UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

ISOLAMENTO DO TRANSPORTADOR DE TREALOSE DE
Saccharomyces cerevisiae

CLEONICE DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR:
Prof. Dr. PEDRO SOARES DE ARAUJO

SÃO PAULO
1999

“Isolamento do Transportador de Trealose de *Saccharomyces cerevisiae*”.

CLEONICE DA SILVA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dr. PEDRO SOARES DE ARAUJO
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. ALINE MARIA DA SILVA
IQ - USP

Prof. Dr. JOÃO ATILIO JORGE
FFCLRP - USP

SÃO PAULO
12 DE ABRIL DE 1999.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Pedro Araujo, pela orientação e confiança no meu trabalho;

À Márcia, por todo o auxílio nos trabalhos com as leveduras

À Neusa e à Ivone, pelo suporte técnico;

À Prof. Maria Júlia e todos os membros de seu laboratório, pela ajuda e consentimento na utilização do cintilador;

À todos os colegas do laboratório, pela convivência e força durante este tempo;

Ao CNPq, pelo auxílio concedido.

ÍNDICE

ABREVIATÓES	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Trealose e anidrobiose	1
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a trealose	3
1.2.1. Metabolismo de trealose em <i>S. cerevisiae</i>	6
1.2.2. O sistema de transporte de trealose de <i>S. cerevisiae</i>	9
1.2.2.1. Transporte de trealose e maltose	12
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Dosagem de proteína	17
3.2. Extração de carboidratos intracelulares	17
3.3. Dosagens de carboidratos intracelulares	17
3.4. Análise dos carboidratos intracelulares	17
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	18
3.6. Cepas utilizadas	18
3.7. Meios de cultura	20
3.8. Métodos de cultivo	20
3.8.1. Células da cepa AP68-7A reprimidas	20

3.8.2. Células da cepa AP68-7A induzidas	21
3.8.3. Células da cepa AP77-4C e AP77-4C-p56-5	21
3.9. Curvas de crescimento	21
3.10. Medidas de transporte de ^{14}C -trealose em células	22
3.11. Purificação de membranas plasmáticas	23
3.12. Solubilização de membranas plasmáticas	24
3.13. Remoção de detergente e delipidação de amostras	25
3.14. Tratamento de membranas com tampão de contendo NaCl 2M	25
3.15. Cromatografia de troca iônica	26
3.16. Ensaio de ligação de ^{14}C -trealose em proteínas solubilizadas de membranas	26
3.17. Cromatografia de afinidade	27
3.18. Outros	27
4. RESULTADOS	
4.1. Curva de crescimento da cepa AP68-7A	28
4.2. Identificação inicial do transportador de trealose na cepa AP68-7A	32
4.3. solubilização da membrana plasmática e padronização do ensaio de ligação de ^{14}C -trealose	35
4.4. Tratamento de membranas plasmáticas com NaCl 2 M	40
4.5. Cromatografia de troca iônica das proteínas de membrana plasmática solúveis em octil- β -D-glicosídeo	44
4.6. Cromatografia de afinidade	45
4.7. Proteínas isoladas da membrana da cepa AP77-4C-p56-5	51

5. DISCUSSÃO

- 5.1. Estabelecimento das metodologias de purificação e solubilização de membranas plasmáticas das cepas de *S. cerevisiae* utilizadas, e de detecção da proteína transportadora de trealose 57
- 5.2. Isolamento das bandas de 66 e 57 kDa da cepa AP68-7A: cromatografia de troca iônica, lavagem das membranas com NaCl 2 M e cromatografia de afinidade 61

6. BIBLIOGRAFIA 66

CURRICULUM VITAE 81

ABREVIATÖES

BCA	Ácido bicinchonínico
CMC	Concentração Micelar Crítica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
kDa	Quilo dáltons
Km	Constante de Michaelis-Menten
MES	Ácido 2(N-morfolino) etano sulfônico
MOPS	Ácido3(N-morfolino) propano sulfônico
PM	Peso Molecular
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletenodiamina
TES	Ácido N-tris(hidroxi-metil)-metil-2-amino-metano sulfônico
Tris	Tris-(hidroxi-metil)-amino-metano

RESUMO

O gene *AGT1* do locus *mal1g*, do sistema de transporte de maltose de *S. cerevisiae*, codifica uma proteína de 67 kDa, que tem 75% de similaridade e 58% de identidade com o transportador de maltose do locus *MAL1*. Sua expressão é ativada por genes reguladores constitutivos do sistema *MAL*, e é reprimida pela glicose.

A cepa AP68-7A carrega o gene *AGT1*, e possivelmente o gene transportador *MAL31*, e transporta trealose ao final da primeira fase de crescimento anaeróbico. SDS-PAGE comparando proteínas de membranas de células reprimidas pela glicose (taxa de transporte <0,5 U/mg), com aquelas de células induzidas por α -metilglicosídeo (taxa de transporte de ~35 U/mg), verificou-se 2 bandas (PMs 57 e 66 kDa) exclusivas em membranas de células induzidas.

As 2 bandas foram isoladas por três métodos diferentes (cromatografia de troca iônica, lavagens da membrana com tampão de alta força iônica e cromatografia de afinidade) e testadas para ligação de ^{14}C -trealose. A ligação foi enriquecida ~3 X após a cromatografia de troca iônica.

O transporte de trealose na cepa AP77-4C (que não tem nenhum dos genes transportadores dos loci *MAL*) foi recuperado após sua transformação com plasmídeo *YEpl366-AGT1*. De membranas plasmáticas destas células (transporte de trealose ~25 U/mg) foram isoladas por cromatografia de afinidade, 2 bandas cujos PMs em SDS-PAGE são idênticos aos das proteínas isoladas das membranas da cepa AP68-7A. Estes resultados permitem concluir que o transportador de trealose de leveduras é codificado pelo gene *AGT1*.

ABSTRACT

The *AGT1* gene present in the *mal1g* locus from *S. cerevisiae* maltose transport system encodes a 67 kDa protein which shares 75% similarity and 58% identity with the maltose transporter protein encoded in *MAL6* locus. The expression of this gene is regulated by regulatory genes from *MAL* system and is repressed by glucose.

The strain AP68-7A which harbors the *AGT1* gene and probably the *MAL31* transporter gene, expresses trehalose transport activity at the end of first anaerobic growth. The comparison from the SDS-PAGE of membrane proteins from glucose repressed cells (trehalose transport activity of <0.5 U/mg), and α -methylglucoside induced cells (trehalose transport activity of ~35 U/mg), revealed 2 bands (M_r 57 and 66 kDa) present only in the induced cells membranes.

Those bands were isolated by 3 different methods (ionic exchange chromatography, high strength ionic washes and affinity chromatography), and tested for ^{14}C -trehalose binding. Both bands bind trehalose and this activity was enriched about 3 times after the ionic exchange chromatography.

The trehalose transport activity was recovered by strain AP77-4C, (which does not harbor any *MAL* transporter gene) after its transformation with a plasmid containing the *AGT1* gene. From the membranes of these cells (trehalose transport activity ~25 U/mg) 2 bands were isolated by affinity chromatography with similar M_r s to those isolated from AP68-7A strain. The results permit to conclude that the *AGT1* gene encodes the yeast trehalose transporter.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Trealose e anidrobiose

A anidrobiose, ou capacidade de sobreviver mesmo em total ausência de água, é um fenômeno descrito no final do século XVIII por Leeuwenhoek, em nematóides e tardígrados (Keilin, 1959). Não só estes organismos, mas também insetos, algumas plantas e sementes, esporos de fungos, rotíferos e crustáceos como a *Artemia*, podem permanecer em anidrobiose por longos períodos, recuperando rapidamente a vida ativa quando novamente em presença de água (Leopold, 1986).

Os organismos que sobrevivem à dessecação têm em comum a capacidade de acumular trealose (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosídeo), (Birch, 1963; Elbein, 1974), um dissacarídeo não redutor, formado pela ligação (α 1-1) entre os dois resíduos de glicose (revisto por Panek, 1995). A sobrevivência destes organismos à desidratação está relacionada diretamente ao acúmulo de trealose no citoplasma de suas células, em taxas que atingem até 20% de seu peso seco (Madin & Crowe, 1975).

Para explicar o mecanismo pelo qual a trealose atua na proteção das células contra os danos da dessecação, há uma teoria, conhecida como hipótese da "substituição da água". Tal mecanismo é resultante da capacidade que a trealose possui de se associar às regiões polares dos fosfolípidios da membrana plasmática (Crowe et al., 1984; Gaber et al., 1986; Lee et al., 1986; Crowe et al., 1988; Crowe & Crowe, 1988; Lee et al., 1989; Crowe et al., 1990; Chandrasekhar & Gaber, 1993). Durante o processo de desidratação de bicamadas lipídicas, a remoção da água permite a aproximação dos fosfolípidios adjacentes e o aumento da interação entre suas caudas hidrofóbicas. Esta interação muda o estado de fluidez da bicamada, levando à sua transição do estado líquido-cristalino para o estado gel.

Experimentos feitos com vesículas contendo proteínas transportadoras de cálcio, mostraram que após serem desidratadas, os fosfolipídios da bicamada da vesícula formam domínios e estruturas cristalinas que causam a extrusão das proteínas presentes na membrana. Durante a rehidratação, ocorrem alterações morfológicas e consequente perda da atividade de transporte (Crowe & Crowe, 1982). Entretanto se a desidratação ocorre na presença de trealose (20%), não há alterações estruturais ou morfológicas, e após a rehidratação a atividade de transporte de cálcio é conservada (Crowe et al., 1983)

Vesículas de DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), desidratadas na presença de trealose possuem temperatura de transição de fase (T_m , Chapman et al., 1967) entre 24 °C e 40 °C, próxima da T_m encontrada nas vesículas totalmente hidratadas, que é de cerca de 41 °C. Enquanto isso, as vesículas desidratadas na ausência de trealose apresentam T_m entre 100 e 120 °C (Crowe & Crowe, 1988; Tsvetkov et al., 1989; Fabrie et al., 1990). Nas membranas biológicas, a manutenção da fase líquido-cristalino e da T_m , após a desidratação em presença de trealose, permite que estas sejam rehidratadas em temperaturas fisiológicas, que não comprometem sua estrutura e evitam a ocorrência de vazamentos (Gaber et al., 1986; Beker & Rapoport, 1987; Leslie et al., 1994). A trealose atua durante a remoção da água, como um substituinte da camada de solvatação das bicamadas, impedindo que as cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios se associem, e que haja transição de fase e variações na T_m (esquema 1) (Crowe & Crowe, 1988; Crowe et al., 1984a; 1984b; 1989).

Outra hipótese para explicar o papel protetor da trealose sugeria que a vitrificação do açúcar durante a desidratação preservaria as estruturas celulares (Koster et al., 1994). Porém, foi demonstrado que apesar de sua importância, a vitrificação sem interação direta do açúcar com os fosfolipídios durante a remoção da água, não é eficiente para a proteção (Koster & Leopold, 1988; Green & Angell, 1989; Carpenter, 1993; Crowe & Crowe, 1993). Para prevenir o aumento da T_m das membranas durante a desidratação, o carboidrato deveria possuir

temperatura de vitrificação (T_g) bem maior que a T_m da membrana. Entretanto, foi demonstrado que a glicose e a sacarose, que têm T_g de 30 e 60° C respectivamente, conferem maior proteção à lipossomos de DPPC (T_m de 42°C quando totalmente hidratadas) quando vitrificados, do que dextrana e hidroximetilamido, que têm T_g de 110°C. Aparentemente, a manutenção das membranas no estado líquido cristalino mesmo durante a vitrificação depende da inserção do carboidrato entre as cabeças polares dos fosfolipídios e sua interação com este grupo (Crowe et al., 1996a; 1996b; Oliver et al., 1998)

Em células inteiras, além de se associar à membrana, a trealose também pode se ligar às regiões hidrofílicas das proteínas celulares submetidas à desidratação, ajudando na manutenção da estrutura terciária destas moléculas mesmo quando toda a água de solvatação foi removida (Carpenter & Crowe, 1989; Carpenter, 1993; Prestrelski, 1993).

1.2. *Saccharomyces cerevisiae* a trealose

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um eucarionte unicelular com capacidade de fermentar diferentes fontes de carbono na presença de oxigênio (metabolismo anaeróbico). Esta característica permite sua utilização prática na panificação, fabricação de bebidas alcoólicas e combustíveis. Em meio contendo concentrações relativamente altas de um carboidrato, como ocorre no habitat natural deste microorganismo, mesmo na presença de oxigênio a levedura realiza principalmente metabolismo anaeróbico, fermentando o açúcar até CO₂, etanol, glicerol e ácidos orgânicos (Lagunas, 1979), fenômeno fisiológico conhecido como efeito “Crabtree” (Fiechter et al., 1981). O metabolismo aeróbico se inicia quando o açúcar presente no meio se torna escasso. Os produtos da fermentação são então consumidos nos processos de respiração celular.

Culturas de *S. cerevisiae* em meio líquido contendo glicose como fonte de carbono e na presença de oxigênio, apresentam três fases de crescimento.

Esquema 1. Estabilização de membranas biológicas durante a desidratação em presença de trealose. As membranas desidratadas na ausência de trealose sofrem transição de fase de líquido-cristalino para o estado gel. Na presença de trealose, esta se associa com as cabeças polares dos fosfolípidios da membrana e impede a transição de fase (modificado de Beker & Rapoport, 1987; Crowe et al., 1988; Crowe & Crowe, 1992).

Na primeira fase, de crescimento exponencial, as células reprimidas pela glicose consomem grande parte do açúcar através de metabolismo anaeróbico. Durante esta fase, apenas cerca de 13% da glicose total consumida é respirada e assimilada nos constituintes celulares, o restante é acumulado nos produtos de fermentação. Quando cerca de 50% da glicose presente no meio de cultura já foi degradada, as células entram na segunda fase do crescimento, conhecida como transição ou diauxia. As células agora de-reprimidas pela queda da concentração de glicose no meio, começam a assimilar aeróbicamente os compostos acumulados durante o crescimento logarítmico, e apresentam uma queda considerável na taxa de crescimento. Quando todo o etanol presente no meio é consumido, a cultura entra na fase estacionária, mantendo o metabolismo aeróbico sem que haja ganho de massa ao longo do tempo (Lagunas, 1976; Fraenkel, 1982; Rieger et al., 1983; Lewis et al., 1993).

Vários sistemas de transporte de açúcares presentes na membrana plasmática de *S. cerevisiae* já foram descritos e caracterizados, sendo que a regulação desta atividade é realizada provavelmente por repressão e inativação catabólica (Busturia & Lagunas, 1985, 1986). A glicose é transportada por dois carreadores diferentes, com diferentes mecanismos. Há um sistema de difusão facilitada com baixa afinidade pelo substrato, que está ativo durante a fase exponencial, quando as células estão reprimidas (Bisson & Fraenkel, 1983; Lang & Cirillo, 1987). Quando as concentrações de glicose no meio começam a baixar, a levedura sintetiza transportadores com maior afinidade pela glicose (Postma et al., 1988). Para galactose foi caracterizado um sistema de transporte facilitado de alta afinidade, que possui dois mecanismos de regulação independentes, indução por galactose e repressão por glicose (Cirillo, 1968; Mattern & Holzer, 1977; De Juan & Lagunas, 1986; Lagunas, 1993).

Dissacarídeos e oligossacarídeos também são utilizados como fonte de carbono, tanto α -glicosídeos como β -frutosídeos ou α -galactosídeos. Porém, apenas os α -glicosídeos necessitam ser transportados para o interior da célula

para serem hidrolisados. As enzimas que hidrolizam os demais oligossacarídeos estão ancoradas na parede celular e a hidrólise ocorre no meio extracelular (Barnet, 1981; Frankel, 1982; Gancedo & Serrano, 1989; Lagunas, 1993)

A presença de trealose em *Saccharomyces cerevisiae* foi descrita pela primeira vez por Koch & Koch (1925) (apud Panek, 1991). Devido às características de seu metabolismo nesta levedura, acreditou-se por muito tempo que sua principal função era de carboidrato de reserva (Thevelein, 1984). Em *S.cerevisiae* o acúmulo de trealose ocorre em situações onde há depleção de nutrientes do meio de cultura, como a glicose, o nitrogênio, sulfato ou fosfato, ou ainda em mudanças nos estágios do ciclo celular: períodos imediatamente anteriores à gemulação e à formação dos esporos, e durante a diauxia, onde há a transição para a fase estacionária do crescimento (Panek, 1962; Kuenzi & Fiechter, 1972; Kane & Roth, 1974; Grba et al., 1975; Panek, 1975; Panek & Mattoon, 1977). O dissacarídeo que foi acumulado nestas circunstâncias é degradado durante a germinação (Panek & Bernardes, 1983), gemulação (Kuenzi & Fiechter, 1969) e quando as células em repouso reiniciam o crescimento (Suomalainen & Pfäffli, 1961).

1.2.1. Metabolismo de trealose em *S. cerevisiae*

As vias de síntese e degradação de trealose em *S.cerevisiae* já estão identificadas e as enzimas responsáveis pelos processos já foram purificadas e caracterizadas. Há duas enzimas na via de síntese e ao menos duas enzimas com capacidade de hidrolisar o dissacarídeo.

