DÉBORA TRICHEZ

**Análise estrutural da permease
Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2012

DÉBORA TRICHEZ

**Análise estrutural da permease
Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Boris J. C. U. Stambuk

Versão original

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Trichez, Débora.

Análise estrutural da permease Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae*
/ Débora Trichez. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Microbiologia aplicada.

Versão do título para o inglês: Structural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Agt1p permease.

1. Agt1 2. Fermentação 3. Inativação catabólica 4. Levedura 5. Transporte 6. *Saccharomyces cerevisiae* I. Stambuk, Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB089/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Débora Trichez.

Título da Tese: Análise estrutural da permease Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae*.

Orientador(a): Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Aos meus pais, Igídio e Marli,
e aos meus irmãos, Fabíola e Rafael.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo carinho, exemplo e incentivo, não só durante este percurso, mas durante toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk pela orientação, atenção e contribuição à minha formação pessoal e profissional e, também, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Pedro Soares de Araújo, por me conceder a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, período que me proporcionou grande crescimento pessoal e profissional, e também aos profs. Dr. Hernan Chaimovich Guralnik e Dr. Iolanda Cuccovia, por permitirem a utilização dos equipamentos de seus laboratórios, bem como pela atenção prestada.

Aos Profs. Dr. Sandro Marana (IQ-USP) e Dr. Rodrigo Baiany Leal (BQA-UFSC), por permitir a utilização de alguns dos equipamentos de seus laboratórios.

Aos Profs. Dr. Luiz Claudio Milette e Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior, pela atenção, amizade e pela troca de conhecimento ao longo dos anos de convívio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e aos funcionários da secretaria, pela atenção durante o doutoramento, e também aos funcionários do Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica.

Aos amigos e colegas de laboratório, estejam eles em Florianópolis ou em São Paulo, pela convivência, amizade, troca de conhecimentos, momentos de descontração e pelas contribuições diretas e indiretas a este trabalho.

À Ana e Chaiene, pelo apoio, amizade e pela participação na realização de parte deste trabalho e à Débora Veske pela colaboração realizada.

Aos amigos (e irmãos) encontrados durante este caminho: Áurea, Catarina, Daniel, Letícia, Marcelo Dário, Nina, Patrícia, Priscila, Suzana, que tornaram esse período muito mais leve e agradável. E aos amigos de longa data, que sempre se mantiveram presentes, mesmo na distância.

Ao Marcelo Lemos, pelo carinho, amor e companheirismo, e também pela tranquilidade que me fez sentir neste último ano do doutorado.

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

RESUMO

TRICHEZ, D. **Análise estrutural da permease Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 117 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Proteínas de membrana têm um papel crucial em diferentes processos fisiológicos, como na homeostasia de metabólitos, excreção, comunicação entre células e na adaptação ao ambiente. Em *Saccharomyces cerevisiae*, algumas proteínas de membrana são responsáveis pelo transporte de diferentes açúcares através da membrana celular e, portanto, são importantes para os processos fermentativos, permitindo que estes açúcares sejam metabolizados e fermentados pela levedura. Visando melhorar a compreensão do metabolismo de açúcares em *S. cerevisiae*, estudamos, em nível molecular, o transporte ativo de açúcares mediado pela permease Agt1p, uma proteína que realiza o co-transporte de prótons com diversos α -glicosídeos de interesse biotecnológico. Dois aspectos dessa proteína transportadora foram caracterizados: o mecanismo de transporte e a inativação catabólica do transportador promovida pela glicose. Para isso, mutantes em resíduos específicos da permease Agt1p foram gerados por mutagênese sítio-dirigida e expressados em uma linhagem deletada no respectivo gene (*agt1 Δ*) para avaliar a funcionalidade das proteínas. Os resultados obtidos indicam que os aminoácidos presentes nos segmentos transmembrana (TM) Glu-120, Asp-123, Glu-167, Arg-504 e Ile-505 estão envolvidos com o simporte açúcar-H⁺ realizado pela permease Agt1p. A substituição de Arg-504 por um resíduo neutro (mutante R504A) aboliu completamente a atividade de transporte da permease Agt1p, sugerindo que este resíduo seja essencial para a ligação do substrato e/ou processo catalítico. A modificação da Ile-505 por uma treonina (I505T) não afetou de forma severa a utilização de açúcares pela levedura, porém causou menores velocidades de transporte, indicando que este resíduo possa estar relacionado ao reconhecimento ou afinidade pelo açúcar durante o transporte. Já nos mutantes dos aminoácidos carregados E120A, D123G e E167A, observou-se que a translocação do próton foi mais afetada, visto que todos estes mutantes foram capazes de utilizar maltotriose ou transportar α -glicosídeos, porém com reduzidas velocidades de transporte. Em relação aos resíduos e/ou domínios envolvidos com o processo de inativação catabólica promovido pela glicose, os resultados obtidos demonstram que a região N-terminal do Agt1p, bem como a alça citoplasmática

presente entre os TMs 6 e 7, são essenciais para a resposta celular frente a presença de glicose. A substituição dos resíduos Glu-51 e Leu-55 da permease por resíduos de glicina e histidina, respectivamente (mutante E51G/L55H), bem como o provável motivo di-leucina presente na região N-terminal (mutante L100A/L101A) e o resíduo Thr-369 localizado na alça citoplasmática (mutante T369A), tornaram o transportador mais resistente à regulação pela glicose, provavelmente em consequência de uma menor susceptibilidade do Agt1p ser ubiquitinado, endocitado e/ou degradado. Nossos resultados também sugerem que a fosforilação da Ser-301 é importante para a atividade de transporte, já que o mutante S301A apresenta baixa atividade de transporte, embora apresente quantidades estáveis da proteína na célula. Finalmente, a fusão da permease Agt1p com a glutathione-S-transferase permitiu purificar uma proteína de ~67 kDa, condizente com a massa molecular prevista para este transportador. As informações obtidas neste estudo contribuem para esclarecer o mecanismo de transporte de α -glicosídeos mediado pela permease Agt1p, permitindo o desenvolvimento de estratégias que visem o melhoramento dos processos fermentativos industriais com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: AGT1. Fermentação. Inativação catabólica. Levedura. Transporte. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

TRICHEZ, D. **Structural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Agt1p permease**. 2012. 117 p. Ph. D thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Membrane proteins have crucial roles in diverse physiological processes such as metabolite homeostasis, excretion, communication between cells, and adaptation to the environment. In *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteins are responsible for the transport of different sugars across the cellular membrane and, therefore, are important for fermentation processes, allowing sugars to be metabolized and fermented by yeast. In order to improve our understanding of sugar metabolism in *S. cerevisiae*, we studied at the molecular level the active sugar transport mediated by Agt1p permease, a protein that co-transporters protons with several α -glucosides of biotechnological relevance. Two aspects of this transport protein were characterized: the mechanism of transport and the catabolite inactivation of the transporter induced by glucose. Thus, mutants in specific residues of the Agt1p permease were generated by site direct mutagenesis and expressed in a strain deleted on the corresponding gene (*agt1 Δ*) to evaluate the functionality of the proteins. The results indicate that the Glu-120, Asp-123, Glu-167, Arg-504 and Ile-505 residues present in the transmembrane segments (TMs) are involved in the sugar-H⁺ symport mediated by the Agt1p permease. The substitution of the Arg-504 residue by the neutral residue alanine (R504A mutant) completely abolished Agt1p transport activity, suggesting that this residue is essential for substrate binding and/or the catalytic process. The modification of Ile-505 to threonine (I505T) did not affect severely the utilization of sugars by the yeast, but promoted lower transport activities, indicating that this residue could be related with sugar recognition or affinity during transport. In mutants of the charged amino acids E120A, D123G and E167A it was observed that proton translocation was more affected, since all these mutants allow maltotriose utilization or transport α -glucosides, although with lower rates of transport. Regarding residues and/or domains involved in the process of catabolite inactivation promoted by glucose, the results indicate that the N-terminal region of Agt1p, and the intracellular loop between TMs 6 and 7, are essential for the cellular response to the presence of glucose. The substitution of the Glu-51 and Leu-55 residues of the permease by glycine and histidine residues, respectively (E51G/L55H mutant), as well as the putative di-

leucine motif present in the N-terminal region (L100A/L101A mutant) and the Thr-369 residue found in the cytoplasmic loop (T369A mutant), turned the transporter more resistant to the regulation by glucose, probably due to less susceptibility of Agt1p to ubiquitination, endocytosis and/or proteolysis. Our results also suggest that Ser-301 phosphorylation is important for the transport activity, since the S301A mutant showed low transport activity, despite stable quantities of the permease in the cell. Finally, the fusion of the Agt1p permease to glutathione-S-transferase allowed the purification of a ~67 kDa protein, consistent with the predicted molecular weight of this transporter. The information obtained in this study contributes to clarify the mechanism of α -glucoside transport mediated by the Agt1p permease, allowing the development of strategies for the improvement of industrial fermentation processes with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: *AGT1*. Catabolite inactivation. Fermentation. Transport. *Saccharomyces*. Yeast.

LISTA DE SIMBOLOS

$\approx$	Aproximadamente
Et	Etanol
Mal	Maltose
Mtt	Maltotriose
K_m	Constante de Michaelis-Menten
X	Concentração celular (g/L)
t_g	Tempo de geração celular (h)
$Y_{Et/s}^{Exp}$	Fator de conversão de substrato a etanol, calculado na fase exponencial de crescimento (g ET.g substrato ⁻¹)
$Y_{Et/s}^{Glo}$	Fator de conversão de substrato a etanol, calculado no momento da obtenção máxima de etanol (g ET.g substrato ⁻¹)
$Y_{x/s}^{EXP}$	Fator de conversão de substrato a células, calculado na fase exponencial de crescimento (g X.g substrato ⁻¹)
μ_x	Velocidade específica de crescimento celular (h ⁻¹)
μ_{Et}	Velocidade específica de produção de etanol (h ⁻¹)
μ_s^{Exp}	Velocidade específica de consumo de substrato (h ⁻¹)
P_{Et}	Produtividade em etanol (g ET . (L.h) ⁻¹)

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AMBEV	American Beverage Company
AMPc	Adenosina monofostato cíclica
DDM	Dodecil- β -D-maltopiranosideo
kDa	Quilo Dalton
Meio LB	Meio Luria-Bertani
Meio SC	Meio sintético
Meio YP	Meio rico
pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>p</i> NF α G	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
rpm	Rotações por minuto
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
SINDICERV	Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja
TCDB	Transporter Classification Database
TMs	segmentos transmembrana
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ordem de captação de açúcares pelas leveduras	20
Figura 2 - Modelo estrutural para os transportadores com 12 TMs pertencentes a Major Facilitator Superfamily (MFS)	23
Figura 3 - Representação da estrutura e do controle da expressão dos genes <i>MAL</i>	27
Quadro 1 - Linhagens utilizadas no estudo	35
Quadro 2 - Plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	36
Figura 4 - Representação esquemática do plasmídeo pGRSd-AGT1	37
Figura 5 - Desenho esquemático dos oligonucleotídeos utilizados para a mutagênese	38
Figura 6 - Fusão de <i>GFP</i> à extremidade C-terminal do <i>AGT1</i>	42
Figura 7 - Fusão do gene <i>GST</i> à extremidade N-terminal do <i>AGT1</i>	43
Figura 8 - Representação da estrutura secundária da permease Agt1p	53
Figura 9 - Alinhamento das sequências de transportadores de açúcares conhecidos e similares ao Agt1p	53
Figura 10 - Confirmação da mutação no aminoácido E167 de Agt1p	54
Figura 11 - Confirmação da mutação no aminoácido I505 de Agt1p	55
Figura 12 - Utilização de maltose pela cepa LCM003 portando as permeases Agt1p mutantes.....	56
Figura 13 - Utilização de maltotriose pela cepa LCM003 portando as permeases Agt1p mutantes.....	57
Figura 14 - Atividade de transporte da permease Agt1p e da enzima α -glicosidase	60
Figura 15 - Estequiometria do transporte ativo de trealose e sacarose em células de <i>S. cerevisiae</i>	62
Figura 16 - Ausência de efluxo e contra-fluxo de trealose pela cepa LCM003 portando a permease Agt1p normal ou os mutantes D123G e E167A.....	63
Figura 17 - Efeito do pH na atividade de transporte de ^{14}C -trealose ou ^{14}C -sacarose	64

Figura 18 - Perda da funcionalidade da permease Agt1p na presença da dupla mutação (D123G/E167A)	65
Figura 19 - Construção do módulo GFP-KanMX6 e confirmação da correta integração do módulo nos plasmídeos	67
Figura 20 - Localização da permease Agt1p fusionada a GFP em células da cepa LCM003 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
Figura 21 - Representação do modelo estrutural de Agt1p	70
Figura 22 - Mecanismo proposto para o simporte açúcar-H ⁺ promovido pela permease Agt1p	72
Figura 23 - Comparação entre a sequência de Agt1p e as sequências dos transportadores Mal21p e Mal61p	74
Figura 24 - Confirmação da mutação nos aminoácidos E51 e L55 da permease Agt1p	74
Figura 25 - Confirmação da mutação nos aminoácidos L100 e L101 da permease Agt1p ..	75
Figura 26 - Confirmação da mutação no aminoácido S301 da permease Agt1p	75
Figura 27 - Confirmação da mutação no aminoácido T369 da permease Agt1p	76
Figura 28 - Utilização de maltose pela cepa LCM003 contendo a permease Agt1p normal ou as permeases mutantes derivadas	77
Figura 29 - Utilização de maltotriose pela cepa LCM003 contendo a permease Agt1p normal ou as permeases mutantes derivadas	79
Figura 30 - Atividade de transporte da permease Agt1p	80
Figura 31 - Resistência à degradação induzida por glicose da permease Agt1p normal ou mutantes	82
Figura 32 - Inativação catabólica do transportador Agt1p	84
Figura 33 - Representação comparativa das atividades de transporte de <i>p</i> NPαG pelas permeases durante a inativação catabólica promovida pela glicose.	84
Figura 34 - Degradação da permease Agt1p normal e das proteínas mutantes.	85
Figura 35 - Localização celular das permeases fusionadas com GFP durante a inativação catabólica	88

Figura 36 - Fermentação em frascos agitados de maltose, maltotriose e glicose pela linhagem LCM003 transformada com os diferentes plasmídeos	93
Figura 37 - Fusão da <i>GST</i> à extremidade N-terminal do <i>AGT1</i>	95
Figura 38 - Verificação da correta integração do módulo de fusão KanMX6-P _{GAL} -GST	95
Figura 39 - Indução com galactose para expressão da proteína Gst-Agt1p	96
Figura 40 - Purificação parcial da proteína Gst-Agt1p	99
Figura 41 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS mostrando amostras eluídas concentradas e frações clivadas com trombina	100

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Parâmetros fisiológicos da linhagem LCM003 portando os diferentes plasmídeos, crescida em frascos agitados contendo meio sintético sem uracila e 2% de açúcar 59
- Tabela 2** - Parâmetros fisiológicos da linhagem LCM003 portando os diferentes plasmídeos, crescida em frascos agitados contendo meio sintético sem uracila e 2% de açúcar 77
- Tabela 3** - Parâmetros fisiológicos da linhagem LCM003 transformada com os diferentes plasmídeos, obtidos na fermentação em frascos agitados contendo meio sintético e concentração de 100 g/L de açúcar 91
- Tabela 4** - Atividade de transporte de α -glicosídeos da cepa LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd- GST-nAGT1, após indução com galactose 97
- Tabela 5** - Atividade de GST da fração de membrana bruta extraída da levedura LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd- GST-nAGT1, nos diferentes tempos de indução com galactose 97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3 OBJETIVOS	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Cepas, plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados	35
4.2 Mutagênese sítio-dirigida	37
4.3 Meios de cultura e condições de crescimento	39
4.4 Determinação de glicose, maltose, maltotriose e etanol	40
4.5 Fusão de GFP à extremidade C-terminal da permease Agt1p	41
4.6 Fusão do epítipo GST à extremidade N-terminal da permease Agt1p.....	42
4.7 Determinação do transporte ativo de açúcares pela permease Agt1p	44
4.8 Ensaio de efluxo e contra-fluxo de trealose.....	45
4.9 Determinação da atividade de α -glicosidase	46
4.10 Ensaios de inativação da permease Agt1p	46
4.11 Western Blot	47
4.12 Microscopia de Fluorescência	47
4.13 Cálculo dos parâmetros fisiológicos	48
4.14 Purificação parcial da permease Agt1p	48
4.14.1 <i>Indução da expressão da permease Agt1p com galactose</i>	48
4.14.2 <i>Preparação da fração de membranas</i>	49
4.14.3 <i>Determinação da atividade da enzima Glutathione-S-Transferase</i>	49
4.14.4 <i>Dosagem de proteína</i>	49
4.14.5 <i>Solubilização das proteínas presentes na membrana celular</i>	50
4.14.6 <i>Cromatografia de afinidade</i>	50
4.14.7 <i>Clivagem da GST com trombina</i>	50
4.14.8 <i>Eletroforese de proteínas e coloração dos géis</i>	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Análise dos aminoácidos envolvidos com o transporte ativo realizado pela permease Agt1p	52
5.2 Aminoácidos envolvidos com a inativação catabólica da permease Agt1p	72

5.3 Purificação parcial da permease Agt1p	94
6 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é um dos mais velhos produtos biotecnológicos. Indícios arqueológicos sugerem o início de seu consumo e elaboração há cerca de 8.000 anos, na região da Ásia ocidental, onde surgiram os primeiros campos de cultura de cereais. Entretanto, foi a partir da segunda metade do século XIX, graças aos estudos de Louis Pasteur e Emil Christian Hansen, que o processo de fabricação dessa bebida sofreu uma revolução que permitiu o desenvolvimento das grandes indústrias cervejeiras. Pasteur desenvolveu o método de pasteurização, que garante uma conservação prolongada da cerveja e Hansen comprovou a importância da utilização de culturas puras de leveduras na sua fabricação. A evolução do processo de elaboração dessa bebida continuou de forma acentuada em nosso século, ainda mais influenciada pelos conhecimentos adquiridos com a bioquímica, microbiologia, engenharia de processo e biotecnologia, que permitiram a elaboração de um produto com maior qualidade, uniformidade e menor custo de produção (ALVES, 2010; MORADO, 2009; SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA – SINDICERV, 2008).

Atualmente, a indústria cervejeira é um importante ramo da economia mundial. Segundo dados do SINDICERV referente ao ano de 2007, o Brasil está entre os quatro maiores fabricantes de cerveja do mundo, com 10,34 bilhões de litros/ano, só perde para a China (35 bilhões), Estados Unidos (23,6 bilhões) e Alemanha (10,7 bilhões). O setor emprega cerca de 150.000 pessoas entre postos diretos e indiretos e apresentou, em 2007, um faturamento de R\$ 25,8 bilhões. Esse destaque também é refletido em relação às empresas envolvidas: recentemente a AmBev (American Beverage Company, maior fabricante de cerveja do Brasil) se uniu a Interbrew para fundar a maior cervejaria do mundo, InBev, responsável pela venda de 20,2 bilhões de litros de cerveja por ano.

No entanto, em relação ao consumo per capita, o Brasil, com uma média de 49 litros/ano, está abaixo do registrado por países como México (50 litros/ano) e Japão (56 litros/ano) e significativamente inferior aos países europeus, como a Alemanha (117,7 litros/ano). Esse fato pode ser explicado se levarmos em consideração o baixo poder aquisitivo de boa parte dos consumidores brasileiros e o alto preço do produto. Embora na saída da fábrica, seu custo seja um dos menores do mundo, a cerveja sofre a incidência de uma série de tributos, encarecendo consideravelmente o preço final dessa bebida (SINDICERV, 2008).

Visando aumentar o consumo per capita de cerveja em nosso país, as indústrias têm adotado diferentes estratégias de mercado, como tentativas de redução no preço final do produto através de melhorias do processo fermentativo e da produtividade e diversificação do produto com elaboração de cervejas especiais ou com baixo teor alcoólico, a fim de atingir públicos diferenciados. Um exemplo é o expressivo crescimento do número de microcervejarias nas últimas décadas, que é justificado pelo aumento na demanda do mercado por diversificação de produtos. Desta forma, o panorama nacional do mercado da cerveja mostra um potencial de produção e consumo ainda em expansão.

Levando em consideração a crescente ampliação do mercado cervejeiro, vários esforços vêm sendo feitos para estudar a bioquímica e a genética das leveduras, uma vez que estes microrganismos possuem um papel crucial no processo fermentativo. Assim, estes estudos têm como objetivo, primeiramente, compreender mais sobre a bioquímica, genética e metabolismo das leveduras empregadas na fabricação de cerveja e, além disso, contribuir para o melhoramento do desempenho de tais leveduras nos aspectos referentes à capacidade de utilização de diferentes substratos, aumento da produção de etanol, maior tolerância ao estresse ambiental (etanol, pressão osmótica, temperatura, sais,...) e menor tempo de fermentação (STEWART, 2009).

Durante a fermentação, os açúcares presentes no mosto cervejeiro são convertidos a etanol e dióxido de carbono e, em uma menor extensão, a alcoóis superiores, ácidos orgânicos e ésteres. Em virtude disso, a eficiência desse processo depende da capacidade de utilização dos açúcares pelas células. Dos açúcares fermentáveis presentes no mosto, a maltose é o açúcar mais abundante, somando cerca de 45 a 65% do total, seguido por maltotriose (15 - 20%) e glicose (10 - 15%) (WILLAERT, 2001). Geralmente, apenas após a metade da concentração inicial de glicose ter sido consumida, é que se inicia a captação da maltose e da maltotriose (vide Figura 1). Além disso, a utilização de maltotriose é mais lenta que a maltose e, frequentemente, quantidades significativas deste açúcar deixam de ser fermentadas (DIETVORST; LONDESBOROUGH; STEENSMA, 2005; STEWART, 2009; ZASTROW et al., 2001). Esta fermentação incompleta acaba gerando problemas econômicos para a indústria em virtude do baixo rendimento de etanol e da obtenção de uma cerveja de baixa qualidade, com grande conteúdo de açúcares residuais e sabor atípico (ZHENG et al., 1994).

Figura 1 - Ordem de captação de açúcares pelas leveduras.

Figura modificada de Stewart (2009) mostrando a preferência de consumo de açúcares presentes no mosto cervejeiro pelas leveduras.

FONTE: Modificado de Stewart (2009).

Dessa forma, estratégias alternativas vêm sendo propostas com o intuito de melhorar a utilização dos açúcares presentes nos hidrolisados de amido que compõem o mosto cervejeiro. Formas de sobrepor os efeitos da repressão causada pela glicose, permitindo o consumo completo e simultâneo de todos os açúcares, também têm sido estudadas. Podemos citar, como exemplo, os avanços na identificação de novos transportadores de α -glicosídeos, estudos de sobre-expressão de enzimas e transportadores e isolamento de mutantes que apresentam uma maior resistência a repressão pela glicose.

O presente trabalho de doutoramento tem como proposta promover uma melhor compreensão da utilização de α -glicosídeos pela levedura *S. cerevisiae*, através da investigação do mecanismo de transporte realizado pela permease Agt1p, identificando elementos estruturais importantes para a atividade do transportador, e do processo de inativação catabólica promovido pela glicose. Dessa forma, os resultados obtidos podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias que visem o melhoramento dos processos fermentativos industriais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As membranas celulares são essenciais para a manutenção da vida, comunicação entre as células e adaptação às mudanças do ambiente. Além de servirem como uma barreira, delimitando o conteúdo da célula junto ao ambiente extracelular, permitem a formação de compartimentos intracelulares, com funções e microambientes diferenciados. Pequenas moléculas, como CO₂, O₂ e etanol, e outras moléculas hidrofóbicas podem atravessar a membrana por simples difusão, enquanto íons, moléculas maiores e/ou hidrossolúveis têm seu transporte mediado por proteínas presentes na membrana. Uma grande variedade de proteínas transportadoras, encontradas em procariotos e eucariotos, pertence à superfamília denominada *Major Facilitator Superfamily* (MFS), que conta com 58 distintas famílias e apresenta mais de 5.000 membros já sequenciados (LAW; MALONEY; WANG, 2009; segundo banco de dados TCDB – Transporter Classification Database). Permeases dessa superfamília estão envolvidas em uma variedade de processos fisiológicos e mostram distintas especificidades, sendo capazes de transportar através da membrana açúcares, oligossacarídeos, nucleosídeos, drogas, aminoácidos, cátions e ânions orgânicos e inorgânicos (PAO; PAULSEN; SAIER-JR, 1998; SAIER-JR, 2000).

A principal característica estrutural dos transportadores pertencentes à MFS é a presença de 12 domínios transmembrana (TM 1-12), ricos em aminoácidos hidrofóbicos em estrutura de α -hélice (vide Figura 2). Estes transportadores geralmente possuem domínios amino e carboxila-terminal longos voltados para o citoplasma da célula, além de um domínio citoplasmático separando os segmentos transmembrana em dois blocos de 6 (SAIER-JR, 2000). Estas informações estruturais foram deduzidas a partir da análise da hidrofobicidade da sequência de aminoácidos e da topologia das proteínas e mostram, juntamente com as estruturas tridimensionais resolvidas, que apesar da divergência observada na sequência primária das proteínas pertencentes à MFS, elas partilham uma estrutura tridimensional bastante similar. Isto sugere a possibilidade de que os dobramentos constituem um arcabouço comum para todos os membros da superfamília com 12 TMs e que a especificidade pelos substratos é resultante de variações no conjunto de resíduos presentes nos domínios de translocação e de ligação do substrato (LAW; MALONEY; WANG, 2009).

Em consequência da dificuldade experimental de se obter formas solúveis de proteínas de membrana para posterior cristalização e determinação da estrutura, apenas 5

estruturas tridimensionais de alta resolução de transportadores MFS foram obtidas: o transportador de lactose LacY (ABRAMSON et al., 2003), o transportador de glicerol-3-fosfato GlpT (HUANG et al., 2003), o transportador multidrogas codificado pelo gene *EmrD* (YIN et al., 2006) e o transportador de fucose FucP (DANG et al., 2010), todos de *Escherichia coli*, e PepT de *Shewanella oneidensis* (NEWSTEAD et al., 2011). Estes dados permitiram uma análise mais detalhada da estrutura e a inferência sobre o mecanismo de transporte. Entretanto, diversas técnicas de biologia molecular, principalmente a identificação e substituição de aminoácidos essenciais para o transporte e/ou especificidade dos transportadores, vêm possibilitando identificar elementos estruturais importantes para o funcionamento, regulação e localização celular destas proteínas (GUAN; KABACK, 2006; SAHIN-TÓTH; KARLIN; KABACK, 2000; SORGEN et al., 2002).

O membro da MFS mais estudado é o transportador de lactose de *E. coli*, codificado pelo gene *LacY* (ABRAMSON et al., 2003; GUAN; KABACK, 2006; SORGEN et al., 2002). O transporte ativo de lactose mediado por esta permease é um sistema simporte lactose- H^+ que utiliza o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana para transportar lactose contra um gradiente de concentração. Guan e Kaback (2006) e Mirza et al. (2006) propuseram o mecanismo de acesso alternante para explicar o mecanismo de transporte de LacY, no qual a proteína é submetida a mudanças conformacionais de forma que o sítio de ligação do substrato é alternativamente acessível para um e outro lado da membrana, mas não simultaneamente. Para LacY, na presença de ligantes apropriados, resíduos específicos da permease adotam diferentes conformações que alteram a orientação do transportador para a conformação com a face voltada para o interior do citoplasma ou com a face voltada para o periplasma (KABACK et al., 2011). Esse mesmo mecanismo de transporte parece ser comum entre os membros da família MFS, uma vez que outros transportadores com estrutura determinada - GlpT, EmrD e FucP - estão de acordo com este modelo (DANG et al., 2010; HUANG et al., 2003; YIN et al., 2006).

