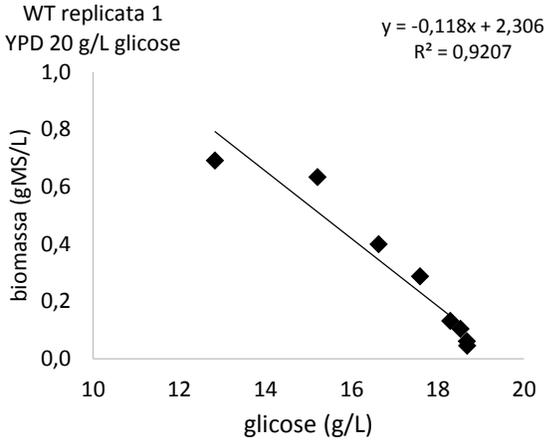
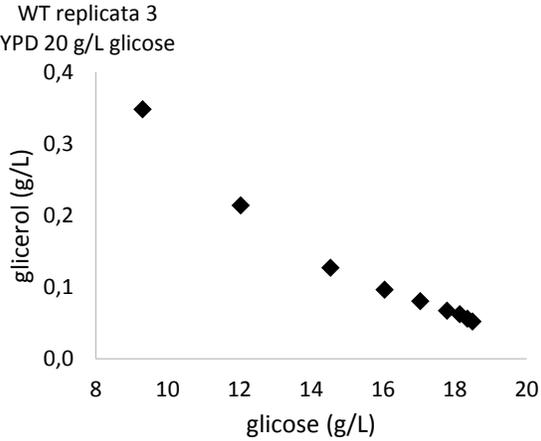


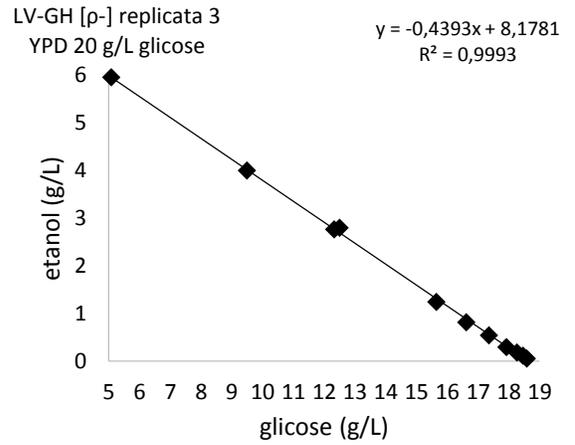
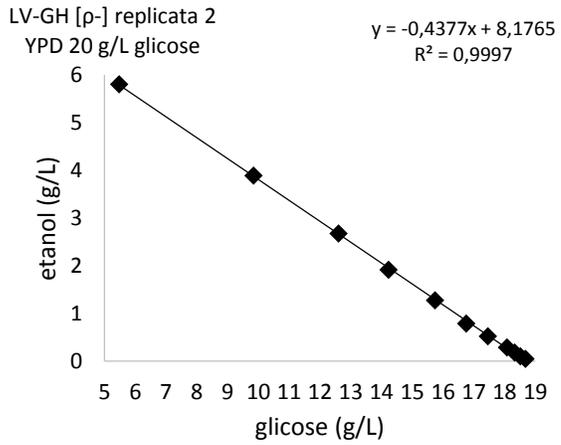
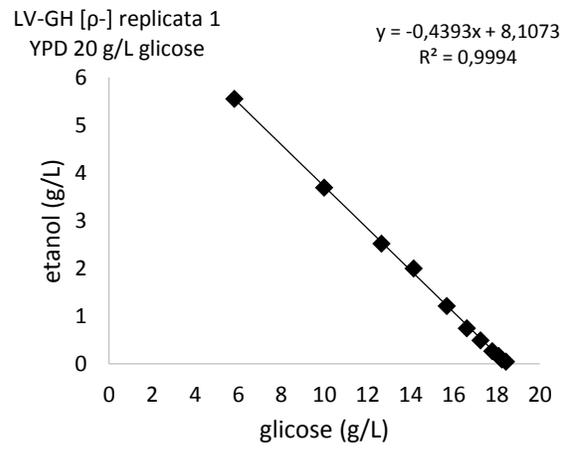
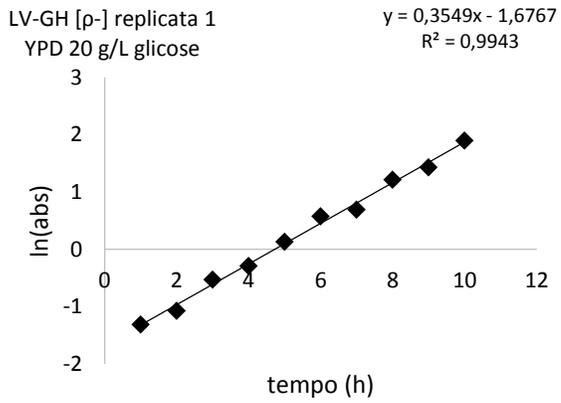
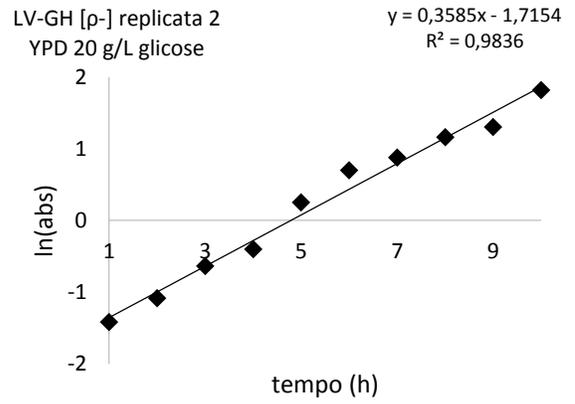
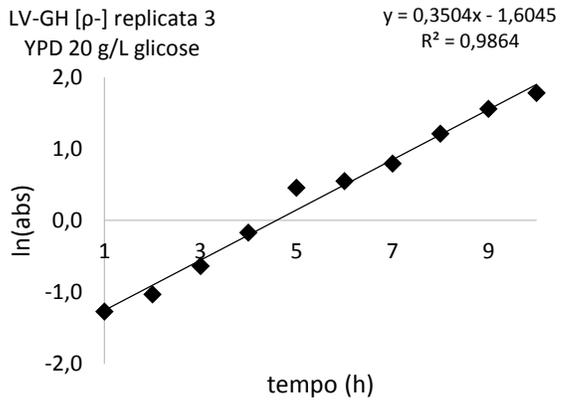
12 APÊNDICE E