A trealose é sintetizada no citoplasma da célula de *S. cerevisiae* a partir de glicose-6-fosfato e UDP-glicose pelas trealose-6-fosfato sintase e a trealose-6-fosfatase (Elander et al., 1968; Elbein, 1974; Panek et al., 1987; Vandercammen et al., 1989; Londesborough & Vuorio, 1991; Vuorio et al., 1992; Bell et al., 1998). As duas enzimas encontram-se associadas num complexo de síntese que contém pelo menos quatro subunidades, e cujos genes já foram

identificados e clonados. A atividade trealose-6-fosfato sintase é desempenhada por uma subunidade de 56 kDa, codificada pelo gene *TPS1* (Bell et al., 1992). A atividade dessa subunidade foi identificada quando a introdução do gene *TPS1* complementou uma cepa de *E. coli* que não apresentava atividade de trealose-6-fosfato sintase (McDougall et al., 1993). O gene *TPS1* é idêntico a outros que regulam o metabolismo da glicose em leveduras (González et al., 1992; Hohmann et al., 1992; Van Aelst et al., 1993), e se acredita que o complexo de síntese de trealose possa também estar envolvido na regulação da glicólise (Thevelein & Hohmann, 1995).

A subunidade de 100 kDa do complexo de síntese de trealose é codificada pelo gene *TSP2*, e é responsável pela atividade de trealose-6-fosfatase (De Virgilio et al., 1993). Dois outros genes, *TPS3* que codifica um peptídeo de 123 kDa, e o gene *TLS1* são responsáveis pela regulação do complexo de síntese (De Virgilio et al., 1997; Bell et al., 1998).

Quanto à degradação da trealose, foram descritas duas trealases em *S. cerevisiae*: “trealse neutra” citoplasmática, codificada pelo gene *NTH1* (van Solingen et al., 1975; Keller et al., 1982; Londesborough & Varimo, 1984; Dellamora-Ortiz et al., 1986; App & Holzer, 1989; Kopp et al., 1993) e “trealse ácida” vacuolar (Londesborough & Varimo, 1984; Mittenbühler & Holzer, 1988, 1990; Kienle et al., 1993), produto do gene *ATH1* (Destruelle et al., 1995). O gene *YBR0106* (*NTH2*), possivelmente codifica uma terceira trealse, pois apresenta 77% de identidade com o gene *NTH1* (Wolfe & Lohan, 1994). Apesar disso, estudos em cepas que foram submetidas à disrupção deste gene, não mostraram nenhuma mudança na atividade trealásica total, nem variações na concentração de trealose nas células. Entretanto, ficou demonstrado que o produto deste gene, bem como o do gene *NTH1* desempenham função de proteínas de “heat shock” (Holzer et al., 1995).

A trealse citoplasmática tem cerca de 80 kDa, um pH ótimo em torno de 7, é ativada por um processo de fosforilação dependente do AMPc, e sua

atividade é dependente de Ca^{2+} ou Mn^{2+} e inibida por Zn^{2+} (Ortiz et al., 1983; Londesborough & Varimo, 1984; Panek et al., 1987). A trealase ácida é uma glicoproteína de cerca de 220 kDa, pH ótimo de 4,5, independente de íons divalentes (Mittenbühler & Holzer, 1988). Nwaka et al. (1996), demonstraram que mutantes que não possuem o gene da trealase ácida, *ATH1*, são incapazes de crescer em meio contendo unicamente trealose como fonte de carbono, ao contrário dos mutantes que não possuem apenas o gene da trealase neutra, *NTH1*. Aparentemente há especificidade na degradação da trealose obtida por diferentes vias pelas células de *S. cerevisiae* (síntese ou transporte a partir do meio externo). A “trease neutra” do citoplasma seria responsável pela degradação da trealose sintetizada e acumulada dentro da célula, haja vista que os mutantes para esta enzima crescem normalmente utilizando trealose externa como fonte de carbono.

Por outro lado, mutantes que não tem a trease vacuolar, não crescem utilizando trealose como fonte de carbono, mesmo fenótipo que é observado em cepas que apresentam defeitos na biogênese dos vacúolos. Isto sugere que a trease ácida seja responsável pela utilização da trealose que foi captada e não da sintetizada pela célula.

Como a regulação das enzimas de síntese e degradação de trealose é feita por um sistema de interconversão das formas fosforilada/desfosforilada, desencadeado por uma proteína quinase dependente do AMPc (Panek et al., 1987; Ortiz et al., 1983; Uno et al., 1983), semelhante ao complexo de síntese e degradação do glicogênio (Fosset et al., 1971; Rothman-Denes & Cabib, 1971), considerou-se por muito tempo que a trealose, como o glicogênio, era unicamente um carboidrato de reserva em *S. cerevisiae*.

Entretanto, a diferença na dinâmica de mobilização dos dois carboidratos não é compatível com a hipótese de que eles desempenhassem o mesmo papel metabólico. Em culturas de células de *S. cerevisiae* crescendo em meio contendo glicose como fonte de carbono, o acúmulo de trealose inicia-se na

diauxia, quando há a transição para a fase estacionária do crescimento, atingindo seu máximo na a fase pós-diáuxica. Já o glicogênio começa a ser acumulado antes da exaustão da glicose do meio, atingindo seu ponto máximo pouco antes da diauxia (Lillie & Pringle, 1980).

Estudos mais detalhados sobre a tolerância das células de *S. cerevisiae* à dessecação (Hottiger et al., 1987a; Mackenzie et al., 1988; Singh & Norton, 1991), à choques térmicos (Hottiger et al., 1987b e 1989; Trollmo et al., 1988; Panek et al., 1989) e à processos de congelamento e descongelamento (Coutinho et al., 1988; Gélinas et al., 1989; Hino et al., 1990; Attifield et al., 1992) sempre associados à presença e ao acúmulo de trealose, e a caracterização deste açúcar como um importante agente protetor de membranas e proteínas, permitiram por fim, comprovar o importante papel da trealose como agente protetor contra os danos causados pela dessecação em levedura. O acúmulo de trealose durante a fase estacionária do crescimento de *S. cerevisiae* está correlacionado com o aumento de sobrevivência das células. Na fase exponencial do crescimento, quando não há trealose acumulada, a taxa de sobrevivência é menor do que a verificada durante a fase estacionária. A sobrevivência de células na fase exponencial pode ser aumentada entretanto, se elas forem submetidas a um choque térmico, que induz rapidamente a síntese e o acúmulo de trealose (Hottiger et al., 1987a, 1987b, 1989; Elliot & Fitcher, 1993).

1.2.2. O Sistema Transportador de Trealose de *Saccharomyces cerevisiae*

O sistema de transporte de trealose através da membrana plasmática de leveduras foi descrito pela primeira vez em 1979, por Kotyk & Michaljanicová. Trata-se de um processo ativo, sem efluxo do açúcar e com pH ótimo em torno de 5,5. Estes autores também verificaram a ocorrência de duas formas de transporte, uma de alta e outra de baixa afinidade. Posteriormente o transportador foi caracterizado em estudo mais detalhado em células inteiras de

S. cerevisiae, nas quais se confirmou que o sistema é formado por dois componentes independentes, com afinidades diferentes (Crowe et al., 1991).

O componente de alta afinidade tem Km estimado em cerca de 4 mM, e é regulado negativamente pela presença de glicose (Crowe et al., 1991; Stambuk et al., 1996). Este componente do sistema de transporte de trealose, encontra-se reprimido durante a fase exponencial do crescimento pela glicose presente no meio. Há um acréscimo contínuo da sua atividade de transporte durante a de-repressão das células, atingindo o ponto máximo durante a fase da diauxia. A atividade começa então a diminuir gradativamente até a cultura entrar na fase estacionária. A repressão e a inativação catabólica dos sistemas de metabolismo de carboidratos pela glicose, já foram descritas anteriormente para os sistemas de transporte de maltose (Busturias & Lagunas, 1985), glicose (Busturias & Lagunas, 1986) e galactose (DeJuan & Lagunas, 1986), além de ocorrer também no complexo de síntese de trealose (Paschoalin et al., 1987; François et al., 1991).

Características cinéticas semelhantes àsquelas determinadas em células inteiras foram verificadas para o transporte de trealose em vesículas de membranas plasmáticas isoladas de células de levedura (de Araujo et al., 1991). Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que o componente de alta afinidade está diretamente associado ao transporte de prótons através da membrana. Trata-se de um sistema de transporte do tipo *symport* H⁺/trealose, que transloca simultaneamente um próton para cada molécula de trealose (Stambuk et al., 1996). O transporte de maltose em *S. cerevisiae* (Serrano, 1977) e de hexoses em *Chlorella* sp. (Komor et al., 1983) também é feito por um mecanismo do tipo *symport*. Há uma forte correlação entre a expressão do transportador de trealose em *S. cerevisiae* e o nível de acúmulo de trealose pela célula. A trealose acumulada no citoplasma da célula de levedura pode ser indutora da atividade de transporte, ou as rotas de seu acúmulo e transporte seriam reguladas pelos mesmos elementos (Stambuk et al., 1998).

O sistema de transporte de trealose de baixa afinidade teve seu K_m estimado em 100 mM, e não sofre os efeitos da presença da glicose no meio. A não repressão por glicose e a ausência de co-transporte de prótons são indícios de que este seja um de um processo de difusão através da membrana (Crowe et al., 1991; Stambuk et al., 1996).

O fato da trealose não ser um açúcar disponível como fonte de carbono na natureza levantou questões a respeito da presença e do papel de um sistema de transporte deste carboidrato em um organismo que é capaz de sintetizá-lo. Crowe & Crowe (1986) já haviam demonstrado que para trealose atuar como protetor em situações de dessecação de membranas, era necessária a sua associação com os fosfolipídios dos dois lados da bicamada. A necessidade da presença da trealose nos dois lados da membrana plasmática sugeriu que o transportador presente em células de *S. cerevisiae*, seria o responsável pelo carregamento da trealose sintetizada pela célula, para o seu exterior. Apesar de já haver sido demonstrado que os principais *symporter* de levedura são unidirecionais *in vivo* (Serrano, 1991), em vesículas isoladas de membrana plasmáticas foi observado ocorrer efluxo do substrato quando o gradiente de prótons através da membrana foi dissipado (de Araujo et al., 1991; Van Leeuwen et al., 1992; van der Rest et al., 1995).

A capacidade da trealose atuar como protetor contra a desidratação em células inteiras de levedura, depende portanto, da presença de um sistema que seja capaz de escoá-la através da membrana plasmática. O primeiro trabalho que mostrou haver esse carregamento de trealose entre o interior e o exterior das células durante o processo de dessecação foi de Damberg, em 1982 (apud Beker & Rapoport, 1987). O autor demonstrou que durante a desidratação cerca de 16% do conteúdo de trealose intracelular é excretada para o meio de incubação. Posteriormente, durante a rehidratação, 60% da trealose presente no meio era reabsorvida pelas células. Ou seja, transporte de trealose ocorre durante a desidratação e a posterior rehidratação das células de levedura.

A extrusão de trealose para o exterior das células de *S. cerevisiae* como condição determinante da capacidade de resistir à desidratação, foi comprovada em um trabalho utilizando dois tipos diferentes de mutantes. Os primeiros não apresentam atividade de transporte de trealose, apesar de sintetizarem e acumularem este açúcar. Os outros mutantes não sintetizam e nem acumulam trealose, mas expressam o transportador normalmente. A taxa de sobrevivência destes mutantes após desidratação e posterior rehidratação é menor que 1%. Esta situação foi revertida para os dois mutantes, quando as células foram desidratadas e rehidratadas em meio contendo 10% de trealose. A taxa de sobrevivência verificada neste caso foi de 40% (Eleutherio et al., 1993).

1.2.2.1. Transporte de trealose e maltose

Devido à demonstração da existência de competição de maltose pelo transportador de trealose (Kotyk & Michaljanicová, 1979; Crowe et al., 1991) e vice-versa (Alonso & Kotyk, 1978), o transporte dos dois dissacarídeos foi inicialmente considerado ocorrer via um só transportador, o de maltose, cujo sistema está bem caracterizado genética e bioquimicamente. O sistema transportador de maltose é formado por uma série de 5 *loci* MAL não ligados, MAL1, MAL2, MAL3 MAL4, e MAL6. A presença de qualquer um destes *loci* é suficiente para o transporte e utilização da maltose (Needleman, 1991). Cada um dos *loci* MAL é um complexo de três de genes, todos necessários à metabolização completa da maltose. O gene 1 codifica para uma proteína transportadora (Chang et al., 1989; Cheng & Michels 1989; 1991). O gene 2 para uma α -hidrolase, a maltase (Dubin et al., 1985; Hong & Mamur, 1987). E o gene 3 é um regulador, necessário prara a expressão indutível dos dois genes estruturais (Charron et al., 1986; Chang et al., 1988; Kim & Michels, 1988; Sollitti & Mamur, 1988). Nos *loci* MAL3 e MAL6 além do gene 3, foi identificado um outro gene regulador, o gene 4 (Charron et al., 1986; Cohen et al., 1984 e 1985; Needleman et al., 1984). Também já foram caracterizados três tipos de *loci* MAL

parcialmente funcionais, que possuem apenas um ou dois dos genes do locus normal (*malg*: apresenta os genes 1 e 2, *malp* possui só o gene 3 e *mal^p* possui apenas o gene 2) (Charron & Michels, 1988; Chow et al., 1989; Michels & Needleman, 1984; Michels et al., 1992; Naumov et al., 1991; Needleman & Michels, 1983; Vanoni et al., 1989).

Apesar das permeases codificadas pelos genes 1 dos vários loci *MAL* não serem específicas para maltose, e transportarem com diferentes afinidades vários α -glicosídeos, os transportadores codificados pelos loci *MAL1*, *MAL2* e *MAL4* não são capazes de transportar trealose (Stambuk et al., 1998), e a permease codificada pelo gene 1 presente no locus *MAL6* é específica para maltose e turanose (Chang et al., 1989; Stambuk et al., 1998).

Em 1988, Charron & Michels descreveram um alelo do gene 1 presente no locus parcialmente funcional *mal1g*, diferente dos genes 1 dos outros loci *MAL*, e sugeriram que este gene codificasse um transportador de α -glicosídeos com especificidade de substratos diferente da permease codificada pelo gene 1 do locus *MAL6*. Na caracterização desta permease foi verificado que ela apresenta 57% de identidade e 75% de similaridade com a permease Mal61p, e seria capaz de transportar maltose, turanose, palatinose, isomaltose, α -metil-glicosídeo e maltotriose, mas não transportaria trealose e melezitose. Devido a essa ampla variedade de substratos, o gene foi denominado transportador de α -glucosídeos, *AGT1* (Han et al., 1995).

A expressão do gene *AGT1* é indutível por maltose e mediada por reguladores de expressão dos loci *MAL*. A proteína Agt1 possui 617 resíduos de aminoácidos, com significativa homologia estrutural com os demais membros identificados da superfamília de permeases de levedura que possuem 12 domínios transmembrana (MFS). As proteínas desta superfamília são caracterizados pela presença de duas unidades estruturais de 6 segmentos de α -hélice que atravessam a membrana, e são conectados por alças citoplasmáticas (Nelissen et al., 1997). Os transportadores de açúcares de levedura formam a

maior família dentro das MFS, formada por 34 membros entre os quais se encontram os transportadores de glicose (Lewis & Bisson, 1991) e galactose (Nehlin et al., 1989).

A especificidade da permease Agt1 descrita por Han et al. (1995), foi determinada pela comparação do crescimento e da capacidade de fermentação de cepas contendo o gene *AGT1*, com o obtido de cepas carregando o gene *MAL61*. Esta abordagem pode não ser a mais adequada neste tipo de análise, já que não metabolizar um determinado açúcar e não crescer utilizando-o como fonte de carbono pode estar relacionada não com a incapacidade de transportá-lo para o interior da célula, mas sim com alguma falha no sistema de degradação (ver Nwaka et al., 1996). Além disso, no caso do transporte de α -glucosídeos, deve-se considerar a presença do sistema de transporte constitutivo de baixa afinidade (Crowe et al, 1991; Stambuk et al., 1996), que em altas concentrações de açúcar, é capaz de garantir os requerimentos necessários para o crescimento das células.