LacY foi a primeira proteína de membrana a ser sequenciada, purificada e reconstituída em proteolipossomos (KASHO; SMIRNOVA; KABACK, 2006; NEWMAN et al., 1981). Vários trabalhos têm analisado e identificado os resíduos de aminoácidos envolvidos na atividade de transporte, na ligação do H^+ ou na especificidade do açúcar a ser transportado pela permease LacY. Os dados obtidos através de estudos bioquímicos, biofísicos e de mutagênese sítio-dirigida indicam que Glu-269 (TM-8), Arg-302 (TM-9), e His-

322 e Glu-325 (TM-10) seriam os aminoácidos responsáveis pelo transporte do H^+ acoplado ao co-transporte de lactose. Enquanto que os resíduos envolvidos na ligação do açúcar estariam localizados no TM-4 (Glu-126) e TM-5 (Arg-144) (ABRAMSON et al., 2003; CHAPTAL et al., 2011; FRILLINGOS et al., 1998; GUAN; KABACK, 2006; SAHIN-TÓTH; KARLIN; KABACK, 2000; VENKATESAN; KABACK, 1998).

Figura 2 - Modelo estrutural para os transportadores com 12 TMs pertencentes a Major Facilitator Superfamily (MFS).

A: Esquema da estrutura secundária mostrando os 12 TMs arranjados em dois domínios de 6 TMs. **B:** Posição relativa dos 12 TMs no plano da membrana. O substrato transportado é representado por uma esfera preta. **C:** Modelo de acesso alternante para o transporte, que propõe mudanças estruturais para a face interior (figura à esquerda) e para a face exterior (figura à direita) durante a passagem da molécula através da membrana. FONTE: Adaptada de Abramson et al. (2003) e Sorgen et al. (2003).

A determinação da estrutura de LacY por difração de raios-X confirmou a maioria destes dados, o que mostra a relevância desses estudos para a compreensão das interações locais que ocorrem durante o transporte. Assim, tanto as técnicas bioquímicas e moleculares bem como a análise de cristais por difração de raios-X, são abordagens necessárias para a compreensão do mecanismo de transporte promovido por estas permeases.

A identificação de resíduos de aminoácidos importantes para a atividade de transporte e/ou especificidade pelo substrato de outras proteínas transportadoras da MFS já foram alvos de inúmeros estudos. Como exemplo, podemos citar Arg-126, Gln-161, Val-165 e Trp-388 do transportador Glut1p humano (MUECKLER; MAKEPEACE, 1999; MUECKLER;

WENG; KRUSE, 1994; SALAS-BURGOS et al., 2004); Asp-129, Arg-147, Glu-270, Arg-300, His-320 e Glu-323 do transportador de sacarose CscB de *E. coli* (VADYVALOO et al., 2006); Asp-41, Asp-44, Arg-124 e Arg-328 da permease PcaK de *Pseudomonas putida*, que catalisa um simporte hidroxibenzoato-H⁺ (DITTY; HARWOOD, 2002) ou Asp-46 e Glu-135 do transportador de fucose de *E. coli* (DANG et al., 2010). A característica mais significativa que pode ser deduzida das análises mencionadas acima é que os transportadores do tipo simporte com H⁺ possuem aminoácidos com grupos funcionais ionizáveis (p. ex. ácido glutâmico, ácido aspártico, histidina) no meio dos domínios transmembrana, indicando que estes aminoácidos seriam os responsáveis pela ligação do próton durante o processo de transporte.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, algumas proteínas de membrana são responsáveis pelo transporte de diferentes açúcares através da membrana celular e, portanto, são elementos importantes para os processos fermentativos, permitindo que estes açúcares sejam metabolizados e fermentados pela levedura. Essa capacidade que *S. cerevisiae* tem de fermentar diferentes açúcares, mesmo na presença de oxigênio, faz com que ela seja o principal microrganismo utilizado em processos biotecnológicos, tais como panificação, cervejaria, produção de álcool combustível e bebidas alcoólicas (CAVALIERI et al., 2003; INGLEDEW, 1993).

Como os açúcares não atravessam livremente a membrana plasmática celular, a sua utilização envolve inicialmente o seu transporte para o interior da célula (LAGUNAS, 1993). No caso dos monossacarídeos glicose e frutose, a captação ocorre pelo processo de difusão facilitada. Já foram descritos mais de 20 genes envolvidos no transporte de hexoses (*HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3*, *RGT2*), sendo que os genes *HXT1-7* codificam as principais permeases responsáveis pelo transporte das hexoses (glicose, frutose e manose), enquanto que Snf3p e Rgt2p são proteínas da membrana plasmática, com alta similaridade aos transportadores Hxtp, porém são incapazes de fazer o transporte de soluto (GANCEDO, 2008; JOHNSTON; KIM, 2005; LAGUNAS, 1993; OZCAN; JOHNSTON, 1999; WIECZORKE et al., 1999). Estas proteínas atuam como sensores de glicose extracelular e estão envolvidas na regulação dos outros genes *HXT*. Snf3p parece ser um sensor de baixos níveis de glicose, sendo requerido para a indução de genes que codificam transportadores de hexose de alta afinidade, enquanto que Rgt2p funciona como um sensor de altos níveis de glicose, sendo requerido na indução da expressão do gene *HXT1*, que codifica para um transportador de baixa afinidade

por glicose (GANCEDO, 2008; OZCAN; JONHSTON, 1999; SANTANGELO, 2006). Snf3p e Rgt2p possuem uma longa cauda C-terminal citoplasmática, ausente nos carreadores de glicose, que é relacionada à transmissão do sinal induzindo a maquinaria de transcrição via Mth1p/Std1p (GANCEDO, 2008; SANTANGELO, 2006).

Outra via de sinalização por glicose é através do receptor Gpr1p, uma proteína da membrana plasmática acoplada à proteína G (Gpa2p) requerida para a ativação da via da proteína quinase A dependente de AMPc (GANCEDO, 2008). Além da glicose, a sacarose também pode se ligar a este receptor, sendo que Gpr1p apresenta uma maior afinidade por este último açúcar. Estudos apontam o envolvimento dessa via de sinalização com vários processos celulares importantes, como a floculação e formação de pseudo-hifas (VAN DE VELDE; THEVELEIN, 2008).

A fim de compreender o amplo espectro de afinidades apresentado pelos transportadores Hxtp, alguns elementos estruturais foram investigados através de mutagênese sítio-dirigida e construção de permeases quiméricas. A análise de quimeras entre Hxt2p e Hxt1p revelou que os TMs 1, 5, 7 e 8 são requeridos para a atividade de alta afinidade apresentada por Hxt2p e que o TM 10 está envolvido com o reconhecimento da glicose. Dentro destes TMs, apenas 20 aminoácidos diferem entre as duas proteínas. Análises mais detalhadas revelaram que Phe-431 é importante para o reconhecimento do substrato, e Leu-201, Cys-195, Phe-198 e Asn-331 estão envolvidos com o transporte de alta afinidade pelo açúcar (KASAHARA; KASAHARA, 2003; KASAHARA; MAEDA, 1998; KASAHARA; SHIMODA; MAEDA, 1996). Ao passo que, para o transportador Hxt7p, o resíduo Asp-340 parece ser determinante na afinidade do substrato, apesar do estudo indicar que este resíduo não interage diretamente com o açúcar (KASAHARA; KASAHARA, 2010).

S. cerevisiae é também capaz de utilizar e fermentar uma série de α -glicosídeos, incluindo maltose, maltotriose e sacarose. Os transportadores de α -glicosídeos de *S. cerevisiae* são H^+ -simporters, ou seja, transportam de forma ativa açúcares juntamente com prótons, com uma estequiometria de 1 próton para cada molécula de açúcar (SERRANO, 1997; STAMBUK et al., 1996, 1999). São caracterizados como transportadores ativos secundários, em vista que utilizam o gradiente eletroquímico da membrana, gerado por proteínas H^+ -ATPases, para realizar o transporte dos açúcares (LAGUNAS, 1993). Apresentam ampla homologia em relação à sequência, mas possuem especificidades pelo substrato distintas. Os genes *MALxT* codificam para transportadores de alta afinidade (K_m 2-5 mM)

para maltose, mas baixa afinidade (K_m 90-120 mM) para trealose e sacarose, não sendo aparentemente capazes de transportar maltotriose ou α -metilglicosídeo (ALVES-JR et al., 2008; DUVAL et al., 2010; HAN et al., 1995). Já o gene *AGT1* codifica para uma permease com alta afinidade para trealose e sacarose ($K_m \approx 7$ mM) e baixa afinidade (K_m 20-50 mM) para maltose, maltotriose e α -metilglicosídeo (STAMBUK; BATISTA; DE ARAUJO, 2000; STAMBUK; DE ARAUJO, 2001). As permeases codificadas pelos genes *MPH2* e *MPH3* foram descritas como transportadores de alta afinidade (K_m 5-7 mM) para maltose e maltotriose (DAY et al., 2002). Contudo, recentes estudos sugerem que estes genes têm pouca influência na utilização de maltotriose, uma vez que Duval et al. (2010) não observaram correlação entre a utilização de maltotriose e a presença dos genes *MPHx* durante a avaliação de diversas linhagens de levedura, industriais e de laboratório. Em 2005, outro transportador de α -glicosídeos (Mtt1p ou Mty1p), isolado a partir de leveduras Lager (um híbrido natural de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*), foi caracterizado funcionalmente por dois grupos de pesquisa, sendo aparentemente capaz de transportar maltose, trealose e maltotriose, porém incapaz de transportar sacarose e α -metilglicosídeo (DIETVORST; LONDESBOROUGH; STEENSMA, 2005; SALEMA-OOM et al., 2005). A maior afinidade de Mtt1p por maltotriose ($K_m \approx 20$ mM) que por maltose ($K_m \approx 70$ mM) faz com que esta permease tenha grande importância nas fermentações de mostos cervejeiros (SALEMA-OOM et al., 2005).

A metabolização de sacarose pelas leveduras pode ocorrer por duas vias: através do co-transporte com H^+ mediado pelos transportadores Agt1p ou Malx1p e posterior hidrólise intracelular ou através de hidrólise extracelular pela enzima invertase codificada pelo gene *SUC2*, gerando os monossacarídeos glicose e frutose que são transportados por difusão facilitada via proteínas Hxtp. Ambas invertases, intracelular e extracelular, são codificadas pelo mesmo gene *SUC*, que origina um transcrito maior, contendo uma sequência de nucleotídeos que codifica um peptídeo sinal, responsável por direcionar a secreção da proteína para o espaço periplasmático; e um transcrito menor, que permite a síntese da enzima intracelular (BADOTTI et al., 2008; BASSO et al., 2011; DÁRIO, 2012).

A utilização de maltose e maltotriose pela levedura envolve o transporte ativo para o interior da célula e posterior hidrólise pela ação da maltase (α -glicosidase), liberando moléculas de glicose que serão metabolizadas na via glicolítica (HAN et al., 1995; LAGUNAS, 1993; NOVAK; ZECHNER-KRPAN; MARIÉ, 2004; STAMBUK et al., 1999, STAMBUK; BATISTA; DE ARAUJO, 2000). Para que ocorra a fermentação de maltose é necessário que a levedura

apresente ao menos um dos cinco loci *MAL* encontrados em diferentes regiões teloméricas: *MAL1* (cromossomo VII), *MAL2* (cromossomo III), *MAL3* (cromossomo II), *MAL4* (cromossomo XI) e *MAL6* no cromossomo VIII (JESPERSEN et al., 1999; KODAMA et al., 1995). Cada locus contém três genes: *MALxS* que codifica para a maltase, *MALxT* que codifica para o transportador de maltose e *MALxR* que codifica uma proteína reguladora que interage com a região promotora UAS_{MAL} , induzindo a expressão dos genes *MALxS* e *MALxT* na presença de maltose no meio (NOVAK; ZECHNER-KRPAN; MARIÉ, 2004). Além desses loci *MAL*, existem ainda pelo menos três tipos de loci *MAL* parcialmente funcionais (*malp*, *malg* e *mal⁰*), sendo que as cepas incapazes de fermentar maltose geralmente apresentam algum destes loci. O locus *malp* contém apenas o gene regulador *MALx3*, o locus *malg* contém apenas os genes para o transportador de maltose e para a α -glicosidase (*MALx1* e *MALx2*, respectivamente) e o locus *mal⁰* apresenta apenas o gene para a α -glicosidase (MICHELS et al., 1992).

Figura 3 - Representação da estrutura e do controle da expressão dos genes *MAL*.

(A) Representação de um locus *MAL* funcional, apresentando telômero à direita e centrômero à esquerda. As setas maiores indicam a posição de cada gene *MAL* dentro do locus e sentido a qual são transcritos. As linhas pontilhadas indicam as proteínas traduzidas a partir de cada gene; as linhas contínuas com setas, indução; e as linhas contínuas com pontas rombas, repressão. (B) Representação do locus *mal1g*.

FONTE: Alves-Jr (2010).

Na presença de maltose, o regulador Malx3p se liga ao DNA da região promotora UAS_{MAL} induzindo a transcrição das proteínas transportadoras e das α -glicosidases. Vale ressaltar que a região promotora de cada alelo *MALx3* também possui uma sequência

reconhecida pela proteína Malx3p, de forma que a própria proteína reguladora consegue elevar seu nível de expressão gênica (GANCEDO, 1998). Por outro lado, na presença de glicose, a expressão dos genes *MAL* é inibida pela ativação de proteínas repressoras (p.ex. *MIG1*) que se ligam na região promotora, impedindo a transcrição dos genes *MAL*, ou pela inibição da ativação da proteína reguladora Malx3p (GANCEDO, 1998; SANTANGELO, 2006).

Assim, a glicose, quando presente no meio, provoca a repressão de muitos genes envolvidos com o metabolismo de outros açúcares. Há uma adaptação no metabolismo da levedura a fim de tornar a célula apta a preferencialmente consumir a glicose: são observadas mudanças na concentração de metabólitos intracelulares e na estabilidade do RNAm, indução ou repressão de genes, modificação e/ou degradação de algumas enzimas e inativação catabólica de transportadores.

A repressão catabólica na utilização de maltose é mediada principalmente pela repressão da transcrição dos genes através do repressor Mig1p. A ativação do repressor Mig1p requer uma cascata de sinalização iniciada com o transporte da glicose através da membrana plasmática e sua subsequente fosforilação pela hexoquinase (Hxk2p). Com a captação e fosforilação da glicose, o complexo proteína-fosfatase Reg1p-Glc7p é ativado e, por sua vez, defosforila tanto a proteína-quinase Snf1p quanto o repressor Mig1p (GANCEDO, 1998; JIANG et al., 2000; SANTANGELO, 2006). Enquanto estiver fosforilada, a proteína-quinase Snf1p se mantém ativa e fosforila o repressor Mig1p, inativando-o. Porém, quando desfosforilada, Snf1p é desativada e o repressor Mig1p, ativado (ELBING et al., 2004; GANCEDO, 1998; SANTANGELO, 2006), o que permite sua ligação a sequências específicas de DNA em regiões reguladoras.

Por estarem localizados próximos às regiões teloméricas, os genes *MAL* ainda podem sofrer silenciamento transcricional em consequência de variações da estrutura da cromatina. Este processo requer modificações pós-traducionais de histonas, sendo que o complexo COMPASS está envolvido com a trimetilação da Lys-4 da histona H3. Houghton-Larsen e Brandt (2006) mostraram que o complexo COMPASS atua no silenciamento dos genes *MAL* nos estágios finais da fermentação de mostos cervejeiros e que na ausência de um complexo COMPASS funcional, devido a deleções de seus componentes, observa-se um aumento na produção de etanol em fermentações contendo altas concentrações de maltose.

Além disso, a glicose exerce um controle pós-traducional através da inativação catabólica (fosforilação, ubiquitinação e degradação) de diferentes transportadores

localizados na membrana (GANCEDO, 2008; HATANAKA et al., 2009; MEDINTZ et al., 2000; NOVAK; ZECHNER-KRPAN; MARIÉ, 2004; STAMBUK, 2002). No caso dos transportadores Malx1p, a fosfatase Reg1p-Glc7p, na presença de glicose, ativa as quinases Yck1p e Yck2p que fosforilam estas permeases, promovendo rápida perda de suas atividades (GADURA; ROBINSON; MICHELS, 2006; JIANG et al., 2000). Depois de fosforiladas, essas permeases sofrem ubiquitinação antes de serem encaminhadas para degradação no vacúolo (MEDINTZ; JIANG; MICHELS, 1998). Para isso, o sensor de altas concentrações de glicose Rgt2p ativa a proteína Grr1p, que faz parte do complexo SCF ubiquitina ligase, estimulando a proteólise vacuolar dos transportadores em questão (GANCEDO, 2008; JIANG; MEDINTZ; MICHELS, 1997; MEDINTZ et al., 2000).

Na tentativa de elucidar os domínios presentes nas permeases Malx1p que estariam envolvidos no processo de inativação pela presença de glicose, Medintz et al. (2000) analisaram a influência dos domínios amino- e carboxi-terminal do transportador Mal61p na inibição da atividade de transporte e na proteólise vacuolar do mesmo. Apesar das mutações na região C-terminal não terem bloqueado a inativação catabólica, foi verificado que os resíduos 49-78, localizados no domínio N-terminal, estão relacionados com a rápida perda da atividade de transporte e com a sua proteólise. Estes dados corroboram resultados publicados anteriormente, que demonstram existir uma sequência PEST entre os resíduos 48-79 na região amino-terminal dessa mesma permease (CHENG; MICHELS, 1989). A sequência PEST é uma região rica em resíduos de prolina, aspartato, glutamato, serina e treonina, que é comumente encontrada em proteínas que são sujeitas a um rápido *turnover*. A fosforilação dessa sequência é indicada como uma marcação da proteína para a degradação (MARCHAL; HAGUENAUER-TSAPIS; URBAN-GRIMAL, 1998; MEDINTZ et al., 2000). No domínio N-terminal do transportador Mal61p, além da sequência PEST, também foi observada a presença de um motivo di-leucina (MEDINTZ et al., 2000). Gadura e Michels (2006) demonstraram que o motivo de di-leucina encontrado nessa permease, apesar de não estar relacionado com a internalização do transportador, está diretamente ligado ao direcionamento da proteína, após ter sido internalizada, do endossomo tardio para a sua degradação no vacúolo.

Além dos estudos realizados a respeito da fosforilação dos domínios N- e C-terminal das permeases Malx1p, resíduos possíveis de serem fosforilados em outros domínios citoplasmáticos foram também avaliados. Ao investigarem a relação de resíduos de Serina e

Treonina localizados em segmentos intracelulares da permease Mal61p com o processo de inativação catabólica, Brondijk et al. (1998) verificaram que os resíduos T363, S487 e, especialmente, o resíduo S295, quando fosforilados, promovem a inibição da atividade de transporte e atuam como sinal para a proteólise do transportador.

Recentemente, Hatanaka et al. (2009) mostraram que a permease Mal21p possui uma maior resistência a degradação induzida pela glicose do que Mal31p e Mal61p. Esta resistência parece estar associada a uma menor susceptibilidade do transportador à ubiquitinação, em consequência da presença dos resíduos Gly-46 e His-50, presentes apenas neste transportador. De fato, quando substituíram os resíduos de Mal61p por estes (D46G e L50H), o mesmo fenótipo de resistência à inativação foi observado.

A ubiquitinação tem sido identificada como um sinal para endocitose e degradação vacuolar de diferentes proteínas de membrana, entre elas o receptor Ste3p e os transportadores Fur4p, Gal2p, Gap1p e Mal61p (HEIN; ANDRÉ, 1997; LUCERO; LAGUNAS, 1997; MARCHAL; HAGUENAUER-TSAPIS; URBAN-GRIMAL, 1998; MEDINTZ et al., 1996; RISINGER et al., 2006; STRINGER; PIPER, 2011). Neste processo, uma molécula de ubiquitina (Ub) é ligada a específicos resíduos de lisina das proteínas-alvo através da atividade enzimática de 3 proteínas: E1 (enzima ativadora de ubiquitina), E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) e E3 (proteína ubiquitina ligase), sendo E3 responsável pelo reconhecimento da proteína-alvo (STAUB; ROTIN, 2006). Em uma etapa posterior, durante a degradação da proteína-alvo, ocorre a reciclagem da ubiquitina através de hidrólise por proteínas específicas (como Doa4p). Para a ubiquitinação da permease Mal61p, em *S. cerevisiae*, é essencial a presença de Rsp5p (uma proteína ubiquitina ligase), que é também necessária na degradação de outros transportadores como Fur4p, Jen1p, Hxt6p e Gap1p (LUCERO; LAGUNAS, 1997; MARCHAL; HAGUENAUER-TSAPIS; URBAN-GRIMAL, 1998; NIKKO; PELHAM, 2009; PAIVA et al., 2009; RISINGER et al., 2006; STRINGER; PIPER, 2011). Como a mesma proteína (Rsp5p) parece estar envolvida na ubiquitinação de diferentes transportadores, tem-se investigado como ela reconheceria esse amplo espectro de substratos, uma vez que não é observada uma sequência consenso nas proteínas-alvo. Apenas recentemente, foi identificada uma família de proteínas adaptadoras (similares a arrestinas) que parecem cumprir essa função (BECUWE et al., 2012; NIKKO; PELHAM, 2009).

Becuwe et al. (2012) investigaram a ativação da via de ubiquitinação e endocitose dos transportadores Jen1p em resposta a sinais intracelulares, provocados pela presença de

glicose. A inativação catabólica desse transportador requer, inicialmente, a ubiquitinação por Rsp5p, através da interação com Rod1 (molécula adaptadora), como também mostrado para a endocitose de Hxt6p (NIKKO; PELHAM, 2009). Rod1 é alvo da proteína-quinase Snf1p e da fosfatase Reg1p/Glc7p e quando defosforilado sofre ubiquitinação, desencadeando a ubiquitinação e endocitose do transportador. No entanto, ainda não foi identificado de que forma a ubiquitinação de Rod1 influencia na ubiquitinação e endocitose de Jen1p. Outro aspecto interessante deste trabalho foi a revelação de uma integrada resposta fisiológica em função da flutuação dos níveis de glicose, onde as mesmas proteínas coordenam a regulação transcricional e pós-traducional (BECUWE et al., 2012).

Uma vez que Rsp5p interage com transportadores via moléculas adaptadoras, esta interação deve também envolver sequências específicas nos transportadores. Muitos transportadores sofrem fosforilação e este sinal, notadamente quando ocorre nas sequências PEST, é ligado a ubiquitinação, como observado para Fur4p e Mal61p (BRONDIJK et al., 1998; GADURA; MICHELS, 2006; MARCHAL; HAGUENAUER-TSAPIS; URBAN-GRIMAL, 1998; MEDINTZ et al., 2000). Em adição, os resíduos de lisinas presentes nas proteínas transportadoras também são diretamente envolvidos neste processo. A ubiquitinação de duas lisinas nas regiões N-terminal de Fur4p e Gap1p foi observada ser necessária para a endocitose destes transportadores (MARCHAL; HAGUENAUER-TSAPIS; URBAN-GRIMAL, 1998; RISINGER et al., 2006). Em Fur4p, serinas localizadas na porção N-terminal, próximas aos resíduos de lisina, devem ser fosforilados para a subsequente ubiquitinação da proteína (MARCHAL; HAGUENAUER-TSAPIS; URBAN-GRIMAL, 1998).

Em relação à maltotriose, as informações não são tão detalhadas sobre a sua utilização pelas leveduras quanto para a maltose. Ao analisarem alelos naturais do transportador de maltose presentes em locus *mal1g*, Han et al. (1995) caracterizaram um gene que passou a ser chamado *AGT1* (*α -glucoside transporter*), responsável pelo transporte ativo (através do simporte com prótons) de uma série de α -glicosídeos, incluindo maltose, maltotriose, sacarose, trealose, α -metilglicosídeo e turanose. Este gene é aparentemente regulado pelos mesmos mecanismos de regulação gênica dos demais genes *MAL*, uma vez que possui uma sequência UAS_{mal} na sua região promotora (HAN et al., 1995; STAMBUK et al., 1998, 1999; STAMBUK; BATISTA; DE ARAUJO, 2000; STAMBUK; DE ARAUJO, 2001). Condizente com a importância que o transporte de α -glicosídeos tem para os processos

fermentativos, constatou-se que a maioria das cepas industriais possuem pelo menos um transportador dos loci *MAL* e que praticamente todas contém o gene *AGT1*.

A importância da permease Agt1p para a fermentação de maltotriose foi investigada por Stambuk et al. (2006), os quais mostraram que a expressão incrementada da permease Agt1p melhora o rendimento de etanol de células de leveduras industriais fermentando este açúcar. Smit, Cordero-Otero e Pretorius (2007) demonstraram ainda que pequenas alterações na sequência de aminoácidos desse transportador podem incrementar, mas também prejudicar, a utilização desse açúcar pelas células de *S. cerevisiae*. Nesse sentido, Dietvorst, Londesborough e Steensma (2005) verificaram que o transportador de maltotriose codificado pelo gene *MTT1*, quando teve seus 21 aminoácidos da extremidade C-terminal substituídos, proporcionou um aumento da atividade de transporte de maltotriose no fim do processo fermentativo. Esse perfil melhorado está provavelmente ligado a uma maior estabilidade do transportador na membrana plasmática das células. Esses mesmos pesquisadores observaram também que no domínio C-terminal da permease Mtt1p selvagem existe um motivo RSXpSXP que poderia estar envolvido com essa estabilidade.

Apesar da importância das proteínas transportadoras de açúcares na levedura *S. cerevisiae* para os inúmeros processos fermentativos em que estão envolvidas, ainda pouco se sabe a cerca de suas estruturas. Alguns elementos estruturais envolvidos com a atividade de transporte da permease Agt1p foram recentemente investigados por nosso grupo de pesquisa (TRICHEZ, 2007). A mutagênese sítio-dirigida de 3 resíduos carregados presentes nos TMs da permease Agt1p provocaram alterações no fenótipo da cepa de *S. cerevisiae*. Os resultados obtidos demonstraram que o resíduo Arg-504 seria necessário para a ligação do(s) substrato(s) e/ou processo catalítico, enquanto que os resíduos Glu-120 ou Asp-123, possivelmente, estariam envolvidos com a translocação de prótons. Porém, a funcionalidade dessas permeases mutantes ainda não foi avaliada em níveis mais detalhados.

Embora alguns resíduos importantes para a atividade de transporte da permease Agt1p já estejam determinados, até o presente não foi investigado quais aminoácidos estariam envolvidos com a afinidade e/ou especificidade do transportador, assim como quais resíduos e/ou domínios da permease Agt1p seriam responsáveis pela sua inativação catabólica. Dessa forma, pretendemos investigar os detalhes moleculares do processo de inativação catabólica e do transporte ativo de α -glicosídeos realizado pela permease Agt1p.

Os resultados a serem obtidos poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias que visem o melhoramento dos processos fermentativos industriais.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo fazer uma análise estrutural da permease Agt1p presente em células de *Saccharomyces cerevisiae*, investigando os detalhes moleculares do mecanismo de transporte e do processo de inativação catabólica da permease e, desse modo, contribuir para o melhoramento de processos fermentativos nos quais essas leveduras são empregadas.

Especificamente:

- a) **analisar os aminoácidos envolvidos com o transporte ativo realizado pela permease Agt1p:** com este intuito, investigamos os possíveis resíduos de aminoácidos envolvidos com a atividade de transporte e/ou especificidade pelo(s) substrato(s) e os substituímos através de mutagênese sítio-dirigida;
- b) **obter uma permease Agt1p mais estável na membrana plasmática:** utilizando metodologias de mutagênese, verificamos quais regiões e/ou resíduos de aminoácidos estavam relacionados com a inativação catabólica desse transportador;
- c) **analisar os parâmetros fermentativos e de captação de açúcares pelos transportadores Agt1p mutados:** foram avaliados os parâmetros fermentativos e a atividade de transporte de açúcares das cepas após transformação com os plasmídeos contendo as mutações no gene *AGT1*. Transportadores com características incrementadas foram avaliados quanto à fermentação de maltose e maltotriose (importantes na cervejaria);
- d) **purificar a permease Agt1p:** pretendeu-se estabelecer uma metodologia para a solubilização e purificação da permease Agt1p da levedura, a fim de obter níveis suficientes para produção de sondas e anticorpos, bem como para tentativas de cristalização da proteína.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas, plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho encontram-se descritas no Quadro 1. A cepa de *E. coli* DH5 α -T1 (Invitrogen) foi utilizada para replicar os plasmídeos e obter os genes *AGT1* mutantes. A cepa de *S. cerevisiae* LCM003 foi usada para analisar as alterações provocadas pelas mutações na permease Agt1p. Esta cepa foi obtida neste laboratório a partir da linhagem de laboratório CENPK2-1C, através da deleção do gene *AGT1* por recombinação homóloga utilizando-se o gene de resistência à Geneticina, conforme descrito por Alves-Jr et al. (2008). Todas as transformações realizadas, tanto em *S. cerevisiae* quanto em *E. coli*, seguiram protocolos padrões descritos na literatura (AUSUBEL et al., 1995; ; GIETZ; WOODS, 2002; KNOP et al., 1999).

