

Universidade de São Paulo

CLAUDIA DE SOUSA CAETANO

Caracterização do papel das enzimas manosiltransferases no processo de envelhecimento em *Saccharomyces cerevisiae*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2022

CLAUDIA DE SOUSA CAETANO

Caracterização do papel das enzimas manosiltransferases no processo de envelhecimento em *Saccharomyces cerevisiae*.

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Henrique de Barros

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertação da USP (BDTD).

São Paulo

2022

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Sousa Caetano, Claudia
Caracterização do papel das enzimas
manosiltransferases no processo de envelhecimento
em *Saccharomyces cerevisiae* / Claudia de Sousa
Caetano; orientador José Ribamar dos Santos
Ferreira Júnior; coorientador Mário Henrique de
Barros. -- São Paulo, 2022.
69 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Longevidade. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3.
Biologia Molecular. I. dos Santos Ferreira Júnior,
José Ribamar, orientador. II. Henrique de Barros,
Mário, coorientador. III. Título.

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

Candidato (a): Claudia de Sousa Caetano

Título da Dissertação: Caracterização do papel das enzimas manosiltransferases no processo de envelhecimento em *Saccharomyces cerevisiae*.

Orientador (a): Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior

Co-orientador (a): Prof. Dr. Mário Henrique de Barros

A comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, 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

Presidente (a): Assinatura

Nome

Instituição



EACH

Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

CARTA DE ISENÇÃO (2ª via)

Orientador(a): Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Junior

Orientando(a): Claudia de Sousa Caetano

Título do Projeto de Pesquisa: “Caracterização do papel das enzimas manosiltransferases no processo de envelhecimento em ‘Saccharomyces cerevisiae’” **Instituição:** Escola de Artes, Ciências e Humanidades – EACH/USP

De acordo com a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, somente estão sujeitos à análise pelo CEUA os projetos de pesquisa ou atividade de ensino que envolvam animais do filo “Chordata”, subfilo “Vertebrata”.

Conforme avaliação do projeto por este Comitê, aprovado ‘*ad referendum*’ em 05.02.19 e referendado na 49ª. reunião do CEUA em 31 de maio de 2019, declaro que o referido estudo não se enquadra nessas normas e, portanto, está isento de análise ou aprovação por esse CEUA.

Recomendo que o projeto seja submetido à Comissão Interna de Biossegurança da EACH-USP, para análise e autorização de atividades de pesquisa em regime de contenção com microrganismos geneticamente modificados.

Atenciosamente,

São Paulo, 06 de maio de 2021.

Prof.ª Dr.ª Michele Schultz Ramos
Coordenadora

Agradecimentos

Em primeiro lugar, três pessoas muito importantes. Minha mãe, que me dá exemplos de coragem, honestidade e resiliência. Meu pai, que partiu muito breve, porém deixou testemunhos de uma pessoa respeitadora, honesta e amiga. Outra pessoa que também não está mais comigo, porém sempre me estimulou buscar o que eu desejasse e necessitasse. Sempre alertando que, seria sempre com trabalho que eu conseguiria, porém não poderia jamais me deixar esmorecer. À ti, minha avó Gumerçília (*in memoriam*).

Um agradecimento muito especial aos meus três sobrinhos, que por eles nutro muito amor, Guilherme, Gabriel e Bruno. Aos meus irmãos Marcelo, Lourdes, Claudio e Aline. Muito obrigada pelo apoio e amizade.

Dos colegas de laboratório, um agradecimento especial para Vittoria de Lima Camandona, sempre prestativa, pronta para colaborar e ajudar; pessoa com quem pude aprender e dar muitas risadas. Sabrina, figura ímpar, alegre espontânea e cheia de vida. Foi percorrer outros caminhos, e que estes lhe tragam muito mais vivacidade.

Agradeço muito ao Prof. Dr. Mário Henrique de Barros, que iniciou cedendo-me seu laboratório e, posteriormente, aceitou-me como sua co-orientanda, doando seu tempo, conhecimento e insumos laboratoriais. Enfim, boa parte deste projeto deve-se à sua colaboração.

Professor Ribamar, o Riba, como muitos conhecem. Este, um entusiasta da Ciência, dispensa seu tempo com longas conversas de diversas naturezas, sempre nos transmitindo seu conhecimento, suas vivências dentro e fora da USP. Um professor que, além de tudo isso, mostra que é possível uma ciência honesta e alinhada aos valores exigidos para uma sociedade como a nossa.

Agradeço à Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

Finalmente, agradeço à agência de fomento CAPES pela bolsa concedida.