Testes estritos de transporte de trealose realizados em várias cepas, demonstraram que o carregamento de trealose estava sempre associado à presença dos seguintes *loci*: *MAL* constitutivo (*MAL^c*) no qual o gene regulador é expresso constitutivamente, *MAL3* e *mal1g* (Stambuk, 1995). Foi demonstrado também, que cepas que eram posteriormente deletadas do *locus mal1g* perdiam a capacidade de transportar trealose, sugerindo a possibilidade da proteína transportadora codificada pelo gene *AGT1* ser também capaz de transportar trealose. Cruzando cepas que possuíam apenas o *locus mal1g* e portanto não eram capazes de transportar maltose, com cepas contendo apenas os genes reguladores dos *loci MAL*, as cepas resultantes foram capazes de transportar maltose, mas não trealose. Do cruzamento destas cepas carregando o gene *AGT1* e capazes de transportar maltose, com outra contendo apenas o gene regulador constitutivo dos *loci MAL*, resultaram diplóides que possuíam tanto a capacidade de transportar maltose como trealose. A taxa de transporte inicial de

trealose nestas cepas foi consideravelmente maior que a de maltose (Stambuk et al., 1998). Algumas das cepas utilizadas neste trabalho contém o gene 1 do locus *MAL3*, porém todas carregam o gene o *AGT1*, do locus *mal1g*. Apesar de não ser possível ainda excluir a possibilidade do transportador codificado pelo gene 1 do locus *MAL3* ser também responsável pelo transporte preferencial de trealose em *S. cerevisiae*, os resultados obtidos até o momento são indicativos de que tal transporte é realizado pela proteína expressa pelo gene *AGT1*.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tinha como objetivos estabelecer uma metodologia correta para a solubilização e identificação da proteína responsável pelo transporte de trealose, presente na membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e isolá-la a níveis suficientes para sua utilização posterior em reconstituição em vesículas.

Além disso, foram empregados esforços para provar que a proteína transportadora de trealose presente em leveduras é codificada pelo gene *AGT1* (alpha glucoside transporter 1), descrito em 1995 por Han et al.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método do biureto (Peters et al., 1982), pelo método do BCA (Smith et al., 1985) modificado por Morton & Evans (1992), ou pelo método do amido black (Kaplan & Pedersen, 1985)

3.2. Extração de carboidratos intracelulares

As células de levedura coletadas por centrifugação (3 minutos a 500 x g) foram lavadas 3 vezes em água destilada a 4°C e congeladas e armazenadas a -20°C. 3 volumes de ácido tricloroacético 0,5 M foram adicionados aos “pellets” de células congeladas, e os carboidratos intracelulares foram extraídos por 40 minutos a 4°C. Após centrifugação e uma segunda extração, os sobrenadantes foram combinados e utilizados para as análises.

3.3. Dosagem de carboidratos totais

Os carboidratos extraídos das células foram dosados pelo método do fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al.(1956), utilizando trealose como padrão.

3.4. Análise dos carboidratos intracelulares

Os extratos de carboidratos extraídos com TCA 0,5 M foram tratados com éter para a remoção do ácido, até o pH da fase aquosa atingir 5,0, e os carboidratos foram analisados qualitativamente por cromatografia de camada delgada (TLC) em Sílica Gel 60 (Merck). O solvente usado foi *n*-butanol/etanol/água (5/2/1 v/v), como padrões, foram utilizados 10 µg de glicose, de trealose e de glicogênio. A cromatografia foi revelada com ácido sulfúrico 20% a 100 °C por 15 minutos.

3.5. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

As proteínas destinadas à eletroforese em gel de poliacrilamida foram preparadas em tampão de amostra (Tris 125 mM-pH 6,8, SDS 0,14 M, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0,03 mM, e desnaturadas por 60 minutos a temperatura de 60°C. Para a separação eletroforética foram utilizados géis de empilhamento de 4% de poliacrilamida e géis de separação linear de 9 ou 12,5%, ambos contendo SDS 0,1%, como descrito por Laemmli (1970). Os géis de 1,5 mm de espessura foram submetidos a uma corrente constante de 25 mA/gel e os de 0,75 mm a 12,5 mA/gel, em tampão tris 0,1 M, glicina 0,768 M e SDS 0,4%. Os géis foram corados com prata (Blum et al., 1987) ou com Comassie blue, e os pesos moleculares aparentes das proteínas foram calculados utilizando padrões de alto peso molecular Sigma Marker, contendo as seguintes proteínas: miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), frutose-6-fosfato quinase (84kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), glutâmico desidrogenase (55 kDa), ovoalbumina (45kDa) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa).

3.6. Cepas utilizadas

Neste trabalho foram utilizadas 4 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* : AP68-7A e AP77-4C, haplóides segregantes respectivamente das cepas diplóides AP68 e AP77, obtidas pela Dr. Anita D. Panek (Dep. de Bioquímica- IQ - UFRJ) e AP77-4C-p56-5, obtida pelo Prof. Bóris Stambuk (Dep. Bioquímica - ICB - UFSC) da transformação da cepa AP77-4C com o plasmídeo multicópia YEp366-AGT1, que contém o gene *AGT1* completo, mais sua região upstream e a região de replicação autônoma em levedura (2 μ), além do gene de seleção LEU2 e da origem de replicação em bactérias. Este plasmídeo foi construído e descrito por Han et al. 1995. As cepas AP68-7A e Ap77-4C-p56-5 apresentam altas taxas de transporte de trealose.

Cepas	genótipos
S288C	<i>MATα AGT1 MAL12 mal13Δ MAL31 MAL32 mal33 gal2 me)</i>
MAL1-1^c-D	<i>MATα mal11 mal12 MAL13-1^c [mal21 mal22]::TRP1 mal23 leu1 trp</i>
W303-1B	<i>MATα AGT1 MAL12 mal13Δ MAL32 mal33Δ ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>
AP68	diplóide do cruzamento SC288C X MAL1-1 ^c -D
AP68-7A	haplóide segregada da cepa AP68
AP77	diplóide do cruzamento W303-1B X MAL1-1 ^c -D
AP77-4C	haplóide segregada da cepa AP77
AP77-4C-p56-5	haplóide da transformação da cepa AP77-4C com o plasmídeo YEp366-AGT1.

Tabela 1. Genótipos das cepas utilizadas nos cruzamentos e segregação das cepas haplóides utilizadas neste trabalho.

3.7. Meios de cultura

Para o crescimento das células foram utilizados meios de cultura líquidos YPD 2% (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%), YP α 2% (extrato de levedura 1%, peptona 2% e α -metilglucopiranosídeo 2%), meio mínimo enriquecido/leu+ (MES 50mM, pH 6,0, extrato de levedura sem aminoácidos 0,7%, glicose 2%, acrescido de: adenina (40 μ g/ml), arginina (20 μ g/ml), ácido aspártico (50 μ g/ml), ácido glutâmico (100 μ g/ml), histidina (20 μ g/ml), leucina (120 μ g/ml), lisina (30 μ g/ml), metionina (20 μ g/ml), fenilalanina (50 μ g/ml), serina (375 μ g/ml), treonina (200 μ g/ml), triptofano (20 μ g/ml), tirosina (30 μ g/ml), valina (150 μ g/ml), uracila (20 μ g/ml) e meio mínimo enriquecido/leu-, que possui os mesmos constituintes do meio mínimo enriquecido, porém sem leucina).

Também foram utilizados meios sólidos: YPD 2% (meio YPD2% acrescido de ágar para uma concentração final de 1,5%) e meio mínimo sem aminoácidos, acrescido apenas de uracila (0,003%), e de ágar (1,5%).

3.8. Métodos de cultivo

Os repiques em meio sólido eram sempre feitos em estufa a 28 °C. O cultivo em meio líquido foi sempre realizado em enrlenmeyers com 1/5 de seu volume preenchido, sob agitação constante (160 rpm), e a temperatura de 28°C. A densidade celular das culturas era calculada a partir dos valores de absorbância a 570 nm de alíquotas retiradas das culturas, com o auxílio de um fator de correção, anteriormente estimado para cada fase de crescimento e específico para cada cepa.

3.8.1. Células da cepa AP68-7A reprimidas

Para obter uma cultura da cepa AP68-7A reprimidas, sem transporte de trealose, células de um repique novo crescidas em meio YPD 2% sólido eram inoculadas em meio YPD 2% líquido, e incubadas nas condições padrão até atingir a densidade celular em torno de 1mg/ml, após aproximadamente 12 horas de crescimento.

3.8.2. Células da cepa AP68-7A induzidas

Para células da cepa AP68-7A com atividade de transporte de trealose, as células do repique novo eram inoculadas em meio YP α 2%, e cultivadas por cerca de 20 h nas mesmas condições descritas acima, até a densidade entre 4,0 e 4,3 mg/ml.

3.8.3. Células da cepas AP77-4C e AP77-4C-p56-5

No caso das cepas AP77-4C e AP77-4C-p56-5, os repiques eram feitos em meio mínimo sólido, e inoculados em meio mínimo enriquecido/leu+, para a primeira, e /leu- para a segunda. Devido a presença de um gene seletor no plasmídeo (LEU), a cepa transformada deve ser crescida em meio ausente de leucina, para que as células mantenham o plasmídeo ao longo de várias gerações. Entretanto, a taxa de crescimento em meio mínimo é bem baixa, e o acúmulo de massa no ponto em que o transporte de trealose é adequado é relativamente baixo. Para um maior rendimento em massa celular das culturas, após crescerem em condições de agitação e temperatura padrão até a densidade média de 1,5 mg/ml (cerca de 20 horas), na qual a taxa de transporte de trealose é de cerca de 20 U/mg para a cepa contendo o plasmídeo, e <0,5 U/mg para a cepa controle, as células eram coletadas por centrifugação (10 minutos a 1000 x g), e inoculadas no mesmo volume inicial de meio líquido YPD 2%. A cultura era incubada por mais 15-16 horas nas condições padrão, e só então utilizada, quando atingia densidade de cerca de 3,0 - 3,2 mg/ml. A taxa de transporte obtido para a cepa transformada nesse estágio é semelhante àquela exibida após o crescimento inicial em meio mínimo enriquecido, 25 U/mg.

3.9. Curvas de crescimento

Células de um repique novo, foram ressuspensas em 10 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, e 50 μ g de células desta suspensão foram inoculadas em 250 ml de YPD 2%. Alíquotas de 10 ml da cultura foram retiradas, filtradas em filtro

de nitrocelulose com poros de 0,45 μm , e secas em estufa a 80°C até peso constante. Em paralelo, para cada ponto onde foi determinado o peso seco, foram também tomadas amostras da cultura para a determinação do valor da absorbância a 570 nm, para a extração de carboidratos e para determinar a atividade de transporte de trealose. As coletas das amostras foram realizadas a cada 2 horas a partir de 12 horas de e até 56 horas após o inóculo.

O peso seco e o valor da absorbância absoluta para cada ponto ao longo do crescimento foram utilizados para o cálculo de um fator de conversão das medidas das absorbâncias das culturas a 570 nm em peso seco.

3.10. Medidas de transporte de ^{14}C -treiose em células de levedura

A atividade de transporte de treiose foi determinada através da incorporação de ^{14}C -treiose pelas células de levedura da cepa AP68-7A, segundo o método descrito por Crowe et al. (1991).

Após crescer até a densidade desejada, as células eram lavadas 3 vezes e ressuspensas em água gelada para uma densidade final entre 10 e 15 mg/ml. À alíquotas de 150 μl desta suspensão eram adicionados 150 μl de tampão tris-succinato 100 mM, pH 5,0, e a suspensão de células era mantida por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a adição de 16 μl de ^{14}C -treiose 100 mM para se obter uma concentração final de 5 mM no ensaio, alíquotas de 100 μl foram retiradas a 1, 3 e 5 minutos, filtradas rapidamente em filtro de nitrocelulose com poros de 0,45 μm e lavadas com 2 ml de água destilada gelada. Os filtros eram embebidos em 10 ml de líquido de cintilação miscível, e a radioatividade foi determinada após 24 horas, em um contador de cintilação Rackbeta 1214 (LKB). Uma unidade de atividade de transporte (1U), corresponde a 1 ηmol de ^{14}C -treiose incorporado $\times \text{minuto}^{-1}$. A atividade específica de transporte é determinada por $\eta\text{mol } ^{14}\text{C}$ -treiose $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de células: U/mg.

3.11. Purificação de membranas plasmáticas

Membranas plasmáticas das células da cepa AP68-7A reprimidas e induzidas eram purificadas utilizando o método descrito por Kolarov et al. (1988) modificado.

Células de um repique novo crescido nas condições padrão eram inoculadas em de YPD 2%, e incubadas até atingir densidade celular entre 3,7 e 3,9 mg/ml, formando um pré-inóculo com atividade de transporte de cerca de 12 U/mg. Uma alíquota deste pré-inóculo era transferida para meio YPD 2% para uma concentração final de 9,6 µg de células /ml (purificação de membranas de células reprimidas), ou para YP α 2%, num volume suficiente para que a concentração final fosse de 165 µg/ml (membranas induzidas).

Após o crescimento até a densidade desejada (1,0 mg/ml para células reprimidas e 4,0-4,3 mg/ml para células induzidas), as células eram coletadas por centrifugação (500xg, 10 min), lavadas com água gelada e novamente centrifugadas (500 x g, 10 min) por duas vezes e uma vez com o tampão MOPS-KOH 50 mM, sacarose 250 mM, MgCl₂ 1 mM, PMSF 0,25 mM e benzamidina 0,25 mM, pH 7,5. As células precipitadas eram ressuspensas no mesmo tampão, na proporção de 100 ml de tampão para cada 40 g de células, e homogeneizadas a 4°C, em Bead Beater (Biospec Products), utilizando pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro (120 g para cada 40 g de células). Para as células da cepa AP68-7A induzidas, foram utilizados 15 ciclos de 1 minuto de homogeneização, com intervalos de 1 minuto em banho de gelo. Para as células das cepas AP68-7A reprimidas, AP77-4C e AP77-4C-p56-5 foram utilizados 7 ciclos de homogeneização.

O homogenato era coletado, e as pérolas eram lavadas duas vezes com 10 a 20 ml de tampão de homogeneização. O pH do homogenato era ajustado para 7,5 com KOH 1 M, e as paredes celulares e células inteiras removidas por 2 centrifugações a 500 x g e uma a 1.500 x g por 10 minutos. O pH do sobrenadante final coletado era ajustado para 7,5 e novamente submetido à centrifugação (30.000 x g, 30 minutos). O precipitado, que corresponde a uma fração bruta de

membranas, era ressuspensão em tampão Tris-succinato 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, PMSF 0,25 mM, e benzamidina 0,25mM, pH 5,2. A concentração proteica desta fração era determinada rapidamente pelo método do biureto e ajustada para aproximadamente 5 mg/ml. O pH era reajustado para 5,2 com ácido succínico 100 mM, e a suspensão bruta de membranas era centrifugada por 10 minutos, a 2000 x g, para precipitar a fração de mitocôndrias.

Após coletar o sobrenadante, seu pH era reajustado novamente para 7,5 com KOH 1M e a fração de membrana plasmática era coletada por centrifugação a 100.000 x g por 40 minutos. O precipitado de membrana era ressuspensão por agitação vigorosa em tampão TES-KOH 20 mM, sorbitol 0,3 M, EDTA 1 mM e DTT 0,5 mM, pH 7,5. A concentração de proteína final era estimada pelo método do BCA ou do amido black, e ajustada para 1-2 mg/ml. A preparação era então imediatamente utilizada, ou aliquoteada e rapidamente congelada em banho de gelo seco e álcool, e armazenada a $-80^{\circ}C$ até sua utilização.

3.12. Solubilização das membranas plasmáticas

Volumes de membrana purificada suficiente para obter 10 mg de proteína eram centrifugados a 100.000 x g por 40 minutos, e o precipitado era ressuspensão em tampão Tris 20 mM, octil β -glucopiranosídeo 3%, pH 7,5 ou citrato 20mM, octil β -D-glucosídeo 3% -pH 5,2, ambos contendo PMSF 0,25 mM e benzamidina 0,5 mM, num volume final de 2 ml. A concentração de proteína na suspensão de solubilização era via de regra, 5mg/ml. As amostras eram mantidas por 12 horas sob agitação, em banho de gelo, e em seguida centrifugadas por 40 minutos a 100.000 x g. O sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas era coletado e o precipitado ressuspensão no tampão de solubilização. A concentração proteica das duas frações era determinada pelo método de BCA ou do amido black e calculadas as taxas de solubilização.

3.13. Remoção de detergente e delipidação

A remoção de detergente de amostras de até 200 µg de proteínas solubilizadas ou, a delipidação de membranas íntegras para serem aplicadas em SDS-PAGE, era feita pelo método descrito por Wessel & Flügge (1984). As amostras eram colocadas em tubos de microcentrífuga com tampa e o volume completado para 100µl. Em seguida, 400µl de metanol eram adicionados, os tubos eram agitados em vórtex e centrifugados por 10 segundos a 9.000 x g. 100µl de clorofórmio era adicionado às amostras, que eram novamente agitadas e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Para a separação de fases, eram adicionados 300µl de água bidestilada, as amostras eram agitadas fortemente e centrifugadas por 1 minuto a 9.000 x g. A fase superior era descartada e 300µl de metanol era adicionado à interfase e fase inferior. As proteínas eram coletadas por centrifugação por 2 minutos a 9.000 x g, mantidas por alguns minutos sob uma corrente de ar até completa evaporação dos resíduos de metanol, congeladas rapidamente ou ressuspensas em SDS 10% para utilização imediata.