Quadro 1 - Linhagens utilizadas no estudo.

Cepas	Genótipo ou Descrição	Fonte ou Referência
<u>S. cerevisiae</u>		
CEN.PK2-1C	<i>MATa MAL21 MAL22 MAL23-8^c AGT1 ura3-52 his3Δ1 leu2-3_112 trp1-289</i>	Entian e Kotter (1998)
LCM003	Isogênica à CEN.PK2-1C, mas <i>agt1::kan^r</i>	Alves-Jr et al. (2008)
CMY1050	<i>MATa mal61Δ::HIS3 MAL12 MAL13 GAL leu2 ura3-52 lys2-801 ade 2-101 trp 1-Δ63 his3-200</i>	Medintz, Jiang e Michels (1998)
<u>E. coli</u>		
DH5α-T1	<i>F- recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK-mK+) supE44 relA1 Δ(lacZYA- argF) U169 ϕ80 lacZ ΔM15 endA1 phoA tonA</i>	Invitrogen

FONTE: Trichez (2012).

Os plasmídeos e oligonucleotídeos estão detalhados no Quadro 2. O plasmídeo centromérico pGRSd-AGT1 (vide Figura 4) foi utilizado como DNA molde na construção dos genes *AGT1* mutantes e usado na transformação da cepa LCM003 para análise da atividade de transporte da permease. Esse plasmídeo contém o promotor GPD do gene *TDH3* (que codifica para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), garantindo a sobre-expressão constitutiva do gene *AGT1* (JULES et al., 2004). Quando requerido, a linhagem LCM003 foi transformada também com o plasmídeo pGRSd, sem o gene *AGT1*.

Quadro 2 - Plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Descrição		
<u>Plasmídeos</u>	<u>Genótipo</u>	<u>Enzima de restrição^b</u>
<i>pGRSd</i>	<i>CEN6 ori amp^r URA3</i>	
<i>pGRSd-AGT1</i>	<i>CEN6 ori amp^r URA3 P_{GPD}-AGT1-T_{PGK}</i>	
<i>pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6</i>	<i>Amp^r ori GFP(S65T)-T_{ADH1}-P_{TEF}-kan^r-T_{TEF}</i>	
<i>pFA6a-kanMX6-P_{GAL}-GST</i>	<i>Amp^r ori kan^rP_{GAL} GST</i>	
<u>Oligonucleotídeos</u>	<u>Sequência (5'→3')</u>	
<i>AGT1-F</i>	ATGAAAAATATCATTTTCATTGG	
<i>AGT1-R</i>	TTAACATTTATCAGCTGC	
<i>AGT1-E120A-F^a</i>	TCTACTACCCTGGTTAT GGCC GGTTATGATA	<i>HpaII</i>
<i>AGT1-E120A-R</i>	CATAACCAGGGTAGCAGACACTAATATG	
<i>AGT1-D123G-F^a</i>	CTGGTTATGGAAGGTTAT GGT ACCGCACTAC	<i>KpnI</i>
<i>AGT1-D123G-R</i>	ATAACCTTCCATAACCAGGGTAGTAGAC	
<i>AGT1-E167A-F^a</i>	ATGTGTGTCCTTTGT GGTGCC ATGATTGGTT	<i>BanI</i> ou <i>BshNI</i>
<i>AGT1-E167A-R</i>	ACCACAAAGGACACACATGTTTAAACCA	
<i>AGT1-R504A-F^a</i>	AAGACTATAGTGCTGG CCGCG ATTGCTACA	<i>BstUI</i>
<i>AGT1-R504A-R</i>	GGCCAGCACTATAGTCTTAGTTCTCAAC	
<i>AGT1-I505T-F^a</i>	ACTATAGTGCTGGCCCGT ACT TGCTACAATC	<i>RsaI</i>
<i>AGT1-I505T-R</i>	ACGGGCCAGCACTATAGTCTTAGTTCTC	
<i>AGT1-E51G,L55H-F^a</i>	AGGATAGTGCCTTTG GTCT AGACCACC ACG AGTTCACCACC	<i>XbaI</i>
<i>AGT1-E51G,L55H-R</i>	AAAGGCACTATCCTTTTTCCCTTCCTC	
<i>AGT1-L100A,L101A-F^a</i>	ACTTTGAAGCAGG CGGCCG CAAAATATCCAAAA	<i>NotI</i>
<i>AGT1-L100A,L101A-R</i>	CGCCTGCTTCAAAGTCATGCTTTTTTC	
<i>AGT1-S301A-F^a</i>	ATCTTTTTCGCTCCTGA AGCT CCCTGGTGGTTG	<i>AluI</i>
<i>AGT1-S301A-R</i>	AGGAGCGAAAAAGATACCGATCATTAA	
<i>AGT1-T369A-F^a</i>	GTTAATGGAAGA AGCTC GACTTGCATGTTA	<i>SacI</i>
<i>AGT1-T369A-R</i>	TCTTCTTCCATTAACCTCCCTTGAAACA	
<i>AGT1-PFA6-F2</i>	CAGTCCTCAAGCATAAAACAGCGAGAATTAAATGCAGCTGATAAATGTCTG GATCCCCGGGTTAATTAA	
<i>pGRSd-PFA6-R1</i>	CCAATAATTCAAAGAAGCACCACCACCAGTAGAGACATGGGGCATAGG CCACTAGTGGATC	
<i>V-Kan^r-R</i>	GGAATCGAATGCAACCGG	
<i>GST-nAGT1-F5</i>	TCGAGTTTATCATTATCAATACTGCCATTTCAAAGAATACGTAGAATTCGA GCTCGTTTAAAC	
<i>GST-nAGT1-R6</i>	TGAGGCAGCCTTCTTCTTGCTTACCAATGAAATGATATTTTTCATACGCGG AACCAGATCCGATT	

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

^b Enzimas de restrição utilizadas para verificar a presença das mutações.

FONTE: Trichez (2012).

Para a construção do módulo de fusão de *GFP* no gene *AGT1* foi utilizado o plasmídeo *pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6*, contendo o gene *kan^r* que confere resistência à Geneticina. Já para a construção do módulo de fusão de *GST* na porção N-terminal do *AGT1* foi utilizado o plasmídeo *pFA6a-KanMX6-P_{GAL}-GST* (LONGTINE et al., 1998; PETRACEK; LONGTINE, 2002). Os

procedimentos de fusão dos genes específicos ao *AGT1* e a verificação da correta inserção estão descritos detalhadamente nas seções 4.5 e 4.6.

Figura 4 - Representação esquemática do plasmídeo pGRSd-AGT1.

O plasmídeo pGRSd-AGT1 possui o gene *AGT1* sob controle do promotor *GPD*, o marcador auxotrófico *URA3*, o gene de resistência *AMP^r* e origens de replicação para bactérias (*F1 ori*) e leveduras (*ARSH4*).

FONTE: Trichez (2012).

4.2 Mutagênese sítio-dirigida

Os aminoácidos de interesse da permease Agt1p foram modificados por mutagênese sítio-dirigida utilizando-se o kit *Gene Tailor™ Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen). O plasmídeo pGRSd-AGT1 (Figura 4) foi metilado e, então, amplificado por PCR com oligonucleotídeos específicos para cada mutação (Quadro 2). Os oligonucleotídeos apresentam uma região complementar no final 5' de suas sequências e as bases modificadas de forma a mudar o códon do aminoácido correspondente e, ao mesmo tempo, inserir um novo sítio de restrição, conforme demonstrado na Figura 5. O produto resultante da amplificação, DNA fita dupla linear contendo a mutação desejada, foi utilizado para transformar *E. coli* DH5α-T1. Uma vez que esta cepa é capaz de degradar DNA metilado, o DNA molde utilizado é degradado, restando apenas as novas sequências de DNA, portando a mutação de interesse.

As colônias transformantes foram selecionadas em placas de meio Luria-Bertani sólido contendo ampicilina e os plasmídeos obtidos a partir delas foram testados quanto à

presença da mutação desejada no gene *AGT1* através da clivagem do DNA com enzimas de restrição cujos sítios foram introduzidos pela mutação. Os mutantes E120A, que têm substituído o ácido glutâmico-120 por uma alanina, apresentam um novo sítio de restrição para a enzima *HpaII*. Os mutantes D123G (substituição do ácido aspártico-123 por uma glicina) apresentam um novo sítio de restrição para *KpnI*. Mutantes no resíduo E167 e R504 (substituição dos resíduos por uma alanina) apresentam um novo sítio para *BshNI* e *BstUI*, respectivamente. Os mutantes I505T, que têm substituído a isoleucina por uma treonina, têm introduzido um sítio de restrição para *RsaI*. Além deste método de verificação dos possíveis plasmídeos mutantes através da digestão com enzimas de restrição, foi realizado o sequenciamento das regiões de interesse nos genes *AGT1* mutantes para confirmação da sequência. Confirmadas as mutações, os diferentes plasmídeos contendo o gene *AGT1* mutado foram utilizados para transformar as células da cepa LCM003 (cepa portando *MALxI*).

Figura 5 - Desenho esquemático dos oligonucleotídeos utilizados para a mutagênese.

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

FONTE: Trichez (2012).

A mesma metodologia foi utilizada para investigar os resíduos envolvidos com a inativação catabólica do transportador, porém para estas construções foi utilizado o plasmídeo pGRSd-AGT1-GFP como DNA molde. Os oligonucleotídeos AGT1-E51G,L55H-F e -R foram utilizados para promover a substituição dos resíduos ácido glutâmico-51 e leucina-55 por uma glicina e histidina, respectivamente, o que provocou a inserção de um sítio de restrição para a enzima *XbaI*. AGT1-L100A,L101A-F e -R proporcionaram a substituição dos resíduos de Leucina-100 e -101 por duas alaninas. Essa modificação introduziu um sítio de restrição para a enzima *NotI*. Os oligonucleotídeos AGT1-S301A-F e -R proporcionaram a substituição do resíduo Serina-301 por uma alanina, introduzindo um sítio de restrição para *AluI*, enquanto que AGT1-T369A-F e -R fizeram com que o resíduo Treonina-369 fosse

substituído por uma alanina. Neste caso, ao mesmo tempo, foi introduzido um sítio para a enzima *SacI*. Depois de confirmadas as mutações, os diferentes plasmídeos contendo o gene *AGT1* mutado foram utilizados para transformar as células da cepa LCM003.

4.3 Meios de cultura e condições de crescimento

As leveduras foram crescidas em meio rico (YP) contendo 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona, suplementado com 20 g/L da fonte de carbono de interesse (glicose, maltose ou maltotriose) ou em meio sintético (SC) contendo 6,7 g/L de base nitrogenada sem aminoácidos (Sigma), 20 g/L da fonte de carbono e 1,92 g/L de um suplemento de aminoácidos necessários ao crescimento das células, sem uracila (Ura drop-out supplement, Sigma). Quando necessário foram adicionados aos meios 20 g/L de bacto-água (meios sólidos), 200 mg/L de Geneticina (meios seletivos) ou 40 mg/L de adenina (meios usados na transformação das leveduras). Estes meios tiveram seu pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico.

Para o pré-cultivo das leveduras, as células foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio líquido de interesse e incubadas por 48 horas a 28 °C, sob agitação de 160 rpm.

Para a verificação do perfil de crescimento, uma alíquota do pré-cultivo (1/100 do volume do meio de cultura) foi transferida para frascos Erlenmeyers contendo 1/5 do volume de meio líquido, sendo a cultura mantida em uma incubadora orbital de frascos (Nova Ética 430) a 28 °C e 160 rpm. O crescimento celular foi determinado através da absorbância (Abs_{570nm}) das amostras da cultura, coletadas em tempos pré-determinados, em espectrofotômetro (Beckman DU-7) e os sobrenadantes obtidos por centrifugação foram armazenados a -20 °C, para posterior análise do consumo de açúcar e produção de etanol. Alternativamente, as células foram inoculadas em placas de 96 poços com 100 µL de meio por poço e incubadas a 30 °C e 160 rpm em um leitor de placas (Tecan Infinite M200 /Áustria), com leituras da absorbância das amostras (Abs_{570nm}) a cada 15 minutos.

No ensaio de fermentação em batelada foram utilizadas leveduras crescidas em meio sintético contendo 2% de maltose, até o início da fase exponencial. As células foram lavadas e ressuspensas de modo a atingirem a concentração de 10 mg/mL de células em meio sintético contendo 65 g/L de maltose, 20 g/L de maltotriose e 15 g/L de glicose. O

ensaio de fermentação foi realizado durante 28 h, com retirada de amostras para determinação da densidade celular, consumo de açúcar, produção de glicerol e etanol.

O cultivo de bactérias foi realizado a 37 °C em meio Luria-Bertani, pH 7,5, contendo, quando necessário, 100 mg/L de ampicilina e/ou 20 g/L de bacto-ágar. Todos os meios foram esterilizados em autoclave, a 120 °C por 20 minutos (AUSUBEL et al., 1992).

4.4 Determinação de glicose, maltose, maltotriose e etanol

Amostras das culturas de celulares foram centrifugadas e os sobrenadantes utilizados na determinação de etanol e consumo de glicose e α -glicosídeos.

A concentração de glicose foi determinada através do método enzimático da glicose oxidase/peroxidase, utilizando um kit comercial (BioTécnica, MG, Brasil). As análises foram realizadas seguindo as instruções do fabricante: 10 μ L de cada amostra reagiram com 1 mL do reagente de cor desse kit, sob incubação de 10 minutos a 37 °C. Em seguida, fez-se a leitura da absorbância da quinonimina (produto de cor avermelhada produzido na reação) em espectrofotômetro a 505 nm. A concentração de glicose foi determinada correlacionando a absorbância apresentada pela amostra com a absorbância apresentada por uma solução padrão de glicose (1 g/L).

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

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

absorbância foi medida a 415 nm em um leitor de placas (Tecan Infinite M200/Áustria). A concentração de etanol foi determinada pela correlação da absorbância apresentada pela amostra com a equação de reta extraída de uma curva padrão, construída com soluções padrão de etanol (0-10 g/L).

Alternativamente, para alguns experimentos, a determinação de açúcares e alcoóis presentes nas amostras foi feita por cromatografia líquida (LC-2000Plus, Jasco) utilizando a coluna HyperRez XP Carbohydrate H⁺ (Thermo Scientific) a 65 °C e 5 mM de H₂SO₄ como fase móvel, a um fluxo de 0,3 mL.min⁻¹.

4.5 Fusão de GFP à extremidade C-terminal da permease Agt1p

A proteína verde fluorescente (GFP) foi fusionada à porção C-terminal da permease Agt1p através da substituição do códon de terminação do *AGT1* pelo módulo GFP-KanMX por recombinação homóloga e metodologias baseadas em PCR como descrito por Petracek e Longtine (2002). Através de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos AGT1-PFA6-F2 e pGRSd-PFA6-R1 (Quadro 2) juntamente com o plasmídeo pFA6-GFP(S65T)-kanMX6, foi produzido um fragmento linear de DNA com ≈2,4 kb (módulo GFP-KanMX) portando em suas extremidades regiões homólogas à região C-terminal do gene *AGT1* e ao terminador *PGK* localizado após o gene *AGT1* presente no plasmídeo pGRSd-AGT1. Localizados entre essas extremidades estão o gene *GFP* e o gene *Kan^r* que confere resistência à Geneticina (Figura 6). Esse fragmento, quando inserido nas células de *S. cerevisiae*, integrou-se no plasmídeo pGRSd-AGT1 (ou nos seus derivados contendo as mutações específicas), substituindo o códon de terminação do *AGT1* pelo códon de início da *GFP*. Para isolar as células contendo as modificações esperadas, as cepas foram selecionadas em meio YP sólido contendo 2% de glicose e 200 mg/L de Geneticina.

Em seguida, as cepas parentais e os transformantes selecionados foram analisados por PCR (Quadro 2) com os oligonucleotídeos AGT1-R504A-F (correspondente aos nucleotídeos 1492 a 1522 do gene *AGT1*) e V-Kan^r-R (correspondente aos nucleotídeos 382 a 400 do gene *Kan^r*) permitindo a amplificação de uma banda de aproximadamente 2100 pb nas cepas contendo a correta inserção do módulo de fusão de *GFP* e nenhuma banda nas cepas parentais. Além disso, um controle positivo foi feito amplificando o locus *AGT1* de ambos plasmídeos, sem ou com *GFP*, utilizando os oligonucleotídeos AGT1-F e AGT1-R.

Figura 6 - Fusão de *GFP* à extremidade C-terminal do *AGT1*.

A) O módulo GFP-KanMX, obtido por PCR, foi utilizado para transformar células competentes da cepa CMY1050 abrigando os diferentes plasmídeos. Nestas células, o módulo foi integrado corretamente, nos plasmídeos pGRSd-AGT1 ou mutantes derivados, por recombinação homóloga. (B) Após a seleção dos transformantes em meio com Geneticina, os oligonucleotídeos AGT1-R504A-F e V-kan^r-R foram utilizados para a verificação da correta integração do módulo. Os primers AGT1-F e AGT1-R foram usados para amplificação da ORF do *AGT1*, como controle positivo.

FONTE: Trichez (2012).

4.6 Fusão do epítipo GST à extremidade N-terminal da permease Agt1p

Para a construção do plasmídeo pGRSd-GST-nAGT1, que apresenta o gene *AGT1* fusionado ao epítipo GST (Glutathione-S-Transferase) em sua porção N-terminal sob ação de um promotor induzível por galactose, foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente (PETRACEK; LONGTINE, 2002). Através de PCR, os oligonucleotídeos GST-nAGT1-F5 e GST-nAGT1-R6 juntamente com o plasmídeo pFA6-KanMX6-P_{GAL}-GST produziram um fragmento linear de DNA com ≈2,8 kb portando em suas extremidades regiões homólogas à região a montante do gene *AGT1* e ao início do gene (porção N-terminal),

presentes no plasmídeo pGRSd-AGT1 (Figura 4). Localizados entre essas extremidades, estão o gene *Kan^r* que confere resistência à Geneticina (marcador para seleção), o promotor P_{GAL} (promotor GAL1 de *S. cerevisiae*) e o gene *GST*. Quando inserido nas células de *S. cerevisiae*, esse fragmento (módulo KanMX-P_{GAL}-GST) integrou-se no plasmídeo pGRSd-AGT1 já presente na levedura.

Figura 7 - Fusão do gene *GST* à extremidade N-terminal do *AGT1*.

NOTA: (A) O módulo KanMX-P_{GAL}-GST, obtido por PCR, foi utilizado para transformar células competentes de levedura. Nestas células, o módulo foi integrado no plasmídeo pGRSd-AGT1 por recombinação homóloga. (B) Os oligonucleotídeos V-Kan^r-R, AGT1-T369A-R, AGT1-F e AGT1-R foram utilizados para verificar a presença do módulo KanMX-P_{GAL}-GST no plasmídeo pGRSd-AGT1.

FONTE: Trichez (2012).

As células transformantes foram selecionadas em meio YP sólido contendo 2% de glicose e 200 mg/L de Geneticina. Em seguida, células contendo o plasmídeo controle (pGRSd-AGT1) e os transformantes selecionados (pGRSd-GST-nAGT1) foram analisadas através de PCR com os oligonucleotídeos V-kan^r-R (correspondente aos nucleotídeos 382 a

400 do gene *Kanr*) e AGT1-T369A-R (correspondente aos nucleotídeos 1080 a 1105 do gene *AGT1*). Observou-se a amplificação de um fragmento de aproximadamente 2700 pb nos plasmídeos contendo a correta inserção do módulo de fusão de *GST* e ausência de fragmento de DNA no plasmídeo controle. Além disso, um controle positivo foi feito amplificando o locus *AGT1* de ambos plasmídeos, sem ou com *GST*, utilizando os oligonucleotídeos AGT1-F e AGT1-R (Figura 7).

4.7 Determinação do transporte ativo de açúcares pela permease Agt1p

A atividade da permease Agt1p foi avaliada colorimetricamente, utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*NP α G) como descrito por Stambuk (2000) e Hollatz e Stambuk (2001). Células cultivadas até o início da fase exponencial do crescimento, em meio sintético contendo maltose, foram centrifugadas, lavadas com água a 4 °C e ressuspensas de modo a atingirem a concentração de 20 g/L. Em seguida, adicionou-se 100 μ L dessa suspensão a 100 μ L de tampão succinato-Tris 100 mM (pH 5,0) contendo 10 mM de *p*NP α G. Após incubação das células por 5 minutos a temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de bicarbonato de sódio 2 M (pH > 9,0) e o *p*-nitrofenol produzido foi revelado. As células foram centrifugadas (12.000 rpm, 5 min) e o *p*-nitrofenol foi estimado a 400 nm. As medidas foram realizadas em triplicata e foram utilizados controles com células previamente fervidas.

A estequiometria do transporte ativo de açúcares pela permease Agt1p foi determinada pela avaliação, em paralelo, do co-transporte de H⁺ e do transporte de ¹⁴C-açúcar pelas células. Para estimar as velocidades iniciais de transporte, ambos ensaios foram conduzidos a 20 °C, assim o transporte ocorre com menor velocidade e é possível acompanhar a entrada do açúcar e do próton com uma maior precisão (SERRANO, 1977). O co-transporte de H⁺ associado ao transporte de açúcares foi avaliado como descrito por Stambuk et al. (1996, 1998, 1999), Stambuk, Batista e De Araújo (2000) e Stambuk e De Araújo (2001). Células ressuspensas de modo a atingirem concentração celular de $\approx$ 15 g/L foram colocadas em um recipiente com temperatura controlada (20 °C). A capacidade tampão das células foi determinada pela adição de pulsos de 50 ou 100 nmols de H⁺ (HCl). Em seguida, o pH dessa suspensão foi ajustado para 5,0 e a reação foi iniciada pela adição de determinado açúcar (concentração final de 20 mM), o que ocasionou mudanças no pH. Essas

alterações foram monitoradas em um pHmetro PHM84 acoplado a um registrador gráfico TT1 Servograph (ambos da Radiometer, Copenhagen). As atividades de transporte foram calculadas a partir da inclinação da porção inicial (transcorridos 20 segundos) da curva obtida no registrador, provocada pelo influxo de prótons para o interior das células (co-transporte açúcar- H^+).

O transporte de ^{14}C -açúcar (maltose, trealose ou sacarose) foi determinado como descrito por Serrano (1997) e Batista, Milette e Stambuk (2004), com algumas modificações. As células foram ressuspensas em tampão succinato-Tris 50 mM (pH 5,0) e incubadas por 3 minutos a 20 °C. O açúcar foi adicionado (concentração final de 20 mM contendo $\approx 0,35 \mu Ci$ do ^{14}C -açúcar – Amersham, UK) e, em intervalos determinados, alíquotas foram removidas e as células filtradas (filtros de nitrocelulose HAWP, Millipore) e lavadas com água gelada. As membranas de filtração foram colocadas em recipientes contendo 10 mL de líquido de cintilação e, posteriormente, a radioatividade foi dosada em um contador de cintilação (Packard, C1600 TR, USA). O transporte dos açúcares radioativos foi determinado como descrito acima, utilizando-se os tempos 20, 60 e 100 segundos para maltose e sacarose e os tempos 20, 80 e 140 segundos para trealose. Mesmo procedimento foi utilizado para determinar o transporte de ^{14}C -açúcar em diferentes pHs, porém acertando o pH do tampão Succinato com Tris para o pH desejado.

4.8 Ensaio de efluxo e contra-fluxo de trealose

Para a análise da captação de ^{14}C -trealose pela permease Agt1p, utilizamos condições semelhantes às descritas acima. As células foram incubadas em tampão succinato-Tris 50 mM (pH 5,0), a 28 °C. Após a adição do açúcar radioativo, alíquotas das células foram retiradas em tempos determinados (30, 90, 150, 210 e 270 segundos). Para observar a ocorrência de efluxo e contra-fluxo, após os 120 segundos iniciais, as células foram centrifugadas e ressuspensas em um mesmo volume de água ou solução de 200 mM de trealose e novas alíquotas foram retiradas nos tempos 180, 240 e 300 segundos. A observação do efluxo e contra-fluxo da ^{14}C -trealose foi determinada pela radioatividade presente nas células (STAMBUK et al., 1996).

4.9 Determinação da atividade de α -glicosidase

A atividade da α -glicosidase foi determinada utilizando-se células permeabilizadas, como descrito por Stambuk (2000). As células foram coletadas no início da fase exponencial ($Abs_{570nm} \approx 4,0$), lavadas com água e ressuspensas de modo a atingirem a concentração celular de 20 g/L. Aproximadamente 2 mg de células foram lavadas com 0,5 mL de tampão MOPS-NAOH 100 mM, pH 6,8 (tampão A) e, posteriormente ressuspensas em 200 μ L do mesmo tampão contendo 20% de glicerol, EDTA 1 mM e DTT 1 mM (tampão B). Para permeabilizar as células, foram adicionados 12 μ L de uma solução de tolueno/etanol/10% triton X-100 em água (1:4:1; v/v) e os tubos foram vigorosamente agitados durante 1 minuto. Após centrifugação, as células foram lavadas com o tampão B e ressuspensas em 1 mL de tampão A. Um volume de 50 μ L dessa suspensão celular foi adicionado à 950 μ L de uma solução 2 mM de *p*NP α G ou, alternativamente, 40 μ L de células foram adicionados a 60 μ L de uma solução 200 mM de maltose ou maltotriose.

Essas amostras foram incubadas a 30 °C por 1 minuto (para as determinações com *p*NP α G) ou 5 minutos (para as amostras com carboidratos), fervidas a 100 °C por 5 minutos e centrifugadas. Os sobrenadantes foram utilizados para determinar a atividade enzimática através da determinação do *p*-nitrofenol liberado com a hidrólise do *p*NP α G (Abs_{400nm}) e através da determinação da glicose formada pela hidrólise da maltose ou maltotriose. As determinações foram realizadas em triplicata e os controles negativos, com células previamente fervidas, em duplicata. A atividade da α -glicosidase foi expressa em nmoles de glicose ou *p*-nitrofenol produzidos por mg^{-1} de células (peso seco) por min^{-1} .

4.10 Ensaios de inativação da permease Agt1p

O ensaio de inativação da permease Agt1p foi realizado conforme metodologia descrita por Medintz et al. (1996) para o transportador Mal61p, com algumas modificações. Células crescidas até a fase exponencial em meio sintético contendo 20 g/L de maltose como fonte de carbono, foram colhidas e transferidas para um meio sintético contendo apenas 1,7 g/L de base nitrogenada (sem aminoácidos e sem sulfato de amônio) e 20 g/L de glicose. Em seguida, as células foram coletadas a cada hora, durante um período total de 3 horas, e cada amostra foi utilizada para determinação da atividade de transporte da permease em questão

(utilizando-se o substrato sintético *pNPαG*). No tempo 0h, adicionou-se cicloheximida (30 µg/mL) ao meio de inativação. A diluição de crescimento foi calculada pelo quociente da Abs_{570nm} no tempo 0 (zero) pela Abs_{570nm} no tempo determinado. Todos os ensaios de inativação foram feitos em duplicata, utilizando-se culturas independentes.