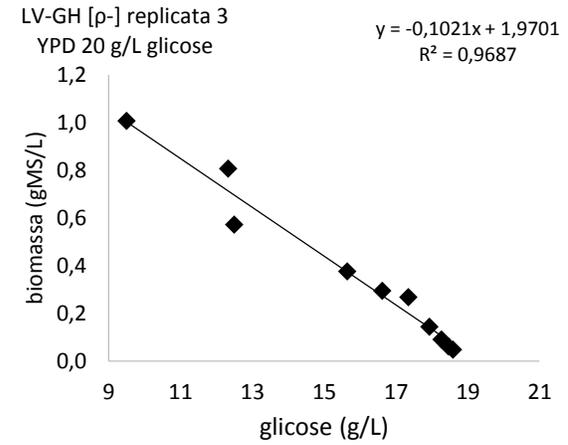
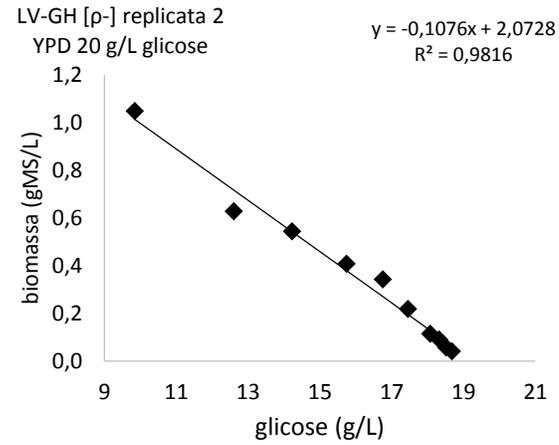
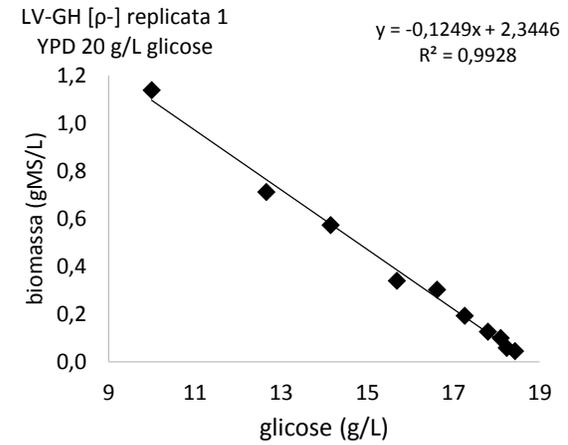
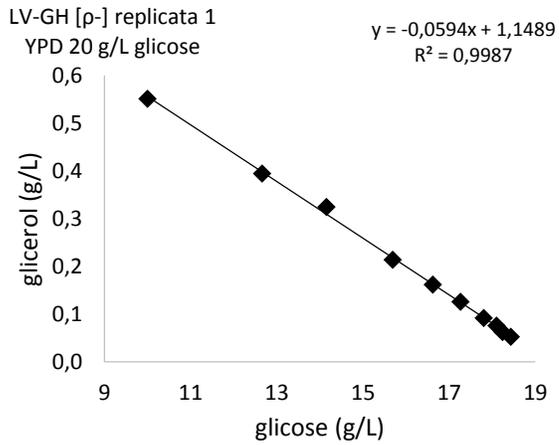
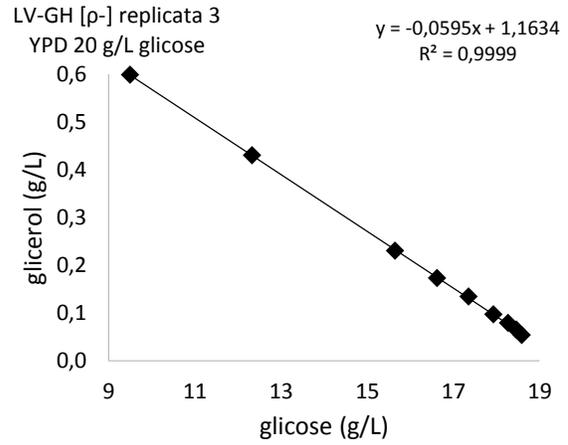
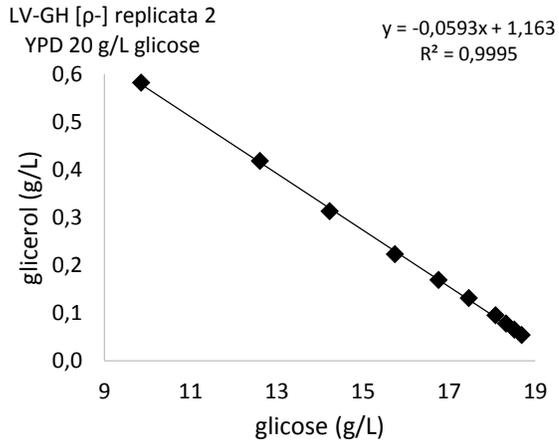
Curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm em função do tempo, curvas de concentração de etanol em função da concentração de glicose, curvas de concentração de glicerol em função da concentração de glicose e curvas de concentração de biomassa em função da concentração de glicose para as triplicatas das linhagens WT, WT[ρ], LV-GH e LV-GH[ρ]. Os cultivos foram realizados em frasco agitado a 30°C com 20 g/L iniciais de glicose, em meio complexo YPD.