3.14. Tratamento com tampão contendo NaCl 2M

Amostras de 2 a 10 mg de proteína de membranas na concentração de 2 mg/ml, foram ressuspensas em 20 volumes no tampão TES 20 mM-KOH, sorbitol 300 mM, EDTA 1 mM e DTT 0,5 mM, pH 7,5 contendo NaCl 2 M. Após incubar em banho de gelo por 30 minutos, foram centrifugadas a 100.000 x g por 40 minutos a 4°C. A fração de membranas foi coletada, ressuspensa em tampão sem NaCl no mesmo volume inicial, e submetido novamente ao tratamento. A fração de membranas foi então ressuspensa em 20 volumes de tampão sem NaCl, e coletada nas mesmas condições anteriores. Foram feitas dosagens de proteína após cada passo de centrifugação, no sobrenadante e na fração de membranas.

3.15. Cromatografia de troca iônica

O material solubilizado com octil- β -D-glicosídeo 3% foi aplicado em uma coluna Mono Q HR 5/5, equilibrada com tampão piperazina 20 mM-succinato, pH 5,2 contendo octil- β -D-glicosídeo 1%, e eluído com um gradiente de 20 ml de 0 a 0,5 M de NaCl. Foram coletadas frações de 1,0 ml, utilizadas posteriormente em ensaios de ligação e em SDS-PAGE.

3.16. Ensaio de ligação de ^{14}C -trealose em proteínas solubilizadas da membrana

O ensaio de ligação de ^{14}C -trealose foi adaptado de Xavier et al. (1996), e foi realizado somente em proteínas solubilizadas.

Alíquotas contendo 600 μg de proteínas de membranas solubilizadas foram incubadas com tampão piperazina-succinato ou tris succinato 50 mM, pH 5,2, por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado volume suficiente de ^{14}C -trealose 250 mM (0,5 mCi/mmol), para uma concentração final de 5 mM. A amostra foi mantida por mais 5 minutos a temperatura ambiente, e então 2 ml de tampão piperazina-succinato ou tris succinato 50 mM pH 5,2 saturado com sulfato de amônio gelado foram adicionados, e incubados em banho de gelo por 10 minutos. O material foi filtrado através de filtro de nitrocelulose Millipore, com poros de 0,45 μm de diâmetro, imediatamente lavado com 2 ml de tampão saturado com sulfato de amônio, e então imerso em 10 ml de líquido de cintilação miscível. A radioatividade foi determinada em contador de cintilação Racketa 1214 (LKB), no mínimo 14 horas depois. Foram feitos controles sem proteína, e sem ^{14}C -trealose. A contagem de cintilação e a massa de proteína contida em cada ensaio foram utilizadas para determinar a taxa de ligação, expressa em ηmol de ^{14}C -trealose/mg de proteína.

3.17. Cromatografia de afinidade

Em uma coluna (7 ml) de Epoxy-Sepharose 6B (Sigma), à qual foi acoplada trealose seguindo as especificações do fabricante., foram aplicadas proteínas de membranas solubilizadas com tampão citrato 20 mM, pH 5,2 contendo octil- β -D-glicosídeo 3% p/v. A coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado na solubilização. Após um período de equilíbrio de 10 minutos, a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão citrato 20 mM, octil- β -glicosídeo 1%, pH 5,2. A eluição foi feita em tampão citrato-fosfato 50 mM, octil- β -glicosídeo 1%, trealose 2%, pH 8,0, a um fluxo de 10 ml/h. Frações de 1,0 ml foram coletadas, e utilizadas posteriormente para determinar o perfil de absorbância a 280 nm. As frações correspondentes ao pico de proteína eluído no tampão contendo trealose foram dialisadas por 12 horas contra tampão tris 20 mM, pH 7,5, e o detergente foi removido segundo o método de Wessel & Flüge (1984). As amostras foram utilizadas em SDS-PAGE.

3.18. Outros

A ^{14}C -trealose utilizada para os experimentos de transporte e de ligação foi sintetizada em nosso laboratório a partir de D-[U- ^{14}C]glicose (270 mCi/mmol, Amershan, ou 250 mCi/mmol, ICN), por uma cepa de *S. cerevisiae* deletada no gene da fosfoglicoisomerase (*pgi1- Δ 25*), como descrito por Stambuk et al.(1993).

Os açúcares usados nos meios de cultura foram obtidos da Sigma, os demais compostos da Difco ou Sigma. Demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

4. RESULTADOS

4.1. Curva de crescimento da cepa AP68-7A

Para obter membranas de células de *S. cerevisiae* ricas na proteína transportadora de trealose, foi necessário antes de iniciar a purificação, certificar-se da densidade e tempo de crescimento ideais nos quais a cepa AP68-7A atinge seu nível máximo de atividade de transporte de trealose. Dada a inviabilidade de se fazer testes de transporte de trealose ao longo do tempo em cada preparação de membranas, a construção de uma curva de crescimento, conjugada com uma curva de acúmulo e transporte de trealose auxilia na determinação de uma faixa confiável de tempo de crescimento e densidade celular, na qual as culturas podem ser utilizadas. Estas curvas padrão portanto, são exclusivas e particulares para cada cepa, e os dados obtidos só podem ser aplicados para culturas da mesma cepa, crescidas nas mesmas condições.

Na curva de crescimento da cepa AP68-7A (figura 1), obteve-se a variação do peso seco da cultura ao longo das duas fases de crescimento de interesse: crescimento logarítmico e diauxia. Os valores de peso seco ao longo do tempo permitem determinar fatores de conversão, que podem ser utilizados rotineiramente no monitoramento do crescimento de outras culturas da mesma cepa, auxiliando na obtenção imediata do valor do peso seco de uma dada cultura num tempo determinado, a partir do valor da absorbância da cultura a 570 nm. Os fatores correspondem à razão entre a densidade em mg/ml e a absorbância da cultura num determinado ponto de amostragem: $f = \text{mg/ml} \times \text{abs}^{-1}$. Para cada uma das fases de crescimento determina-se um fator, que corresponde à média dos fatores determinados para cada ponto onde foi colhida uma amostra da cultura, e determinado o seu peso seco.

A

B

C

Figura 1. A) Curva de crescimento da cepa AP68-7A em YP 2%. **B)** Transporte de trealose ao longo do crescimento (1U corresponde a 1 nmol de trealose transportada por minuto nas condições de ensaio). **C)** Acúmulo de trealose ao longo do crescimento.

Para a cepa AP68-7A, a fase de crescimento logarítmica, nas condições de inóculo e cultivo utilizadas, vai até cerca de 3,0 mg de células/ml de cultura. Até atingir esta densidade, as células presentes nas culturas não mostram transporte significativo de trealose (normalmente, $< 0,5$ U/mg). Também não há trealose acumulada dentro da célula, pois durante a fase logarítmica as células acumulam glicogênio (figura 2, raias 4 a 6). O fator de conversão de peso seco obtido para este período, é de 0,36. Quando a densidade da cultura está acima de 3,2 mg/ml, inicia-se o acúmulo de trealose (figura 2, raias 9 a 14), e a taxa de transporte começa a aumentar (figura 1B), pois começa a de-repressão do transporte pela queda dos níveis de glicose do meio. Porém, níveis expressivos de transporte de trealose são atingidos em densidades superiores a 3,7 mg/ml, e o máximo na fase pós-diáuxica, entre 4,0 e 4,3 mg/ml, mesma faixa onde se encontra o pico de acúmulo de trealose (figura 1 e 2, raias 10 e 11). O fator de conversão determinado nesta faixa de crescimento foi de 0,31. Como o transporte de trealose é regulado não só pela repressão catabólica da glicose, mas também pela presença de genes reguladores indutíveis por maltose, a utilização de células crescidas em meio contendo o açúcar indutor auxilia na obtenção de células com altas taxas de transporte, resultante de altos níveis de expressão do gene do transportador. Em testes anteriores, já havia sido determinado que o açúcar α -metilglicosídeo é melhor indutor do transporte de trealose do que a maltose, razão pela qual as culturas de células a serem induzidas foram rotineiramente crescidas em meio YP α 2%.

Para a preparação de membranas plasmática das células da cepa AP68-7A com atividade de transporte de trealose, as culturas foram coletadas numa densidade entre 4,0 e 4,3 mg/ml, utilizando-se o fator de conversão de 0,31. Uma amostra de células de cada cultura, também era submetida a um

Figura 2. Análise dos carboidratos extraídos de células da cepa AP68-7A durante o crescimento em YPD 2%, em TLC, realizada como escrito em material e métodos. **1)** Padrão de glicogênio; **2)** Padrão de trealose; **3)** Padrão de glicose **4 a 14)** amostras extraídas de células após 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 e 52 horas de crescimento respectivamente.

teste de transporte de trealose, e os valores determinados sempre estiveram dentro da faixa esperada para a densidade celular calculada utilizando-se os fatores de conversão.

4.2. Identificação inicial do transportador de trealose na cepa AP68-7A

Durante os primeiros testes de purificação de membranas plasmáticas da cepa AP68-7A utilizando o método descrito por Kolarov et al. (1986), ficou clara a diferença de rendimento proteico entre as membranas purificadas de células reprimidas e induzidas. No primeiro caso, utilizando o mesmo número de ciclos descritos no protocolo original, obteve-se o rendimento esperado (1,0 a 1,5 mg de proteína/g de células). Para as células induzidas entretanto, o rendimento era de cerca de 0,2 a 0,6 mg/g. Vários testes foram realizados, modificando as proporções de células/tampão/pérolas de vidro e o número de ciclos de homogeneização. Acompanhando a variação da concentração proteica do homogenato ao longo dos ciclos de homogeneização, verificou-se que para as células induzidas, somente após 15 ciclos é que o homogenato atingia a mesma concentração proteica alcançada com 7 ciclos com células reprimidas. A maior dificuldade de homogeneização das células induzidas, provavelmente é decorrente de diferenças de composição e estrutura da parede celular das células ao final da primeira fase de crescimento. Durante a fase estacionária, a espessura e resistência da parede celular de leveduras são bem maiores do que o verificado na fase inicial de crescimento. Isto se deve principalmente a aumentos do número de pontes dissulfeto entre as proteínas que envolvem a matriz de polissacarídeos da parede (Cabib et al., 1982; 1988; Valentin et al. 1987). Apesar de ainda não se encontrarem na fase estacionária, é possível que tais modificações já estejam pronunciadas nas células da cepa AP68-7A durante a diauxia, tornando a parede celular muito mais resistente à

homogeneização do que nas células reprimidas. Após a otimização do processo de homogeneização, o rendimento da purificação de membranas de células induzidas foi semelhante ao verificado para células reprimidas.

Num “screening” inicial, membranas plasmáticas isoladas de células reprimidas (crescidas em meio com glicose e coletadas durante o crescimento logarítmico, em densidade de 1,0 mg/ml), com atividade de transporte < 0,5 U/mg, e de células induzidas (crescidas em meio contendo α -metilglicosídeo até a diauxia, densidade celular entre 4,0 e 4,3 mg/ml) com atividade de transporte > 35 U/mg, foram solubilizadas totalmente em SDS, e analisadas em SDS-PAGE.

Como a comparação foi feita entre membranas purificadas de células crescidas e coletadas em situações diferentes, esperava-se verificar um número razoável de bandas exclusivas da fração obtida de células induzidas. Como a proteína carreadora de trealose é codificada por um alelo do gene 1 dos loci *MAL*, seu peso molecular deveria estar entre 55 e 70 kDa, mesma faixa na qual se encontram também outros transportadores de açúcar presentes na membrana de levedura (Han et al., 1995; van den Broek et al., 1994). Desta forma, para restringir o número de possibilidades na comparação entre as duas membranas, foram consideradas somente as bandas exclusivas das frações da membrana das células induzidas, que se encontravam na faixa de PM aparente descrita acima. Foram selecionadas 2 bandas, possíveis candidatas a posterior identificação, com PMs aparentes de 57e 66 kDa (figura 3). Bandas em posições semelhantes já haviam sido identificadas em cepas diplóides que recuperaram a capacidade, cujas cepas parentais não possuíam, de transportar trealose (Stambuk, 1995), um indício de que alguma destas bandas poderia ser a proteína carreadora de trealose.

Figura 3 . Proteínas de membranas purificadas de células da cepa AP68-7A induzidas (**I**), com atividade de transporte de trealose em torno de 35U/mg; e reprimidas (**R**), com atividade de transporte de trealose <0,5 U/mg. As frações totais de membranas foram delipidadas como descrito em material e métodos, e ressuspensas em SDS 10%. As setas indicam as posições das proteínas de 57 kDa observadas nas frações de proteínas de membranas de células induzidas. (**PM**), padrão de peso molecular.

4.3. Solubilização da membrana plasmática e padronização do ensaio de ligação de ¹⁴C-trealose

A purificação de proteínas de membrana apresenta vários problemas que normalmente não são encontrados com as proteínas solúveis. As proteínas intrínsecas, que estão intimamente associadas à bicamada de lipídios da membrana, como é o caso dos transportadores, são essencialmente insolúveis em água e requerem o uso de detergentes ou outros agentes disruptivos para sua solubilização e purificação.

O critério mais comumente utilizado para definir a solubilização de uma proteína é o de sua retenção, ou a retenção de sua atividade no sobrenadante após ultracentrifugação, normalmente em volta de 100.000 x g, por cerca de 1 hora, condições nas quais a membrana plasmática normalmente sedimenta (Hjelmeland & Chrambach, 1984). Apesar da interação entre os detergentes com as membranas ainda não ter sido totalmente descrita, a solubilização de proteínas de membranas ocorre aparentemente seguindo alguns passos: o detergente se liga à membrana, que sofre um processo de lise; formam-se complexos detergente-lipídio-proteína que são solubilizados para formar complexos de detergente-proteína e detergente-lipídio. Entretanto, desfazendo a estrutura da membrana, também se desfazem as estruturas nativas das proteínas que conseqüentemente podem ter a sua atividade alterada. O desafio em muitos estudos com proteínas de membrana, é conseguir que sua função associada à membrana não seja alterada ou destruída durante os processos de solubilização e purificação.

No caso dos transportadores um outro problema é a dificuldade de se monitorar a atividade da proteína ao longo do procedimento. O transporte de um substrato que poderia ser acompanhado só existe quando a proteína está efetivamente inserida numa vesícula, separando um compartimento contendo o

substrato a ser transportado, de outro, para onde ele é transportado. Ou seja, após a solubilização e cada tentativa de separação, a localização da proteína só pode ser feita se ela for corretamente reconstituída numa vesícula. Entretanto a reconstituição de uma proteína também não é trivial, e não existem métodos gerais estabelecidos. Para cada proteína é necessário estabelecer condições ideais, o que muitas vezes depende de testes de tentativas e erros.

Para a identificação do transportador de trealose de *S.cerevisiae*, foi necessário adaptar um ensaio para a sua detecção após a solubilização, baseado na sua capacidade de se ligar ao dissacarídeo a ser transportado. A opção por este tipo de ensaio foi feita levando em conta o dispêndio de tempo e proteína a ser gasto, uma vez que o rendimento proteico das preparações de membrana são relativamente baixos (cerca de 1,0 a 1,5 mg de proteína total/g de peso de seco de células).

A metodologia adequada de solubilização não seletiva das proteínas da membrana plasmática, usando o detergente octil- β -D-glicosídeo (figura 4) (descrito em material e métodos, item 3.4.) foi estabelecida após alguns testes utilizando dois outros detergentes não iônicos: Triton X-100 e Brij 58. A melhor taxa de solubilização total, e facilidade de remoção posterior foi obtida com o octil- β -D-glicosídeo, que também não interferiu na capacidade de ligação da proteína solubilizada ao substrato, importante para a sua detecção nos ensaios de ligação descritos a seguir.

A identificação de frações de proteínas solubilizadas da membrana foi feita adaptando-se um método de ligação específica de substratos, descrito por Richarme & Kepes (1983), e utilizado na purificação e caracterização do transportador de trealose e maltose de *Thermococcus litoralis* (Xavier et al., 1996). A técnica baseia-se na adição de sulfato de amônio numa mistura contendo a proteína solubilizada e um ligante radioativo, pois o sulfato de

amônio "congela" o complexo proteína-ligante, impedindo que haja associação ou dissociação de ligante depois. A amostra é então filtrada através de um filtro de nitrocelulose, onde o complexo é retido e pode-se então determinar uma relação de concentração de substrato retido por massa de proteína. Esta relação depende portanto da concentração da proteína capaz de se ligar ao substrato em cada fração analisada.

Para utilizar este método com o transportador de trealose de levedura, inicialmente foram introduzidas as mesmas modificações de tempo de incubação após a adição do sulfato de amônio descritas por Xavier et al.(1996). Entretanto tempo e temperatura de incubação das amostras antes da adição do sulfato de amônio foram modificadas para as condições ideais de transporte de trealose. A temperatura de incubação e os tampões foram os mesmos rotineiramente utilizados para os ensaios de transporte de trealose em células inteiras e em membranas. O tempo de incubação utilizado foi o tempo máximo dos ensaios de transporte de trealose em células, 5 minutos. Como a concentração da ^{14}C -trealose disponível e utilizada era cerca de 10 vezes menor que a utilizada com o transportador de *T. litoralis*, o volume final da solução a ser precipitada era 10 vezes maior, o que tornou o procedimento de filtração mais lento.