4.11 Western Blot

Aproximadamente 10 mg de células das leveduras foram ressuspensas em 500 µL de tampão de lise (50 mM de Tris HCl, 5 mM de EDTA, 2 mM de DTT e 5% de SDS). O extrato celular foi obtido após agitação em vortex (5 ciclos/ 1 min), com 0,5 g de microesferas de vidro. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C, por 10 min, e centrifugadas para eliminar os restos celulares (HATANAKA et al., 2009). As amostras (60 µg de proteína total) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 8%. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando um aparato de transferência semi-seco (TE 70 SemiPhor™ Unit, GE Healthcare Life Sciences, USA) (1.2mA/cm 306 2; 1.5h), como descrito por Bjerrum e Heegaard (1988) com adaptações. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado em TBS (10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 7.5), por 1 hora. As proteínas fusionadas (Agt1-GFP ou mutantes-GFP derivados) foram detectadas usando um anticorpo específico (Anti-GFP/Sigma: anticorpo contra a porção N-terminal da proteína GFP), diluído para a concentração de 0,125 µg/mL em tampão TBS-T (10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20, pH 7.5) contendo 2.5% de BSA. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (conjugado a peroxidase, diluição 1:5.000) por 1 hora e a reação foi revelada com ECL. Todos os passos foram seguidos por 3 lavagens (5 min) das membranas com TBS-T.

4.12 Microscopia de Fluorescência

A localização celular da permease Agt1p e das permeases mutantes foram baseadas na observação da distribuição dessas proteínas fusionadas a *GFP* em células vivas de *S. cerevisiae*, através de microscopia de fluorescência. Células da levedura LCM003 portando o plasmídeo *pGRSd-AGT1-GFP* ou os mutantes-GFP, crescidas em maltose, foram centrifugadas e lavadas com água. Amostras das suspensões celulares foram misturadas a

um mesmo volume de agarose 1% (pré-aquecida a 60 °C) em lâminas de microscopia e foram visualizadas em um microscópio confocal. Estas análises foram feitas em um microscópio LSM 510 Meta Confocal Zeiss, com objetiva de 100x, laser de excitação de 488 nm e filtros de emissão NFT 545 (Secondary Dichroic Beam Splitter) e BP 505-530 (Main Dichroic Beam Splitter) ou por contraste de fase. Alternativamente, foi utilizado o microscópio Leica DMI6000 B Microscope, com objetiva de 60x. As imagens mostradas são representações dos resultados obtidos.

4.13 Cálculo dos parâmetros fisiológicos

Os parâmetros fisiológicos (tempo de geração celular, fator de conversão de substratos a células, fator de conversão de substrato a etanol, velocidade de crescimento, velocidade de consumo de substrato e velocidade de formação de etanol) dos cultivos realizados foram calculados segundo Schmidell et al. (2001).

4.14 Purificação parcial da permease Agt1p

O transportador Agt1p foi purificado parcialmente a partir da cepa LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd-GST-nAGT1. Esse plasmídeo foi construído durante este trabalho, segundo metodologias descritas por Petracek e Longtine (2002) e apresenta o gene *AGT1* fusionado ao epítipo *GST* em sua porção N-terminal (vide seção 4.6).

4.14.1 Indução da expressão da permease Agt1p com galactose

As leveduras, contendo a construção *GST-AGT1*, foram crescidas em meio sintético com maltose até o meio da fase exponencial (2,0 a 2,5 g/L) e tiveram a expressão da permease induzida pela adição de 2% de galactose. Foram testados os tempos de indução de 0, 4, 8 e 24 horas para identificar a melhor condição de trabalho.

4.14.2 Preparação da fração de membranas

Células expressando a proteína fusionada GST-Agt1 foram coletadas por centrifugação, lavadas uma vez com água e ressuspensas em tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA, 2 mM de DTT, pH 8,5). O extrato celular foi obtido pelo rompimento das células através de agitação vigorosa (7 ciclos /1 min), com bolinhas de vidro e um agitador (Bead-beater), a 4 °C. A suspensão foi centrifugada a 3.000 rpm, por 10 min, para retirar os restos celulares e, em seguida, o sobrenadante (extrato bruto) foi centrifugado a 30.000 rpm, por 30 min, em rotor 55T (Hitachi). Ao precipitado de membranas foi adicionado tampão contendo 20% de glicerol, 10 mM de Tricina-Tris e 0,1 mM de DTT, homogeneizado cuidadosamente, resultando na fração bruta de membranas. Adicionou-se 1 mM de PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonila) nos tampões utilizados para a preparação da fração de membranas, para inibir a atividade de proteases presentes nestes extratos.

4.14.3 Determinação da atividade da enzima Glutathione-S-Transferase

A atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (EC 2.5.1.18) presente nas amostras obtidas durante as etapas da purificação da proteína GST-Agt1p foi determinada segundo Habig, Pabst e Jakoby (1974), usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. Até 100 µL da amostra foi misturada a uma solução contendo 1 mM de CDNB e 1 mM de glutathione (GSH) em tampão fosfato (KH_2PO_4) 0,1 M, pH 6,5, e a absorbância foi mensurada a 340 nm, em intervalos de 20 segundos, por 5 minutos. Como controle negativo foi usado mesma solução de reação, porém não foi adicionado enzima ou amostra. Para o cálculo da atividade levou-se em conta o coeficiente de extinção de $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para 2,4-dinitrofenil glutathione.

4.14.4 Dosagem de proteína

A concentração protéica das amostras foi estimada pelo método do Ácido Bicinchonínico (SMITH et al., 1985), utilizando albumina de soro bovino (BSA -Sigma) como padrão (2,5 a 20 µg) . Todas as dosagens foram feitas em duplicata.

4.14.5 Solubilização das proteínas presentes na membrana celular

Para a solubilização das proteínas presentes nas membranas celulares (obtidas como descrito na seção 3.13.2) usamos protocolo adaptado de Taylor et al. (1997), Guan et al. (2006) e Lemieux et al. (2003). O precipitado de membranas brutas foi ressuspensão em tampão TPI (25 mM de Tris-HCl, 2 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 137 mM de NaCl, 2,6 mM de KCl, 1 mM de PMSF, 2 mM de benzamidina e 2 µg/mL de aprotinina) contendo 1% do detergente dodecil-β-D-maltopiranosídeo (DDM) e 10% de glicerol, de forma a se ter uma concentração de 3 a 4 mg de proteína/mL. A suspensão foi homogeneizada cuidadosamente e incubada a 4 °C, por 1 hora. Em seguida, o sobrenadante contendo a fração de proteínas solubilizadas foi obtido após ultracentrifugação a 40.000 rpm, por 30 minutos, em rotor 55T (Hitachi).

4.14.6 Cromatografia de afinidade

A coluna de Glutathiona-Sefarose (GSTrap HP, 5 mL, Amersham) foi inicialmente equilibrada com 5 volumes de tampão TPI contendo 0,3% de DDM. Ao tampão foi adicionado ainda 10 mM de DTT, para garantir que a glutathiona presente na coluna estivesse na sua forma reduzida. A fração de proteínas solubilizadas (70 mL) foi aplicada na coluna, em temperatura ambiente, com fluxo de 0,5 mL. min⁻¹. Em seguida, a coluna foi lavada com 3 volumes de tampão TPI e detergente e a eluição realizada com mesmo tampão acrescido de 20 mM de glutathiona (pH 8,0).

4.14.7 Clivagem da GST com trombina

A proteína fusionada com GST (GST-Agt1) foi clivada com trombina seguindo especificações do fabricante (The Thrombin CleanCleave Kit, Sigma), utilizando-se 24h de incubação da reação de clivagem, em temperatura ambiente, com posterior centrifugação para recuperar a proteína clivada (Agt1p).

4.14.8 Eletroforese de proteínas e coloração dos géis

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de detergente (SDS-PAGE), conforme metodologias descritas por Ausubel et al. (1996) e Laemmli (1970). A concentração de acrilamida/bisacrilamida (30:1) do gel de separação foi 10% e do gel de empilhamento 4%. As amostras foram diluídas em tampão de amostra contendo Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), 20% de glicerol, 2% de SDS, 4% de β -mercaptoetanol e 0,001% de azul de bromofenol, aquecidas a 95 °C por 5 minutos e aplicadas em um sistema de eletroforese. O padrão de peso molecular usado foi o SigmaMarker (36 a 205 kDa, Sigma) contendo miosina (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97 kDa), frutose-6-fosfato quinase (84 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), glutamina desidrogenase (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa) e inibidor de tripsina (20 kDa).

A coloração dos géis foi feita com Coomassie ou Nitrato de prata. Na coloração com corante azul de coomassie (Coomassie Blue R-250), o gel foi incubado em uma solução contendo 40% de metanol, 10% de ácido acético e 0,1% de Coomassie, por 30 minutos e descorado em solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético. Para a coloração com nitrato de prata, foi feito um tratamento inicial com solução de fixação (50% de metanol, 12% de ácido acético, 0,05% de formaldeído 37%), incubado *overnight*, seguido de lavagens com etanol. Os géis foram tratados com uma solução de tiosulfato de sódio (0,2 g/L) e impregnados com solução de nitrato de prata (2g/L) e formaldeído 37% (0,75 mL/L) por 20 minutos. A revelação foi feita com uma solução de Carbonato de cálcio (60 g/L de Na_2CO_3 ; 0,5 mL/L de formaldeído 37%; 4 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). A reação foi bloqueada tratando o gel com a solução de fixação e posterior lavagem em água.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos aminoácidos envolvidos com o transporte ativo realizado pela permease Agt1p

Inúmeros trabalhos têm demonstrado que transportadores do tipo simporte com H^+ possuem resíduos de aminoácidos com grupos funcionais ionizáveis presentes nos segmentos transmembrana (p.ex. ácido glutâmico, ácido aspártico, histidina, arginina), indicando que estes resíduos seriam os responsáveis pela ligação do próton durante o processo de transporte ou que estariam envolvidos no processo de translocação do soluto (ABRAMSON et al., 2003; DANG et al., 2010; DITTY; HARWOOD, 2002; GUAN; KABACK, 2006; HUANG et al., 2003; MUECKLER; MAKEPEACE, 1999; PINSON; CHEVALLIER; URBAN-GRIMAL, 1999; SAHIN-TÓTH; KARLIN; KABACK, 2000).

Um trabalho anterior feito por nosso grupo de pesquisa (TRICHEZ, 2007) demonstrou a importância de 3 resíduos de aminoácidos – Glu-120, Asp-123 e Arg-504 – para a atividade de transporte da permease Agt1p. Os estudos de mutagênese sítio-dirigida mostraram que a substituição da Arg-504 por um aminoácido neutro aboliu completamente a atividade de transporte mediada pela permease, enquanto que mutantes nos resíduos Glu-120 e Asp-123 apresentaram atividades de transporte inferiores à observada para o transportador normal. Dessa forma, os resultados obtidos indicavam o envolvimento dos resíduos mutados no transporte ativo de açúcares realizado pela permease Agt1p, sugerindo a participação dos resíduos Glu-120 e Asp-123 na translocação do próton e de Arg-504 na ligação do substrato.

Levando em consideração esses resultados, buscamos caracterizar melhor o papel de cada um desses resíduos através de ensaios complementares e, além disso, estudar outros aminoácidos possivelmente envolvidos com a atividade de transporte, ligação do próton ou especificidade pelo(s) substrato(s).

Analisando a estrutura secundária prevista para o transportador Agt1p, pode-se observar a presença de quatro resíduos de aminoácidos carregados em seus segmentos transmembrana, que são os resíduos previamente estudados Glu-120 e Asp-123 (no TM-1) e Arg-504 (no TM-11), e Glu-167 (no TM-2), resíduo que inicialmente investigamos nesse trabalho (Figura 8). Estes resíduos mantêm-se conservados em posições similares em outros transportadores de α -glicosídeos de diversas leveduras - Malx1p, Mph2p e Mph3p de *S.*

cerevisiae (CHENG; MICHELS, 1991; DAY et al., 2002; HAN et al., 1995); Mty1p e Mtt1p de *S. pastorianus* (DIETVORST; LONDESBOROUGH; STEENSMA, 2005; SALEMA-OOM et al., 2005); Mal11p de *Torulaspora delbrueckii* (ALVES-ARAUJO et al., 2004) e HpMal2p de *Hansenula polymorpha*/*Pichia augusta* (VIIGAND; ALAMAE, 2007; VIIGAND; TAMMUS; ALAMAE, 2005), como mostrado no alinhamento de sequências (Figura 9).

Figura 8 - Representação da estrutura secundária da permease Agt1p.

Modelo da topologia previsto para a permease Agt1p, mostrando os 12 TMs e os domínios N e C-terminal voltados para o citoplasma. Aminoácidos carregados presentes nos TMs, estão realçados em vermelho.
FONTE: Trichez (2007).

Figura 9 - Alinhamento das sequências de transportadores de açúcares conhecidos e similares ao Agt1p.

		TM I		TM II		TM XI
AGT1_Sc	113	STTLVMEGYDTALLSALYALPVFQRK	148	YEITSQWQIGLNMVCLCGEMIGLQI	498	KTIVLARICYNLMAVINAILTPYMLN
MAL11_Sc	113	STTLVMEGYDTALLNALYALPVFQRK	148	YEITSQWQIGLNMVQCCEIIGLQI	498	KTIVLARICYNLMAVINAILTPYMLN
MAL_Td	116	STTLVMEGYDTSLNLALFALPVFQEK	151	YEISSQWQIGLNMCI FVCEIIGLQM	524	QTIVLARNCYNLMAIVNAILTPYMLN
MAL31_Sc	106	STTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKK	144	YEISVSQWIGLCLCYMAGEIVGLQM	492	KTIILARNAYNVIVQVVTVLIMYQLN
MAL61_Sc	106	STTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKK	144	YEISVSQWIGLCLCYMAGEIVGLQV	492	KTIILARNAYNVIVQVVTVLIMYQLN
MAL21_Sc	106	STTLIQEGYDTAILGAFYALPVFQKK	144	YEISVSQWIGLCLCYMAGEIVGLQL	492	KTIILARNAYNVIVQVVTVLIMYQLN
MTY1_Sp	106	STTLIQEGYDTAILGSFYALPVFQKK	144	YEISAQWIGLCLCVTAGEIVGLQM	493	KSIIILARNAYNMASIVTTVLIMYQLN
MTY1_Sp	106	STTLIQEGYDTAILGSFYALPVFQKK	144	YEISAQWIGLCLCVTAGEIVGLQM	493	KSIIILARNAYNMASIVTTVLIMYQLN
MPH2_Sc	104	STTLIMEGYDTAILGAFYALPIFQRK	142	WEISAQWIGLITLCYMAGEIVGLQL	491	KTIILARNTYNNVVSIIICSVLILYQLN
MAL_Hp	80	STAIIMEGYDITLLNSLSYMQSFAKK	118	YQVPAKWQTSLSMSTYVGEIVGLYI	465	KTVALARNWYNLSQIPLSIVTPYMLN
		: **: : : : : *		***: ** : : : : *		: : : : : : : : : : *

O alinhamento foi feito com as sequências completas usando o programa CLUSTAL W. Aminoácidos em vermelho indicam os resíduos conservados (E-120, D-123, E-167 e R-504). Segmentos transmembrana do transportador Agt1p estão realçados (caixas cinza) e marcados com números romanos.

FONTE: Trichez (2012).

Para verificar o papel do resíduo Glu-167 para a atividade de transporte da permease Agt1p, nós construímos uma permease mutante substituindo esse resíduo por uma alanina através de mutagênese sítio-dirigida (modificação do códon GAG → GCC). O plasmídeo pGRSd-AGT1, que apresenta o gene *AGT1* sob regulação de um promotor forte, foi utilizado como DNA molde. O produto amplificado por PCR com os oligonucleotídeos apropriados para a mutação, conforme descrito na seção Material e Métodos, foi utilizado para transformar bactérias *E. coli*, das quais foram posteriormente extraídos os plasmídeos circularizados. Em seguida, os plasmídeos foram clivados com a enzima de restrição *BshNI* para verificar se a mutação foi corretamente introduzida no gene *AGT1* (dados não mostrados) e os clones selecionados foram confirmados por sequenciamento (Figura 10).

Figura 10 - Confirmação da mutação no aminoácido E167 de Agt1p.

Eletroferograma do sequenciamento parcial do gene *AGT1*, confirmando a mutação E167A. O códon modificado (GAG → GCC) está indicado na figura (caixa). A numeração presente se refere à posição dos nucleotídeos obtidos na reação de sequenciamento.

FONTE: Trichez (2012).

Mesmo procedimento foi utilizado para observar o efeito da substituição da Ile-505 por uma treonina (modificação do códon ATT → ACT). Smit, Cordero-Otero e Pretorius (2007) investigaram diferenças nas sequências de transportadores codificados pelo gene *AGT1* de cepas industriais e de laboratório e relacionaram estas diferenças com a capacidade destes alelos da permease de transportar maltotriose e *pNPαG*. Interessantemente, a cepa mais eficiente na utilização de maltotriose portava o gene *AGT1* com algumas mutações pontuais, muitas delas já descritas por Vidgren, Ruohonen e Londesborough (2005), mas apresentava uma substituição nova (I505T) na sequência da permease capaz de transportar melhor os açúcares (SMIT; CORDERO-OTERO; PRETORIUS, 2007). Estes resultados vão de encontro com a importância do resíduo de aminoácido Arg-504 para a atividade de

transporte (TRICHEZ, 2007), sugerindo que Arg-504 e Ile-505 pudessem fazer parte do sítio de ligação do açúcar na permease Agt1p e que, possivelmente, a substituição de Ile-505 por uma treonina poderia facilitar o reconhecimento do açúcar ou aumentar a afinidade da permease pelo substrato. Nos mutantes I505T, a verificação da correta substituição foi feita inicialmente pela digestão com a enzima *RsaI*, cujo sítio de restrição foi inserido pela modificação do códon de leitura. O sequenciamento do gene foi realizado para confirmação da mutação (Figura 11).

Figura 11 - Confirmação da mutação no aminoácido I505 de Agt1p.

Eletroferograma do sequenciamento parcial do gene *AGT1*, confirmando a mutação I505T. O códon modificado (ATT → ACT) está indicado na figura (caixa). A numeração presente se refere à posição dos nucleotídeos obtidos na reação de sequenciamento.

FONTE: Trichez (2012).

Uma vez confirmadas as mutações desejadas no gene *AGT1*, as permeases foram expressas na linhagem LCM003, uma cepa isogênica à levedura de laboratório CENPK2-1C, mas deletada no gene *AGT1* (ALVES-JR et al., 2008), para avaliar os fenótipos resultantes. Para isso, a cepa LCM003 foi transformada com os plasmídeos portando as diferentes mutações (plasmídeos denominados E120A, D123G, E167A, R504A e I505T), como também com os plasmídeos controles pGRSd (sem o gene *AGT1*) e pGRSd-*AGT1* (que carrega o gene *AGT1* normal).

A Figura 12 apresenta as curvas de crescimento, consumo de açúcar e produção de etanol pelas leveduras, em meio sintético sem uracila, contendo 2% de maltose como fonte de carbono. Em virtude da cepa LCM003 possuir vários transportadores de maltose (p.ex., *MAL21*, *MAL31*, vide ALVES-JR et al., 2008; ENTIAN; KOTTER, 1998; Quadro 1), o crescimento em maltose foi usado como controle positivo do experimento. Como já era esperado, a

utilização desse açúcar não foi alterada por nenhuma das mutações analisadas. Todas as células, abrigando as distintas construções, conseguiram crescer e fermentar eficientemente maltose, consumindo o açúcar em até 35 horas de incubação. De fato, os parâmetros fisiológicos, obtidos a partir da fase exponencial de crescimento das células, não demonstram grandes diferenças entre as leveduras, conforme apresentado na Tabela 1.

Figura 12 - Utilização de maltose pela cepa LCM003 portando as permeases Agt1p mutantes.

Nos tempos indicados, alíquotas dos meios foram retiradas e utilizadas para a determinação do crescimento celular (A), do consumo de açúcar (B) e da produção de etanol (C) pela cepa LCM003 portando os plasmídeos controles ou mutantes, em meio sintético sem uracila, contendo 2% de maltose como fonte de carbono.

FONTE: Trichez (2012).

O perfil de utilização de maltotriose pela cepa LCM003 transformada com os diferentes plasmídeos pode ser visualizado na Figura 13. Na ausência do gene *AGT1*, as células da cepa LCM003 (transformadas com o plasmídeo vazio) são incapazes de crescer em maltotriose ou captar este açúcar através da membrana, mesmo possuindo vários transportadores Malx1p no seu genoma (STAMBUK; DE ARAÚJO, 2001). Já a presença da permease Agt1p restaurou a capacidade de utilizar maltotriose por estas células. A transformação da cepa LCM003 com o plasmídeo pGRSd-AGT1 permitiu uma eficiente fermentação de maltotriose: as células cresceram e consumiram completamente o açúcar presente no meio e produziram quantidades significativas de etanol. Como mostrado por Alves-Jr et al. (2008) e Alves-Jr (2010), a presença da permease Agt1p é indispensável para a fermentação de maltotriose em células de *S. cerevisiae*; contrariando o que foi observado por Day et al. (2002), que afirmaram que os transportadores codificados pelos genes *MALx1*

e *MPHx* (também presentes na cepa LCM003 utilizada neste trabalho) transportam maltotriose com alta afinidade.

Dessa forma, a funcionalidade das permeases mutantes foi avaliada através do crescimento em maltotriose e diferentes padrões de utilização do açúcar foram observados (Figura 13). A substituição do resíduo Arg-504 por uma alanina aboliu totalmente a utilização de maltotriose pelas células da levedura, enquanto que, permeases mutantes geradas pela substituição dos resíduos Glu-120, Asp-123 e Glu-167 não impediram o crescimento em maltotriose, mas causaram uma menor velocidade de consumo do açúcar. A presença da mutação E120A provocou um crescimento mais lento, após uma extensiva fase lag (> 25 h), sem consumo completo do açúcar ou produção de etanol pelas células. Neste mutante, a fonte de carbono parece estar sendo direcionada para a respiração (metabolismo aeróbico), em detrimento do metabolismo fermentativo característico desta levedura. Já os mutantes E167A apresentaram um perfil parecido aos mutantes D123G: as células portando essas mutações mostraram um crescimento similar à cepa portando a permease Agt1p normal, porém consumiram mais lentamente o açúcar e, conseqüentemente, menos etanol foi produzido. Somando-se a isso, as células passaram a consumir o etanol produzido mesmo sem ter consumido completamente o açúcar presente no meio.

Figura 13 - Utilização de maltotriose pela cepa LCM003 portando as permeases Agt1p mutantes.

NOTA: Nos tempos indicados, alíquotas dos meios foram retiradas e utilizadas para a determinação do crescimento celular (A), do consumo de açúcar (B) e da produção de etanol (C) pela cepa LCM003 portando os plasmídeos controles ou mutantes, em meio sintético sem uracila, contendo 2% de maltotriose como fonte de carbono.

FONTE: Trichez (2012).

Em contrapartida, a substituição da Ile-505 por uma treonina não afetou a utilização de maltotriose pela cepa LCM003. As células que portavam esta permease mutante apresentam perfil semelhante às células carregando o *AGT1* normal, atingindo valores aproximados de massa celular e produção de etanol. Aparentemente, apesar da grande diferença entre as propriedades dos aminoácidos em questão, a substituição do resíduo hidrofóbico (Ile) pelo resíduo hidrofílico (Thr) não alterou o fenótipo da levedura (Figura 13).

Os parâmetros detalhados na Tabela 1 também demonstram as alterações na fisiologia das leveduras provocadas pelas mutações. As células portando os plasmídeos E120A e E167A apresentaram menores velocidades específicas de crescimento na fase exponencial ($\mu_x^{\text{exp}} = 0,095$ e $0,127 \text{ h}^{-1}$, respectivamente) quando comparado a cepa portando a permease normal ($\mu_x^{\text{exp}} = 0,203 \text{ h}^{-1}$) e, conseqüentemente, maiores tempos de geração celular (tg) foram observados para estas células. A significativa diminuição da velocidade específica de consumo de maltotriose mostrada pelas células contendo o plasmídeo E120A ($\mu_{\text{Mtt}}^{\text{exp}} = 0,124 \text{ h}^{-1}$) explica a mudança no metabolismo do açúcar: de fermentativo para respiratório. Condizente com isto, nestas células, pode-se observar um maior rendimento na conversão de substrato a biomassa ($Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,770 \text{ gX.gMtt}^{-1}$) quando comparado às células portando a permease normal ($Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,172 \text{ gX.gMtt}^{-1}$). Segundo Postma et al. (1989) e Zastrow et al. (2001), o lento consumo de açúcar pela levedura, resultando em um menor fluxo glicolítico, tende a levar a célula ao crescimento aeróbico (respiratório). Elbing et al. (2004) também observaram que reduzidas velocidades de captação de glicose em células de *S. cerevisiae* modificadas para tal, redirecionam o fluxo de glicose que seria fermentada para a respiração.

Os resultados de velocidade específica de produção de etanol ($\mu_{\text{Et}}^{\text{exp}} = 0,610 \text{ h}^{-1}$) e de velocidade específica de consumo da maltotriose ($\mu_{\text{Mtt}}^{\text{exp}} = 0,526 \text{ h}^{-1}$), indicam um metabolismo mais lento para as leveduras portando a mutação E167A. No entanto, o rendimento na conversão de substrato a etanol foi semelhante à levedura padrão. Já a levedura abrigoando o plasmídeo D123G apresentou uma diminuição de aproximadamente 15% na velocidade específica de consumo da maltotriose ($\mu_{\text{Mtt}}^{\text{exp}} = 1,012 \text{ h}^{-1}$), o que resultou em um rendimento na conversão de substrato a células semelhante a levedura contendo a permease normal (D123G: $Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,1799 \text{ gX.gMtt}^{-1}$ e levedura padrão: $Y_{X/S}^{\text{exp}} = 0,172 \text{ gX.gMtt}^{-1}$), porém com um rendimento na conversão de substrato a etanol 22% menor (D123G: $Y_{\text{Et/S}}^{\text{exp}} = 0,1659 \text{ gEt.gMtt}^{-1}$ e levedura padrão: $Y_{\text{Et/S}}^{\text{exp}} = 0,215 \text{ gEt.gMtt}^{-1}$). Através da

análise dos parâmetros fisiológicos dos mutantes I505T podemos observar com mais detalhes as mudanças provocadas no fenótipo: a presença da mutação conferiu às células uma diminuição das velocidades específicas de crescimento (μ_x^{exp}), de consumo de maltotriose ($\mu_{\text{Mtt}}^{\text{exp}}$) e do rendimento na conversão de substrato a etanol ($Y_{\text{Et/S}}^{\text{exp}}$), o que levou a um aumento de 15% do rendimento na conversão de substrato a células ($Y_{\text{X/S}}^{\text{exp}}$) em comparação à levedura padrão.

Tabela 1 - Parâmetros fisiológicos da linhagem LCM003 portando os diferentes plasmídeos, crescida em frascos agitados contendo meio sintético sem uracila e 2% de açúcar.

Parâmetros fisiológicos ^(a)	LCM003						
	pGRSd	pGRSd-AGT1	E120A	D123G	E167A	R504A	I505T
Maltose							
tg (h)	3,870	3,830	4,450	3,960	3,630	4,240	3,650
$\mu_x^{\text{exp}} (\text{h}^{-1})$	0,179	0,181	0,156	0,175	0,191	0,163	0,190
$\mu_{\text{Mal}}^{\text{exp}} (\text{h}^{-1})$	1,340	1,477	1,166	1,396	1,400	1,455	1,220
$\mu_{\text{Et}}^{\text{exp}} (\text{h}^{-1})$	0,770	0,800	0,640	0,724	0,810	0,658	0,790
$Y_{\text{X/S}}^{\text{exp}} (\text{gX.gMal}^{-1})$	0,133	0,122	0,134	0,125	0,135	0,112	0,155
$Y_{\text{Et/S}}^{\text{exp}} (\text{gEt.gMal}^{-1})$	0,232	0,225	0,243	0,242	0,235	0,248	0,239
Maltotriose							
tg (h)	- ^(b)	3,420	7,281	3,800	5,470	- ^(b)	3,670
$\mu_x^{\text{exp}} (\text{h}^{-1})$	- ^(b)	0,203	0,095	0,182	0,127	- ^(b)	0,189
$\mu_{\text{Mtt}}^{\text{exp}} (\text{h}^{-1})$	- ^(b)	1,180	0,124	1,012	0,526	- ^(b)	0,947
$\mu_{\text{Et}}^{\text{exp}} (\text{h}^{-1})$	- ^(b)	0,939	- ^(b)	1,098	0,610	- ^(b)	0,952
$Y_{\text{X/S}}^{\text{exp}} (\text{gX.gMtt}^{-1})$	- ^(b)	0,172	0,770	0,1799	0,241	- ^(b)	0,199
$Y_{\text{Et/S}}^{\text{exp}} (\text{gEt.gMtt}^{-1})$	- ^(b)	0,215	- ^(b)	0,1659	0,206	- ^(b)	0,198

^{a)} tg = tempo de geração celular, expresso em h; μ_x = velocidade específica de crescimento, expresso em h^{-1} ; μ_{Mal} = velocidade específica de consumo de maltose, expresso em h^{-1} ; μ_{Mtt} = velocidade específica de consumo de maltotriose, expresso em h^{-1} ; μ_{Et} = velocidade específica de formação de etanol, expresso em h^{-1} ; $Y_{\text{X/S}}$ = rendimento na conversão de substrato a células, expresso em g de massa celular formada por g de açúcar consumido (gX.gMal^{-1} ou gX.gMtt^{-1}); $Y_{\text{Et/S}}$ = Rendimento na conversão de substrato a etanol, expresso em g de etanol formado por g de açúcar consumido (gEt.gMal^{-1} ou gEt.gMtt^{-1}).