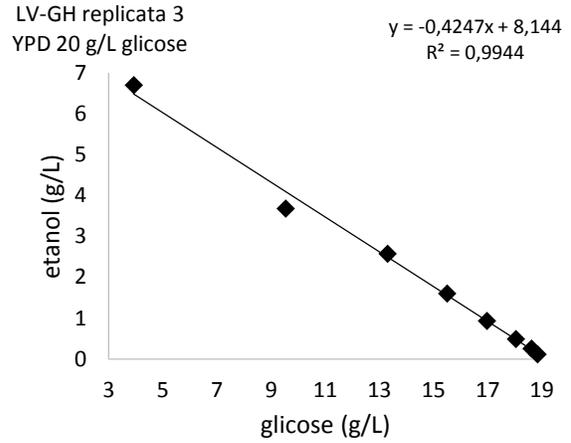
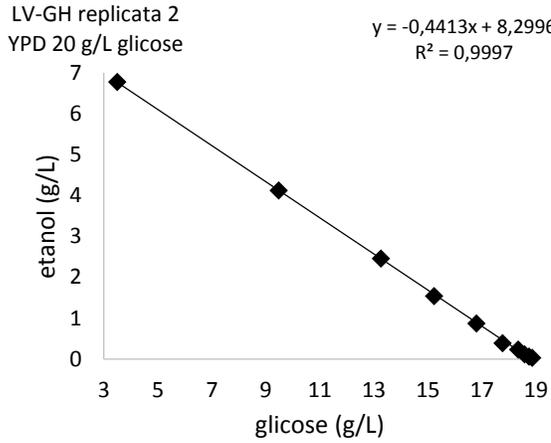
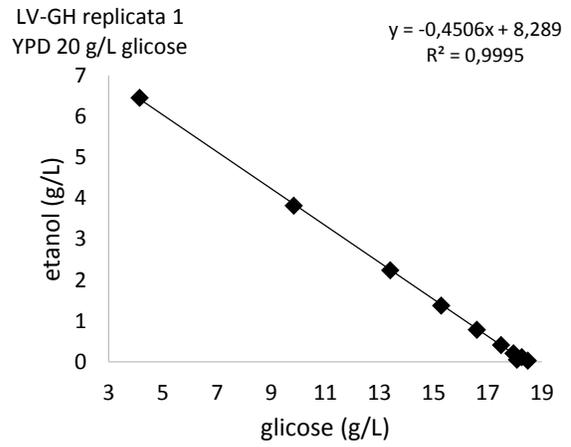
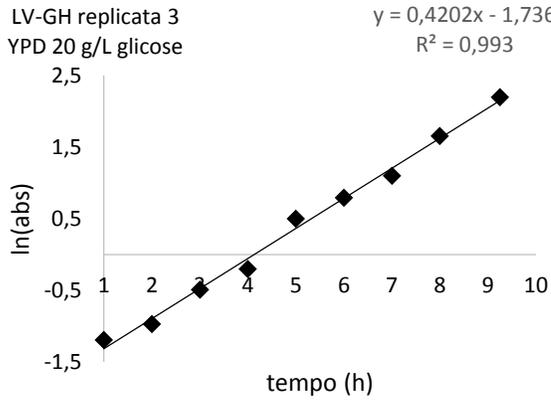
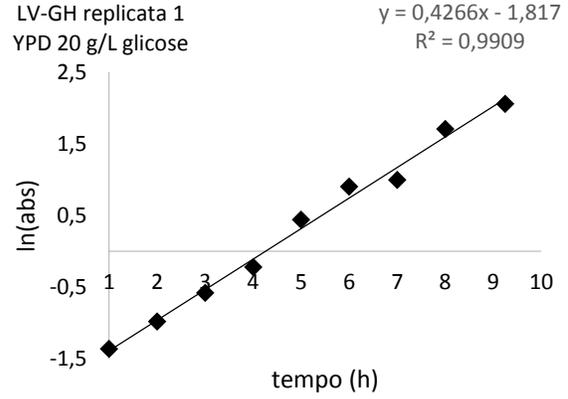
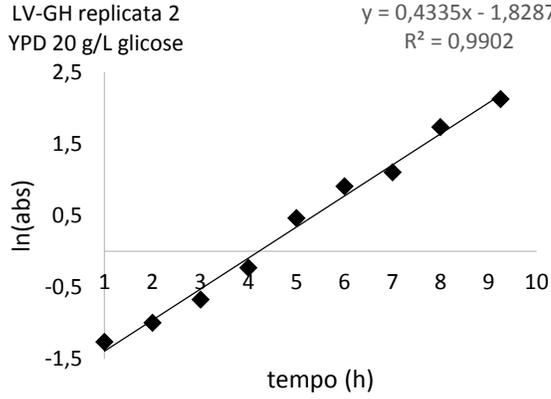


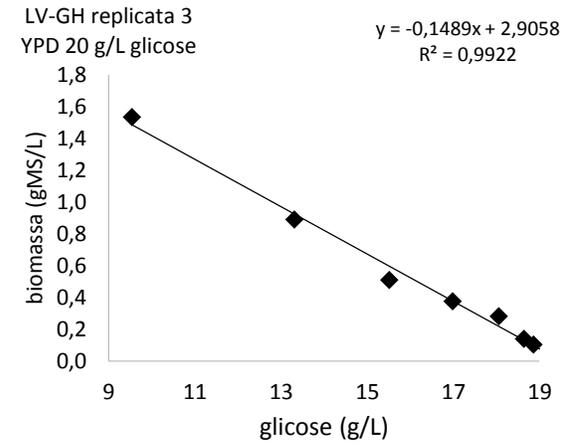
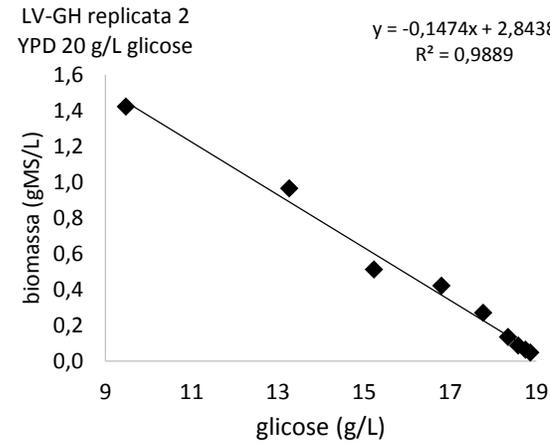
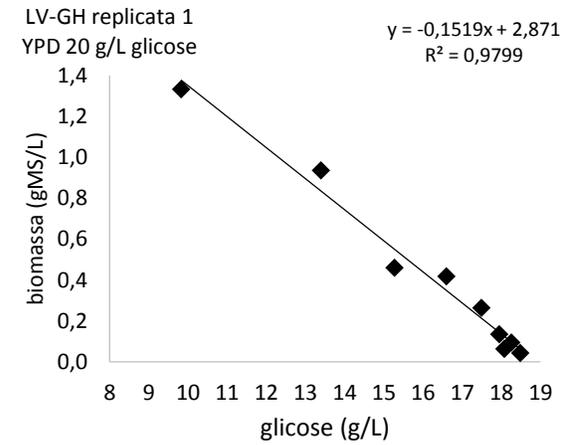
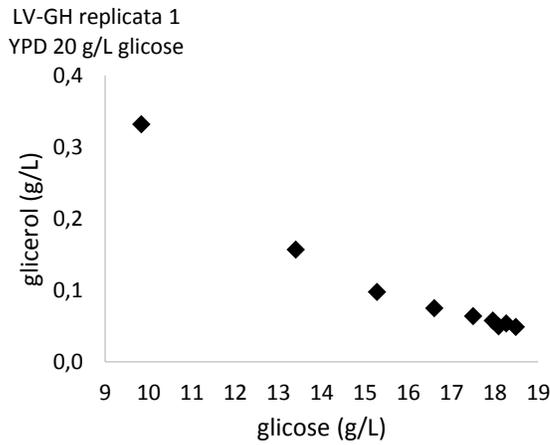
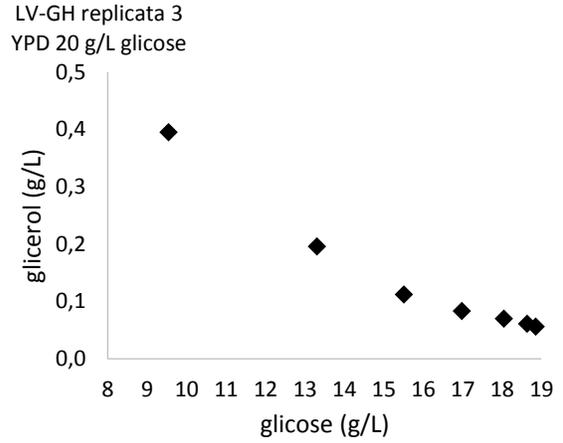
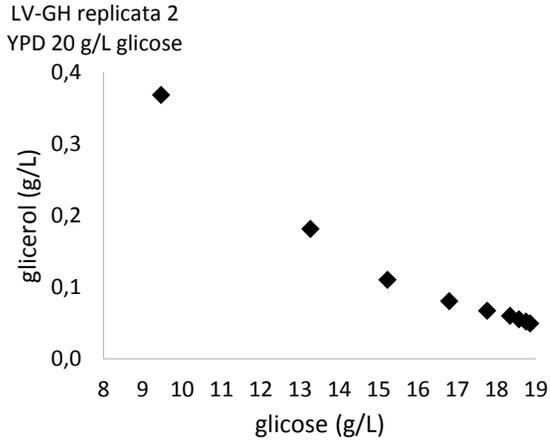