Nos primeiros testes verificou-se a existência de uma contagem de fundo muito alta nas amostras controle sem ^{14}C -trealose, o que descartava a hipótese de se tratar de adsorção inespecífica do açúcar à membrana de nitrocelulose. Considerou-se a possibilidade de que a contagem muito alta do controle fosse decorrente da presença de resíduos de sulfato de amônio usado para precipitar as proteínas em solução. Foram realizados testes controle na ausência de ^{14}C -trealose, utilizando concentrações decrescentes de sulfato de amônio, de 100 a 50%, concentração mínima utilizada por Richarme & Kepes

Tipo de membrana	tratamento	$\eta\text{mol }^{14}\text{C-trealose/mg proteína}$
Induzida	solubilização imediatamente após a purificação	$19,5 \pm 0,1$
	solubilização após ter sido mantida a -80°C	$7,7 \pm 0,2$
	solubilização imediatamente após a purificação e posteriormente mantida a -80°C	6 ± 1
	lavagem com NaCl 2M e solubilizada após ter sido mantida a -80°C	$15,2 \pm 0,4$
reprimida	solubilização imediatamente após a purificação	$2,1 \pm 0,1$
	solubilização após ter sido mantida a -80°C	$2,1 \pm 0,3$

Tabela 2. Atividade de ligação de ^{14}C -trealose em proteínas de membranas purificadas de células da cepa AP68-7A induzidas e reprimidas, solubilizadas como octil- β -D-glicosídeo 3%. Para cada amostra de proteína foram feitos 3 experimentos independentes. Os resultados mostrados são a média destes experimentos.

Figura 4. Análise em gel de poliacrilamida 9%, das frações proteicas das membranas plasmáticas purificadas de células da cepa AP68-7A, solubilizadas com octil- β -D-glicosídeo 3%. **1)** padrão de peso molecular (kDa); **2)** proteínas de membranas não solubilizadas; **3)** proteínas de membranas solubilizadas.

(1983), na qual ainda houve retenção de 100% da proteína precipitada no filtro de nitrocelulose. A diminuição da concentração de sulfato de amônio não modificou a alta contagem dos controles, de maneira que optou-se por manter a solução de sulfato de amônio 100% como padrão.

Testes de ligação de ^{14}C -trealose foram realizados preliminarmente em proteínas solubilizadas de membranas recém purificadas, ou de amostras de membranas que haviam sido mantidas congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na tabela 2 podem ser comparados estes resultados, além daqueles obtidos com o controle feito de membranas de células reprimidas, que não apresentam atividade de transporte de trealose.

4.4. Tratamento com NaCl 2M

Membranas plasmáticas de células da cepa AP68-7A com atividade de transporte de trealose (induzidas), foram submetidas ao tratamento com tampão de alta força iônica, contendo NaCl 2M com o intuito de remover as proteínas solúveis eventualmente associadas à membrana. Com o aumento da força iônica do meio, tais proteínas tendem a se desassociar e podem ser removidas. As proteínas extrínsecas da própria membrana não eram de interesse para o trabalho, pois sabe-se que o transportador de trealose faz parte de uma família de proteínas altamente hidrofóbicas e com vários domínios embebidos na bicamada lipídica da membrana. Para obter este tipo de remoção de proteínas, são descritos procedimentos utilizando tampões contendo NaCl ou KCl em altas concentrações (0,15 a 3 M). A análise da concentração proteica das frações submetidas a este protocolo (tabela 3) revelaram surpreendentemente que apenas 15% do total da proteína total ainda permane -

	Células induzidas	Células reprimidas
Fração de membrana	Proteína recuperada	Proteína recuperada
1º precipitado	15±3%	64%
1º sobrenadante	85 +3%	36%
2º precipitado	94 ±3%	~100%
2º sobrenadante	6 ± 3%	--

Tabela 3. Recuperação de proteína em membranas purificadas de células da cepa AP68-7A induzidas e reprimidas, após o tratamento com NaCl 2M, como descrito em material e métodos. Os valores apresentados são a média de 3 experimentos independentes.

cia na fração de membranas, sendo que o restante tornou-se solúvel no sobrenadante. Quando as frações de membranas foram analisadas visualmente em SDS-PAGE, verificou-se que das proteínas remanescentes, apenas 7 bandas (figura 5), duas das quais estavam especialmente enriquecidas, justamente as bandas de 57e 66 kDa identificadas somente nas membranas de células induzidas (figuras 3 e 5).

Membranas de células reprimidas submetidas ao mesmo tratamento mostraram resultados bem diferentes, com uma porcentagem bem menor de proteína total removida ao final do tratamento (tabela 2). Entretanto, para as membranas de células induzidas, o total quantitativo e qualitativo de proteínas mantidas associadas à membrana ao final do tratamento manteve-se constante, em membranas resultantes de diferentes preparações, mantidas congeladas a - 80 °C antes do tratamento ou utilizadas logo após o isolamento (tabela 2).

A solubilização das proteínas remanescentes na membrana após este tratamento foi relativamente complicada nas mesmas condições utilizadas para as frações de membranas não tratadas com NaCl. Somente cerca de 5% do total ainda remanescente na membrana pôde ser solubilizada com octil- β -D-glicosídeo (de um total de 10 mg proteína, após o tratamento, somente cerca de 75 μ g se tornava disponível). Frações um pouco maiores de proteína solubilizada foram obtidas utilizando SDS 10% na solubilização (rendimento final de 10% de solubilização). Entretanto, proteínas removidas da membrana com SDS estão desnaturadas e só podem ser utilizadas para análise em SDS-PAGE. O baixo rendimento da solubilização com o detergente não desnaturante não permitiu a utilização das proteínas assim obtidas em outros métodos de purificação. Somente após reunir massa de proteínas resultantes de vários experimentos é que se obteve material suficiente para a realização de ensaios de ligação. Tais ensaios porém, não foram realizados nas condições

Figura 5 . Análise por SDS-PAGE em gel 9%, das proteínas presentes nas frações de membranas plasmática purificadas a partir de células induzidas da cepa AP68-7A, e tratadas com NaCl 2M. 1) Padrões de peso molecular (kDa); 2) Fração total de proteínas presentes em membranas de células induzidas; 3) Proteínas remanescentes na membrana após o primeiro tratamento com NaCl 4) Proteínas remanescentes na membrana após o segundo tratamento com NaC

ideais, uma vez que as amostras solubilizadas foram resultantes de preparações diferentes e precisaram ser congeladas antes de serem utilizadas. Entretanto, verificou-se o enriquecimento da taxa de ligação em aproximadamente 3X em relação às proteínas solubilizadas a partir de material previamente congelados (tabela 1). Este resultado pode ser interpretado como mais um indício de que as bandas de 57,0 e 66,0 kDa presentes nas membranas de células induzidas, e majoritariamente nas membranas tratadas com NaCl, poderiam ser as proteínas responsáveis pelo transporte de trealose.

4.5. Cromatografia de troca iônica das proteínas de membrana plasmática solúveis em octil- β -D-glicosídeo

Na tentativa de separar a proteína transportadora de trealose das demais solubilizadas da membrana plasmática, o solubilizado total de proteínas, com taxa de ligação de 19,2 η mol de ^{14} C-trealose/mg proteína, foi submetido a uma cromatografia de troca iônica, numa coluna MonoQ, nas condições descritas em material e métodos. Apenas 6 picos de proteína (absorbância a 280 nm) eluíram da coluna durante o gradiente de NaCl (figura 6A), dos quais todas as frações foram submetidas ao ensaio de ligação de ^{14} C-trealose. Um destes picos de proteína, que elui na faixa de NaCl que vai de 90 a 120 mM, foi isolado pela taxa de ligação de suas frações (figura 6B). Uma destas frações apresentou uma taxa de ligação de 62,2 η mol/mg (fração 31, figura 6B). Relacionada à taxa de ligação obtida do solubilizado total antes de ser aplicado à coluna, houve um enriquecimento de 3,2X só nesta fração eluída da coluna.

As frações 30, 31, 32 e 33 que formam o pico no perfil de proteína (figura 6A), e no perfil de taxa de ligação (figura 6B), foram tratadas para remover o NaCl e o detergente, concentradas e aplicadas em um SDS-PAGE (figura 6C). As duas bandas presentes nestas frações tiveram seus PMs

aparentes calculados em 57,0 e 66,0 kDa, e localizam-se nas mesmas posições nas quais foram identificadas anteriormente 2 das bandas somente expressas nas membranas de células induzidas (figura 3). Estas bandas também são duas das quais permanecem associadas à membrana após o tratamento com tampão contendo NaCl 2M (figura 5).

A possibilidade de que as duas bandas até então observadas sejam as proteínas responsáveis pelo transporte de trealose na cepa AP68-7A é muito grande, uma vez que além da sua visualização nos géis de poliacrilamida, a sua capacidade de ligar trealose foi demonstrada. As chances de que as duas bandas sejam produtos do mesmo gene, possivelmente o *AGT1*, também parecem ser grandes. No processo de identificação do transportador de maltose codificado pelo locus *MAL6* (van den Broek et al., 1994), foi descrita a presença de duas bandas em SDS-PAGE, com PMs aparentes de 64 e 57 kDa, que após sequenciamento revelaram ser ambas produtos do gene 1 do mesmo locus. A presença de duas formas desta mesma proteína possivelmente é consequência de alguma modificação pós-traducional, aparentemente uma proteólise.

4.6. Cromatografia de afinidade

No intuito de comprovar a identidade das duas proteínas isoladas na cromatografia de troca iônica com atividade ligação de trealose, proteínas de membranas solubilizadas foram submetidas a uma cromatografia de afinidade em uma coluna de Sepharose 6B-trealose. Devido à alta especificidade deste método, esperava-se que caso alguma das duas bandas co-purificadas na cromatografia de troca iônica não fosse responsável pela atividade de ligação de ¹⁴C-trealose determinada, tal proteína seria identificada, pois não se ligaria à coluna. A cromatografia de afinidade foi escolhida como mais um testes de identificação, a fim de corroborar os resultados dos testes de ligação. Este tipo

A

B

C

Figura 6.A) Perfil de eluição proteica (Abs_{280nm}) das proteínas da membrana plasmática da cepa AP68-7A solubilizadas com octil- β -D-glicosídeo, submetida a cromatografia de troca iônica na coluna MonoQ. **B)** Perfil de ligação de ^{14}C trealose nas frações eluídas da coluna de troca iônica durante o gradiente de NaCl. **C)** Análise das frações eluídas da cromatografia de troca iônica que apresentaram atividade de ligação à ^{14}C -trealose, em gel de poliácridamida 9%. (PM) Padrões de peso molecular; (30, 31, 32, 33) frações de mesmo número eluídas na cromatografia; (total) fração total de proteína solubilizada aplicada na coluna.

de cromatografia é muito específico, e uma das técnicas mais poderosas para o isolamento de proteínas (Jakoby, 1984, Dean et al., 1985; Deutscher, 1990; Hermanson et al., 1992).

Após a lavagem da coluna para retirar o material não ligado, foi eluído um pico com absorbância a 280 nm (figura 7A). Amostras deste pico foram aplicadas em SDS-PAGE, para análise (figura 7B). Pode-se notar pelo gel que a composição proteica destas frações é semelhante àquela verificada no material com atividade de ligação recuperado da cromatografia de troca iônica, quanto ao número e à posição das bandas presentes. Há 2 proteínas majoritariamente presentes, que tem PMs de 57 e 66 kDa. Há também outras bandas menores, que podem também ser proteínas que se ligam à trealose, mas devido à sua intensidade no gel corado por prata, tudo leva à crer que sejam contaminantes que tenham interagido não especificamente com a coluna ou ainda com as próprias proteínas que se ligaram à coluna.

As proteínas com capacidade de se ligar a trealose identificadas através dos métodos utilizados até aqui, apresentam vários indícios que suportam a hipótese de se tratarem de produtos do gene *AGT1*, como seus PMs aparentes, que estão dentro da faixa esperada para a proteína Agt1p (67 kDa, Han et al., 1995), suas características de migração em SDS-PAGE como bandas difusas que indicam uma alta porcentagem de regiões hidrofóbicas, e a semelhança ao padrão de co-purificação em duas formas, como acontece com o produto do gene 1 do locus *MAL6* (van den Broek et al., 1994).

Entretanto, a existência de um locus *MAL3* na cepa AP68-7A não pode ser desconsiderada uma vez que, nenhuma análise genética para a caracterização desta cepa pode ser feita, pois nunca foi possível obter esporos do seu cruzamento com a cepa parental *MAL 1-1^c-Δ*. A cepa haplóide AP68-7A

A

B

Figura 7. A) Perfil de eluição em trealose (Abs_{280nm}) de proteínas de membrana de células da cepa AP68-7A solubilizadas em octil- β -D-glicosídeo 3%, e aplicas em coluna de Sepharose 6B-trealose. **B)** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 9% das frações eluídas da cromatografia de afinidade (raias 2 a 9), coradas co prata. Raia 1, padrão de peso molecular (kDa), raia 2, fração total de material solubilizado aplicado na coluna, raia 3 a 9, frações do pico de proteína eluído da coluna.

foi originada da esporulação da cepa diplóide AP68, que por sua vez é resultante de um cruzamento entre duas cepas haplóides que não transportam trealose (S288-C e MAL1-1^c-Δ). Das segregantes da diplóide originada deste cruzamento, que é capaz de transportar maltose e trealose, apenas a AP68-7A manteve tais características. O gene *AGT1* está localizado no locus *mal1g*, presente no cromossomo VII. Entretanto, na cepa diplóide está presente o gene 1 do locus *MAL3*, localizado no cromossomo II. Há portanto, a possibilidade de que mesmo na cepa haplóide (AP68-7A), estejam presentes os transportadores codificados pelo gene *AGT1* e pelo gene 1 do locus *MAL3*. A proteína transportadora codificada pelo gene 1 do locus *MAL3* é a única cuja especificidade de substratos transportados ainda não foi determinada (Stambuk et al., 1998), e portanto não pode ser descartada a hipótese de ser esta a proteína responsável pela atividade de transporte de trealose até aqui identificada.

Numa tentativa inicial de determinar a seqüência de tais bandas, amostras em gel de poliacrilamida (cerca de 100 fmoles de cada uma) foram enviadas à W. M. Keck Foundation (Yale University, EUA), para digestão com tripsina e sequenciamento de peptídeos internos, cujas seqüências poderiam ser posteriormente comparadas com aquela predita para a proteína Agt1p. A opção por fazer este tipo de sequenciamento e não um sequenciamento N-terminal, ocorreu em vista das dificuldades encontradas para resolver e corar em gel de poliacrilamida, massas das proteínas de interesse, maiores que 30 µg. Assim, não era possível transferir as bandas para membrana de PVDF e submetê-las ao sequenciamento N-terminal

A análise preliminar dos padrões de espectrometria de massa dos peptídeos gerados pela digestão por tripsina para cada uma das amostras, indi-

Figura 8. A) Curva de crescimento da cepa AP77-4C-p56-5 em meio mínimo enriquecido. **B)** Variação do transporte de trealose ao longo do crescimento em meio mínimo enriquecido da cepa AP77-4C-p56-5. **C)** Variação do transporte de trealose em células da cepa AP77-4C-p56-5 crescidas em meio mínimo até a densidade de 1,6 mg/ml e posteriormente incubadas em meio YPD 2% para aumentar a massa celular.

cou a probabilidade de que ambas as bandas fossem ou estivessem contaminadas por queratina. Como as massas submetidas a análise eram realmente muito pequenas, novas amostras foram preparadas, tomando todos os cuidados para evitar possíveis contaminações. Além disso, como controle negativo, foram utilizadas membranas de células reprimidas, e a ausência nas nestas membranas das bandas a serem isoladas e analisadas indicava a ausência de uma possível contaminação. Os resultados das espectrometria de massas dos peptídeos, desta vez obtidos de uma massa maior de proteínas (cerca de 450 fmoles de cada uma), indicaram que a banda de 66 kDa fosse, com uma média de cobertura de 46%, uma piruvato quinase de levedura (KPY1, número de acesso: P00549), e a de 57 kDa, com uma média de cobertura de 31%, a subunidade alfa da ATPase de levedura (número de acesso: J02603). Como a cobertura do mapa de peptídeos é baixa, e não há nenhum mapa deste tipo para qualquer um dos transportadores de dissacarídeo de levedura, tais resultados ainda são inconclusivos. Somente a sequência dos peptídeos poderá descartar a hipótese destas bandas não serem realmente produtos do gene *AGT1*.

O ideal para se comprovar se as proteínas isoladas das membranas da cepa AP68-7A são produtos do gene *AGT1*, seria expressá-lo em um vetor de expressão, isolar o produto expresso e então compará-lo com as proteínas isoladas.

4.7. Proteínas isoladas da membrana da cepa AP77-4C-p56-5

Para a comprovação da identidade das bandas isoladas das membranas da cepa AP68-7A, um último experimento foi realizado utilizando membranas plasmáticas purificadas de células da cepa AP77-4C-p56-5. Esta cepa foi obtida pelo prof. Boris Stambuk, da Universidade Federal de Santa Catarina, através da transformação da cepa haplóide AP77-4C, que não possui

nenhum gene 1 de qualquer um dos loci *MAL*, com o plasmídeo *YEp366-AGT1*, que carrega o gene *AGT1* (Han et al., 1995).