^(b) Não determinado.

FONTE: Trichez (2012).

Resultados similares foram obtidos quando investigamos a atividade de transporte da permease Agt1p ou dos mutantes derivados. De acordo com Hollatz e Stambuk (2001), o substrato sintético pNPαG é transportado através da membrana celular apenas pela permease codificada pelo gene *AGT1*, que apresenta uma alta afinidade ($K_m \approx 3 \text{ mM}$) por pNPαG. Dessa forma, avaliamos a importância de cada aminoácido mutado para o transporte ativo realizado pela permease Agt1p, utilizando pNPαG como substrato. Para

isso, as células foram crescidas em meio sintético contendo 2% de maltose, açúcar metabolizado por todas as linhagens analisadas, de forma que o crescimento fosse equitativo para todas as células. Conforme pode ser observado na Figura 14-A, a mutação R504A ocasionou a total perda da atividade de transporte de *pNPαG* pelas células, uma vez que apresentou velocidades de transporte similares às obtidas com as células portando o plasmídeo vazio (sem o gene *AGT1*). Já para os mutantes E120A, D123G e E167A foram verificadas atividades de transporte de *pNPαG* inferiores à observada para o transportador normal (queda de $\approx 93\%$, 48% e 87% , respectivamente). Estes resultados mostram uma correlação direta entre a atividade de transporte de *pNPαG* e utilização de maltotriose por *S. cerevisiae*. Da mesma forma, o mutante I505T não apresentou significativas alterações na atividade de transporte de *pNPαG*, mostrando apenas uma leve redução na velocidade de transporte.

Figura 14 - Atividade de transporte da permease Agt1p e da enzima α -glicosidase.

A) A atividade de transporte da permease codificada pelo gene *AGT1* e pelos seus respectivos mutantes presentes na cepa LCM003 foi determinada utilizando *pNPαG* como substrato. B) O mesmo substrato foi usado para avaliar a atividade da enzima α -glicosidase nestas células, após permeabilização com tampão MOPS-NaOH, pH 6,8. Os testes foram realizados com células da levedura (LCM003 transformada com os plasmídeos indicados) crescidas em meio sintético, contendo 2% de maltose.

FONTE: Trichez (2012).

Como o ensaio colorimétrico de determinação do transporte de *pNPαG* depende também da hidrólise intracelular do substrato pela enzima α -glicosidase (maltase), avaliamos também esta atividade enzimática, utilizando como substrato *pNPαG* (HOLLATZ; STAMBUK, 2001; NEEDLEMAN et al., 1978; ZASTROW et al., 2000). No entanto, como mostra a Figura 14-B, não verificamos nenhuma diferença significativa na atividade de α -glicosidase entre as células, indicando que a alteração observada no fenótipo da cepa LCM003 é

consequência de uma variação na atividade de transporte do substrato através da membrana.

Visando detalhar quais aspectos estavam sendo mais afetados pelas mutações introduzidas no gene *AGT1*, nós decidimos investigar a estequiometria do transporte ativo de H^+ -açúcares nestas permeases. Em *S. cerevisiae*, o transporte de α -glicosídeos é realizado por um sistema de co-transporte com prótons (H^+) que utiliza o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana, gerado pelas H^+ -ATPases, para transportar o açúcar contra um gradiente de concentração (HAN et al., 1995; STAMBUK et al., 1996). Já foi demonstrado, para *S. cerevisiae*, que a atividade de transporte de α -glicosídeos – como maltose, sacarose e trealose – apresenta uma estequiometria de um próton por molécula de açúcar transportada (SERRANO, 1977; STAMBUK et al., 1996, 1999).

Dessa forma, nós avaliamos a atividade de transporte das permeases através de ensaios, em paralelo, de co-transporte de H^+ e de transporte de açúcar radioativo pelas células. Como mostra a Figura 15, a mutação na Arg-504 causou a perda total da atividade de transporte mediada pela permease Agt1p, indicando que este resíduo é essencial para o transporte e/ou ligação do açúcar. Ambos transporte de açúcar e de H^+ foram significativamente prejudicados em mutantes E120A, enquanto que a substituição dos resíduos D123 e E167 afetou principalmente o simporte de H^+ . Para estas células, a translocação de H^+ parece estar sendo mais afetada, já que os ensaios de co-transporte (que levam em consideração o influxo de prótons para o interior da célula) foram os que mostraram atividade nula, diferentemente do que foi verificado para o transporte dos açúcares radioativos, cujo transporte continua a ocorrer, apesar da menor atividade observada. Nossos resultados então sugerem que, nestes mutantes, o transporte de açúcar poderia estar desacoplado do transporte de H^+ (GUAN; KABACK, 2006). A razão estequiométrica 1:1 parece estar mantida nos mutantes I505T, tanto para o transporte de trealose ($3,99 \pm 0,18$: $3,74 \pm 0,05$) quanto de sacarose ($6,06 \pm 0,36$: $5,60 \pm 0,29$); porém, as células apresentaram valores de atividade de transporte inferiores aos obtidos para a cepa portando a permease Agt1p normal. Estes resultados sugerem que o resíduo I505T poderia estar envolvido com a afinidade pelo substrato.

Figura 15 - Estequiometria do transporte ativo de trealose e sacarose em células de *S. cerevisiae*.

As velocidades iniciais de transporte do açúcar radioativo ou co-transporte de H⁺ foram determinadas em células da cepa LCM003, pré-crescidas em maltose, expressando os transportadores Agt1p normal ou mutantes.

FONTE: Trichez (2012).

Parâmetros cinéticos como efluxo e contra-fluxo podem estar alterados em mutantes que apresentam o desacoplamento entre transporte de açúcar e translocação do próton (DANG et al., 2010; FRANCO; BROOKER, 1994; GUAN; KABACK, 2006; SAHIN-TÓTH; KABACK, 2001; SMIRNOVA; KASHO; KABACK, 2008). No entanto, quando avaliamos esses parâmetros nos mutantes D123G e E167A observamos a ausência de efluxo (em água) e contra-fluxo em solução de 200 mM de trealose (vide Figura 16). Da mesma forma, nas condições estudadas e com células íntegras, as leveduras portando a permease normal parecem apresentar um

sistema de transporte ativo unidirecional, como já foi previamente mostrado para o transporte de trealose mediado pelo Agt1p (STAMBUK et al., 1996).

Figura 16 - Ausência de efluxo e contra-fluxo de trealose pela cepa LCM003 portando a permease Agt1p normal ou os mutantes D123G e E167A.

A captação de ¹⁴C-trealose foi determinada em células pré-crescidas em maltose, expressando os transportadores Agt1p normal ou os mutantes D123G e E167A. No tempo indicado (↓), as células foram colhidas, centrifugadas e ressuspensas em água (Δ) ou trealose (□).

FONTE: Trichez (2012).

Entretanto, Brondijk, Konings e Poolman (2001) mostraram que o transporte de maltose poderia ser reversível. Utilizando uma linhagem de levedura incapaz de metabolizar maltose em consequência do rompimento do gene *MALx2*, que codifica para a enzima maltase, observaram que a cepa foi capaz de realizar tanto influxo como efluxo de maltose, apesar de apresentar parâmetros cinéticos diferenciados para a captação e efluxo do açúcar.

Anteriormente, um estudo feito com membranas artificiais contendo a permease Mal61p também mostrou que o transporte de maltose era reversível, uma vez que nestas condições foi possível observar tanto captação como efluxo de maltose. Porém, neste caso, os resultados são um pouco duvidosos, pois a orientação das proteínas na membrana, durante a preparação das vesículas, provavelmente foi aleatória (VAN DER REST et al., 1995).

Outro aspecto que pode ser observado na Figura 16 é que estes mutantes apresentam uma menor capacidade de captação de ^{14}C -trealose quando comparado às células portando o Agt1p normal.

Figura 17 - Efeito do pH na atividade de transporte de ^{14}C -trealose ou ^{14}C -sacarose.

Células crescidas em maltose, expressando a permease normal ou os mutantes E120A, D123G e E167A, foram usadas para medir a atividade de transporte de ^{14}C -trealose (A) ou ^{14}C -sacarose (B), nos pHs indicados.

FONTE: Trichez (2012).

A Figura 17 mostra a influência do pH externo na atividade de transporte das permeases Agt1p normal e mutantes E120A, D123G e E167A. Como pode ser visualizado na Figura 17 e também já foi demonstrado por Stambuk et al. (1996), o pH ótimo para o transporte de trealose através da permease Agt1p é o pH 5,0, apresentando um claro declínio da atividade de transporte em valores de pH abaixo ou acima do ótimo. Da mesma

forma, o pH ótimo para o transporte de sacarose parece ser em torno de 5,0. Nas células portando as mutações, o perfil de transporte nos diferentes pHs é similar, apenas mostrando reduzidas atividades de transporte de trealose e sacarose.

Para tentar esclarecer melhor o papel dos resíduos Asp-123 e Glu-167 na translocação do próton, nós construímos uma permease portando as duas mutações combinadamente. As células da cepa LCM003, portando a permease com essa dupla mutação (D123G e E167A), foram incapazes de utilizar maltotriose e transportar *pNPαG* ou açúcares como trealose e sacarose (Figura 18). Portanto, quando estes dois resíduos estão mutados, nós observamos a perda da atividade de transporte da permease. Dessa forma, podemos sugerir que ambos resíduos cooperam na ligação do H^+ durante o transporte de açúcares promovido pelo Agt1p e que na presença de apenas uma das mutações na proteína, a ligação do H^+ é estabelecida com o outro resíduo.

Figura 18 - Perda da funcionalidade da permease Agt1p na presença da dupla mutação (D123G/E167A).

(A) Crescimento celular em meio contendo 2% de maltotriose, (B) atividade de transporte de *pNPαG* e (C) estequiometria do transporte ativo de açúcares pela cepa LCM003 expressando a permease Agt1p normal ou o duplo mutante.

FONTE: Trichez (2012).

Como algumas das mutações provocaram a perda total da atividade da permease, via-se necessário verificar se as mutações não estariam provocando problemas na síntese e/ou encaminhamento correto da proteína até a membrana plasmática via retículo endoplasmático rugoso e rede trans-Golgi. A retenção de proteínas mal-dobradas no retículo endoplasmático faz parte de um sistema de controle de qualidade celular já bem conhecido, onde as proteínas mal formadas são ubiquitinadas e direcionadas para degradação no proteossoma. Além disso, as mutações poderiam afetar a permanência da proteína na membrana plasmática, sendo que o processo de inativação (envolvendo a fosforilação, ubiquitinação e endocitose para posterior degradação vacuolar) já foi descrito tanto para os transportadores codificados pelos genes *MALx1*, quanto para o *AGT1* (BRONDIJK et al., 1998; HATANAKA et al., 2009; MEDINTZ et al., 2000; STAMBUK, 2002).

Merhi et al. (2011) observaram alterações no tráfego intracelular da proteína Gap1p – um transportador geral de aminoácidos de *S. cerevisiae* – ao analisarem os domínios citoplasmáticos por mutagênese sítio-dirigida. Proteínas que possuíam mutações na região N-terminal foram corretamente direcionadas até a membrana, contudo, uma sequência de 15 aminoácidos (resíduos 20 a 35) presente nesse domínio se mostrou essencial para a ubiquitinação de dois resíduos de lisina (Lys-9 e 16) e posterior endocitose do transportador. Além disso, resíduos da porção N-terminal ou da alça citoplasmática, situados próximos aos TMs, parecem ser importantes para a atividade de transporte da permease e talvez estejam envolvidos com a mudança conformacional durante o transporte. Enquanto que alguns domínios presentes nas alças que conectam as hélices transmembrana e na região C-terminal estão envolvidos com a saída da proteína do retículo endoplasmático e secreção da proteína Gap1p até a membrana plasmática.

Dessa forma, para avaliar se as mutações introduzidas na permease Agt1p afetaram o tráfego intracelular até a membrana, nós fusionamos o epítipo *GFP* na extremidade C-terminal de Agt1p através de recombinação homóloga, o que nos possibilitou acompanhar a localização celular das permeases normais e mutantes (PETRACEK; LONGTINE 2002; STAMBUK, 2002). O mesmo procedimento descrito por Trichez (2007) para a construção dos plasmídeos E120A-GFP, D123G-GFP e R504A-GFP, foi adotado para fusionar a *GFP* nos plasmídeos pGRSd-AGT1, E167A e D123G/E167A. Um fragmento linear de $\approx 2,4$ kb foi gerado por PCR, portando o gene *GFP* e o gene *Kan^r* flanqueados por regiões homólogas a porção C-terminal do *AGT1* e ao terminador *PGK* localizado após o gene *AGT1* presente no plasmídeo

pGRSd-AGT1 (Figura 19-A). As colônias selecionadas após transformação com o módulo GFP-KanMX6 foram verificadas quanto à correta integração do módulo e um fragmento de $\approx 2,1$ kb foi amplificado a partir dos plasmídeos contendo a correta fusão de *AGT1-GFP* (Figura 19-B).

Figura 19 - Construção do módulo GFP-KanMX6 e confirmação da correta integração do módulo nos plasmídeos.

Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação por PCR: (A) do módulo de fusão GFP-KanMX6 (linhas 1 e 2), com $\approx 2,4$ Kb; e gel representativo da confirmação (B) da fusão da *GFP* na extremidade 3' do *AGT1* presente nos plasmídeos. Linhas: 1 - pGRSd-AGT1-GFP; 2 - E167A-GFP; 3 - D123G/E167A-GFP. Em ambos painéis, na linha P encontramos o marcador molecular 1 Kb.

FONTE: Trichez (2012).

Analisando as células de levedura portando os distintos plasmídeos-GFP através de microscopia de fluorescência (Figura 20), pode-se verificar a presença de fluorescência em toda superfície celular das leveduras contendo os diferentes plasmídeos, o que indica que as mutações em questão não alteraram a correta síntese e localização da proteína transportadora. Cabe salientar que células da linhagem LCM003 carregando os diferentes plasmídeos mutantes fusionados à GFP mostraram os mesmos fenótipos na utilização de maltotriose já descritos anteriormente.

Figura 20 - Localização da permease Agt1p fusionada a GFP em células da cepa LCM003 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Fotomicrografias representativas das células de levedura carregando, respectivamente, a permease normal (A e G) ou mutantes E120A-GFP (B e H), D123G-GFP (C e I), E167A-GFP (D e J), R504A-GFP (E e K) e D123G/E167A-GFP (F e L). Os painéis A-F mostram imagens de fluorescência, enquanto G-L são micrografias em contraste de fase.

FONTE: Trichez (2012).

Portanto, os resultados obtidos neste estudo indicam que os aminoácidos Glu-120, Asp-123, Glu-167 e Arg-504 estão envolvidos com o simporte açúcar- H^+ realizado pela permease Agt1p de *Saccharomyces cerevisiae*. Tais dados estão de acordo com trabalhos já publicados referentes à caracterização do mecanismo de co-transporte de outros transportadores da superfamília MFS.

Recentemente, FucP, proteína responsável pela captação de fucose em *E. coli*, teve sua estrutura determinada (DANG et al., 2010). Tanto a análise estrutural e computacional, como os dados bioquímicos referentes ao transportador de fucose, mostram que dois resíduos ácidos (Asp-46 e Glu-135) são essenciais para o transporte ativo realizado pela permease, mais especificamente para as etapas de protonação e desprotonação da permease durante o co-transporte (DANG et al., 2010). No modelo de transporte sugerido para o simporte fucose- H^+ , Glu-135 parece também estar envolvido com a ligação e/ou reconhecimento do substrato, sendo que a mudança conformacional provocada pela presença dos ligantes parece desencadear a alteração da orientação da permease. Neste sentido, quando a proteína está orientada com a face voltada para o periplasma é observada a formação de uma ponte de hidrogênio entre Glu-135 e Tyr-365, porém na presença dos ligantes, esta interação é quebrada, gerando, em combinação com outros fatores, uma mudança conformacional da proteína para a orientação com a face voltada para o interior seguido da liberação dos substratos (DANG et al., 2010).

No caso do transportador codificado pelo gene *LacY* (ABRAMSON et al., 2003; FRILLINGOS; SAHIN-TOTH; KABACK, 1998; GUAN; KABACK, 2006; MIRZA et al., 2006; SAHIN-

TOTH; KARLIN; KABACK, 2000; VENKATESAN; KABACK, 1998), diversos estudos mostraram que resíduos de glutamato, arginina e histidina são indispensáveis para o simporte lactose- H^+ efetuado por essa permease de *E. coli*. Segundo Huang et al. (2003), dois resíduos de arginina são indicados como os responsáveis pela ligação do substrato durante o processo de transporte mediado pelo transportador glicerol-3-fosfato (GlpT), o qual catalisa o antiporte de fosfato citoplasmático por glicerol-3-fosfato do meio externo. Ainda Vadyvaloo et al. (2006) demonstrou que o transportador de sacarose (CscB) de *E. coli* possui uma organização estrutural dos resíduos envolvidos na ligação do açúcar e na translocação do H^+ semelhante ao transportador LacY, e estes resíduos, quando substituídos por mutagênese sítio-dirigida, refletiram em diferenças na especificidade e na afinidade pelo substrato. Já no caso da mutação do resíduo Glu-270 de CscB ocorreu abolição da atividade de transporte de sacarose.

A disponibilidade da estrutura de LacY por raio-X tem permitido a construção de modelos teóricos tridimensionais para diferentes transportadores MFS (KASHO; SMIRNOVA; KABACK, 2006; VADYVALOO et al., 2006). Utilizando-se do alinhamento entre as sequências de Agt1p e LacY, bem como das coordenadas da estrutura 3D de LacY, foi construído um modelo tridimensional para a permease Agt1p (TRICHEZ, 2007). Consistente com a predição da estrutura secundária, o modelo teórico mostra que o Agt1p contém 12 segmentos transmembrana, com os domínios N e C-terminal localizados para o lado citoplasmático. De forma semelhante aos transportadores da superfamília MFS, estes segmentos estão organizados em 2 blocos de 6 TMs, sendo que os TMs 1, 2, 4 e 5 da porção N-terminal e os TMs 7, 8, 10 e 11 da porção C-terminal formam uma cavidade hidrofílica central (Figura 21). Como pode ser observado no modelo estrutural da permease Agt1p, os resíduos estudados no presente trabalho (E120, D123, E167, R504 e I505) localizam-se próximos a cavidade hidrofílica por onde ocorre a translocação do substrato. Então, a princípio, esses resíduos poderiam participar ativamente do processo de transporte mediado pelo Agt1p. Diferentemente do padrão observado para a permease LacY (KASHO; SMIRNOVA; KABACK, 2006), os resíduos envolvidos com a translocação do H^+ estão localizados nas hélices da porção N-terminal (TMs 1 e 2), enquanto que na porção C-terminal são encontrados os resíduos relacionados a especificidade pelo açúcar, no caso Arg-504 e Ile-505 (TM 11). Similar perfil parece estar presente também no transportador FucP (DANG et al., 2010).

Nossos dados demonstram que a substituição de Arg-504 por um resíduo neutro aboliu completamente a atividade de transporte da permease Agt1p, conforme pode ser observado pela ausência da atividade de transporte de *p*NPαG (Figura 14) e de outros α-glicosídeos (Figura 15) e pela incapacidade da cepa de utilizar maltotriose (Figura 13). Portanto, este resíduo parece ser essencial para a ligação do substrato e/ou processo catalítico envolvido no transporte.

Figura 21 - Representação do modelo estrutural da permease Agt1p.

O modelo teórico do transportador Agt1p foi construído por comparação com a estrutura conhecida de LacY. A) Visão lateral da proteína mostrando as posições relativas das hélices. B) Visão frontal da permease mostrando os 12 TMs formando a cavidade hidrofílica e a localização dos resíduos E120, D123, E167, R504 e I505 próximos a cavidade.

FONTE: Trichez (2012).

Guan e Kaback (2006) observaram que mutações em resíduos importantes para a ligação do açúcar tendem à inativar o transportador, enquanto que permeases mutantes nos resíduos envolvidos com a ligação do próton geralmente continuam catalisando o transporte do açúcar, porém com alterações na afinidade. Tanto para o mutante E120A, como para os D123G e E167A, observou-se que a translocação do próton foi mais afetada, visto que todos estes mutantes são capazes de utilizar maltotriose (Figura 13) ou transportar outros açúcares (Figura 15), porém com reduzidas velocidades de transporte. Isto sugere o envolvimento desses resíduos na translocação do próton. Devido as suas cargas negativas,

poderíamos especular que participariam do movimento do próton que é co-transportado com o açúcar através da permease Agt1p.

A modificação da Ile-505 por uma treonina permitiu o crescimento da cepa em maltotriose, mostrando um perfil semelhante ao da cepa contendo a permease normal (Figura 13). No entanto, foram observadas velocidades um pouco reduzidas para o transporte de açúcares, indicando que este resíduo de aminoácido possa participar da interação e/ou reconhecimento do substrato, na etapa inicial da translocação. Smit et al. (2008) demonstraram que os resíduos Thr-505, Val-549 e Ser-557 são diretamente relacionados a eficiência do transporte de maltotriose na cepa WH310 – uma linhagem industrial utilizada na fabricação de “whisky”. Mutantes que tiveram substituída a Thr-505 por uma isoleucina mostraram completa redução na atividade de transporte, sugerindo o papel desse resíduo na interação com a maltotriose durante a passagem do açúcar pela cavidade hidrofílica, uma vez que se localiza no TM-11, TM que participa da formação do canal por onde ocorre a translocação. Vale ressaltar que a presença de uma Ile-505 é observada na sequência do Agt1p de outras linhagens expressando permeases Agt1p completamente funcionais (por exemplo, WH314 e CENPK), de forma que o fenótipo diferenciado da linhagem WH310 pode ser resultado do efeito de algumas mutações combinadas (ALVES-JR et al., 2008; SMIT; CORDERO-OTERO; PRETORIUS, 2007).

Considerando todas as observações apresentadas no presente trabalho e os dados publicados para os transportadores FucP, GltT e LacY (ABRAMSON et al., 2003; DANG et al., 2010; GUAN; KABACK, 2006; HUANG et al., 2003; MIRZA et al., 2006), propomos um mecanismo para o simporte açúcar- H^+ realizado pela permease Agt1p (Figura 22). Na ausência do açúcar, o transportador Agt1p na conformação com a face voltada para o periplasma possivelmente teria o resíduo Glu-167 protonado. O açúcar é então reconhecido pela região envolvendo este resíduo e também Arg-504, Ile-505 e possivelmente Tyr-507 (resíduo posicionado na permease Agt1p de uma maneira similar a Trp-151 de LacY). Uma vez ligado o substrato, o próton passa a ser partilhado entre Glu-167 e Asp-123. Ocorreria a formação de uma ponte salina entre Arg-504 e Glu-167, provocando a desprotonação do resíduo Glu-167, fazendo com que o próton passe a ser partilhado entre os resíduos Asp-123 e Glu-120. Isto provocaria a mudança conformacional para a orientação da proteína com a face voltada para o citoplasma. Por fim, o substrato é liberado para o lado interno da membrana celular e a ponte salina entre Arg-504 e Glu-167 é quebrada. Então, o próton é

finalmente liberado para o citoplasma e a conformação da permease volta para a orientação com a face da proteína voltada para o periplasma.

Figura 22 - Mecanismo proposto para o simporte açúcar- H^+ promovido pela permease Agt1p.

Resíduos de aminoácidos importantes para a atividade estão representados na figura. O próton (H^+) e o substrato (S) estão mostrados em verde e vermelho, respectivamente. **(A)** Na conformação com a face voltada para o periplasma, provavelmente E167 estaria protonado **(B)**. O açúcar é reconhecido por I505, R504 e E167 e o H^+ é partilhado entre E167 e D123 **(C)**. Uma ponte salina é formada entre R504 e E167 e, então, o H^+ passa a ser partilhado entre os resíduos E120 e D123 **(D)**. Isto provoca a mudança conformacional da proteína, para a face voltada para o interior do citoplasma. O substrato é liberado para o lado interno da membrana e a ponte salina é rompida **(E)**. Finalmente, o H^+ é liberado **(F)** e a proteína volta para a conformação com a face voltada para o periplasma **(A)**.

FONTE: Trichez (2012).

4.2 Aminoácidos envolvidos com a inativação catabólica da permease Agt1p

A levedura *S. cerevisiae* utiliza preferencialmente a glicose como fonte de carbono. Isso pode ser compreendido levando em consideração que o seu transporte através da membrana ocorre por difusão facilitada, sem requerer consumo de energia comparado aos sistemas de transporte do tipo simporte com H^+ . Observa-se também que algumas enzimas e transportadores apresentam uma maior afinidade por este açúcar. Somando-se a isto, a presença da glicose provoca a repressão transcricional de genes e a regulação pós-traducional e/ou inativação de enzimas e proteínas transportadoras envolvidas com a utilização de outras fontes de carbono. Esse controle pós-traducional das permeases exercido pela glicose é denominado inativação catabólica e envolve a fosforilação, ubiquitinação e degradação dos transportadores (GADURA; MICHELS, 2006; GANCEDO,

1998; HICKE, 1999; HORAK; WOLF, 1997; LUCERO; HERWEIJERB; LAGUNAS, 1993; LUCERO; LAGUNAS, 1997; MEDINTZ et al., 1996, 2000).

Vários aspectos sobre a inativação dos transportadores de maltose já foram elucidados (BRONDIJK et al., 1998; GADURA; MICHELS, 2006; HATANAKA et al., 2009; LUCERO; LAGUNAS, 1997; MEDINTZ et al., 1996, 2000). Dessa forma, neste trabalho, nós buscamos investigar os domínios que estariam envolvidos com a inativação catabólica do transportador Agt1p, que é a permease responsável pela eficiente utilização de maltotriose em células de *S. cerevisiae* (ALVES-JR et al., 2008; ALVES-JR, 2010) e, no entanto, nenhum dado referente a este aspecto se encontra disponível na literatura.

Para analisar os resíduos de aminoácidos que estariam envolvidos com o processo de inativação catabólica promovido pela glicose de Agt1p, construímos permeases mutantes em resíduos específicos da proteína transportadora e analisamos o impacto dessas modificações no fenótipo da levedura. Esses resíduos foram identificados como candidatos à mutagênese através da comparação com dados da literatura (BRONDIJK et al., 1998; GADURA; MICHELS, 2006; HATANAKA et al., 2009; MEDINTZ et al., 2000) e as respectivas sequências de proteína depositadas no Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>).