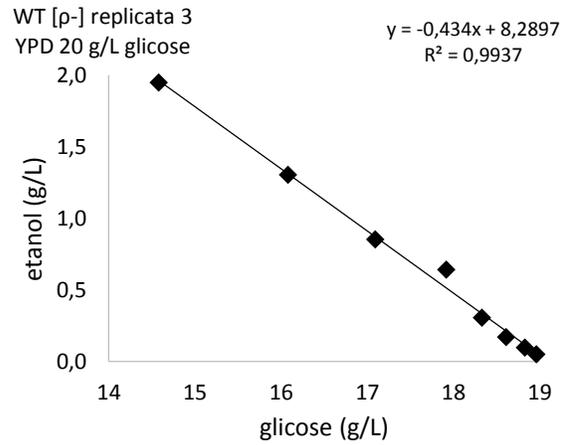
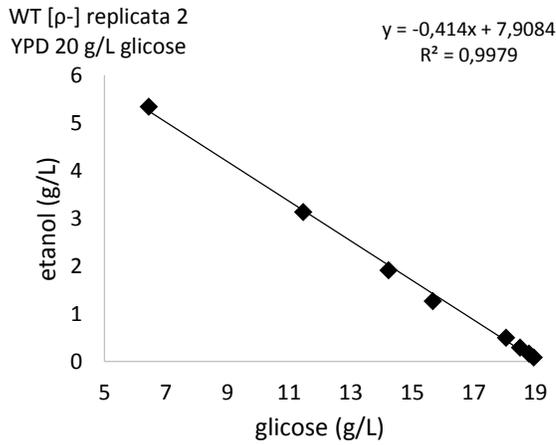
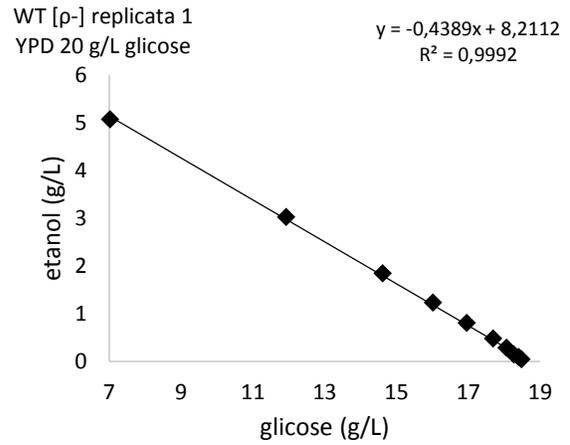
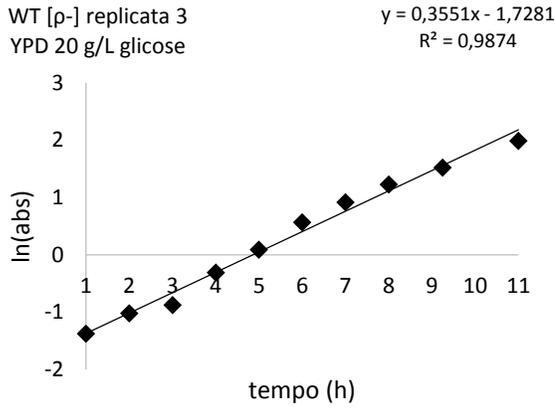
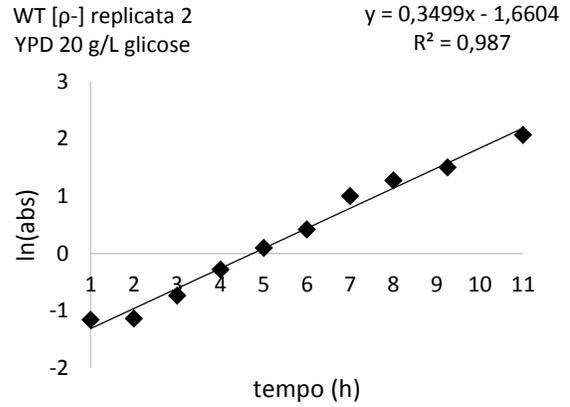
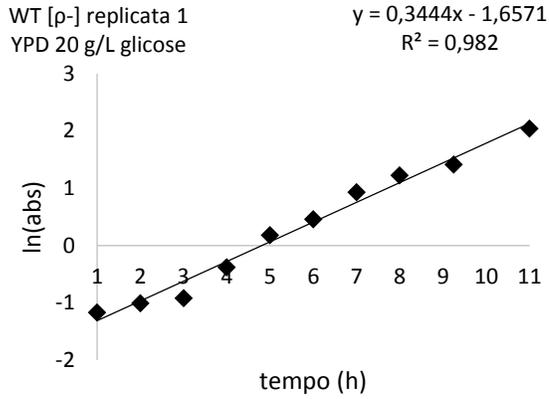