“A educação, se bem compreendida, é a chave para o progresso moral.” (Allan Kardec)

RESUMO

CAETANO, C.S. **Caracterização do papel das enzimas manosiltransferases no processo de envelhecimento em *Saccharomyces cerevisiae***. 2022. 66 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Projeta-se para 2050 o dobro de pessoas acima de 65 anos e o triplo, acima de 80 anos. Espera-se uma elevada prevalência de indivíduos com doenças relacionadas ao envelhecimento (Diabetes Mellitus, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer). Durante o envelhecimento, há perda da proteostase e todo o proteoma é afetado, inclusive a homeostase de glicosilação que ocorre no RE (retículo endoplasmático), mas a via *UPR* (*Unfolded Protein Response*) pode ser ativada para reestabelecer a homeostase proteica. Mutantes das manosiltransferases *ALG12* (BY4741) e *PMT1* (BY4742) são capazes de induzir esta via e promover a extensão da *RLS* (*Replicative Lifespan*) em *Saccharomyces cerevisiae*. Este trabalho estudou um conjunto de mutantes nulos de manosiltransferases, codificadas nos genes *ALG6*, *ALG12*, *EOS1*, *MNN1*, *MNN2*, *PMT1*, *PMT3*, *PMT5* e *YUR1*. Verificou-se se estes, individualmente, estendem a *RLS* de *S. cerevisiae* por ativação da *UPR*. Todos os mutantes, exceto *eos1Δ* estenderam a *RLS*. Vermelho do Congo e *Calcofluor White* foram utilizados para analisar a resistência ao estresse da parede celular. A atividade do sistema Ubiquitina-Proteassomo foi mensurada e mostrou-se reduzida nos mutantes nulos de manosiltransferases. Os resultados de *RT-PCR* sugerem que, nos mutantes testados, não houve a ativação da via *UPR*, indicando que a observada extensão de longevidade é promovida por uma outra via de *S. cerevisiae*. Outras vias deverão ser estudadas, para analisar quais colaboram com este fenótipo. Conclui-se que o conjunto de manosiltransferases estudadas, não constitui um conjunto fenotípico homogêneo, porque apenas alguns mutantes estenderam a longevidade de *S. cerevisiae*.

Palavra-chave: Manosiltransferases. *Saccharomyces cerevisiae*. Longevidade. Biologia Molecular.

ABSTRACT

CAETANO, C.S. **Deletion of mannosyltransferases reduce overall protein translation and extend yeast replicative lifespan.** 2022. 66 p. Master thesis (Biotechnology), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

By 2050, it is expected that the population of 65+ years old will double and that of 80+ years old will triple. Biologically, molecular and cellular factors are detrimental for the life expectancy across species. For example, it is known that when proteostasis declines, the entire proteome is affected, including the glycosylation homeostasis in the ER (endoplasmic reticulum). The UPR (Unfold Protein Response) signaling pathway can be activated to reestablish homeostasis. The null mutants of the mannosyltransferases encoded in *ALG12* and *PMT1* are able to induce this pathway and promote the extension of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*, by activating the UPR. Not only these two mannosyltransferases, but a set of null mutants of mannosyltransferases, encoded in *ALG6*, *ALG12*, *EOS1*, *MNN1*, *MNN2*, *PMT1*, *PMT3*, *PMT5*, and *YUR1* genes, are able to promote the extension of longevity. We studied these nine mutants to analyze whether they could extend longevity by activating the UPR. Eight of these mutants (*alg6* Δ , *alg12* Δ , *mnn1* Δ , *mnn2* Δ , *pmt1* Δ , *pmt3* Δ , *pmt5* Δ and *yur1* Δ) extended longevity. The activity of the Ubiquitin-Proteasome was reduced in the null mutants of mannosyltransferases. The RT-PCR assays results suggest that in the tested mutants, there was no activation of the UPR pathway, indicating that the observed extension of longevity is promoted by a different pathway in *S. cerevisiae*. Other tests should be performed to analyze which pathways are involved in the RLS extension phenotype of this set of mutants. Taken together, mannosyltransferases null mutants do not behave similarly regarding *S. cerevisiae* RLS extension.

Key words: Mannosyltransferases. *Saccharomyces cerevisiae*. Longevity. Molecular Biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do ensaio de Longevidade Replicativa

Figura 2 – Esquema do ensaio de Envelhecimento Cronológico

Figura 3 – Mecanismos de perda da proteostase

Figura 4 – Ativação da via de *UPR* em leveduras

Figura 5 – Sequência de *KanMX*

Figura 6 – Mutantes nulos de manosiltransferases apresentam extensão de longevidade replicativa

Figura 7 – Mutantes nulos de manosiltransferases respondem diferentemente ao ensaio de estresse térmico

Figura 8 – Mutantes nulos de manosiltransferases respondem diferentemente ao ensaio de resistência da parede celular

Figura 9 – Análise do perfil de polissomos dos mutantes nulos de manosiltransferases

Figura 10 – Comparação da razão de polissomos/monossomos do perfil dos polissomos dos mutantes de manosiltransferases

Figura 11 - Estresse do Retículo Endoplasmático causado por Tunicamicina não afeta negativamente os mutantes nulos de manosiltransferases

Figura 12 - Mutantes nulos de manosiltransferase inibem a atividade peptidásica do proteassomo