Conforme pode ser observado na Figura 23, os resíduos de aminoácidos da permease Mal61p, que foram caracterizados como aminoácidos importantes na inativação catabólica desse transportador, apresentam resíduos correspondentes na permease Agt1p. Medintz et al. (2000) e posteriormente Gadura e Michels (2006), mostraram que um domínio di-leucina presente na região N-terminal da permease Mal61p estaria relacionado ao correto direcionamento da proteína para degradação. Enquanto que os resíduos Ser-295 e Thr-363 estariam envolvidos com a perda da atividade de transporte e degradação da proteína (BRONDIJK et al., 1998). Um provável motivo di-leucina também é encontrado na permease Agt1p, porém em uma região um pouco mais adiante na sequência de aminoácidos. Resíduos idênticos e alinhados a Ser-295 e Thr-363 de Malx1p também foram identificados na permease Agt1p (Ser-301 e Thr-369). Estudos mais recentes de Hatanaka et al. (2009) demonstram que a presença dos resíduos Gly-46 e His-50 na permease Mal21p torna a proteína mais resistente à degradação induzida por glicose. No alinhamento, observamos que, na permease Agt1p, estes resíduos foram substituídos por um ácido glutâmico (Glu-51) e por uma leucina (Leu-55).

Figura 25 - Confirmação da mutação nos aminoácidos L100 e L101 da permease Agt1p.

A) Eletroforese em gel de agarose 1% da hidrólise do DNA com a enzima *NotI* mostrando os diferentes perfis de digestão entre o *AGT1* amplificado a partir do plasmídeo pGRSd-AGT1-GFP (portanto o gene *AGT1* normal) e de plasmídeos L100A/L101A-GFP. Linhas: P- marcador molecular 1Kb; 1 - pGRSd-AGT1-GFP; 2 - pGRSd-AGT1-GFP digerido com *NotI*; 3, 5, 7, 9 e 11 - plasmídeos L100A/L101A-GFP; 4, 6, 8, 10 e 12 - respectivos plasmídeos L100A/L101A-GFP digeridos com a enzima. Confirmação da mutação nos plasmídeos representados nas linhas 3/4, 7/8, 9/10. B) Eletroferograma do sequenciamento parcial do gene *AGT1*, confirmando as mutações. Os códons modificados (TTG → GCC e CTA → GCA) estão indicados na figura (caixa).

FONTE: Trichez (2012).

Figura 26 - Confirmação da mutação no aminoácido S301 da permease Agt1p.

NOTA: Eletroferograma do sequenciamento parcial do gene *AGT1*, confirmando a mutação S301A. O códon modificado (TCG → GCT) está indicado na figura (caixa). A numeração presente se refere à posição dos nucleotídeos obtidos na reação de sequenciamento.

FONTE: Trichez (2012).

Uma vez confirmadas as mutações no gene *AGT1*, a cepa LCM003 (*agt1Δ*) foi transformada com os plasmídeos portando as diferentes modificações (plasmídeos denominados E51G/L55H-GFP, L100A/L101A-GFP, S301A-GFP e T369A-GFP), como também com o plasmídeo controle pGRSd-AGT1-GFP (que carrega o gene *AGT1* normal).

Figura 27 - Confirmação da mutação no aminoácido T369 da permease Agt1p.

A) Eletroforese em gel de agarose 1% da hidrólise do DNA com a enzima *SacI* mostrando os diferentes perfis de digestão entre o plasmídeo pGRSd-AGT1-GFP (portanto o gene *AGT1* normal) e plasmídeos T369A-GFP. Linhas: P- marcador molecular 1Kb; 1 - pGRSd-AGT1-GFP; 2 - pGRSd-AGT1-GFP digerido com *SacI*; 3, 5 e 7 - plasmídeos T369A-GFP; 4, 6 e 8 - respectivos plasmídeos T369A-GFP digeridos com a enzima. Confirmação da mutação no plasmídeo representado nas linhas 7/8. B) Eletroferograma do sequenciamento parcial do gene *AGT1*, confirmando a mutação T369A. O códon modificado (ACG → GCT) está indicado na figura (caixa). A numeração presente se refere à posição dos nucleotídeos obtidos na reação de sequenciamento.

FONTE: Trichez (2012).

Iniciamos a caracterização do fenótipo destes mutantes através da análise do crescimento das células em frascos Erlenmeyer, contendo meio sintético com 2% de maltose ou maltotriose como fonte de carbono, durante aproximadamente 100 horas de incubação. Neste ensaio, amostras foram retiradas em tempos determinados durante o crescimento das células, para posterior dosagem de consumo de açúcar e produção de etanol. Os dados apresentados na Figura 28 demonstram que as células foram capazes de fermentar eficientemente a maltose, consumindo o açúcar em aproximadamente 25 h de incubação. Conforme esperado, a fermentação de maltose não foi alterada pelas modificações inseridas na permease Agt1p (Figura 28), já que se verifica um mesmo perfil de utilização do açúcar para as células carregando as distintas mutações, o que está condizente com os dados já descritos para a cepa LCM003 (ALVES-JR et al., 2008; ENTIAN; KOTTER, 1998), que possui outros transportadores de maltose codificados pelos genes *MALx1*, com alta afinidade para este açúcar e que seriam os responsáveis pelo transporte através da membrana nestas células, como já exposto anteriormente.

Figura 28 - Utilização de maltose pela cepa LCM003 contendo a permease Agt1p normal ou as permeases mutantes derivadas.

Nos tempos indicados, alíquotas dos meios foram retiradas e utilizadas para a determinação do crescimento (A), do consumo de maltose (B) e da produção de etanol (C) pela cepa LCM003 portando os diferentes plasmídeos, em meio sintético contendo 2% de maltose como fonte de carbono.

FORTE: Trichez (2012).

Tabela 2 - Parâmetros fisiológicos da linhagem LCM003 portando os diferentes plasmídeos, crescida em frascos agitados contendo meio sintético sem uracila e 2% de açúcar.

Parâmetros fisiológicos ^(a)	LCM003				
	pGRSd-AGT1-GFP	E51G/L55H-GFP	L100A/L101A-GFP	S301A-GFP	T369A-GFP
Maltose					
tg (h)	4,23	4,34	4,14	4,23	4,24
μ_x^{exp} (h ⁻¹)	0,164	0,160	0,167	0,164	0,163
μ_{Mal}^{exp} (h ⁻¹)	0,755	0,550	0,696	0,691	0,783
μ_{Et}^{exp} (h ⁻¹)	0,513	0,370	0,414	0,383	0,480
$Y_{X/S}^{exp}$ (gX.gMal ⁻¹)	0,217	0,289	0,241	0,237	0,209
$Y_{Et/S}^{exp}$ (gEt.gMal ⁻¹)	0,319	0,429	0,401	0,427	0,339
Maltotriose					
tg (h)	4,17	4,41	4,06	9,51	4,13
μ_x^{exp} (h ⁻¹)	0,166	0,157	0,171	0,073	0,168
μ_{Mtt}^{exp} (h ⁻¹)	0,455	0,570	0,412	0,174	0,471
μ_{Et}^{exp} (h ⁻¹)	0,751	0,722	0,755	- ^(b)	1,010
$Y_{X/S}^{exp}$ (gX.gMtt ⁻¹)	0,366	0,276	0,414	0,419	0,357
$Y_{Et/S}^{exp}$ (gEt.gMtt ⁻¹)	0,221	0,218	0,226	- ^(b)	0,166

^(a) tg = tempo de geração celular, expresso em h; μ_x = velocidade específica de crescimento, expresso em h⁻¹; μ_{Mal} = velocidade específica de consumo de maltose, expresso em h⁻¹; μ_{Mtt} = velocidade específica de consumo de maltotriose, expresso em h⁻¹; μ_{Et} = velocidade específica de formação de etanol, expresso em h⁻¹; $Y_{X/S}$ = rendimento na conversão de substrato a células, expresso em g de massa celular formada por g de açúcar consumido (gX.gMal⁻¹ ou gX.gMtt⁻¹); $Y_{Et/S}$ = Rendimento na conversão de substrato a etanol, expresso em g de etanol formado por g de açúcar consumido (gEt.gMal⁻¹ ou gEt.gMtt⁻¹).

^(b) Não determinado.

FORTE: Trichez (2012).

Por outro lado, as mutações inseridas provocaram alterações na utilização de maltotriose pela levedura (Figura 29). A presença da dupla mutação E51G/L55H permitiu uma utilização mais eficiente do açúcar pelas células de *S. cerevisiae*: apesar do crescimento e consumo do açúcar ser similar ao padrão da levedura contendo a permease Agt1p normal (apenas consumo ligeiramente mais rápido e crescimento um pouco menor), ocorreu um aumento na produção de etanol de aproximadamente 25%. Estes resultados sugerem que as células carregando a permease mutante E51G/L55H-GFP estão direcionando uma maior parte da fonte de carbono internalizada para o metabolismo fermentativo. Aspecto que também pode ser observado avaliando os parâmetros fisiológicos (Tabela 2): observa-se que estas células apresentaram uma maior velocidade específica de consumo de maltotriose ($\mu_{Mtt}^{exp} = 0,570 \text{ h}^{-1}$) e um menor rendimento de conversão substrato à células ($Y_{X/S}^{exp} = 0,276 \text{ gX.gMtt}^{-1}$) quando comparado as células portando a permease normal ($\mu_{Mtt}^{exp} = 0,455 \text{ h}^{-1}$ e $Y_{X/S}^{exp} = 0,366 \text{ gX.gMtt}^{-1}$).

Para os mutantes L100A/L101A e T369A outro padrão foi verificado. As células cresceram e consumiram maltotriose, porém a produção de etanol caiu aproximadamente 20% e 40%, respectivamente, em relação às leveduras portando o Agt1p normal. A velocidade específica de crescimento ($\mu_x^{exp} = 0,171 \text{ h}^{-1}$), resultando em um tempo de geração ligeiramente inferior ($tg = 4,06 \text{ h}$), e o aumento de 10% do rendimento na conversão de substrato à células ($Y_{X/S}^{exp} = 0,414 \text{ gX.gMtt}^{-1}$) nas leveduras portando a mutação L100A/L101A, indicam que um fluxo maior do açúcar estaria sendo direcionado para o crescimento celular, através do metabolismo aeróbico. Em contrapartida, como mostra a Figura 29, os mutantes T369A apresentaram uma menor velocidade de consumo global de maltotriose e uma menor produção de etanol, corroborando com os resultados obtidos para $Y_{X/Et}^{exp}$, visto que estes mutantes apresentaram um rendimento na conversão de substrato a etanol 25% menor (T369A-GFP: $Y_{Et/S}^{exp} = 0,166 \text{ gEt.gMtt}^{-1}$ e levedura padrão: $Y_{Et/S}^{exp} = 0,221 \text{ gEt.gMtt}^{-1}$). No entanto, quando avaliamos a velocidade específica de consumo da maltotriose (μ_{Mtt}^{exp}), calculado para a fase exponencial do crescimento, não observamos diferenças tão significativas com as células portando a permease normal.

Figura 29 - Utilização de maltotriose pela cepa LCM003 contendo a permease Agt1p normal ou as permeases mutantes derivadas.

Nos tempos indicados, alíquotas dos meios foram retiradas e utilizadas para a determinação do crescimento (A), do consumo de maltotriose (B) e da produção de etanol (C) pela cepa LCM003 portando os diferentes plasmídeos, em meio sintético contendo 2% de maltotriose como fonte de carbono.

FONTE: Trichez (2012).

Em relação à utilização de maltotriose pelas células de leveduras contendo a permease mutada no resíduo S301 (substituição da serina por uma alanina), observa-se um menor crescimento e consumo lento do açúcar, sem produção de etanol, indicando um metabolismo respiratório nestas células (Figura 29). Os parâmetros fisiológicos obtidos reforçam o perfil respiratório apresentado pelas células. Como consta na Tabela 2, estas células apresentaram uma menor velocidade específica de crescimento (μ_x^{exp}), dobrando o tempo de geração e uma menor velocidade específica de consumo da maltotriose (S301A-GFP: $\mu_{\text{Mtt}}^{\text{exp}} = 0,174 \text{ h}^{-1}$ e levedura padrão: $\mu_{\text{Mtt}}^{\text{exp}} = 0,455 \text{ h}^{-1}$), o que provavelmente resultou na ausência da produção de etanol, uma vez que o menor fluxo glicolítico tende a levar as células a realizar o metabolismo aeróbico (POSTMA et al., 1989; SALEMA-OOM et al., 2005; ZASTROW et al., 2001).

A atividade de transporte da permease Agt1p foi avaliada através do ensaio colorimétrico com *pNPαG* - substrato sintético específico para esse transportador (vide HOLLATZ; STAMBUK, 2001 ou Material e Métodos). Com o intuito de obter células na mesma condição fisiológica e não reprimidas, nós crescemos as leveduras em meio sintético contendo maltose como fonte de carbono, uma vez que estas utilizaram o açúcar de maneira similar, mesmo contendo os diferentes plasmídeos (vide Figura 28). Em concordância com os dados de utilização de maltotriose pelas células, a capacidade de

transporte de *pNPαG* através da permease foi alterada pelas distintas mutações, com efeito mais pronunciado nos mutantes S301A-GFP e E51G/L55H-GFP. Como mostra a Figura 30, o mutante S301A-GFP apresentou uma acentuada queda na atividade de transporte ($\approx 80\%$), enquanto que a presença da dupla mutação E51G/L55H levou a um aumento maior do que 100% na atividade de transporte comparado ao Agt1p normal. Esses resultados ajudam a explicar o perfil de utilização de maltotriose mostrado por estas células durante o ensaio de crescimento, já que uma maior atividade de transporte do substrato promovido pela permease pode resultar num incremento da produção de etanol (mutante E51G/L55H-GFP) e, em contrapartida, o lento consumo de maltotriose observado para o mutante S301A-GFP está de acordo com a menor atividade de transporte de *pNPαG* apresentada pelas células. Já os mutantes L100A/L101A-GFP e T369A-GFP apresentaram atividades de transporte de *pNPαG* similares à permease normal, porém com valores ligeiramente inferiores.

Figura 30 - Atividade de transporte da permease Agt1p.

A atividade de transporte da permease codificada pelo gene *AGT1* e pelos respectivos mutantes presentes na cepa LCM003 foi determinada após o crescimento das leveduras em meio sintético, contendo 2% de maltose e utilizando o substrato sintético *pNPαG*, como descrito em Material e Métodos.

FONTE: Trichez (2012).

Como este ensaio é dependente da hidrólise intracelular do substrato pela enzima α -glicosidase (maltase), avaliamos também esta atividade enzimática (utilizando *pNPαG* como substrato) nas mesmas células utilizadas para a determinação da atividade da permease Agt1p. Os resultados obtidos demonstram que a hidrólise de *pNPαG* foi similar em todas as

células (atividade de maltase acima de $2.000 \text{ nmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), portando a permease Agt1p normal ou mesmo as mutações nos resíduos selecionados (dados não mostrados).

Em seguida, iniciamos a análise do impacto das mutações no processo de inativação catabólica promovido pela glicose. O efeito repressor da glicose no metabolismo de fontes alternativas de carbono é observado em muitos organismos. Em *S. cerevisiae*, observa-se que a adição de glicose em células que estão fermentando maltose provoca a repressão da transcrição dos genes envolvidos com o metabolismo deste açúcar e a rápida inativação e degradação dos transportadores Malx1p (GADURA; MICHELS, 2006; GANCEDO, 1998; HATANAKA et al., 2009; JIANG et al., 2000; MEDINTZ et al., 1996). Dessa forma, para estimar a taxa de inativação das permeases Agt1p normal ou mutante, nós crescemos estas células portando os distintos plasmídeos em meio sintético contendo 2% de maltotriose, suplementado com diferentes concentrações de 2-deoxi-glicose (2-DOG), um composto análogo a glicose. Apesar de 2-DOG não ser assimilada como fonte de carbono pela levedura, ela é capaz de induzir a degradação dos transportadores Malx1p e Agt1p de forma similar ao efeito causado pela glicose, como também já foi observado por Brondijk et al. (1998) e Stambuk (2002).

Conforme pode ser visualizado no crescimento das leveduras em meio sólido (Figura 31), mesmo na presença de 2 mM de 2-DOG, o mutante E51G/L55H-GFP apresentou um pronunciado crescimento em maltotriose, indicando uma maior resistência dessa permease à inativação induzida por glicose, o que poderia ser explicado por uma maior estabilidade da proteína mutante na membrana plasmática da célula. Esse resultado é endossado pelos ensaios de crescimento (Figuras 28 e 29) e determinação da atividade de transporte da permease Agt1p (Figura 30), onde se observou um acentuado aumento no transporte de *pNPαG* mediado por esta permease mutante e uma maior produção de etanol, que seriam justificados pelo aumento do número de transportadores funcionais na superfície celular. Já os mutantes L100A/L101A-GFP, S301A-GFP e T369A-GFP apresentaram um crescimento limitado na presença de 2 mM de 2-DOG, sendo que os mutantes L100A/L101A-GFP e T369A-GFP mostraram um crescimento comparável a cepa portando a permease normal, cujo crescimento em maltotriose sofreu influência da presença e concentração de 2-DOG no meio de cultura.

Figura 31 - Resistência à degradação induzida por glicose da permease Agt1p normal ou mutantes.

As células portando os distintos plasmídeos (pGRSd-AGT1-GFP, E51G/L55H-GFP, L100A/L101A-GFP, S301A-GFP ou T369A-GFP) foram crescidas em meio sintético sem uracila, contendo maltose como fonte de carbono. As leveduras foram coletadas, lavadas com água e ressuspensas para uma $Abs_{600nm} = 3,0$. Em seguida, a suspensão celular e suas diluições seriadas de 10X, foram inoculadas em placas de Petri, contendo meio sintético com 2% de maltotriose, suplementadas com 2-DOG nas concentrações descritas acima. As placas foram incubadas a 28 °C, por 4 dias, antes de serem fotografadas.

FONTE: Trichez (2012).

Com o intuito de investigar detalhadamente os efeitos das mutações inseridas na inativação catabólica da permease Agt1, induzimos essa regulação através de um ensaio de exposição à glicose. As células foram crescidas até a fase exponencial em maltose, lavadas e ressuspensas em meio com limitada fonte de nitrogênio contendo 2% de glicose e 30 µg/mL de cicloheximida (CHX). A cicloheximida foi utilizada como inibidor de síntese protéica, assim, a tradução de novas proteínas foi bloqueada, permitindo um melhor acompanhamento do processo de inativação induzido pela glicose, dos transportadores que se localizavam na membrana celular. Nos tempos determinados, alíquotas da cultura celular foram retiradas para determinação da atividade de transporte das permeases e das α -glicosidases e também para posterior análise por Western Blot dos níveis de proteína.

A Figura 32 mostra que as células contendo o transportador Agt1p normal, pré-crescidas em maltose, perdem rapidamente sua atividade de transporte quando transferidas para um meio com glicose. Em apenas 2 horas de incubação em glicose, verifica-se uma queda de aproximadamente 80% na atividade de transporte do Agt1p e semelhante redução é observada nos níveis de proteína, quando analisadas por Western Blot usando o anticorpo Anti-GFP (Figura 34). Uma severa redução na atividade de transporte de *pNP α G* também é observada para as células que portam o plasmídeo E51G/L55H-GFP ou S301A-GFP. Entretanto, características muito distintas são apresentadas por estes mutantes. Apesar do mutante E51G/L55H apresentar uma alta taxa de inativação e de proteólise da permease ao longo do tempo, este mutante ainda mantém uma atividade de transporte correspondente a 65% da atividade normal apresentada pelo Agt1p em condições de não-repressão (Figuras 33 e 34). Em contrapartida, a glicose falhou em induzir a proteólise da permease nas células portando a mutação S301A, mostrando níveis estáveis da proteína mesmo após 3 horas de incubação com glicose (Figura 34).

Já as leveduras transformadas com os plasmídeos L100A/L101A-GFP ou T369A-GFP, mantiveram aproximadamente 50% da atividade de transporte de *pNP α G* após a exposição à glicose (Figura 32). Dessa forma, observa-se uma redução significativa nas taxas de inativação dessas permeases mutantes, alteração que também é observada na maior resistência das proteínas à degradação promovida pela glicose, como mostrado na Figura 34, cujos níveis de proteínas encontram-se estabilizados após a segunda hora de incubação com o açúcar repressor.

Figura 32 - Inativação catabólica do transportador Agt1p.

A cepa LCM003 portando os diferentes plasmídeos foi pré-crescida em maltose até a fase exponencial. As células foram colhidas e transferidas para um meio com deficiência de nitrogênio contendo 2% de glicose. A atividade de transporte de $pNP\alpha G$ pelas permeases (●), atividade da α -glicosidase (○) e a diluição do crescimento (□) foram determinadas nos tempos indicados (0, 1, 2 e 3 horas). Os valores obtidos no tempo 0h correspondem a 100% do valor inicial.

FONTE: Trichez (2012).

Figura 33 - Representação comparativa das atividades de transporte de $pNP\alpha G$ pelas permeases durante a inativação catabólica promovida pela glicose.

Comparação das atividades de transporte de $pNP\alpha G$ apresentadas pela cepa LCM003 portando os diferentes plasmídeos, no tempo inicial (zero) e após 3 horas de exposição à glicose.

FONTE: Trichez (2012).

Figura 34 - Degradação da permease Agt1p normal e das proteínas mutantes.

Alíquotas contendo 10 mg de células foram coletadas durante o ensaio de inativação, nos tempos indicados. Os extratos celulares foram preparados como descrito na seção Material e Métodos e as proteínas foram separadas por SDS-PAGE 8%. Os transportadores Agt1p normal e mutantes, fusionados a GFP, foram analisados por Western Blot usando o anticorpo anti-GFP.

FONTE: Trichez (2012).

A atividade de hidrólise pela α -glicosidade foi acompanhada nestas mesmas células e nos tempos determinados, não apresentando variação significativa entre as leveduras carregando os diferentes plasmídeos (Figura 32) e, além disso, ocorreu apenas uma pequena redução na atividade da enzima durante o período de exposição à glicose (atividade acima de $1.700 \text{ nmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Em suma, as variações observadas na atividade de transporte de $p\text{NP}\alpha\text{G}$, durante a inativação catabólica dos transportadores, podem ser relacionadas diretamente às mutações introduzidas no Agt1p.

A construção de proteínas fusionadas a GFP também nos permitiu observar a localização celular das permeases durante o processo de inativação catabólica (Figura 35). Em células crescidas em maltose, a fluorescência da proteína normal Agt1p-GFP foi observada na superfície celular, sendo também possível detectar um forte sinal do GFP em compartimentos intracelulares, semelhantes aos vacúolos. Similar localização da proteína em vacúolos intracelulares foi observada para os transportadores Mal61p e parece ser resultante da internalização constitutiva dos transportadores, uma vez que células *end3Δ* ou *doa4Δ* apresentam uma diminuição severa dos sinais de GFP nos vacúolos (GADURA; MICHELS, 2006; GADURA; ROBINSON; MICHELS, 2006). *END3* é um componente do citoesqueleto de actina que auxilia na formação das vesículas endocíticas estimulando a despolarização da actina nos sítios de brotamento das vesículas, enquanto que o gene *DOA4*

codifica para uma hidrolase envolvida na reciclagem da ubiquitina, portanto, estão relacionadas com o processo de internalização de proteínas da membrana plasmática (MEDINTZ; JIANG; MICHELS, 1998). Da mesma forma, o forte sinal nos vacúolos também pode ser relacionado a estabilidade do motivo GFP e maior resistência a degradação vacuolar, como já foi descrito por Gadura e Michels (2006) e Nikko e Pellham (2009). Como demonstrado na Figura 35, a glicose induziu a rápida remoção das permeases Agt1p-GFP que estavam presentes na membrana plasmática e a degradação das proteínas em compartimentos intracelulares, como consequência da endocitose desses transportadores e degradação nos vacúolos da levedura. Em contrapartida, foram observados diferenciados efeitos na distribuição celular da permease, quando avaliadas as células portando as mutações E51G/L55H, L100A/L101A, S301A e T369A após a exposição a glicose.

Brondijk et al. (1998) mostraram que mutantes nos resíduos de possíveis sítios de fosforilação de Mal61p (S295A, T363A e S487A) apresentaram reduzidas taxas de inativação catabólica, porém seus maiores efeitos foram vistos nas taxas de degradação da proteína. Os níveis da proteína permaneceram estáveis, principalmente no mutante S295A, mesmo após sofrer inibição da atividade de transporte em consequência da exposição à glicose. A substituição deste mesmo resíduo por um ácido glutâmico, com o intuito de imitar a fosforilação pela presença da carga negativa, causou a constante endocitose desse transportador. Portanto, a fosforilação de alguns resíduos na permease Mal61p parece preceder a ubiquitinação e endocitose dos transportadores para degradação da proteína em vacúolos. Esse aspecto também foi evidenciado por Gadura, Robinson e Michels (2006), que demonstram o papel relevante da fosforilação de Mal61p via *YCK* para a internalização da proteína: em células *yckΔ*, ou seja, deletadas no gene *YCK* que codifica para uma proteína quinase localizada na membrana celular, observa-se a inibição da proteólise de Mal61p. Em concordância também estão os dados descritos por Gadura e Michels (2006) e Marchal, Haguenaue-Tsapis e Urban-Grimal (1998), que demonstram que proteínas mutadas nas serinas e treoninas da sequência PEST de ambas permeases (Mal61p e Fur4p) se tornaram mais resistentes à degradação.

Levando em consideração esses dados e os resultados obtidos em nosso trabalho, podemos sugerir que a mutação S301A estaria causando uma maior estabilidade da proteína Agt1p na célula, como pode ser notado pelos níveis constantes da proteína na análise por Western Blot (Figura 34), porém este fato não está ligado diretamente a permanência de

apenas proteínas funcionais na membrana, algumas podem já ter sua atividade inibida ou então estar localizadas em vesículas em uma etapa intermediária entre o processo de endocitose e a degradação, o que explicaria a menor atividade de transporte observada pelas células carregando esta mutação. De fato, quando observamos estas células por microscopia (Figura 35), percebemos um acúmulo do sinal do GFP na superfície celular e em compartimentos que precedem o vacúolo, mesmo após a adição de glicose.

Um perfil similar de distribuição celular foi observado para outras proteínas de membrana, como Jen1p, Ste3p, Gap1p, Smf1p e Fur4p, quando o processo de ubiquitinação foi impedido ou prejudicado através de deleções da proteína ubiquitina ligase Rsp5 (mutantes *rsp5Δ*) ou de moléculas adaptadoras – “arrestin-like” – (por exemplo, mutantes *rod1Δ*). Nestas células, não se observa a degradação das proteínas analisadas devido a um impedimento de sua entrada nos corpos multivesiculares, etapa que antecede a fusão com o vacúolo (BECUWE et al., 2012; NIKKO; PELHAM, 2009; NIKKO; SULLIVAN; PELHAM, 2008; STRINGER; PIPER, 2011). No entanto, células *rsp5Δ* têm seus fenótipos re-estabelecidos, mostrando correta internalização e degradação das proteínas nos vacúolos, quando as proteínas são fusionadas a ubiquitina. Desse modo, a ubiquitina sinaliza tanto a endocitose das proteínas de membrana como também serve como um importante sinal para o endereçamento destas para o interior de corpos multivesiculares, os quais, posteriormente, irão se fundir aos vacúolos digestivos (HURLEY; STENMARK, 2011; LEON; ERPAPAZOGLU; HAGUENAUER-TSAPIS, 2008; STRINGER; PIPER, 2011).

Condizente com a importância da fosforilação na regulação da internalização de proteínas de membrana, podemos especular que a fosforilação da Ser-301 poderia servir como um sinal para ubiquitinação e posterior degradação do transportador Agt1p nos vacúolos. Em células portando a mutação S301A, observa-se a presença da proteína na membrana, possivelmente devido à reciclagem constante, e também o seu acúmulo em compartimentos intracelulares, não atingindo o vacúolo para degradação.

Quanto aos mutantes T369A e L100A/L101A, é observada uma menor perda da atividade de transporte destas permeases durante a exposição à glicose, que coincide com os níveis de degradação da proteína (vide Figuras 32 e 34). Brondijk et al. (1998) mostram que o resíduo T363 de Mal61p é fosforilado e, juntamente com a fosforilação de outras serinas e treoninas, marca a proteína para a degradação no vacúolo. A mutação desse resíduo provoca uma redução na taxa de inativação da permease Mal61p, afetando tanto os

níveis de proteólise como de inibição da atividade de transporte. Por outro lado, o motivo dileucina presente em algumas proteínas de membrana parece estar envolvido com as etapas iniciais da endocitose, na formação das vesículas revestidas por clatrin, assim como alguns estudos demonstram a importância desses resíduos para a internalização da permease no vacúolo para degradação (BONIFACINO; TRAUB, 2003; GADURA; MICHELS, 2006; HEIN; ANDRÉ, 1997; KELLY et al., 2008; MEDINTZ et al., 2000).