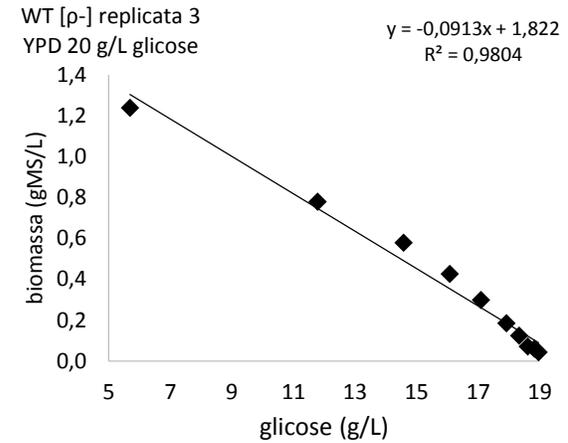
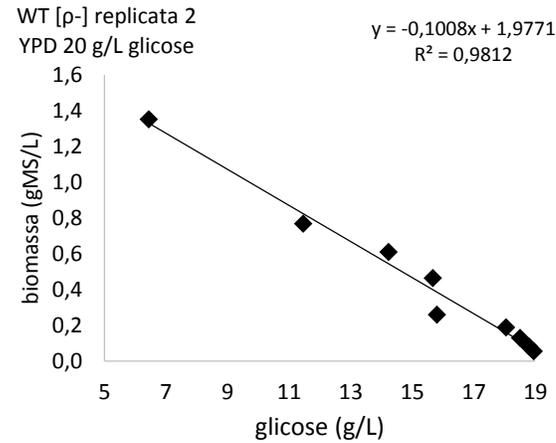
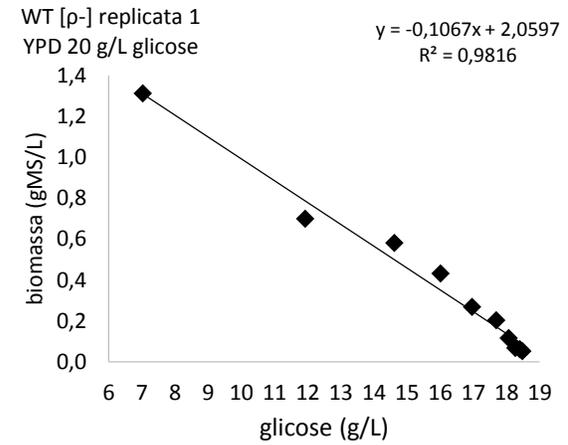
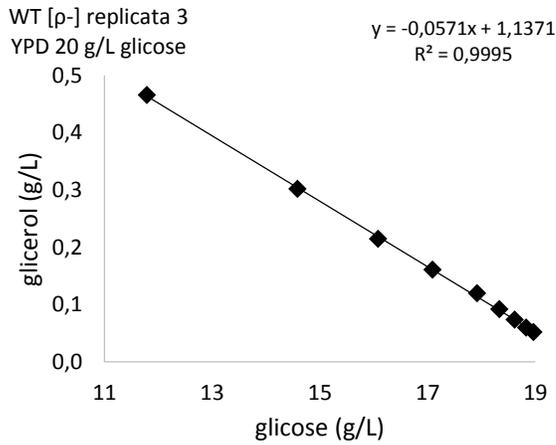
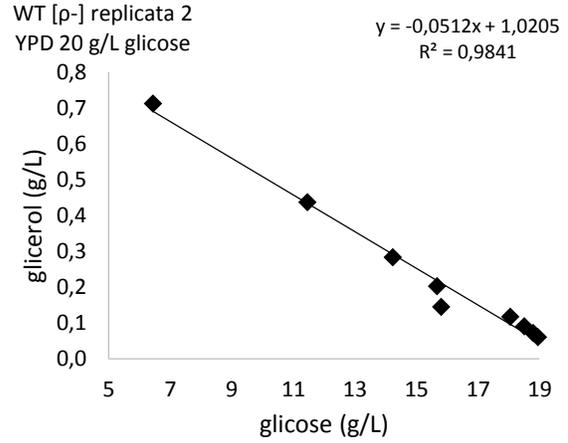
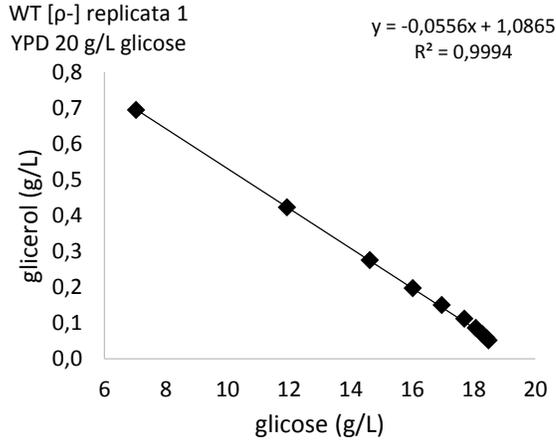






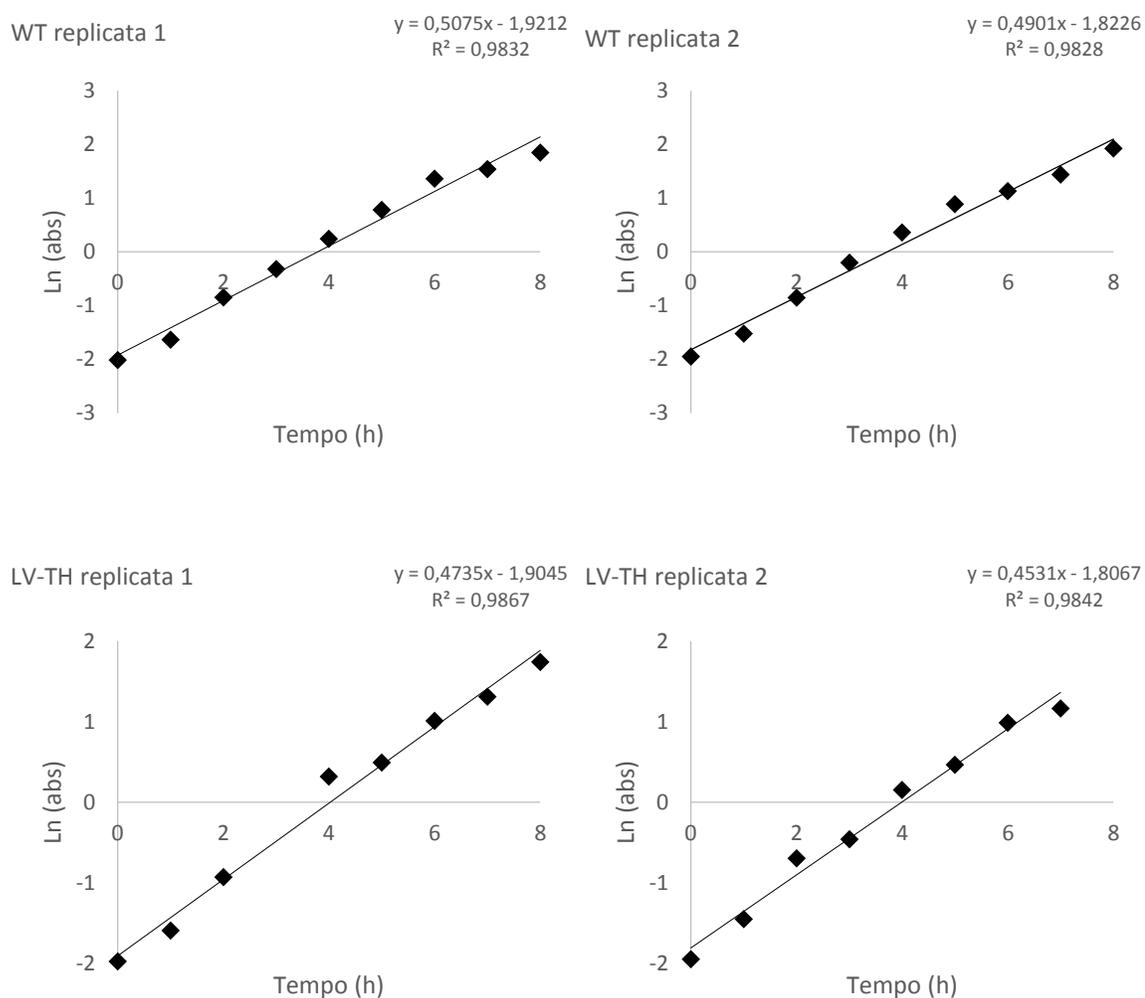






13 APÊNDICE F

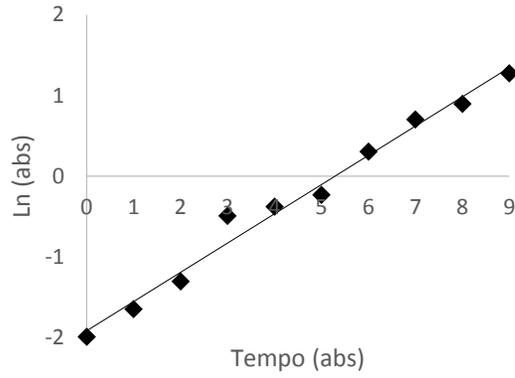
Curvas do logaritmo neperiano da absorbância a 600 nm em função do tempo, curvas de concentração de etanol em função da concentração de glicose, curvas de concentração de glicerol em função da concentração de glicose e curvas de concentração de biomassa em função da concentração de glicose para as duplicatas das linhagens WT, LV-TH, LV-GH, LV-CC. Os cultivos foram realizados em frasco agitado a 40°C com 20 g/L iniciais de glicose, em meio complexo YPD.