A cepa AP77-4C não apresenta atividade de transporte de maltose ou trealose, enquanto a cepa transformada transporta ambos os açúcares. Tal atividade deve ser resultante da expressão do gene *AGT1* contido no plasmídeo, uma vez que este é o único gene presente nesta cepa que codifica para um transportador do sistema *MAL*, e a única diferença em relação a cepa não transformada. O sistema composto pela cepa transformada é o mais indicado para investigar a atividade da proteína Agt1p, e também para identificá-la entre as diversas proteínas presentes na membrana plasmática. Inicialmente há a vantagem de se comparar membranas de células crescidas em condições idênticas, pelo mesmo período de tempo, e que se encontram na mesma fase de crescimento. As únicas diferenças entre as duas membranas devem ser decorrentes da expressão do gene contido no plasmídeo. Em segundo lugar, a abordagem é mais direta uma vez que, determinada a capacidade das proteínas expressas apenas na cepa transformada de se ligarem à trealose, a identificação destas proteínas por sequenciamento não se torna imprescindível, já que se conhece o gene responsável por sua expressão. As informações novas obtidas pelo sequenciamento estariam apenas ligadas às possíveis modificações pós-traducionais por exemplo.

Para a utilização desta cepa foram primeiramente padronizados seu tempo de crescimento, o fator de conversão para o monitoramento da cultura, e a variação do transporte de trealose ao longo do crescimento como para a cepa AP68-7A (figura 8). A atividade máxima de transporte de trealose das células de-reprimidas é de aproximadamente 20 U/mg.

Na comparação das proteínas contidas nas membranas plasmáticas das cepas AP77-4C e AP77-4C-p56-5, foram identificadas 3 bandas exclusivas

nas membranas de células transformadas (figura 9), com PMs aparentes calculados de 57, 66 e 84 kDa. As bandas de 57 e 66 kDa estão nas mesmas posições das bandas identificadas e isoladas da cepa AP68-7A, e tudo leva a crer que se tratam das mesmas proteínas. A banda de 84 kDa, ainda não havia sido observada em nenhuma fração de membranas de células de-reprimidas ou induzidas, entretanto, num trabalho recente (Eleutherio et al., 1998) foi identificada uma proteína de membrana de leveduras de cerca de 80 kDa, cuja expressão é induzida em resposta à desidratação. Tal proteína só é identificada em frações de membranas de células que são capazes de transportar trealose, e os autores sugerem que possa ser uma forma modificada do produto de expressão do gene *AGT1*. O atraso na migração em relação ao esperado pelo peptídeo Agt1p poderia ser resultante de glicosilações pós traducionais, o que aumentaria seu PM aparente.

As proteínas das membranas plasmáticas das células da cepa transformada solubilizadas com octil- β -D-glicosídeo foram submetidas a uma cromatografia de afinidade em Sepharose 6B-trealose, nas mesmas condições utilizadas para as proteínas de membranas da cepa AP68-7A. Na figura 10A está o perfil de proteína eluídas da coluna, em um único pico e padrão semelhante ao observado para a cepa AP68-7A. As proteínas contidas nesta fração foram aplicadas em SDS-PAGE, cujo resultado pode ser visto na figura 9B. As bandas de 66 e 57 kDa são portanto, capazes de se ligarem à trealose, e puderam assim ser isoladas das demais proteínas presentes na membrana plasmática das células induzidas. A proteína de 84 kDa não se ligou à coluna, e seriam necessárias outras investigações para determinar sua identidade e a causa de sua expressão nas células transformadas.

Figura 9. Análise por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 9%, das proteínas presentes nas frações de membrana plasmática purificadas de células da cepa AP77-4C-p56-5 (**2**), e da cepa AP77-4C (**3**). **1**), padrões de peso molecular (kDa). As setas indicam as bandas de 57, 65 e 84 kDa, presentes apenas nas amostras de membranas de células transformadas com o plasmídeo contendo o gene *AGT1*.

A

B

Figura 10. A) Perfil de eluição proteico (Abs_{280nm}) da cromatografia de afinidade das proteínas solubilizadas das membranas purificadas de células da cepa AP77-4C-p56-5, em coluna de Sepharose 6B-trealose. **B)** Gel de poliacrilamida 9% das proteínas eluídas da coluna de afinidade. **1)** Padrão de peso molecular (kDa); **2)** fração de proteínas solubilizadas aplicadas à coluna; **3 e 4)** frações eluídas da coluna.

Os resultados obtidos com o sistema de expressão do gene *AGT1* comprovam a hipótese de que o transporte de trealose em *Saccharomyces cerevisiae* é realizado pela proteína Agt1p.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estabelecimento das metodologias de purificação e solubilização de membranas plasmáticas das cepas de *S.cerevisiae* utilizadas e de detecção da proteína transportadora de trealose

O estudo do sistema transportador da trealose em *Saccharomyces cerevisiae* é essencial para a compreensão do papel que este dissacarídeo tem na aquisição de resistência às situações nas quais as células de leveduras são submetidas à vários tipos de estresse, notadamente na dessecação.

Apesar de poucos trabalhos demonstrarem que a ocorrência de translocação da trealose acumulada no interior celular para o seu exterior seja estritamente necessária para aquisição desta resistência, tal hipótese parece bem razoável, uma vez que os efeitos protetores da trealose em membranas e bicamadas só são verificados quando este dissacarídeo se associa com os fosfolipídios presentes nos dois folhetos das membranas (Crowe & Crowe, 1988; Tsvetkov et al., 1989; Fabrie et al., 1990). O transporte de trealose é verificado em condições de de-repressão das células, quando a síntese deste açúcar pelas células de levedura é expressiva, podendo ser acumulado em taxas de até 20% do peso seco das células. Apesar destes níveis de acúmulo de trealose no citoplasma, não há difusão do açúcar para o exterior da célula, e ocorre transporte ativo mesmo contra o gradiente de concentração (Stambuk et al., 1996). Ou seja, para que esteja disponível para se ligar à camada exterior da membrana plasmática a trealose precisa ser translocada do citoplasma celular para o exterior, e tal translocação ocorre através de um transportador presente na própria membrana.

Para compreender o mecanismo de resistência à desidratação em leveduras é necessário primeiramente compreender a dinâmica de mobilização

da trealose nas situações de desidratação e rehidratação e as características cinéticas do sistema de transporte. Para estudos cinéticos adequados, a obtenção da proteína responsável pelo transporte purificada é o ponto de partida, já que a utilização quer de células inteiras, quer de vesículas de membrana para este tipo de estudo, pode comprometer os resultados pela presença de outros sistemas, como outros transportadores de dissacarídeos por exemplo. Assim, neste trabalho procurou-se estabelecer as condições iniciais que possibilitarão pormenorizar os estudos do sistema transportador de trealose de *S. cerevisiae*, partindo de sua solubilização e de seu isolamento da membrana.

Apesar dos resultados publicados por Han et al (1995), sugerindo que o gene *AGT1* não era responsável pelo transporte de trealose verificado em leveduras, informações obtidas em nosso laboratório demonstravam o contrário. Os resultados daqueles pesquisadores foram obtidos utilizando uma metodologia aparentemente não adequada. Como já comentado, inferir a capacidade de uma cepa transportar um determinado carboidrato analisando sua capacidade de crescer e fermentá-lo pode levar a conclusões errôneas já que outros sistemas, além do de transporte, são necessários. A ausência de crescimento e fermentação, podem ser resultantes por exemplo, de falhas nos sistemas de hidrólise do dissacarídeo, que portanto não pode ser utilizado como fonte de carbono. Assim, apesar de apta a transportar um determinado açúcar, uma cepa pode não crescer utilizando-o como fonte de carbono porque não consegue metabolizá-lo. (ver exemplo de Nwaka et al., 1996). Para obter resultados claros quanto à capacidade de transporte de trealose das cepas utilizadas neste trabalho, foram testadas as capacidades das células destas cepas incorporarem trealose, nas condições previamente estabelecidas por de Araujo et al., 1991e

Stambuk et al., 1996. Apesar das cepas também serem capazes de crescer utilizando a trealose, esta característica não foi considerada essencial.

Antes de isolar a proteína foi preciso solubilizá-la mantendo sua atividade, e descobrir como detectar esta atividade, uma vez que não havia até então nenhum ensaio que permitisse medir o transporte de trealose em proteínas de membrana solubilizadas. Inicialmente foram concentrados esforços no estabelecimento e na padronização das metodologias de purificação de membranas plasmática das células, de solubilização das proteínas aí presentes e finalmente, de um ensaio que possibilitasse o acompanhamento da atividade de transporte nas proteínas solubilizadas.

Como já comentado em Resultados, todo o trabalho de padronização e caracterização do crescimento e variação da taxa de transporte de trealose foi realizado com a cepa, AP68-7A. No processo de purificação das membranas, surgiram várias dificuldades que levaram a uma adaptação do método descrito inicialmente por Kolarov et al.(1988). Mudanças no tempo de homogeneização das células e também nos métodos de detecção da proteína total presente no homogenato, como exposto em Resultados, foram importantes pois garantiram um aumento no rendimento ao final das preparações. Sem estas adequações, não haveria condições físicas de produção de massa celular suficiente para obter membranas bastantes para as tentativas de purificação do transportador de trealose.

Uma vez determinadas as condições de maior rendimento na purificação de membranas plasmáticas da cepa AP68-7A, foi preciso iniciar um processo de padronização das condições de solubilização das proteínas das membranas. Como nossa proteína de interesse, assim como os demais transportadores de açúcares encontrados nas membranas de levedura, é uma proteína altamente hidrofóbica, com 12 domínios transmembranares (Han et al.,

1995; Nelissen et al., 1997), sua solubilização necessariamente só ocorre se for utilizado um detergente. Mesmo utilizando detergentes não iônicos e não desnaturantes, corre-se o risco de que a estrutura terciária da proteína seja afetada, o que pode alterar a sua atividade. A perda da atividade tornaria impossível posteriormente selecionar a proteína entre as demais solubilizadas da membrana. Para o transportador de trealose, a escolha do detergente mais adequado e o processo de solubilização envolveu muitos testes de tentativas e erros e foi crucial para o prosseguimento do trabalho. Além da solubilização da proteína de interesse, foi preciso considerar também algumas características do detergente, principalmente sua interferência posterior nas técnicas que poderiam ser utilizadas para a purificação da proteína transportadora, e o grau de dificuldade de sua remoção e manuseio.

No caso das proteínas da membrana plasmática da cepa AP68-7A, foram feitas várias tentativas de solubilização, com três detergentes diferentes, até ser estabelecido o procedimento mais adequado, que é o descrito neste trabalho. Tanto em porcentagens de proteínas solubilizadas, como na possibilidade de ser removido das amostras, o detergente octil- β -D-glicosídeo foi o mais eficiente. Este detergente faz parte de um grupo de detergente utilizados com sucesso na solubilização de um grande número de proteínas de membrana, e inclusive é um dos que tem sido utilizados com sucesso em solubilizações consideradas difíceis (Hjelmeland & Chrambach, 1984). Além disso, o octil- β -D-glicosídeo possui uma CMC relativamente alta (de 20 a 25 mM), o que torna sua remoção das amostras facilitada. Esta característica é de grande interesse tanto para a manipulação posterior das proteínas solubilizadas, como será de grande utilidade no futuro estabelecimento do processo de reconstituição dos transportadores em vesículas. A dificuldade de remover o detergente pode por

exemplo interferir na reconstituição das proteínas em vesículas além de quase sempre atrapalhar os métodos de dosagem de proteínas (Dunn, 1989).

A impossibilidade de detectar a atividade do transportador de trealose nas proteínas solubilizadas foi um grande problema inicial. Estimar corretamente a atividade de proteínas transportadoras requer a sua reconstituição em vesículas, o que por sua vez também requer o estabelecimento e a padronização uma metodologia adequada. A opção pela tentativa de adaptação de um ensaio de ligação e não de uma metodologia de reconstituição se deu principalmente pela possibilidade de estabelecer as condições ideais de trabalho mais rapidamente, utilizando amostras relativamente menores de proteínas sem o trabalho de remover o detergente ou reconstituí-las em vesículas, já que até então os ajustes nos procedimentos de purificação de membranas ainda estavam sendo feitos.

Apesar dos problemas levantados em Resultados, os dados obtidos com este ensaio foram confiáveis e de grande importância para o prosseguimento no isolamento do transportador de trealose. Até então, os controles da presença da proteína de interesse nas frações proteicas analisadas, só poderia ser feita pela detecção das bandas de 57 e 66 kDa em SDS-PAGE, as mesmas verificadas presentes em eletroforese de proteínas de membranas de células induzidas e ausentes daquelas de proteínas de membranas reprimidas (figura 3).

O teste de ligação de ^{14}C -trealose tornou-se o principal método de detecção do transportador de trealose nas frações de proteínas solubilizadas de membranas de células induzidas, uma vez que, mesmo estando desassociada da membrana, a proteína manteve sua capacidade de se ligar à trealose, e esta capacidade pôde ser mensurada. A taxa de ligação de trealose às proteínas solubilizadas da membrana denota a capacidade de transporte deste

dissacarídeo, uma vez que depende também da especificidade e afinidade do sítio de ligação da trealose presente na proteína. devido a esta especificidade, foi possível distinguir claramente as frações contendo proteínas ligantes de trealose daquelas que não tem sítio de ligação para este açúcar. A queda de taxa de ligação em proteínas provenientes de membranas previamente congeladas já era esperada, uma vez que vesículas de membranas perdem a atividade de transporte após serem congeladas (de Araujo et al., 1991).

Possivelmente a resolução do sinal do decaimento da ^{14}C -trealose ligada às proteínas possa ser melhor detectado com a queda do sinal da contagem de fundo. Entretanto, para os propósitos deste trabalho, os resultados obtidos com este tipo de experimento foram suficientes para a identificação primária do transportador de trealose.

5.2. Isolamento das bandas de 66 e 57 kDa da cepa AP68-7A: Cromatografia de troca iônica, Lavagem das membranas com NaCl 2M e Cromatografia de afinidade

Como pode ser verificado nas figuras 5, 6C e 7B as bandas de 66 e 57 kDa foram recorrentemente isoladas das demais proteínas solubilizadas da membrana plasmática da cepa AP68-7A, pela sua capacidade de se ligar à trealose radioativa dos ensaios de ligação e à trealose acoplada à resina de Sepharose na cromatografia de afinidade. A última abordagem foi utilizada como mais uma evidência, corroborando portanto os dados dos testes de ligação.

Os resultados obtidos após o tratamento com NaCl foram surpreendentes, uma vez que o intuito inicial era apenas remover proteínas extrínsecas e solúveis, que poderiam ter se associado eletrostaticamente à

membrana durante a sua purificação. Foi testada a utilização de KCl numa concentração final de 150 mM, também amplamente utilizado para a remoção de proteínas associadas (Hjelmeland & Chrambach, 1984). Entretanto, como as amostras eram rotineiramente analisadas em SDS-PAGE, optou-se por utilizar o tampão contendo NaCl, já que o SDS precipita na presença de íons K^+ , o que poderia interferir na migração das proteínas durante a eletroforese. Considerando que a taxa de remoção das proteínas associadas à membrana foi muito diferente em membranas de células induzidas e reprimidas (tabela 2), supôs-se inicialmente que se tratava de um artefato decorrente de problemas no estado de conservação das próprias membranas. Parecia razoável que isto acontecesse já que, na purificação de células induzidas o número de ciclos de homogeneização precisa ser 2 vezes maior que o utilizado para células reprimidas, em função da diferença da composição da parede das células nas duas fases de crescimento (Cabib, 1982; Valentin et al., 1987). Neste caso, o tampão de alta força iônica poderia estar levando à degradação da membrana, e não favorecendo a desassociação das proteínas extrínsecas. Porém se as proteínas e a própria membrana estavam sofrendo danos durante a homogeneização era de se esperar que também não fosse possível detectar a ligação específica de trealose às proteínas desta mesma membrana, o que foi demonstrado anteriormente não acontecer. A remoção até mesmo de proteínas integrais de membrana por tampões de alta força iônica (1 a 3 M NaCl) contendo um detergente já foi reportada anteriormente (Schägger, 1994). Provavelmente, proteínas integrais da membrana das células induzidas se tornam solúveis em tampão de alta força iônica, mesmo na ausência de detergentes. Isto ocorreria em consequência da composição lipídica da membrana das células induzidas, que também é diferente daquela observada nas células reprimidas. Já foi demonstrado que não só a composição lipídica da membrana plasmática de

células crescidas até a fase estacionária é diferente da de células crescidas apenas até a primeira fase de crescimento anaeróbico (Steels et al., 1994), mas também a sua susceptibilidade à solubilização (Serrano, 1991). Membranas de células crescidas até a fase estacionária apresentam uma maior resistência à solubilização, no entanto, parecem ser mais susceptíveis à altas forças iônicas. Esta diferença de comportamento provavelmente se dá em função justamente da composição lipídica desta membrana, e deve variar de acordo com a fase de crescimento analisada.