Figura 35 - Localização celular das permeases fusionadas com GFP durante a inativação catabólica.

Fotomicrografias representativas das células de levedura carregando a permease normal ou mutantes E51G/L55H-GFP, L100A/L101A-GFP, S301A-GFP e T369A-GFP. As células foram crescidas em maltose e no tempo zero, foram colhidas e transferidas para um meio com deficiência de nitrogênio contendo 2% de glicose e cicloheximida. Nos tempos indicados, as células foram coletadas para observação em microscopia confocal e por contraste de fase. Os painéis à esquerda mostram as imagens em contraste de fase.

FONTE: Trichez (2012).

Além disso, considerando a hipótese levantada por Hatanaka et al. (2009), de que os domínios citoplasmáticos N-terminal e a alça maior de Mal61p possam interagir um com o outro e que essa interação estereo-estrutural influenciaria na eficiência da ubiquitinação nesse transportador, podemos atentar/ponderar que o mesmo poderia ocorrer na permease Agt1p. Duas classes de sinais baseados em motivos di-leucinas já foram relacionados com o tráfico intracelular de proteínas, representadas pelos motivos [DE]XXXL[LI] e DXXLL. Resíduos ácidos e sítios de fosforilação adjacentes a essas sequências também parecem interferir no efeito desses sinais para a internalização das proteínas (BONIFACINO; TRAUB, 2003; KELLY et al., 2008). Desta forma, é plausível supor que a estrutura terciária formada por estas duas alças no Agt1p, aproxime a Tre-369 e o motivo di-leucina e que esta treonina quando fosforilada provoque alterações conformacionais que tornam mais acessível esse motivo facilitando a interação com as clatrininas. Junto a isso, como muitas proteínas não apresentam serinas ou treoninas próximas aos motivos di-leucinas, um outro tipo de regulação desses sinais poderia ocorrer com resíduos, que são passíveis de serem fosforilados, mas que se localizam distantes em relação a estrutura primária (BONIFACINO; TRAUB, 2003).

Assim, o possível motivo di-leucina e o resíduo Ter-369 presentes na permease Agt1p parecem estar envolvidos com as etapas iniciais da endocitose do transportador, uma vez que células portando as mutações L100A/L101A e T369A mostram defeitos na distribuição das permeases até o vacúolo, mostrando um acúmulo maior dessas proteínas nas etapas iniciais da endocitose, em estruturas que parecem locais de brotamento de vesículas ou nos endossomos iniciais (Figura 35).

Em relação aos mutantes E51H/L55H, a despeito da taxa de inativação catabólica ser apenas 10% menor que o observado para as células contendo a permease Agt1p normal, observa-se uma maior atividade de transporte por estas permeases, que parece estar relacionada a uma maior estabilidade da proteína na membrana plasmática, já que uma razoável quantidade destes mutantes fusionados a GFP foram observados na superfície celular, mesmo durante a adição de glicose (Figura 35). Esta permanência da permease na membrana celular poderia ser explicada por uma menor susceptibilidade da proteína à ubiquitinação. Como já exposto anteriormente, a ubiquitinação funciona como uma forma de sinalização da célula para a internalização de diversas proteínas, além de estar envolvida com muitos outros processos celulares (HATANAKA et al., 2009; HEIN; ANDRÉ, 1997; HORAK;

WOLF, 1997; LUCERO; LAGUNAS, 1996; MARSHAL; HAGUENAUER-TSAPIS; URBAN-GRIMAL, 1998; MEDINTZ et al., 2000). Há muito tempo já vem se observando que a porção N-terminal das proteínas está diretamente relacionada ao tempo de vida ou *turnover* destas na célula. Em *S. cerevisiae*, resíduos como Cys, Ala, Ser, Thr, Gly, Val e Met, localizados na porção N-terminal das proteínas e próximos a potenciais sítios de ubiquitinação, são considerados estabilizantes e podem diminuir a eficiência de ligação do complexo de ubiquitinação (BACHMAIR; FINLEY; VARSHAVSKY, 1986; VARSHAVSKY, 1996). A presença natural dos resíduos Gly-46 e His-50 em Mal21p tornaram essa proteína mais resistente a inativação catabólica quando comparada aos outros transportadores Malx1p. Conforme descrito por Hatanaka et al. (2009), provavelmente esta característica está diretamente associada a menor quantidade de ubiquitina conjugada à proteína Mal21p observada. Utilizando mutações sistemáticas das regiões intracelulares de Gap1, Merhi et al. (2011) também mostraram que uma sequência de 15 resíduos localizados na porção N-terminal dessa proteína é essencial para que ocorra a ubiquitinação das lisinas 9 e 16 e posterior endocitose do transportador. Mutações nessa sequência promoveram uma maior resistência das proteínas mutantes a endocitose induzida pela presença de amônia.

Em suma, nossos resultados tentam esclarecer a participação dos resíduos de aminoácidos E51, L55, L100 e L101 - localizados nas porções N-terminal - e S301 e T369 - localizados na alça citoplasmática maior - para o processo de inativação catabólica da permease Agt1p. As alterações desses resíduos provocaram grandes impactos na internalização da proteína e, portanto, indicam a importância e envolvimento desses aminoácidos em diferentes etapas da inativação catabólica, que envolve fosforilação, ubiquitinação, endocitose e correto direcionamento da proteína transportadora para a degradação no vacúolo.

Em virtude dos diferentes fenótipos mostrados pelos mutantes – como por exemplo, a maior resistência a inativação induzida pela glicose e a maior atividade de transporte apresentadas pelos mutantes E51G/L55H – decidimos avaliar se estas novas características poderiam contribuir para uma maior produção de etanol ou consumo completo de maltotriose durante a fermentação de meios contendo misturas de açúcares, em proporções similares ao mosto cervejeiro. Para isso, realizamos ensaios fermentativos em frascos agitados, contendo 100 g/L de açúcar total, sendo 65% de maltose, 20% de maltotriose e 15% de glicose. Os resultados obtidos demonstram que as mutações não proporcionaram

um maior rendimento na conversão de substrato a etanol ($Y_{Et/S}^{Glo}$) ou maior produtividade de etanol (P_{Et}), vide Tabela 3. No entanto, conforme pode ser verificado na Figura 36, as leveduras portando os plasmídeos E51G/L55H-GFP e L100A/L101A utilizaram uma maior quantidade de maltotriose: após 28 horas de fermentação, 38 e 32% da maltotriose já havia sido consumida por estas células, respectivamente, em comparação à 18% da maltotriose consumida pelas células carregando o plasmídeo pGRSd-AGT1-GFP. Interessantemente, para o mutante E51G/L55H, observa-se a utilização simultânea dos 3 açúcares presentes no meio - maltose, maltotriose e glicose - aspecto que não é observado para as células portando a permease normal (pGRSd-AGT1-GFP) ou os outros mutantes (S301A, L100A/L101A e T369A). Dessa forma, seria interessante acompanhar a fermentação por um tempo maior, para avaliar se realmente alguns dos mutantes seriam capazes de utilizar completamente a maltotriose.

Tabela 3 - Parâmetros fisiológicos da linhagem LCM003 transformada com os diferentes plasmídeos, obtidos na fermentação em frascos agitados contendo meio sintético e concentração de 100 g/L de açúcar.

LCM003	Parâmetros fisiológicos*	
	P_{Et} [gEt.(L.h) ⁻¹]	$Y_{Et/S}^{Glo}$ (gEt.gS ⁻¹)
pGRSd-AGT1-GFP	5,98	0,4499
E51G/L55H-GFP	4,41	0,4245
L100A/L101A-GFP	4,36	0,4194
S301A-GFP	5,73	0,4286
T369A-GFP	5,86	0,4386

*Os valores de produtividade de etanol (P_{Et}) são expressos em gEt.(L.h)⁻¹ e os valores de rendimento na conversão de substrato a etanol global ($Y_{Et/S}^{Glo}$) são expressos em gEt.gS⁻¹. Para os cálculos de rendimento assumiu-se que a concentração teórica inicial era de 100 g.L⁻¹. Os dados apresentados são referentes aos dados de apenas um experimento.

FONTE: Trichez (2012).

A incompleta utilização de açúcares, principalmente maltotriose, é um grande problema observado nas fermentações de mostos cervejeiros, que pode gerar perdas econômicas em virtude do baixo rendimento de etanol e da obtenção de um produto com grandes quantidades de açúcar residual e com sabor atípico. Com esta preocupação, vários estudos têm abordado a utilização de maltose e maltotriose pelas leveduras, buscando melhorar a capacidade de transporte de açúcares e de fermentação destas células. Novos transportadores foram identificados e caracterizados (DIETVORST; LONDESBOROUGH; STEENSMA, 2005; SALEMA-OOM et al., 2005). Estratégias alternativas têm sido usadas para

aumentar a eficiência de utilização destes açúcares, como por exemplo, a sobre-expressão de transportadores ou a expressão de enzimas extracelulares capazes de hidrolisar esses α -glicosídeos (DIETVORST et al., 2007; STAMBUK et al., 2006), ou ainda a deleção de proteínas do complexo COMPASS, que causam o silenciamento dos genes *MAL* no final do processo fermentativo (HOUGHTON-LARSEN; BRANDT, 2006). Enfim, a somatória de informações disponibilizadas por estes estudos, possibilita uma maior compreensão dos processos fermentativos e da utilização de α -glicosídeos pelas leveduras, além de contribuir para o melhoramento dos processos fermentativos industriais que dependem da eficiente utilização de açúcares por células de *S. cerevisiae*.

Figura 36 - Fermentação em frascos agitados de maltose, maltotriose e glicose pela linhagem LCM003 transformada com os diferentes plasmídeos.

Nos tempos indicados, amostras foram retiradas dos meios para determinação da concentração de açúcar, etanol e biomassa durante a fermentação de 100 g/L de açúcares totais (65% de maltose, 20% de maltotriose e 15% de glicose).

FONTE: Trichez (2012).

4.3 Purificação parcial da permease Agt1p

Com o intuito de desenvolver uma análise estrutural mais detalhada da permease Agt1p de *S. cerevisiae*, pretendíamos purificar a proteína de membrana a partir da cepa LCM003 (*agt1Δ*) que carrega um plasmídeo, o qual apresenta o gene *AGT1* fusionado ao epítipo *GST* em sua porção N-terminal, sob ação de um promotor induzível por galactose (promotor P_{GAL}). A fusão do epítipo *GST* (Glutathione-S-Transferase) é uma técnica amplamente utilizada por possibilitar a purificação da proteína de interesse por cromatografia de afinidade, além de permitir a detecção da atividade da enzima durante todos os passos experimentais.

Inicialmente, construímos o plasmídeo pGRSd-GST-nAGT1. Para isso, sintetizamos um módulo de fusão de *GST* que fosse introduzido na porção N-terminal do *AGT1* por recombinação homóloga, conforme metodologia descrita por Petracek e Longtine (2002), detalhada na seção Material e Métodos. O fragmento linear de DNA com $\approx 2,8$ kb, produzido por PCR, foi utilizado para transformar células de *S. cerevisiae* que já continham o plasmídeo pGRSd-AGT1, sendo que a integração do módulo ocorreu através de recombinação com sequências presentes no plasmídeo (Figura 37). Como demonstrado na Figura 37, o módulo de fusão possuía na sua porção central o gene *Kanr* (gene marcador) e o gene *GST* regulado pelo promotor P_{GAL} e, nas suas extremidades, regiões homólogas ao plasmídeo pGRSd-AGT1, que permitiram a recombinação e integração do módulo no plasmídeo.

As células contendo as modificações esperadas foram selecionadas em meio rico com Geneticina e os plasmídeos foram extraídos para verificação da correta integração do módulo, através de análises por PCR. Nos plasmídeos pGRSd-GST-nAGT1, contendo a correta inserção do módulo, observa-se a amplificação de um fragmento de DNA com ≈ 2700 pb, enquanto que no plasmídeo controle, como esperado, não foi observada amplificação de fragmentos de DNA. Além disso, foi realizado um controle positivo amplificando o locus *AGT1* de ambos plasmídeos, sem ou com *GST* (Figura 38).

Figura 37 - Fusão da *GST* à extremidade N-terminal do *AGT1*.

A) O módulo KanMX6-P_{GAL}-GST obtido por PCR foi utilizado para transformar células competentes de levedura. Nestas células, o módulo foi integrado corretamente no plasmídeo pGRSd-AGT1 por recombinação homóloga. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação por PCR do módulo de fusão (linha 1 a 3), com ≈2,8 kb.

FONTE: Trichez (2012).

Figura 38 - Verificação da correta integração do módulo de fusão KanMX6-P_{GAL}-GST.

(A) Os oligonucleotídeos V-Kan^r-R, AGT1-T369A-R, AGT1-F e AGT1-R foram utilizados para confirmar a integração do módulo KanMX6-P_{GAL}-GST no plasmídeo pGRSd-AGT1. (B) Eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA plasmidial controle pGRSd-AGT1 (linhas 3 e 6) e os plasmídeos construídos (linhas 1, 2, 4 e 5) foram analisados através de PCR. O fragmento de DNA com aproximadamente 2700 pb, detectado apenas nos plasmídeos construídos (linhas 1 e 2), confirma a correta fusão da *GST* no *AGT1*. Já o gene *AGT1* é detectado em todas as amostras (linhas 4-6).

FONTE: Trichez (2012).

Uma vez confirmada a construção do plasmídeo pGRSd-GST-nAGT1, usamos a cepa LCM003 transformada com o plasmídeo para expressar a proteína. Inicialmente, padronizamos as condições para expressão da proteína fusionada Gst-Agt1p através de testes para estabelecer o melhor tempo de indução da expressão com galactose. Células crescidas em meio com maltose como fonte de carbono até a fase exponencial foram induzidas com 2% de galactose. Amostras nos tempos 0, 4, 8 e 24 horas foram retiradas e usadas para determinar a atividade de transporte de *pNPαG*. Os resultados obtidos demonstram um aumento na atividade de transporte do substrato nos tempos 4 e 8 horas, provavelmente devido a um aumento na expressão da proteína Gst-Agt1p (Figura 39). Porém, também foi observada uma queda na atividade de α -glicosidase (dados não mostrados), o que poderia estar mascarando a atividade de transporte, uma vez que este ensaio depende da hidrólise do *pNPαG* pela maltase (atividade de transporte estimada pela mensuração da quantidade de *p*-nitrofenol liberado com a hidrólise da maltase).

Figura 39 - Indução com galactose para expressão da proteína Gst-Agt1p.

Duas colônias transformantes da cepa LCM003 com o plasmídeo pGRSd-GST-nAGT1 foram selecionadas para fazer os ensaios de expressão. As células foram crescidas até a fase exponencial e, após indução com galactose, alíquotas foram retiradas em tempos determinados para avaliar a atividade de transporte da permease Agt1p. FONTE: Trichez (2012).

Alternativamente, foram também determinadas as atividades de transporte de α -glicosídeos e de GST, usando as mesmas condições de cultivo citadas anteriormente. Para a

determinação do transporte de açúcares pelas leveduras, estimado através da determinação do co-transporte de H^+ , alíquotas da suspensão celular foram retiradas nos tempos 0, 4, 8 e 24 horas após a adição de galactose, lavadas com água a 4 °C e ressuspensas de modo a atingir 15 mg de células/mL. Levando em consideração o fato do Agt1p ser o único transportador de trealose e maltotriose na linhagem LCM003 (vide Quadro 1, na seção Material e Métodos), as atividades de transporte apresentadas pelas células indicam uma maior expressão da permease Gst-Agt1p após 8 horas da adição da galactose ao meio (Tabela 4). O mesmo pode ser observado pelas atividades de GST apresentadas pelas frações de membrana bruta extraídas das células, nos diferentes tempos avaliados (Tabela 5): as amostras referentes aos tempos 4 e 8 horas apresentaram um aumento na atividade de GST de aproximadamente 85 e 145%, respectivamente. Vale ressaltar que uma atividade basal de GST é normalmente observada nas amostras, induzidas ou não com galactose, em consequência da presença de proteínas da própria levedura. Assim, adotamos 8 horas de indução com galactose como condição ótima da expressão da proteína Gst-Agt1p.

Tabela 4 - Atividade de transporte de α -glicosídeos da cepa LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd-GST-nAGT1, após indução com galactose.

Tempo de indução com galactose (horas)	Atividade de transporte ^(a) (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)		
	Maltose	Trealose	Maltotriose
0	42,75 ± 3,77	< 1	<1
4	34,84 ± 6,14	4,36 ± 0,96	2,27 ± 0,22
8	19,98 ± 3,23	5,42 ± 1,02	2,72 ± 0,32
24	< 1	< 1	< 1

^(a) Atividade de transporte estimada pelo ensaio de co-transporte de H^+ (maltose, trealose e maltotriose) nas células, utilizando 20 mM de concentração final de açúcar. Os ensaios foram realizados em triplicata.

FONTE: Trichez (2012).

Tabela 5 - Atividade de GST da fração de membrana bruta extraída da levedura LCM003 transformada com o plasmídeo pGRSd-GST-nAGT1, nos diferentes tempos de indução com galactose.

Tempo de indução com galactose (horas)	Atividade de GST (nmol.min ⁻¹ .mL ⁻¹)	Proteína ^(a) (mg.mL ⁻¹)	Atividade específica (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
0	28,12 ± 1,10	4,62	6,09
4	52,63 ± 3,35	4,83	10,90
8	69,18 ± 3,05	4,52	15,31
24	28,95 ± 1,48	4,50	6,43

NOTA: A atividade de GST das amostras foi determinada usando 1 mM de CDNB e 1 mM de glutatona em tampão fosfato. São representados os valores referentes à medidas feitas em duplicata ou triplicata.

^(a) Os valores mostrados representam a média de dosagens de proteínas feitas em duplicata.

FONTE: Trichez (2012).

Uma vez padronizada a forma de expressão da proteína, nós testamos qual seria a melhor concentração de detergente a ser utilizada e o tempo de incubação para solubilização das proteínas presentes nas membranas. A solubilização foi feita com dodecil- β -D-maltopiranosídeo (DDM), detergente que tem solubilizado eficientemente diversas proteínas de membrana, como a Lac permease, o transportador de glicerol-3-fosfato e o transportador de glicose – Glut1p (ABRAMSON et al., 2003; ALISIO; MUECKLER, 2010; CHAPTAL et al., 2007; HUANG et al., 2003). O DDM foi usado nas concentrações de 0,8, 1,2, 1,6 e 2%, porém a eficiência de solubilização das proteínas da membrana aparentemente foi baixa ($\approx 10\%$), não ocorrendo variações significativas com o aumento da concentração do detergente (dados não mostrados). Como a estimativa de solubilização foi baseada na atividade de GST presente nas amostras, não está claro se a pouca solubilização é real ou se ela reflete a inativação da proteína provocada pela presença do detergente ou pelo preparo da amostra.

Buscando aumentar a eficiência de solubilização, resolvemos aumentar o tempo de incubação com o detergente, antes da etapa de ultracentrifugação (vide Material e Métodos). Para isso, alíquotas da fração de membrana bruta foram ressuspensas em tampão adequado contendo 1% de DDM, incubadas por 1, 2, 4 horas ou “*overnight*”, a 4 °C. Da mesma forma, não foi observada uma alteração significativa na solubilização usando os diferentes tempos de incubação – a eficiência da solubilização variou entre 10 e 13% (dados não mostrados).

Por último, seguindo algumas recomendações descritas por Guan et al. (2006), Jidenko et al. (2005), Lemieux et al. (2003) e Newstead et al. (2011), testamos a adição de glicerol no tampão de solubilização (efeito estabilizante) e diluímos a suspensão de membrana bruta para uma concentração de aproximadamente 3 mg/mL de proteína. Essas mudanças no procedimento de solubilização permitiram a recuperação de uma maior quantidade de proteína a partir da fração de membranas (eficiência de solubilização de $\approx 35\%$). Mesmo com esse aumento considerável no percentual de proteínas solubilizadas, ainda está muito abaixo da eficiência observada durante a purificação de outras proteínas de membrana (ALISIO; MUECKLER, 2010; NEWSTEAD et al., 2007). Este fato pode ser devido a um baixo nível de expressão da permease Gst-Agt1p, como já descrito para várias proteínas de membrana (NEWSTEAD et al., 2007), o que acaba afetando todo o rendimento da

preparação, a uma maior instabilidade da proteína provocada pela fusão de GST na sua porção N-terminal ou ainda ao uso de um detergente não tão adequado.

Apesar da dificuldade com a expressão e/ou solubilização da proteína, seguimos o processo de purificação. A partir de 2 L de suspensão celular foram obtidos aproximadamente 70 mL de fração bruta de membranas (com ≈ 3 mg/mL de proteína total), que foram solubilizados em tampão TPI contendo 10% de glicerol e 1% de DDM. A fração de proteínas solubilizadas foi então aplicada em uma coluna de afinidade (GSTrap - 5 mL - Glutathiona Sefarose), lavada com tampão TPI contendo 0,3% de DDM e apenas 1 mM de DTT e, em seguida, as proteínas retidas na coluna foram eluídas com mesmo tampão, porém contendo 20 mM de GSH.

Figura 40 - Purificação parcial da proteína Gst-Agt1p.

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10%. Linhas: 1 - GST (Sigma - 0,1 mg/mL); 2 - membrana bruta; 3 - membrana solubilizada com 1% de DDM; 4 a 8 - frações eluídas da coluna com 20 mM de GSH; 9 - eluato não retido na coluna.

*Gel corado com nitrato de prata.

FONTE: Trichez (2012).

Como pode ser observado na Figura 40, as frações eluídas da coluna, quando analisadas em gel de poliacrilamida-SDS, apresentaram duas bandas de proteínas: uma proteína com tamanho aproximado de 27 kDa, que parece ser a enzima glutathiona-S-transferase da própria levedura (codificada pelos genes *GTT1* e *GTT2*) e outra banda de aproximadamente 95 kDa, que condiz com o tamanho esperado para a proteína fusionada Gst-Agt1p [27 kDa (GST) + 68 kDa (peso teórico para a proteína AGT1)].

Na tentativa de obter uma amostra mais concentrada da proteína Gst-Agt1p, misturamos as frações eluídas da coluna que apresentavam a proteína (≈ 2 mL) e as concentramos para um volume de $\approx 0,5$ mL com PEG 20.000. Em seguida, procedemos com a clivagem da fusão através da digestão com trombina. Como mostra a Figura 41, após o tratamento com trombina, foi possível visualizar uma nova banda de aproximadamente 68 kDa, correspondente ao tamanho da proteína Agt1p. Porém, uma quantidade muito pequena da proteína foi recuperada após a tentativa de concentração e a etapa da clivagem com trombina, o que nos impediu de seguir com a purificação até a etapa final. Para a obtenção de uma proteína Agt1p mais pura e não fusionada a GST, era necessário incubar as amostras digeridas com trombina novamente na coluna GSTrap, assim a proteína Agt1p passaria completamente pela coluna, enquanto que a GST e outros contaminantes possivelmente presentes nas amostras permaneceriam retidos por afinidade na resina Glutathiona sefarose.

Figura 41 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS mostrando amostras eluídas concentradas e frações clivadas com trombina.

Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10%. Linhas: 1 e 9 - padrões de peso molecular; 2 - GST (Sigma - 0,1 mg/mL); 3 - membrana bruta; 4 - membrana solubilizada com 1% de DDM; 5 - eluato não retido na coluna; 6 - amostra concentrada com PEG 20.000; 7 e 8 - amostras clivadas com trombina.

*Gel corado com nitrato de prata.

FONTE: Trichez (2012).

Embora as proteínas de membrana representem aproximadamente 30% das proteínas em um genoma, apenas uma pequena porcentagem destas foram alvos de

estudos de purificação e resolução de estruturas. De fato, se avaliarmos as estruturas disponíveis em bancos de dados como o PDB (Protein Data Bank – <http://www.rcsb.org>), podemos perceber o quão lento ainda está o progresso nesta área de conhecimento: apenas 1% das estruturas depositadas correspondem à proteínas de membrana (BILL et al., 2011; FORREST; TANG; HONIG, 2006). Se nos atermos apenas as proteínas pertencentes a superfamília dos principais facilitadores (MFS), da qual a permease Agt1p faz parte, vamos verificar que apenas 5 proteínas têm suas estruturas determinadas – LacY, GlpT, EmrD, FucP, PepT – dos mais de 5.000 membros conhecidos (ABRAMSON et al., 2003; ALISIO; MUECKLER, 2010; DANG et al., 2010; HUANG et al., 2003; NEWSTEAD et al., 2011; YIN et al., 2006).

As escassas informações estruturais e estudos bioquímicos com proteínas já purificadas são reflexos das dificuldades experimentais que se tem para obter formas solúveis dessas proteínas, visto que são altamente hidrofóbicas, e quantidades suficientes de material para purificação e tentativas de cristalização. Poucas proteínas de membrana são abundantes em suas membranas nativas, de forma que normalmente se faz necessário a sobre-expressão, estratégia que não tem se mostrado adequada para todos os tipos de proteínas, principalmente quando se trata de proteínas de membrana de eucariotos (GRANSETH et al., 2007). Outro problema a ser vencido é a obtenção de formas estáveis da proteína purificada: várias proteínas, ao serem retiradas das membranas durante a solubilização com detergentes são inativadas ou desnaturadas (BILL et al., 2011). No entanto, apesar das muitas barreiras encontradas nesse campo, vários estudos têm abordado a biologia estrutural de proteínas de membrana, contribuindo para a inovação de técnicas e estratégias mais adequadas a análise destas proteínas, além de possibilitar uma melhor compreensão sobre a função e o mecanismo de ação destas moléculas (FORREST; TANG; HONIG, 2006).

6 CONCLUSÕES

Considerando os resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que:

1. Os resíduos Glu-120, Asp-123, Glu-167 e Arg-504 estão envolvidos com a atividade de transporte da permease Agt1p. Células portando a mutação R504A foram incapazes de utilizar maltotriose e de transportar açúcares normalmente transportados pela permease Agt1p, indicando que esta permease não é funcional. Já os transportadores mutados nos resíduos Glu-120, Asp-123 e Glu-167 apresentaram reduzidas atividades de transporte. A presença da mutação E120A parece afetar ambas ligação do açúcar e próton, enquanto que nos mutantes D123G e E167A a translocação do próton foi mais prejudicada.
2. Parece haver uma cooperação entre os resíduos Asp-123 e Glu-167 na translocação do H^+ : células da levedura contendo as duas mutações se tornaram incapazes de utilizar açúcares através da permease Agt1p. Dessa forma, podemos sugerir que ambos resíduos participam da ligação do H^+ durante o transporte de açúcares pelo Agt1p e que na presença de apenas uma das mutações na proteína, a ligação do H^+ é estabelecida com o outro resíduo.
3. O resíduo Arg-504 parece ser essencial para a ligação do açúcar e/ou processo catalítico envolvido no transporte mediado pelo Agt1p, enquanto que os resultados obtidos para a Ile-505 sugerem a participação desse resíduo no reconhecimento do substrato, porém sem ter um papel crítico durante o processo. Outro resíduo (Tyr-507), localizado próximo a Arg-504 na permease Agt1p e em uma posição similar ao Trp-151 da permease LacY, possivelmente poderia auxiliar na interação com o substrato.
4. O domínio N-terminal da permease Agt1p (resíduos Glu-51/Leu-55 e o provável motivo di-leucina Leu100/Leu101) e também os resíduos Ser-301 e Thr-369, presentes na alça citoplasmática maior, são importantes regiões envolvidas com a inativação catabólica induzida pela glicose desta permease.
5. A presença das mutações E51G/L55H tornou a proteína Agt1p mais estável na membrana, o que levou a propriedades incrementadas de transporte de açúcares nas leveduras

portando estas modificações. Então, seria interessante verificar se esta modificação poderia refletir na manutenção da permease até o final dos processos fermentativos (sabe-se que muitas proteínas sofrem inativação neste estágio), com consequente consumo completo dos açúcares e/ou aumento da produção de etanol.