LV-GH replicata 1

$$y = 0,3628x - 1,9211$$

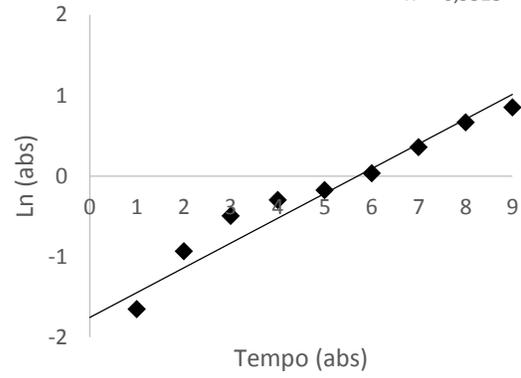
$$R^2 = 0,983$$



LV-GH replicata 2

$$y = 0,3076x - 1,7555$$

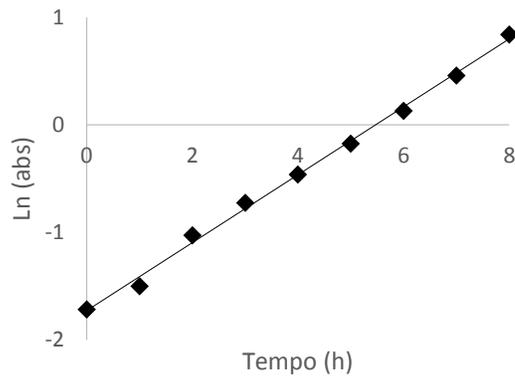
$$R^2 = 0,9523$$



LV-CC replicata 1

$$y = 0,3163x - 1,7286$$

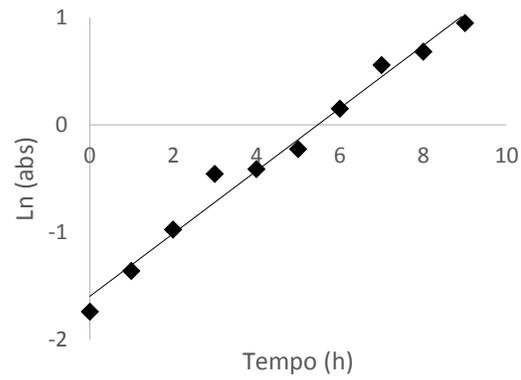
$$R^2 = 0,9967$$



LV-CC replicata 2

$$y = 0,2916x - 1,594$$

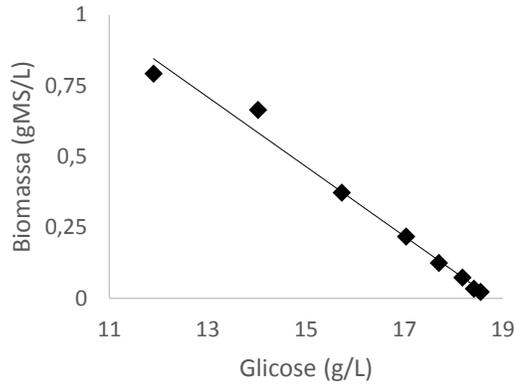
$$R^2 = 0,9826$$



WT replicata 1

$$y = -0,1228x + 2,3055$$

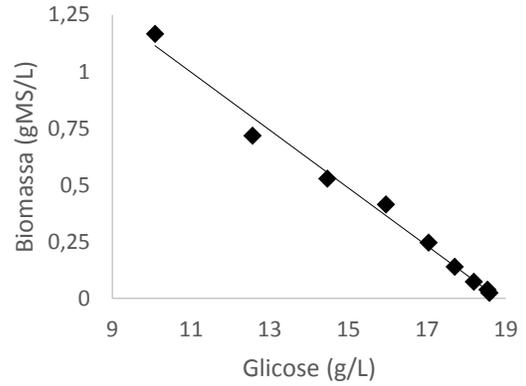
$$R^2 = 0,9846$$



WT replicata 2

$$y = -0,1277x + 2,4027$$

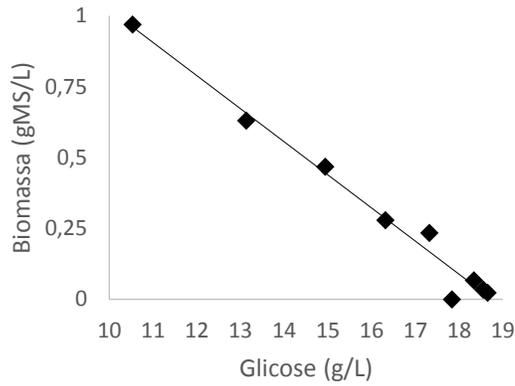
$$R^2 = 0,9891$$



LV-TH replicata 1

$$y = -0,1168x + 2,1904$$

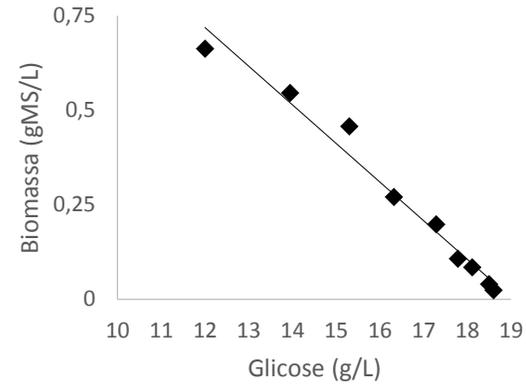
$$R^2 = 0,9798$$



LV-TH replicata 2

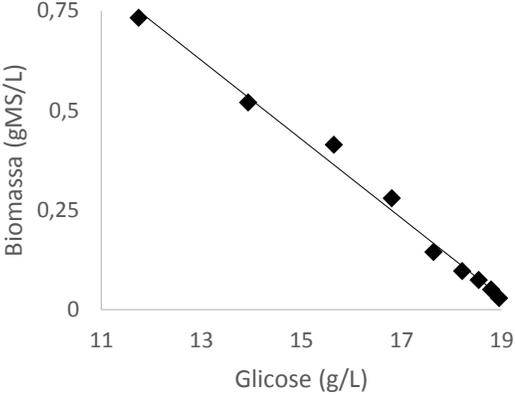
$$y = -0,1022x + 1,9451$$

$$R^2 = 0,9751$$



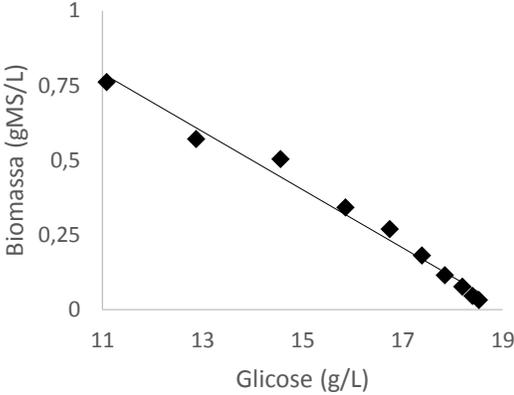
LV-GC replicata 1

$$y = -0,0989x + 1,9113$$
$$R^2 = 0,9904$$