A co-purificação de 2 bandas em todos os métodos utilizados para isolar o transportador de trealose da cepa AP68-7A sugeria a presença de duas proteínas com capacidade de se ligar, e conseqüentemente transportar este açúcar. Foi considerada a hipótese de que uma das bandas pudesse ser produto de expressão do gene 1 do locus *MAL3*, enquanto a outra seria o produto do gene *AGT1*. Como comentado anteriormente, não foi possível fazer uma caracterização genética completa desta cepa, pois não resultaram esporos das tentativas de seu "back-cross" com a cepa *MAL1-1^C-Δ*, e portanto a haplóide pode carregar também o gene do transportador de maltose presente no locus *MAL3*. Se realmente as 2 bandas fossem produtos de genes diferentes, somente o sequenciamento de ambas poderia esclarecer esta identidade, uma vez que ambas eluem juntas em todas as condições utilizadas. Mesmo na hipótese de ser possível a reconstituição das proteínas em vesículas, e a realização de estudos das características cinéticas que permitissem identificar diferenças nas atividades ou afinidades pelo substrato entre as 2 proteínas, a impossibilidade de separá-las adequadamente antes da reconstituição impediria que fossem obtidos dados exclusivos para uma delas apenas, pois ambas seriam reconstituídas no mesmo sistema. O sequenciamento de ambas as

bandas parece ser razoável para definir este aspecto, uma vez que rapidamente revelaria se as duas bandas correspondem a produtos de dois genes diferentes.

Entretanto, acreditávamos que ambas as bandas fossem produtos do mesmo gene, o *AGT1*, pois a deleção apenas do locus *mal1g* em cepas que também carregavam o locus *MAL3*, aboliu sua capacidade de transportar trealose (Stambuk, 1995). Outra evidência de que as bandas fossem produtos do mesmo gene vinham de trabalhos com os transportadores codificados no locus *MAL1*. Utilizando anticorpo contra uma proteína de fusão lacZ-Mal11p, foram identificadas inicialmente 3 bandas em SDS-PAGE, de 50, 62 e 67 kDa (Lucero et al., 1993) e posteriormente foram co-purificadas 2 bandas, com 59 e 64 kDa (van den Broek et al. 1994), todas produtos do gene *MAL11*.

A opção por tentar obter a seqüência das bandas isoladas através do método de digestão em gel e análise da seqüência dos peptídeos, como descrito em resultados, se deveu aos problemas de resolução nos géis de poliacrilamida e coloração com Comassie blue de massas de proteínas maiores que 30 µg. Assim, a massa total de cada uma das bandas disponível era insuficiente para transferência para membrana de PVDF e posterior sequenciamento N-terminal. As análises por espectrometria de massas de ambas as bandas excisadas do gel de poliacrilamida, indicaram a possibilidade das proteínas serem diferentes, dando a de 57 kDa uma subunidade da ATPase de levedura, e a de 66 kDa a piruvato quinase de levedura, o que entretanto não está de acordo com os dados obtidos e até aqui discutidos. Como já dito, no método de identificação utilizado são analisadas e comparadas o padrão de digestão e as massas dos peptídeos resultantes após digestão do material por tripsina, com dados obtidos de maneira semelhante com outras proteínas. Nossos resultados indicam não haver expressão das proteínas enviadas para análise em células reprimidas da cepa AP68-7A e nem na cepa não transformada com o plasmídeo carregando o gene

AGT1, o que não ocorreria em se tratando das proteínas indicadas na análise das espectrometrias de massas. O fato de não haver nenhuma análise deste tipo feita com qualquer uma das proteínas transportadoras dos loci *MAL*, principalmente com o produto do gene *AGT1*, pode ser a causa dos resultados obtidos uma vez que as porcentagens de coberturas encontradas para as proteínas sugeridas são relativamente baixas (46% para a banda de 66 kDa, e 31% para a banda de 57 kDa).

Como o sistema de expressão do gene *AGT1* na cepa AP77-4C-p56-5, tornou-se disponível para ser testado, e como toda a metodologia de solubilização já havia sido estabelecida, a comparação entre o padrão de bandas isoladas das membranas das 2 cepas foi utilizado para comprovação da identidade da proteína transportadora de trealose. Como visto na figura 10B, as bandas isoladas em cromatografia de afinidade da membrana plasmática da cepa carregando o plasmídeo são as mesmas isoladas pelos diferentes métodos da membrana da cepa AP68-7A.

A hipótese de que 1 ou as 2 bandas sejam codificadas pelo gene *MAL31* não parece plausível, uma vez que só após a transformação com o plasmídeo contendo o gene *AGT1* é que tais bandas foram verificadas no padrão eletroforético das proteínas da membrana das células. Caso fosse(m) mesmo produto(s) do gene *MAL31*, a cepa não transformada também deveria transportar trealose e a banda correspondente à esta proteína seria visualizada em SDS-PAGE.

O sequenciamento de ambas as bandas poderá esclarecer se as proteínas codificadas pelo gene *AGT1* sofrem alguma modificação após serem inseridas na membrana, ou se a presença das 2 bandas é decorrente de alguma proteólise causada pelo processo de purificação das membranas e solubilização das proteínas. Há ainda a possibilidade de que devido à presença de regiões

altamente hidrofóbicas nestas proteínas, mesmo em altas concentrações de SDS, nem todas as moléculas exporiam todas as suas regiões hidrofóbicas e portanto, haveria populações de moléculas diferentemente recobertas por detergente, que migrariam com taxas diferentes em SDS-PAGE.

A obtenção de uma metodologia de solubilização das membranas plasmática mantendo a atividade do transportador de trealose, e seu isolamento das demais proteínas solubilizadas da membrana será de grande valia para o estudo das características cinéticas do transporte deste dissacarídeo em ambientes controlados, propiciados pela sua reconstituição em vesículas. As determinações das condições ideais de reconstituição do transportador de trealose serão objetos de atenção futura.

6. BIBLIOGRAFIA

- Attifield, P. V.; A. Raman & C. J. Northcott (1992). Constrution of *Saccharomyces cerevisiae* strains that accumulate relatively low concentrations of trehalose, and their application in testing the contribution of the disaccharide to stress tolerance. **FEMS Microbiol. Lett.** **84**: 271-276.
- Alonso, A. & A. Kotyk (1978). Apparent half-lives of sugar-transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Folia Microbiol.**, **23**: 118-125.
- App, H. & H. Holzer (1989). Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant. **J. Biol.Chem.** **264**: 17583-17588.
- Barnett, J. A. (1981). The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** **39**: 347-404.
- Beker, M. J. & A. I. Rapoport (1987). Conservation of yeast by dehydration. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** **35**: 127-171.
- Bell, W.; P. Klaassen; M. Ohnacker; T. Boller; M. Herweijer; P. Schoppink; P. Vanderzee & A. Wiemken (1992). Characterization of the 56 kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate syntase and cloning of this gene reveal its identity with the product of *CIF1*, a regulator of carbon catabolite inactivation. **Eur.J. Biochem.** **209**: 951-959.
- Bell, W.; W. N. Sun; S. Hohmann; S. Wera; A. Reinders; C. De Virgilio; A. Wiemken & J. M. Thevelein (1998). Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose syntase complex. **J. Biol. Chem.** **273**: 33311-33319.
- Birch, G. G. (1963). Trehalose. **Advan. Carbohydr. Chem.** **18**: 201-225.
- Bisson, L. F. & D. G. Fraenkel (1983). Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **80**: 1730-1734.
- Blum H., H. Beir. & H. Gross. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis** **8**: 93 - 99.
- Busturia, A. & R. Lagunas (1985). Identification of two forms of maltose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation. **Biochim. Biophys. Acta** **820**: 324-326.

- Busturia, A. & R. Lagunas (1986). Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **132**: 379-385.
- Cabib, E.; R. Roberts & B. Bowers (1982). Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. **Annu. Rev. Biochem.** **51**: 763-793.
- Carpenter, J. F. (1993). Stabilization of proteins during freezing and dehydration: Application of lessons from nature. **Cryobiology** **25**: 3916-3922.
- Carpenter, J. F. & J. H. Crowe (1989). An infrared spectroscopic study of the interaction of carbohydrates with dried proteins. **Biochemistry** **28**: 3916-3922.
- Chandrasekhar, I. & B.P. Gaber (1988). Stabilization of the biomembrane by small molecules: interaction of trehalose with the phospholipid bilayer. **J. Biomol. Struct. Dyn.** **5**: 1163-1172.
- Chang, Y. S.; R. A. Dubin; E. Perkins; D., Forrest; C. A. Michels & R. B. Needleman (1988). *MAL63* codes for a positive activator of maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.** **14**: 201-201.
- Chang, Y. S.; R. A. Dubin; E. Perkins; C. A. Michels & R. B. Needleman (1989). Identification and characterization of the maltose permease in a genetically defined *Saccharomyces* strain. **J. Bacteriol.** **171**: 6148-6154.
- Charron, M. J.; R.A. Dubin & C. A. Michels (1986). Structural and functional analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** **6**: 3891-3899.
- Charron, M. J. & C. A. Michels (1988). The naturally occurring alleles of *MAL1* in *Saccharomyces cerevisiae* species evolved by various mutagenic processes including chromosomal rearrangement. **Genetics** **120**: 83-93.
- Chapman, D.; R. M. Williams & B. D. Ladbroke (1967). Physical studies of phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins). **Chem. Phys. Lipids** **1**: 444-475
- Cheng, Q. & C. A. Michels (1989). The maltose permease encoded by the *MAL61* gene of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits both sequence

and structural homology to other sugar transporters. **Genetics** **123**: 477-484.

- Cheng, Q. & C. A. Michels (1991). *MAL11* and *MAL61* encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** **173**: 1817-1820.
- Chow, T. H. C.; P. Sollitti & J. Mamur (1989). Structure of the multigene family of *MAL* loci in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.** **217**: 60-69.
- Cirillo, V. (1968). Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Non-metabolizable sugars as substrates and inducers of galactose transport system. **J. Bacteriol.** **95**: 1727-1731.
- Cohen, J. D.; M. J. Goldenthal; B. Buchfere & J. Mamur (1984). Mutational analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces*: identification and functional characterization of three genes. **Mol. Gen. Genet.** **196**: 208-216.
- Cohen, J. D.; M. J. Goldenthal; B. Buchfere & J. Mamur (1985). Organization of the *MAL* loci of *Saccharomyces*. Physical identification and functional characterization of three genes at the *MAL6* locus. **Mol. Gen. Genet.** **200**:1-8.
- Coutinho, C.; E. Bernardes; D. Felix & A. D. Panek (1988). Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. **J. Biotechnol.** **7**:23-32.
- Crowe, J. H. & L. M. Crowe (1982). Hydration-dependent hexagonal phase lipid in a biological membrane. **Arch. Biochem. Biophys.** **217**: 582-587.
- Crowe, J. H. & L. M. Crowe (1986). Stabilization of membranes in anhydrobiotic organisms. *In*: Membranes, Metabolism and Dry Organisms. p. 188-210. Leopold A. C. (ed). Cornell University Press, New York, USA.
- Crowe, L. M. & J. H. Crowe (1988). Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited. **Biochim. Biophys. Acta** **946**: 193-201.
- Crowe, J. H. & L. M. Crowe (1993). Evidence for direct interaction between disaccharides and dry phospholipids. **Cryobiology** **30**: 226-227.
- Crowe, J. H.; L. M. Crowe & S.A. Jackson (1983). Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum. **Arch. Biochem. Biophys.** **220**: 477-484.

- Crowe, J. H.; L. M. Crowe & D. Chapman (1984a). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. **Science** **223**: 701-703.
- Crowe, L. M.; R. Mouradian; J. H. Crowe; S. A. Jackson & C. Womersley (1984b). Effects of carbohydrates on membranes stability at low water activities. **Biochim. Biophys. Acta** **769**: 141-150.
- Crowe, J. H.; L. M. Crowe; J. F. Carpenter; A. S. Rudolph; C. A. Wistrom; B. J. Spargo & T. J. Anchordoguy (1988). Interactions of sugars with membranes. **Biochim. Biophys. Acta** **947**: 367-384.
- Crowe, J. H.; B. D. McKersie & L. M. Crowe (1989). Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposomes. **Biochim. Biophys. Acta** **979**: 7-10.
- Crowe, J. H.; J. F. Carpenter; L. M. Crowe & T. J. Anchordoguy (1990). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. **Cryobiol.** **27**: 219-231.
- Crowe, J. H.; L. M. Crowe; A. C. Panek & P. S. de Araujo (1991). Trehalose transport in yeast cell. **Biochem. Inter.** **24**: 721-730.
- Crowe, J. H.; F. A. Hoekstra; K. H. N. Nguyen & L. M. Crowe (1996a). Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids? **Biochim. Biophys. Acta** **1280**: 187-196.
- Crowe, L. M.; D. S. Reid & J. H. Crowe (1996b). Is trehalose special for preserving dry biomaterials? **Biophys. J.** **71**: 2087-2093.
- Dean, P. D. G.; W. S. Johnson & F. A. Middle (eds) (1985). "Affinity Chromatography: A Practical Approach". IRL Press, Oxford.
- de Araujo, P. S.; A. C. Panek; J. H. Crowe; L. M. Crowe & A. D. Panek (1991). Trehalose-transporting membrane vesicles from yeast. **Biochem. Inter.** **24**: 731-737.
- DeJuan, C. & R. Lagunas (1986). Inactivation of galactose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.** **207**: 258-261.
- Dellamora-Ortiz, G. M.; C. H. Ortiz; J. C. Maia & A. D. Panek (1986). Partial purification and characterization of the interconvertible forms of trehalase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Biochem. Biophys.** **251**: 205-214.

- Destruelle, M.; H. Holzer & D. J. Klionsky (1995). Isolation and characterization of a novel yeast gene, *ATH1*, that is required for vacuolar acid trehalase activity. **Yeast** **11**: 1015-1025.
- Deutscher, M. P. (ed) (1990). "Methods in Enzymology". Vol 192 (Guide to protein purification). Academic Press, New York.
- De Virgilio, C.; N. Burckert; W. Bell; T. Boller & A. Wiemken (1993). Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100 kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. **Eur.J.Biochem.** **212**:315-323.
- De Virgilio, A.; C. Reinders; N. Burckert; S. Hohmann; J. M. Thevelein; T. Boller & A. Wiemken (1997). Structural analysis of the subunits of the trhalose-6-phosphate syntase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae* and their function during heat shock. **Mol. Microbiol.** **24**: 687-695.
- Dubin, R. A.; R. B. Needleman; D. Gosset & C. A. Michels (1985). Identification of the strucutural gene encoding maltase within the *MAL6* locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. **J. Bacteriol.** **164**: 605-610.
- Dubois, M.; K. Gilles; J. K. Hamilton; P. A. Rebers & F. Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related compounds. **Anal. Chem.** **28**: 350-356.
- Dunn, M. J. (1989). Determination of total protein concentration. In: *Protein purificaton methods: a pratical approach.*. Harris, L. V. & S. Angal (eds). Oxford: Irl Press. vol 1, p. 10-18.
- Elander, M. (1969). Trehalose-6-phosphatase aus Backerhefe. **Ark. Kem.** **31**: 17-30.
- Elbein, A. D. (1974). The metabolism of trehalose. **Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.** **30**: 227-256.
- Eleutherio, E. C. A.; P. S. de Araujo; A. D. Panek (1993). Role of trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta** **1156**: 263- 266.
- Eleutherio, E. C. A.; J. T. Silva & A. D. Panek (1998). Identification of an integral membrane 80 kDa protein of *Saccharomyces cerevisiae* induced in response to dehydration. **Cell Stress Chaperon** **3**: 37-43

- Elliott, B. & B. Futcher (1993). Stress resistance of yeast cells is largely independent of cell-cycle phase. **Yeast** **9**: 33-42.
- Fiechter, A.; G. F. Fuhrmann & O. Kappeli (1981). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. **Adv. Microbiol. Physiol.** **22**:123-183.
- Fraenkel, D. G. (1982). Carbohydrate metabolism. *In: The Molecular Biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression.* Strathern, J.N.; E.W. Jones & J.R. Broach (eds) p. 1-37. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York,
- François, J.; M. J. Neves & H. G. Hers (1991). The control of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for a catabolite inactivation and repression of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase. **Yeast** **7**: 575-587.
- Fabrie, C. H. J. P.; B. Kruijff & J. Gier (1990). Protection by sugars against phase transition-induced leak in hydrated dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. **Biochim. Biophys. Acta** **1024**: 380-384.
- Fosset, M.; L. W. Muir; L. D. Nielsen & E. H. Fischer (1971). Purification and properties of yeast glycogen phosphorylase a and b. **Biochemistry** **10**: 4105-4113.
- Gaber, B. P.; I. Chandrasekhar & N. Pattabiraman (1986). The interaction of trehalose with the phospholipid bilayer: A molecular modeling study. *In: Membranes, Metabolism and Dry Organisms.* p. 231-241. Leopold, A. C. ed. Cornell University Press, New York.
- Gélinas, P.; G. Fiset; A. LeDuy & J. Goulet (1989). Effect of growth conditions and trehalose content on cryotolerance of baker's yeast in frozen doughs. **Appl. Environ. Microbiol.** **55**:2453-2459.
- González, M. I.; R. Stucka; M. A. Blázquez; H. Feldman & C. Gancedo (1992). Molecular cloning of *CIF1*, a yeast gene necessary for growth on glucose. **Yeast** **8**: 183-192.
- Grba, S; E. Oura & H. Soumalainen (1975). On formation of glycogen and trehalose in baker's yeast. **Eur. J. Appl. Microbiol.** **2**: 29-37.
- Green, J. L. & C. A. Angell (1989). Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and trehalose anomaly. **J. Phys. Chem** **93**: 2880-2882.