6. Provavelmente, Ser-301 e Thr-369 são importantes sítios de fosforilação da permease Agt1p. Mutantes S301A são resistentes a proteólise no vacúolo, apresentando níveis estáveis da proteína na célula, mesmo após a adição de glicose. Nesses mutantes parece haver um bloqueio da entrada da proteína de membrana no lúmen do vacúolo para degradação, de forma que estas proteínas se localizam na superfície da célula e em compartimentos que parecem preceder o vacúolo. Estes resultados, somados a estudos feitos com outros transportadores, permitem sugerir que a fosforilação desse resíduo poderia servir como um sinal para ubiquitinação e degradação da proteína Agt1p.
7. A fosforilação da Thr-369 parece também funcionar como um sinal para a endocitose e degradação da proteína Agt1p. A substituição desse aminoácido prejudica a endocitose do transportador nas etapas iniciais, como pode ser observado pelo acúmulo da proteína em estruturas que parecem os locais de brotamento de vesículas ou endossomos iniciais. Uma similar distribuição celular é observada para mutantes no provável motivo dileucina.
8. A obtenção de proteína Agt1p purificada mostrou-se bastante custosa em consequência de uma menor expressão da proteína fusionada Gst-Agt1p. Além disso, os rendimentos de solubilização foram baixos, rendendo pequenas quantidades de proteínas Gst-Agt1p solubilizadas e estáveis.

Ensaio complementares para verificar a funcionalidade das permeases em uma linhagem portando apenas a permease Agt1p como transportador de α -glicosídeo (ou os mutantes nos resíduos envolvidos com a atividade de transporte) seriam de grande relevância para analisar os efeitos das mutações sem nenhuma interferência de outros transportadores, permitindo ainda inferir se ocorrem interações entre os transportadores presentes na membrana celular de uma mesma linhagem de levedura.

Embora alguns resíduos e/ou domínios envolvidos com a inativação catabólica da permease Agt1p foram identificados, muitos estudos ainda podem ser feitos com o intuito de caracterizar melhor o processo de inativação induzido pela glicose. Análises de mutagênese na região C-terminal da permease Agt1p, onde se localiza outro potencial sítio de ubiquitinação, também podem ser desenvolvidas para a obtenção de mutantes com variados fenótipos. A substituição de resíduos de lisinas por argininas, nos potenciais sítios de ubiquitinação da permease Agt1p, também pode nos fornecer informações sobre o processo. Além disso, a realização de ensaios fermentativos com altas concentrações de açúcares e maiores tempos de fermentação é fundamental para a caracterização dessas células modificadas para avaliar os seus potenciais para a indústria cervejeira e de etanol combustível.

REFERÊNCIAS¹

- ABRAMSON, J.; SMIRNOVA, I.; KASHO, V.; VERNER, G.; KABACK, H. R.; IWATA, S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. **Science**, v. 301, p. 610-615, 2003.
- ALISIO, A.; MUECKLER, M. Purification and characterization of mammalian glucose transporters expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Exp. Purif.**, v. 70, p. 81-87, 2010.
- ALVES JR., S. L. **Genômica do metabolismo de maltotriose em *Saccharomyces cerevisiae*: o papel determinante do gene AGT1**. 2010. 135 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ALVES JR., S. L.; HERBERTS, R. A.; HOLLATZ, C.; TRICHEZ, D.; MILETTI, L. C.; DE ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Molecular Analysis of Maltotriose Active Transport and Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Determinant Role for the AGT1 Permease. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 1494-1501, 2008.
- ALVES-ARAÚJO, C.; LOPEZ-HERNANDEZ, M. J.; SOUZA, M. J.; PRIETO, J. A.; RANDEZ-GIL, F. Cloning and characterization of the *MAL11* gene encoding a high-affinity maltose transporter from *Torulaspora delbrueckii*. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p. 467-476, 2004.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. 2nd.ed. New York: Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons, 1992. 1512 p.
- BACHMAIR, A.; FINLEY, D.; VARSHAVSKY, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. **Science**, v. 234, p. 179-186, 1986.
- BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES, S.; CORDIOLI, M.; MILETTI, L.; DE ARAUJO, P.; STAMBUK, B. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.**, v. 7, p. 2-11. 2008.
- BASSO, T. O.; DE KOK, S.; DARIO, M.; DO ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; MÜLLER, G.; SCHLÖLG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J.-M.; GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; STAMBUK, B. U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metab. Eng.**, v. 13, n. 6, p. 694-703, 2011.
- BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 8, p. 26-33, 2004.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BECUWE, M.; VIEIRA, N.; LARA, D.; REZENDE, J. G.; SOARES-CUNHA, C.; CASAL, M.; HAGUENAUER-TSAPIS, R.; VINCENT, O.; PAIVA, S.; LEON, S. A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. **J. Cell. Biol.**, v. 16, p. 1-13, 2012.

BJERRUM, O. J.; HEEGAARD, N. **Handbook of immunoblotting of proteins**: technical descriptions. Florida: CRC Press, 1988. v. 1. 265 p.

BILL, R. M.; HENDERSON, P. J. F.; IWATA, S.; KUNJI, E. R. S.; MICHEL, H.; NEUTZE, R.; NEWSTEAD, S.; POOLMAN, B.; TATE, C. G.; VOGEL, H. Overcoming barriers to membrane protein structure determination. **Nature Biotech.**, v. 29, p. 335-340, 2011.

BONIFACINO, J. S.; TRAUB, L. M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 72, p. 395-447, 2003.

BRONDIJK, T. H.; KONINGS, W. N.; POOLMAN, B. Regulation of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. atabolite inactivation of wild-type and mutant maltose transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiol.**, v. 176, p. 96-105, 2001.

BRONDIJK, T. H.; VAN DER REST, M. E.; PLUIM, D.; DE VRIES, Y.; STINGL, K.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. Catabolite inactivation of wild-type and mutant maltose transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 15352-15357, 1998.

CÁCERES, A.; CARDENAS, A.; GALLEGU, M.; VALCARVEL, M. A continuous spectrophotometric system for the discrimination/determination of monosaccharides and oligosaccharides in foods. **Anal. Chim. Acta**, v. 404, p. 121-129, 2000.

CAVALIERI, D.; MCGOVERN, P. E.; HARTI, D. L.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. **J. Mol. Evol.**, v. 57, p. S226-S232, 2003.

CHAPTAL, V.; KWON, S.; SAWAYA, M. R.; GUAN, L.; KABACK, R.; ABRAMSON, J. Crystal structure of lactose permease in complex with an affinity inactivator yields unique insight into sugar recognition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, p. 9361-9366, 2011.

CHENG, Q.; MICHELS, C. A. The maltose permease encoded by the *MAL61* gene of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits both sequence and structural homology to other sugar transporters. **Genetics**, v. 123, p. 477-484, 1989.

CHENG, Q.; MICHELS, C. A. *MAL11* and *MAL61* encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 1817-1820, 1991.

DANG, S.; SUN, L.; HUANG, Y.; LU, F.; LIU, Y.; GONG, H.; WANG, J.; YAN, N. Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. **Nature**, v. 467, p. 734-738, 2010.

DÁRIO, M. G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

DAY, R. E.; HIGGINS, V. J.; ROGERS, P. J.; DAWES, I. W. Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. **Yeast**, v. 19, p. 1015-1027, 2002.

DIETVORST, J.; BLIECK, L.; BRANDT, R.; VAN DIJCK, P.; STEENSMA, H. Y. Attachment of MAL32-encoded maltase on the outside of yeast cells improves maltotriose utilization. **Yeast**, v. 24, p. 27-38, 2007.

DIETVORST, J.; LONDESBOROUGH, J.; STEENSMA, H. Y. Maltotriose utilization in lager yeast strains: *MTT1* encodes a maltotriose transporter. **Yeast**, v. 22, p. 775-788, 2005.

DITTY, J. L.; HARWOOD, C. S. Charged amino acids conserved in the aromatic acid/H⁺ symporter family of permeases are required for 4-hydroxybenzoate transport by PcaK from *Pseudomonas putida*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 1444-1448, 2002.

DUVAL, E. H.; ALVES-JR, S. L.; DUNN, B.; SHERLOCK, G.; STAMBUK, B. U. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. **J. Appl. Microbiol.**, v. 109, p. 248-259, 2010.

ELBING, K.; STAHLBERG, A.; HOHMANN, S.; GUSTAFSSON, L. Ytranscriptional responses to glucose at different glycolytic rates in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 4855-4864, 2004.

ENTIAN, K. D.; KÖTTER, P. Yeast mutant and plasmid collections. **Meth. Microbiol.**, v. 26, p. 431-449, 1998.

FORREST, R. L.; TANG, C. L.; HONIG, B. On the Accuracy of Homology Modeling and Sequence Alignment Methods Applied to Membrane Proteins. **Biophys. J.**, v. 91, p. 508-517, 2006.

FRANCO, P. J.; BROOKER, R. J. CFunctional role of Glu-269 and Glu-325 within the lactose permease of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 7379-7386, 1994.

FRILLINGOS, S.; SAHIN-TOTH, M.; WU, J.; KABACK, H. R. Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. **FASEB J.**, v. 12, p. 1281-1299, 1998.

GADURA, N.; ROBINSON, L. C.; MICHELS, C. A. Glc7-Reg1 Phosphatase signals to Yck1,2 Casein Kinase 1 to regulate transport activity and glucose-induced inactivation of *Saccharomyces* maltose permease. **Genetics**, v. 172, p. 1427-1439, 2006.

GADURA, N.; MICHELS, C. A. Sequences in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces cerevisiae* maltose permease are required for vacuolar degradation but not glucose-induced internalization. **Curr. Genet.**, v. 50, p. 101-114, 2006.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 334-361, 1998.

GANCEDO, J. M. The early steps of glucose signalling in yeast. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 32, n. 4, p. 673-704, 2008.

GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods in Enzymol.**, v. 350, p. 87-96, 2002.

GRANSETH, E.; SEPPALA, S.; RAPP, M.; DALEY, D. O.; VON HEIJNE, G. Membrane protein structural biology - how far can the bugs take us? **Mol. Memb. Biol.**, v. 24, p. 329-332, 2007.

GUAN, L.; KABACK, H. R. Lessons from lactose permease. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 35, p. 67-91, 2006.

GUAN, L.; SMIRNOVA, I. N.; VERNER, G.; NAGAMORI, S.; KABACK, H. R. Manipulating phospholipids for crystallization of a membrane transport protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 1723-1726, 2006.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S- transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HAN, E. K.; COTTY, F.; SOTTAS, C.; JIANG, H.; MICHELS, C. A. Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. **Mol. Microbiol.**, v. 17, p. 1093-1107, 1995.

HATANAKA, H.; OMURA, F.; KODAMA, Y.; ASHIKARI, T. Gly-46 and His-50 of yeast maltose transporter Mal21p are essential for its resistance against glucose-induced degradation. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 15448-15457, 2009.

HERBERTS, R. A. **Transporte ativo de α -glicosídeos: uma metodologia para avaliar a vitalidade de leveduras cervejeiras.** 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

HEIN, C.; ANDRÉ, B. A C-terminal di-leucine motif and nearby sequences are required for NH₄⁺ -induced inactivation and degradation of general amino acid permease, Gap1p, of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 607-616, 1997.

HICKE, L. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. **Trends in Cell Biol.**, v. 9, p. 107-112, 1999.

HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. Colorimetric determination of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Microbiol. Meth.**, v. 46, p. 253-259, 2001.

HORAK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 331, p. 41-79, 1997.

HORAK, J.; WOLF, D. H. Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 1541-1549, 1997.

HOUGHTON-LARSEN, J.; BRANDT, A. Fermentation of high concentrations of maltose by *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the COMPASS methylation complex. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 7176-7182, 2006.

HUANG, Y.; LEMIEUX, J. M.; SONG, J.; AUER, M.; WANG, D. N. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. **Science**, v. 301, p. 616-620, 2003.

HURLEY, J. H.; STENMARK, H. S. Molecular Mechanisms of Ubiquitin-Dependent Membrane Traffic. **Annu. Rev. Biophys.**, v. 40, p. 119-142, 2011.

INGLEDEW, W. M. Yeasts for production of fuel ethanol. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed). **The yeasts**. San Diego, USA: Academic Press, 1993. v. 5, p. 245-291.

JESPERSEN, L.; CESAR, L. B.; MEADEN, P. G.; JAKOBSEN, M. Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 450-456, 1999.

JIANG, H.; MEDINTZ, I.; MICHELS, C. A. Two glucose sensing/signaling pathways stimulate glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. **Mol. Biol.**, v. 8, p. 1293-1304, 1997.

JIANG, H.; MEDINTZ, I.; ZHANG, B.; MICHELS, C. A. Metabolic signals trigger glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 647-654, 2000.

JIDENKO, M.; NIELSEN, R. C.; SORENSEN, T. L. M.; MOLLER, J. V.; MAIRE, M.; NISSEN, P.; JAXEL, C. The N-end rule: functions, mysteries, uses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 11687-11691, 2006.

JOHNSTON, M.; KIM, J. H. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 247-252, 2005.

JULES, M.; GUILLOU, V.; FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 2771-2778, 2004.

KABACK, H. R.; SMIRNOVA, I.; KASHO, V.; NIE, Y.; ZHOU, Y. The alternating access transport mechanism in LacY. **J. Membrane Biol.**, v. 239, p. 85-93, 2011.

KASAHARA, T.; KASAHARA, M. Transmembrane segments 1, 5, 7 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *Saccharomyces cerevisiae* Hxt2 transporter. **Biochem. J.**, v. 372, p. 247-252, 2003.

KASAHARA, M.; MAEDA, M. Contribution to substrate recognition of two aromatic amino acid residues in putative transmembrane segment 10 of the yeast sugar transporter Gal2 and Hxt2. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 29106-29112, 1998.

KASAHARA, T.; KASAHARA, M. Identification of a key residue determining substrate affinity in the yeast glucose transporter Hxt7: a two dimensional comprehensive study. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 26263-26268, 2010.

KASAHARA, M.; SHIMODA, E.; MAEDA, M. Transmembrane segment 10 is important for substrate recognition in Gal2 and Hxt2 sugar transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 389, p. 174-178, 1996.

KASHO; V. N.; SMIRNOVA, I. N.; KABACK, R. H. Sequence alignment and homology threading reveals prokaryotic and eucaryotic proteins similar to lactose permease. **J. Mol. Biol.**, v. 358, p. 1060-1070, 2006.

KELLY, B. T.; MCCOY, A. J.; SPATE, K.; MILLER, S. E.; EVANS, P. R.; HONING, S.; OWEN, D. J. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. **Nature**, v. 456, p. 976-981, 2008.

KNOP, M.; SIEGERS, K.; PEREIRA, G.; ZACHARIAE, W.; WINSOR, B.; NASMYTH, K.; SCHIEBEL, E. Epitope Tagging of Yeast Genes using a PCR-based Strategy: More Tags and Improved Practical Routines. **Yeast**, v. 15, p. 963-972, 1999.

KODAMA, Y.; FUKUI, N.; ASHIKARI, T.; SHIBANO, Y.; MORIOKA-FUJIMOTO, K.; HIRAKI, Y.; NAKATANI, K. Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 53, p. 24-29, 1995.

LAEMMLI, E. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **NATURE**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 104, p. 1107-1112, 1993.

LAW, C. J.; MALONEY, P. C.; WANG, D. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 67, p. 289-305, 2009.

LEMIEUX, M. J.; SONG, J.; KIM, M. J.; HUANG, Y.; VILLA, A.; AUER, M.; LI, X.D.; WANG, D. N. R. Three-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily. **Protein Sci.**, v. 12, p. 2748-2756, 2003.

LEON, S.; ERPAPAZOGLU, Z.; HAGUENAUER-TSAPIS, R. Ear1p and Ssh4p are new adaptors of the ubiquitin ligase Rsp5p for cargo ubiquitylation and sorting at Multivesicular Bodies. **Mol. Biol. Cell**, v. 19, p. 2379-2388, 2008.

LONGTINE, M. S.; MCKENZIE, A.; DEMARINI, D. J.; SHAH, N. G.; WACH, A.; BRACHAT, A.; PHILIPPSEN, P.; PRINGLE, J. R. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 953-961, 1998.

LUCERO, P.; LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligases *npi1/rsp5* and ubiquitin-hydrolase *npi2/doa4*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 147, p. 273-277, 1997.

LUCERO, P.; HERWEIJERB, M.; LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. **FEBS Letters**, v. 333, p. 165-168, 1993.

MALLUTA, E. F.; DECKER, P.; STAMBUK, B. U. The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Basic Microbiol.**, v. 40, p. 199-205, 2000.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 545 p.

MARCHAL, C.; HAGUENAUER-TSAPIS, R.; URBAN-GRIMAL, D. A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, p. 314-321, 1998.

MEDINTZ, I.; JIANG, H.; HAN, E. K.; CUI, W.; MICHELS, C. A. Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 2245-2254, 1996.

MEDINTZ, I.; JIANG, H.; MICHELS, C. A. The role of ubiquitin conjugation in glucose-induced proteolysis of *Saccharomyces* maltose permease. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 34454-34462, 1998.

MEDINTZ, I.; WANG, X.; HRADEK, T.; MICHELS, C. A. A PEST-like Sequence in the N-Terminal Cytoplasmic Domain of *Saccharomyces* Maltose Permease Is Required for Glucose-Induced Proteolysis and Rapid Inactivation of Transport Activity. **Biochemistry**, v. 39, p. 4518-4526, 2000.

MERHI, A.; GERARD, N.; LAUWERS, E.; PREVOST, M.; ANDRE, B. Systematic mutational analysis of the intracellular regions of yeast Gap1 permease. **PLoS ONE**, v. 6, p. 18457-18469, 2011.

MICHELS, C. A.; READ, E.; NAT, K.; CHARRON, M. J. The telomere-associated *MAL3* locus of *Saccharomyces cerevisiae* is a tandem array of repeated genes. **Yeast**, v. 8, p. 655-665, 1992.

MIRZA, O.; GUAN, L.; VERNER, G.; IWATA, S.; KABACK, H. R. Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H⁺ symport in LacY. **EMBO J.**, v. 25, p. 1177-1183, 2006.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009. 357 p.

MUECKLER, M.; MAKEPEACE, C. Transmembrane segment 5 of the Glut1 glucose transporter is an amphipathic helix that forms part of the sugar permeation pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 10923-10926, 1999.

MUECKLER, M.; WENG, W.; KRUSE, M. Glutamine 161 of Glut1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 20533-20538, 1994.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 05 maio 2012

NEEDLEMAN, R. B.; FEDEROFF, H. J.; ECCLESHALL, T. R.; BUCHFERER, B.; MARMUR, J. Purification and characterization of an alpha-glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. **Biochemistry**, v. 17, n. 22, p. 4657-4661, 1978.

NEWMAN, M. J.; FOSTER, D. L.; WILSON, T. H.; KABACK, H. R. Purification and reconstitution of functional lactose carrier from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 11804-11808, 1981.

NEWSTEAD, S.; DREW, D.; CAMERON, A. D.; POSTIS, V. L. G.; XIA, X.; FOWLER, P. W.; INGRAM, J. C.; CARPENTER, E. P.; SANSOM, M. S. P.; MCPHERSON, M. J.; BALDWIN, S. A.; IWATA, S. Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters PepT1 e PepT2. **EMBO J.**, v. 30, p. 417-426, 2011.

NEWSTEAD, S.; KIM, H.; VON HEIJNE, G.; IWATA, S.; DREW, D. High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 13936-13941, 2007.

NIKKO, E.; PELHAM, H. R. B. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. **Traffic**, v. 10, p. 1856-1867, 2009.

NIKKO, E.; SULLIVAN, J. A.; PELHAM, H. R. B. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter. **EMBO J.**, v. 9, p. 1216-1221, 2008.

NOVAK, S.; ZECHNER-KRPAN, V.; MARIÉ, V. Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 42, p. 213-218, 2004.

OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 554-559, 1999.

PAIVA, S.; VIEIRA, N.; NONDIER, I.; HAGUENAUER-TSAPIS, R.; CASAL, M.; URBAN-GRIMAL, D. Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast Jen1 transporter: role of lysine 63 linked ubiquitin chains. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 19228-19236, 2009.

PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; SAIER-JR, M. H. Major facilitator superfamily. **Microbiol. Mol. Rev.**, v. 62, p. 1-34, 1998.

PETRACEK, M. E.; LONGTINE, M. S. PCR-based engineering of yeast genome. **Meth. Enzymol.**, v. 350, p. 445-469, 2002.

PINSON, B.; CHEVALLIER, J.; URBAN-GRIMAL, D. Only one of the charged amino acids located in membrane-spanning regions is important for the function of the *Saccharomyces cerevisiae* uracil permease. **Biochem. J.**, v. 339, p. 37-42, 1999.

POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 468-477, 1989.

PROTEIN DATA BANK. PDB. Disponível em: < <http://www.rcsb.org>>. Acesso em: 15 abril 2012.

RIBALLO, E.; HERWIJER, M.; WOLF, D. H.; LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 5622-5627, 1995.

RISINGER, A. L.; CAIN, N. E.; CHEN, E. J.; KAISER, C. Activity-dependent Reversible Inactivation of the General Amino Acid Permease. **Mol. Biol. Cell**, v. 17, p. 4411-4419, 2006.

RODIONOV, Y. V.; KEPPE, O. I.; SUKHACHEVA, M. V. A photometric assay for ethanol. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 38, p. 395-396, 2002.

SAIER-JR, M. H. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 354-411, 2000.

SAHIN-TOTH, M.; KARLIN, A.; KABACK, H. R. Unraveling the mechanism of lactose permease of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 10729-10732, 2000.

SALAS-BURGOS, A.; ISEROVICH, P.; ZUNIGA, F.; VERA, J. C.; FISCHBARG, J. Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter Glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules. **Biophys. J.**, v. 87, p. 2990-2999, 2004.

SALEMA-OOM, M.; PINTO, V. V.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces* strains: characterization of a new member of the α -glucoside transporter family. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 5044-5049, 2005.

SALGADO, A. M.; FOLLY, R. O. M.; VALDMAN, B.; CÓS, O.; VALERO, F. Colorimetric method for the determination of ethanol by flow injection analysis. **Biotechnol. Letters**, v. 22, p. 327-330, 2000.

SANTANGELO, G. M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 70, p. 253-282, 2006.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher; 2001. v. 2. 541 p.

SERRANO, R. Energy requirements for maltose transport in yeast. **Eur. J. Biochem.**, v. 80, p. 97-102, 1977.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br>>. Acesso em: 2 fev. 2012.

SMIRNOVA, I. N.; KASHO, V.; KABACK, H. R. Protonation and sugar binding to LacY. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 8896-8901, 2008.

SMIT, A.; CORDERO OTERO, R. R.; PRETORIUS, I. S. Differences among AGT1-encoded α -glucoside transporters and their ability to transport maltotriose in *Saccharomyces* yeast. **Ann. Microbiol.**, v. 57, p. 77-84, 2007.

SMIT, A.; MOSES, S. G.; PRETORIUS, I. S.; CORDERO OTERO, R. R. The Thr505 and Ser557 residues of the AGT1-encoded α -glucoside transporter are critical for maltotriose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 1103-1111, 2008.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Anal Biochem.**, v. 150, p. 76-86, 1985.

SORGEN, P. L.; HU, Y.; GUAN, L.; KABACK, H. R.; GIRVIN, M. E. An approach to membrane protein structure without crystals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 14037-14040, 2002.

STAMBUK, B. U. A simple laboratory exercise illustrating active transport in yeast cells. **Biochem. Mol. Biol. Edu.**, v. 28, p. 313-317, 2000.

STAMBUK, B. U. Transcriptional and posttranslational regulation of a membrane nutrient transporter. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, v. 30, p. 388-393, 2002.

STAMBUK, B.U.; ALVES JR, S.L.; HOLLATZ, C.; ZASTROW, C.R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters Appl. Microbiol.**, v. 43, p. 370-376, 2006.

STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 89, p. 212-214, 2000.

STAMBUK, B. U.; DA SILVA, M. A.; PANEK, A. D.; DE ARAUJO, P. S. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 170, p. 105-110, 1999.

STAMBUK, B. U.; DE ARAUJO, P.S.; PANEK, A.D.; SERRANO, R. Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 237, p. 876-881, 1996.

STAMBUK, B. U.; DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 1, p. 73-78, 2001.

STAMBUK, B. U.; DUNN, B.; ALVES JR, S. L.; DUVAL, H. D.; SHERLOCK, G. Industrial fuel ethanol yeast contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome Res.**, v. 19, p. 2271-2278, 2009.

STAMBUK, B. U.; PANEK, A. D.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; DE ARAUJO, P. S. Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1379, n. 1, p. 118-128, 1998.

STAUB, O.; ROTIN, D. Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. **Physiol. Rev.**, v. 86, p. 669-707, 2006.

STEWART, G. G. The horace brown medal lecture: forty years of brewing research. **J. Inst. Brew.**, v. 115, p. 3-29, 2009.

STRINGER, D. K.; PIPER, R. C. A single ubiquitin is sufficient for cargo protein entry into MVBs in the absence of ESCRT ubiquitination. **J. Cell. Biol.**, v. 192, p. 229-242, 2011.

TAYLOR, G. S.; LIU, Y.; BASKERVILLE, C.; CHARBONNEAU, H. The activity of Cdc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for cell cycle progression. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 24054-24063, 1997.

TRICHEZ, D. **Identificação de resíduos de aminoácidos envolvidos no transporte ativo de açúcares pela permease AGT1 de *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

VADYVALOO, V.; SMIRNOVA, I. N.; KASHO, V. N.; KABACK, H. R. Conservation of residues involved in sugar/H⁺ symport by the sucrose permease of *Escherichia coli* relative to lactose permease. **J. Mol. Biol.**, v. 358, p. 1051-1059, 2006.

VAN DER REST, M. E.; VRIES, Y.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. Overexpression of Mal61p in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of maltose transport in artificial membranes. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 5440-5446, 1995.

VAN DE VELDE, S.; THEVELEIN, J. M. cAMP-PKA and Snf1 signaling mechanisms underlie the superior potency of sucrose for induction of filamentation in yeast. **Eukar. Cell**, v. 7, p. 286-293, 2008.

VARSHAVSKY, A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 12142-12149, 1996.

VENKATESAN, P.; KABACK, H. R. The substrate-binding site in the lactose permease of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 9802-9807, 1998.

VIDGREN, V.; RUOHONEN, L.; LONDESBOROUGH, J. Characterization and functional analysis of the *MAL* and *MPH* loci for maltose utilization in some Ale and Lager yeast strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 7846-7857, 2005.

VIIGAND, K.; TAMMUS, K.; ALAMAE, T. Clustering of *MAL* genes in *Hansenula polymorpha*: Cloning of the maltose permease gene and expression from the divergent intergenic region between the maltose permease and maltase genes. **FEMS Yeast Res.**, v. 5, p. 1019-1028, 2005.

VIIGAND, K.; ALAMAE, T. Further study of the *Hansenula polymorpha* *MAL* locus: characterization of the α -glucoside permease encoded by the *HpMAL2* gene. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, p. 1134-1144, 2007.

WIECZORKE, R.; KRAMPE, S.; WEIERSTALL, T.; FREIDEL, K.; HOLLEMBERG, C. P.; BOLES, E. Concurrent knock-out of least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 464, p. 123-128, 1999.

WILLAERT, R. Sugar consumption kinetics by brewer's yeast during the primary beer fermentation. **Cerevisia**, v. 26, p. 43-49, 2001.

YEAST GENOME DATABASE. Disponível em: <<http://www.yeastgenome.org>>. Acesso em: 05 maio 2012.

YIN, Y.; HE, X.; SZEWCZYK, P.; NGUYEN, T.; CHANG, G. Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. **Science**, v. 312, p. 741-744, 2006.

ZASTROW, C. R.; MATTOS, M.A.; HOLLATZ, C.; STAMBUK, B. U. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p. 455-459, 2000.

ZASTROW, C. R.; HOLLATZ, C.; DE ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, p. 34-38, 2001.

ZHENG, X.; D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 52, p. 41-47, 1994.