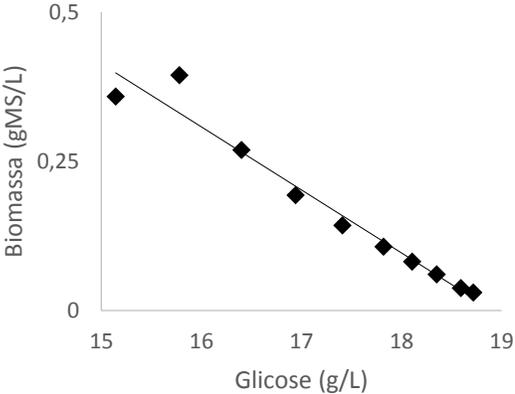
LV-GC replicata 2

$$y = -0,0974x + 1,8623$$
$$R^2 = 0,984$$



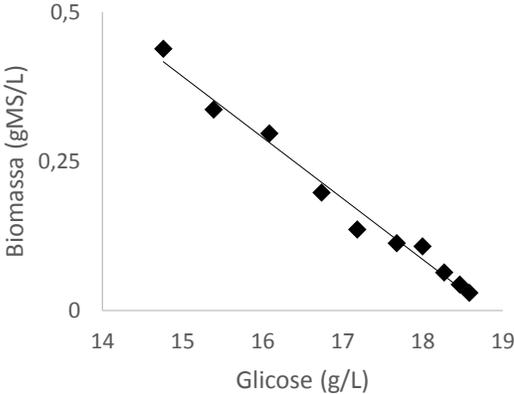
LV-CC replicata 1

$$y = -0,1053x + 1,993$$
$$R^2 = 0,9603$$



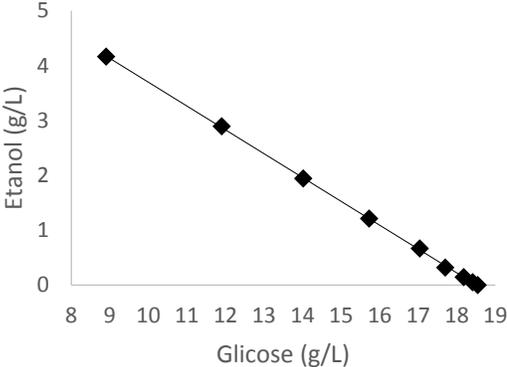
LV-CC replicata 2

$$y = -0,1021x + 1,9244$$
$$R^2 = 0,9827$$



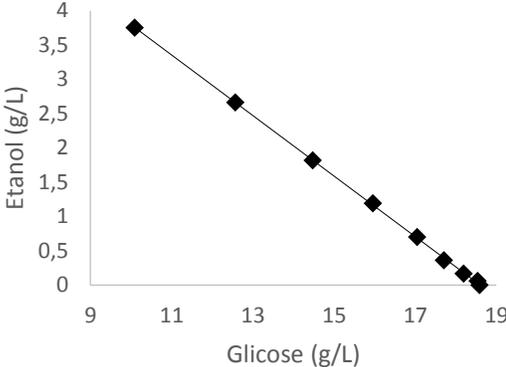
WT replicata 1

$$y = -0,4346x + 8,0461$$
$$R^2 = 0,9998$$



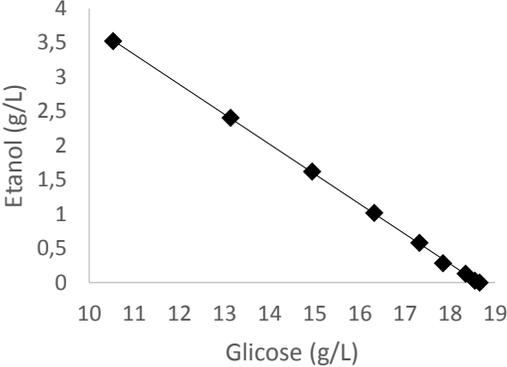
WT replicata 2

$$y = -0,4413x + 8,2086$$
$$R^2 = 0,9997$$



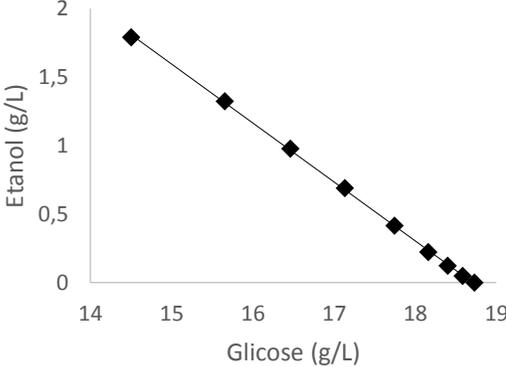
LV-TH replicata 1

$$y = -0,4371x + 8,1377$$
$$R^2 = 0,9997$$



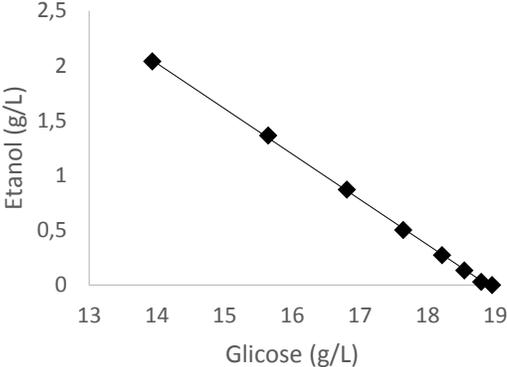
LV-GH replicata 2

$$y = -0,4296x + 8,0366$$
$$R^2 = 0,9996$$



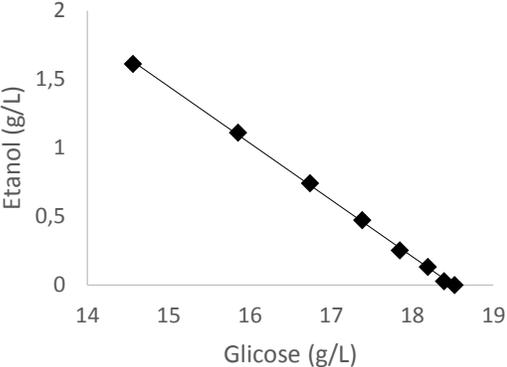
LV-GC replicata 1

$$y = -0,4139x + 7,8168$$
$$R^2 = 0,9995$$



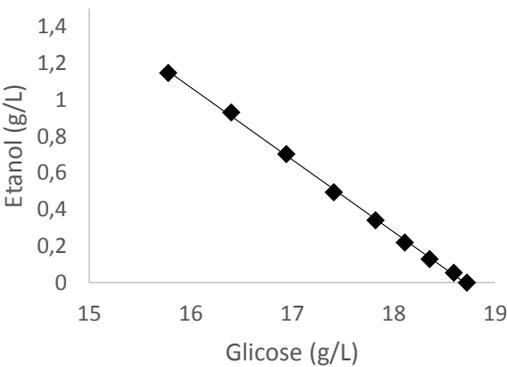
LV-GC replicata 2

$$y = -0,4136x + 7,652$$
$$R^2 = 0,9993$$