- Han, E. K.; F. Cotty; C. Sottas; H. Jiang & C. A. Michels (1995). Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. **Mol. Microbiol.** **17**: 1093-1107.
- Hermanson, G. T.; A. K. Mallia & P. K. Smith (1992). "Immobilized Affinity Ligand Techniques". Academic Press, New York.
- Hino, A.; K. Mihara; K. Nakashima & H. Takano (1990). Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeast. **Appl. Environ. Microbiol.** **56**: 1386-1391.
- Hjelmeland, L. M. & A. Chrambach (1984). In **Methods in Enzymology**. Jakoby, W. B. (ed), Academic Press, New York and London, Vol 104, p. 305.
- Hohmann, S; K. Huse; E. Valentin; K. Mbonyi; J. M. Thevelein & F. K. Zimmermann (1992). Glucose-induced regulatory defects in the *Saccharomyces cerevisiae* *byp1* growth initiation mutant and identification of *MIG1* as a partial supressor. **J.Bacteriol.** **174**: 4183-4188.
- Hong, S. H. & J. Mamur (1987). Upstream regulatory regions controlling the expression of the yeast maltase gene. **Mol. Cell. Biol.** **7**: 2477-2483.
- Hottiger, T.; T. Boller & A. Wiemken (1987a). Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. **FEBS Lett.** **220**: 113-115.
- Hottiger, T.; P. Schmutz & A. Wiemken (1987b). Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** **169**: 5518-5522.
- Hottiger, T.; T. Boller & A. Wiemken (1989). Correlation of trehalose content and heat resistance in yeast mutants altered in the RAS/adenylate cyclase pathway: is trehalose a thermoprotectant? **FEBS Lett.** **255**: 431-434
- Jakoby, W. B. (ed) (1984). "Methods in Enzymology". Vol 104 (Enzyme purification and related techniques, Part C). Academic Press, New York.
- Kane, S. M. & R. J. Roth (1974). Carbohydrate metabolism during ascospore development in yeast. **J. Bacteriol.** **118**: 8-14.

- Kaplan, R. S. & P. L. Pedersen (1985). Determination of microgram quantities of protein in the presence of milligram levels of lipid with amido Black B10. **Anal. Biochem.** **150**: 97-104.
- Keilin, D. (1959). The problem of anabiosis or latent life: History and current concept. **Proc Royal Society Lond. Series B: Biological Sciences**, **150**: 149-191.
- Keller, F.; M. Schellenberg & A. Wiemken (1982). Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Arch. Microbiol.** **131**: 298-301.
- Kienle, I.; M. Burgert & H. Holzer (1993). Assay of trehalose with acid trehalase purified from *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** **9**: 607-611.
- Kim, J & C. A. Michels (1988). The *MAL63* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cysteine-zinc finger protein. **Curr. Genet.** **14**: 319-323.
- Kolarov, J.; J. Kulpa; M. Baijot & A. Goffeau (1988). Characterization of a protein serine kinase from yeast plasma membrane. **J. Biol. Chem.** **263**: 10613-10619.
- Komor, E.; C. Schobert & B. H. Cho (1983). The hexose uptake system of *Chlorella*: it is a proton symport or a hydroxyl ion antiport system? **FEBS Lett.** **156**: 6-10.
- Kopp, M.; H. Muller & H. Holzer (1993). Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** **268**: 4766-4774.
- Koster, K. L. & A. C. Leopold (1988). Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiol.** **88**: 829-832.
- Koster, K. L.; M. S. Webb; G. Bryant & D. V. Lynch (1994). Interactions between soluble sugars and POPC (1palmitoyl-2 oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid. **Biochim. Biophys. Acta** **1193**: 143-150.
- Kotyk, A. & D. Michaljanicova (1979). Uptake of trehalose by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **110**: 323-332.
- Kuenzi, M. T. & A. Fiechter (1969). Changes in carbohydrate composition and trehalase activity during the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiol.** **64**: 398-407.

- Kuenzi, M. T. & A. Fiechter (1972). Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* under growth limitation. **Arch. Microbiol.** **84**: 254-265.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685.
- Lages, F. & C. Lucas (1995). Characterization of a glycerol H⁺ symport in the halotolerant yeast *Picchia sorbitophila*. **Yeast** **11**:111-119.
- Lagunas, R. (1979). Energetic irrelevance of aerobiosis for *S.cerevisiae* growing on sugars. **Mol. Cell. Biochem.** **27**: 139-146.
- Lagunas, R. (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.** **104**:229-242.
- Leopold, A. C.(1986). *Membranes, Metabolism, and Dry Organisms*. Cornell University press, Ithaca.
- Leslie, S. B.; S. A. Teter; L. M. Crowe & J. H. Crowe (1994). Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. **Biochim. Biophys. Acta** **1192**: 7-13.
- Lewis, D. A. & L. F. Bisson (1991). The *HXT1* gene product so *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexoses transporters. **Mol. Cell. Biol.** **11**: 3804-3813.
- Lewis, J. G.; C. J. Northcott; R. P. Learmonth; P. V. Attfield & K. Watson (1993). The need for consistent nomenclature and assessment of growth phases in diauxic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **139**: 835-839.
- Lillie, S. H. & J. R. Pringle (1980). Reserve carbohydrate metabolism en *Saccharomyces cerevisiae*: Responses to nutrient limitation. **J. Bacteriol.** **143**: 1384-1394.
- Londesborough, J & K. Varimo (1984). Characterization of two trehalases in bakers yeast. **Biochem. J.** **219**: 511-518.
- Londesborough, J & O. Vuorio (1991). Trehalose 6-phosphate synthase/phosphatase complex from baker yeast: purification of a proteolytically activated form. **J. Gen. Microbiol.** **137**: 323-330.
- Lucero, P.; M. Herweijer & R. Lagunas (1993). Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. **FEBS Lett.** **333**: 165-168.

- Mackenzie, K. F.; K. K. Singh & A. D. Brow (1988). Water stress plating hypersensitivity of yeast: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **134**: 1661-1666.
- Madin, K. A. C. & J. H. Crowe (1975). Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. **J. Exp. Zool.** **193**: 335-342.
- Matern, H. & H. Holzer (1977). Catabolite inactivation of the galactose uptake system in yeast. **J. Biol. Chem.** **252**: 6399-6402.
- McDougall, J.; I. Kaasen & A. R. Strom (1993). A yeast gene for trehalose-6-phosphate syntase and its complementation of an *Escherichia coli* *otsA* mutant. **FEMS Microbiol. Lett.** **107**: 25-30.
- Michels, C. A. & R. B. Needleman (1984). The dispersed, repeated family of *MAL* loci in *Saccharomyces* spp. **J. Bacteriol.** **157**: 949-952.
- Michels, C. A.; E. Read; K. Nat & M. J. Charron (1992). The telomere-associated *MAL3* locus of *Saccharomyces* is a tandem array of repeated genes. **Yeast** **8**: 655-665.
- Mittenbuhler, K & H. Holzer (1988). Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant. **J. Biol. Chem.** **263**: 8537-8543.
- Morton, R. E. & T. A. Evans (1992). Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein content **Anal. Biochem.** **204**: 332-334.
- Naumov, G. I.; E. S. Naumova & C. A. Michels (1991). Identification of the functional α -glucoside gene in natural mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* which do not ferment maltose. **Dokl. Akad. Nauk. SSSR** **316**: 1249-1252.
- Needleman, R. B (1991). Control maltase synthesis in yeast. **Mol. Microbiol.** **5**: 2079-2084
- Needleman, R. B. & C. A. Michels (1983). Repeated family of genes controlling maltose fermentation in *Saccharomyces carlsbergensis*. **Mol. Cell. Biol.** **3**: 796-802.
- Needleman, R. B.; D. B. Kaback; R. A. Dubin; E. L. Perkins; N. G. Rosenberg; K. A. Sutherland; D. B. Forrest & C. A. Michels (1984). *MAL6* of

- Saccharomyces*: a complex genetic locus containing 3 genes required for maltose fermentation. **Proc. Natl. Sci. Biol.** **81**: 2811-2815.
- Nehlin, J.O.; M. Crlberg & H. Ronne (1987). Yeast galactose permease is related to yeast and mammalian glucose transporters. **Gene** **85**: 313-319.
- Nelissen, B.; R. de Wachter & A. Goffeau (1997). Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev.** **21**: 113-134.
- Nwaka, S.; B. Mechler & H. Holzer (1996). Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. **FEBS Lett.** **386**: 235-238.
- Oliver, A.E.; L.M. Crowe & J.H. Crowe (1998). Methods for dehydration-tolerance: Depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. **Seed. Sci. Res.** **8**: 211-221.
- Ortiz, C. H. D.; J. C. C. Maia; M. N. Tenan; G. R. Braz-Padrão; J. R. Mattoon & A. D. Panek (1983). Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cAMP-dependent phosphorylation- dephosphorylation cascade system. **J. Bacteriol.** **153**: 644-651.
- Panek, A. D. (1962). Synthesis of trehalose by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Arch. Biochem. Biophys.** **98**: 349-355.
- Panek, A. D. (1975). Trehalose synthesis during starvation of baker's yeast. **Eur. J. Applied Microbiol.** **2**: 39-46.
- Panek, A. D. (1991). Storage carbohydrates. In: *The Yeasts*. vol. 4, p. 655-677. Rose, A.H. & J.S. Harrison eds. Academic Press, New York, USA.
- Panek, A. D. (1995). Trehalose metabolism – new horizons in technological applications. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** **28**: 169-181.
- Panek, A. D. & J. R. Mattoon (1977). Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Relationship between catabolite repression, trehalose synthesis, and mitochondrial development. **Arch. Biochem. Biophys.** **183**: 306-316.
- Panek, A. D. & E. Bernardes (1983). Trehalose: its role in germination of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.** **7**: 393-397.

- Panek, A. C.; P. S. de Araujo; V. M. Neto & A. D. Panek (1987). Regulation of trehalose-6-phosphato synthase complex in *Saccharomyces*. **Curr. Genet.** **11**: 459-465.
- Panek, A. D.; R. Ferreira & A. C. Panek (1989). Comparative studies between the glucose induced phosphorylation signal and the heat shock response in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimie** **71**: 313-318.
- Paschoalin, V.M.F.; A.C.Panek & A.D. Panek (1987). Catabolite inactivation of trehalose synthesis during growth of yeast on maltose. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** **20**: 675-683.
- Peters, T. J.; G. Biamonte & B. T. Doumas (1982). Protein (total protein) in serum, urine and cerebrospinal fluid; albumin in serum. *In: Selected Methods of clinical chemistry. (GENERIC)*. Vol 9. Faulkner, W. R. & S. Meiters (eds). American Association for Clinical Chemistry, Washington, D. C., USA.
- Prestrelski, S. J.; T. Arakawa & J. F. Carpenter (1993). Separation of freezing-induced and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization 2. Structural studies using infrared spectroscopy. **Arch. Biochem. Biophys.** **303**: 456-464.
- Richarmes. G. & A. Kepes (1983). Study of binding protein-ligand interactions by ammonium sulfate-assisted adsorption on cellulose esters filters. **Biochim. Biophys. Acta** **742**: 16-24.
- Riegger, M.; O. Kapelli & A. Fiechter (1983). The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **129**: 653-661.
- Rothman-Denes, L. B. & E. Cabib (1971). Glucose-6-phosphate dependent and independent forms of yeast glycogen synthetase. Their properties and interconversions. **Biochemistry** **10**: 1236-1242.
- Sachägger, H (1994). Electrophoretic isolation of membranes proteins from acrylamide gels. **Appl. Biochem. Biotech.** **48**: 185-203.
- Serrano, R. (1977). Energy requirements for maltose transport in yeast. **Eur. J. Biochem.** **80**:97-102.
- Serrano, R. (1991). Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. *In: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics*. Broach, J.R.;

J.R.Pringle & E.W. Jones. Eds. Vol. 1, p. 523-585. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. USA.

Singh, K. K. & R. S. Norton (1991). Metabolic changes induced during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to a water stress. **Arch. Microbiol.** **156**: 38-42.

Smith, P. K.; R. I. Khron; G. T. Hermanson; A. K. Mallia; F. H. Gartner; M. D. Provenzano; E. K. Fujimoto; N. M. Goeke; B. J. Olson & D. C. Klenk (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.** **150**: 76-85.

Sollitt, P & J. Mamur (1988). Primary structure of the regulatory gene from the *MAL6* locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. **Mol. Gen. Genet.** **213**: 56-62.

Soumalainen, H. & S. Pafaffli (1961). Changes in carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on standing. **J. Inst. Brew. London** **67**: 249-254.

Stambuk, B. U. (1995). Caracterização do transportador de trelose em *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP, São Paulo.

Stambuk, B. U.; J. H. Crowe; L. M. Crowe; A. D. Panek & P. S. de Araujo (1993). A dependable method for the synthesis of [¹⁴C]trehalose. **Anal. Biochem.** **212**: 150-153.

Stambuk, B. U.; P. S. de Araujo; A. D. Panek & R. Serrano (1996). Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.** **237**: 876-881.

Stambuk, B. U.; P. S. de Araujo A. D. Panek; J. H. Crowe; L. M. Crowe & (1998). Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta** **1379**: 118-128.

Thevelein, J. M. (1984). Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiol. Rev.** **48**: 42-59.

Thevelein, J. M. & S. Hohmann (1995). Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? **TIBS** **20**: 3-10.

Trollmo, C.; L. André; A. Blomberg & L. Adler (1988). Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.** **56**: 321-326.

- Tsvetkov, T.; L. I. Tsonev; N. M. Tsvetkova; R. D. Koynova & B. G. Tenchov (1989). Effect of trehalose on phase properties of hydrated and lyophilized dipalmitoylphosphatidylcholine multilayers. **Cryobiol.** **26**: 161-169.
- Uno, I.; K. Matsumoto; K. Adachi & T. Ishikawa (1983). Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast. **J. Biol. Chem.** **258**: 10867-10872.
- Valentin, E.; E. Herrero; H. Rico; F. Miragall & R. Sentandreu. (1987). Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **148**: 88-94.
- Van Aelst, L; S. Hohmann; B. Bulaya; W. de Koning; L. Sierkstra; M.J. Neves; K. Luyten; R. Alijo; R. Ramos; P. Coccetti; E. Martegani; N. M. de Magalhães-Rocha; R. L. Brabão; P. Van Dijck; M. Vanhalewyn; P. Durnez; A.W.H. Jans & J.M. Thevelein (1993). Molecular cloning of a gene involved in glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.** **8**: 927-943.
- Van den Broek, P. J. A.; C. C. M. Van Leeuwe; R. A. Weusthuis; E. Postma; J. P. Van Dijlen; R. H. Karssies & R. Amons (1994). Identification of the maltose transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **200**: 45-51.
- Vandercammen, A; J. François & H-G. Hers (1989). Characterization of trehalose 6-phosphate syntase and trehalose 6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur.J.Biochem.** **182**: 613-620.
- Van der Rest, M., A. H. Kamminga; H. Nakano; A. Yasuhiro; B. Poolman & W. N. Konings (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. **Microbiol. Rev.** **59**: 304-322.
- Van Leeuwen, C.C.M.; R.A. Weusthuis; E. Postma; P.J.A. Van den Broek & J.P. Van Dijken (1992). Maltose/proton co-transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparative study with cells and plasma membrane vesicles. **Biochem. J.** **282**: 441-445.
- Van Solingen, P. & J.B. Van der Plaat (1975). Partial purification of protein system controlling breakdown of trehalose in bakers yeast. **Biochem. Biophys. Res. Co.** **62**: 535-560.

- Vanoni, M.; P. Sollitt; M. Goldenthal & J. Mamur (1989). Structure and regulation of the multigene family controlling maltose fermentation in budding yeast. **Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.** **37**: 281-322.
- Vuorio, O; Londesborough, J & N. Kalkkinen (1992). Trehalose synthase: Purification of the intact enzyme and cloning of the structural genes. **Yeast** **8**: S626.
- Wessel, D. & I. Flügge (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. **Anal. Biochem.** **138**: 141-143.
- Wolfe, K. H. & A. J. E. Lohan (1994). Sequence around the centromere of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome II - similarity of cen 2 to cen 4. **Yeast** **10**: s41-s46. Supl. A.
- Xavier, K. B.; L. O. Martins; R. Peist; M. Kossmann; W. Boss & H. Santos (1996). High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archeon *Thermococcus litoralis*. **J. Bacteriol.** **178**: 4773-4777.