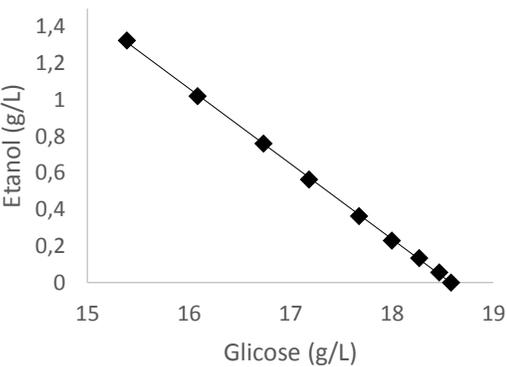
LV-CC replicata 1

$$y = -0,3967x + 7,416$$
$$R^2 = 0,999$$



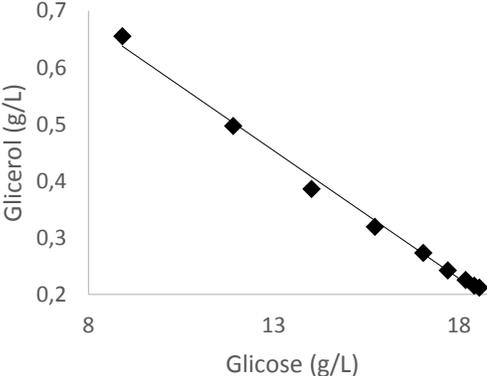
LV-CC replicata 2

$$y = -0,4123x + 7,6595$$
$$R^2 = 0,9997$$



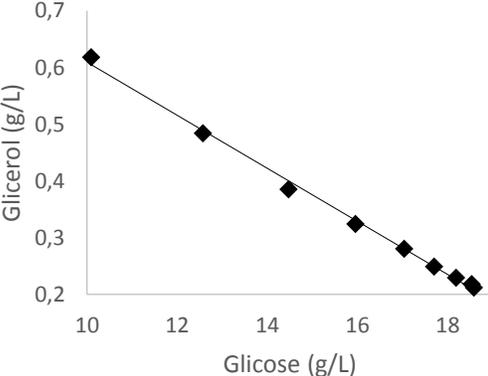
WT replicata 1

$$y = -0,0451x + 1,0397$$
$$R^2 = 0,9943$$



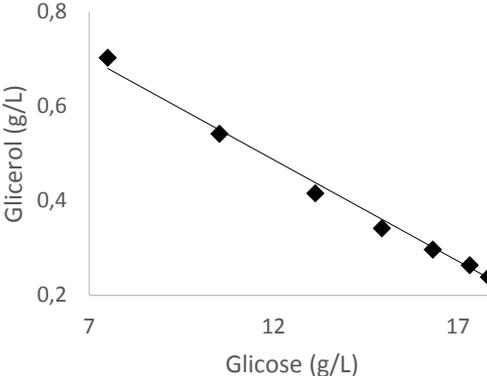
WT replicata 2

$$y = -0,0467x + 1,0766$$
$$R^2 = 0,9964$$



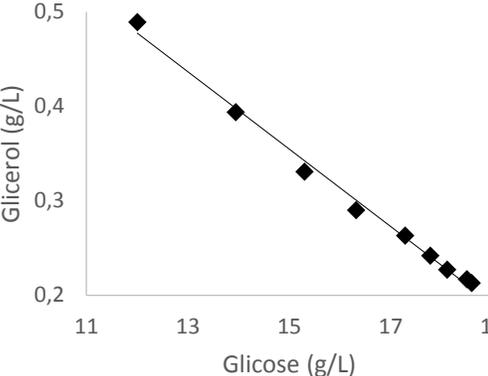
LV-TH replicata 1

$$y = -0,0429x + 1,0019$$
$$R^2 = 0,9919$$



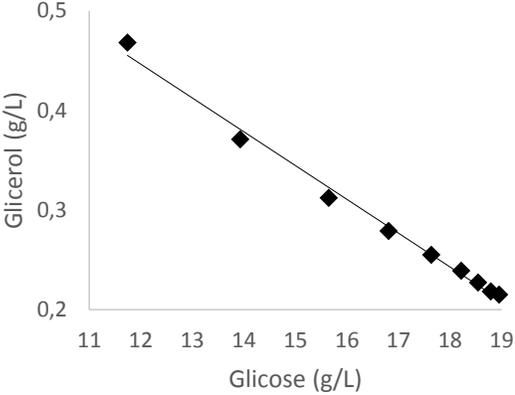
LV-TH replicata 2

$$y = -0,041x + 0,969$$
$$R^2 = 0,9935$$



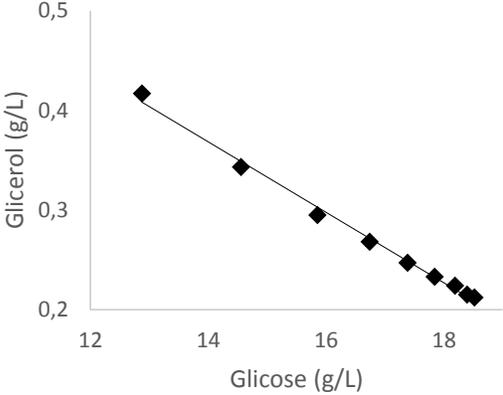
LV-GC replicata 1

$$y = -0,034x + 0,854$$
$$R^2 = 0,9923$$



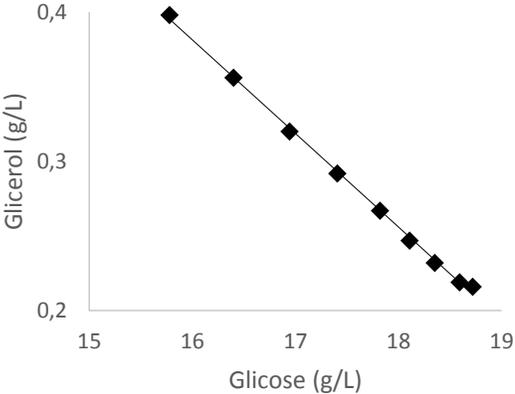
LV-GC replicata 1

$$y = -0,0354x + 0,8636$$
$$R^2 = 0,9943$$



LV-CC replicata 1

$$y = -0,0626x + 1,3836$$
$$R^2 = 0,9985$$



LV-CC replicata 2

$$y = -0,0613x + 1,3525$$
$$R^2 = 0,9997$$