Figura 13 – Deleção de manosiltransferase não altera o crescimento de *S. cerevisiae* em meio rico

Figura 14 – Os mutantes nulos de manosiltransferases de *S. cerevisiae* não induzem a ativação da via *UPR*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aumento da população mundial com mais de 65 anos

Tabela 2 – Função das manosiltransferases de *S. cerevisiae* no processo de glicosilação

Tabela 3 – Significância do aumento da longevidade em *S. cerevisiae* com a deleção das manosiltransferases em relação ao tipo selvagem

Tabela 4 – Oligos utilizados para amplificação do cassete de *KanMX*

Tabela 5 – Preparo do gradiente de sacarose

Tabela 6 – Interação física entre manosiltransferase e Dhh1p

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
<i>ALG</i>	<i>Asparagine-linked glycosylation</i>
<i>Asn</i>	<i>Asparagine</i>
<i>ATF6</i>	<i>Activating transcription factor-6</i>
ATP	Adenosina trifosfato
<i>BiP</i>	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
CaCl_2	Cloreto de cálcio
<i>CDG</i>	<i>Congenital disorders glycosylation</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CFW	<i>CalcoFluor White</i>
<i>CLS</i>	Chronological Lifespan
CMD	Congenital muscular dystrophy
Cp	Comprimento
CRISPR	<i>Clusters Regularly Intpaced Short Palindromic Repeats</i>
CWI	<i>Cell Wall Integrity</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dol-P	Dolicolfosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilediaminotetraacético
ERCs	Círculos extracromossomais de rDNA
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HCl	Ácido clorídrico
Hsc	Heat Shock Cognate
HSP	Heat Shock Protein
HSR	Heat Shock Response
IRE1	Inositol-requiring enzyme-1
<i>LLO</i>	<i>Lipid-linked oligossaccharide</i>
mg	Miligrama
MgCl_2	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro

mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ OAc	Acetato de Amônio
nm	Nanômetro
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OST	Oligosacariltransferase
pb	Pares de base
PCR	Polymerase chain reaction
PERK	Protein ER kinase
pH	Potencial hidrogenoiônico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rDNA	DNA ribossômico
<i>RE</i>	Retículo endoplasmático
<i>RLS</i>	<i>Replicative Lifespan</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
<i>SDC</i>	<i>Synthetic dextrose complete</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sgRNA	Single guide RNA
<i>SIR2</i>	Sirtuin 2
TE	Tris-EDTA
TFT	Taxa de fertilidade total
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TM	Tunicamicina
tRNA	RNA transportador
UPR	Unfolded Protein Response
YPD	Meio rico contendo extrato de levedura peptona e glicose
WWS	<i>Walker-Warburg Syndrome</i>

Sumário

1 - Introdução	12
1.1 – Epidemiologia do envelhecimento	12
2 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo de envelhecimento	14
2.1 – Envelhecimento Replicativo.....	16
2.2 – Envelhecimento Cronológico.....	18
3 – As manosiltransferases em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e em humanos.....	20
3.1 – Glicosilação de proteínas.....	21
3.2 – N-glicosilação.....	22
3.3 – O-glicosilação.....	23
3.4 – O-manosilação.....	24
3.5 – Manosiltransferases e doenças em humanos.....	24
4 – Aspectos biológicos do envelhecimento.....	25
4.1 – <i>Unfolded Protein Response (UPR)</i> como resposta para perda de homeostase de proteínas.....	27
4.2 – Manosiltransferase e a via <i>UPR</i> na extensão da longevidade em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
5 – Justificativa	30
6 – Objetivos.....	31
6.1 – Objetivo Geral.....	31
6.2 – Objetivos Específicos.....	31
7 – Materiais e Métodos.....	32
7.1 – Condições gerais de esterilização, solidificação dos meios de cultivo e crescimento dos microrganismos.....	32
7.2 – Identificação das linhagens.....	34
7.3 – Extração de DNA genômico.....	36

7.4 – Ensaio de longevidade replicativa em mutantes de manosiltransferases.....	36
7.5 – Ensaio de estresse térmico.....	37
7.6 – Ensaio de resistência ao estresse da parede celular pela ação dos Antifúngicos Calcofluor White e Vermelho do Congo.....	38
7.7 – Comparação do perfil de polissomos entre os mutantes de manosiltransferases.....	38
7.7.1 – Preparo do extrato de células.....	38
7.7.2 – Preparação do gradiente de Sacarose.....	39
7.7.3 – Centrifugação dos gradientes.....	40
7.7.4 – Análise das imagens.....	40
7.8 – Ensaio de estresse no Retículo Endoplasmático com o composto Tunicamicina.....	41
7.9 – Análise de atividade peptidásica dos mutantes de manosiltransferases.....	41
7.10 – Ensaio de curva de crescimento.....	42
7.11 – Extração de RNA Total de <i>S. cerevisiae</i> para <i>RT-PCR</i>	42
7.11.1 – Síntese da fita do DNA complementar.....	43
8 – Resultados e discussão.....	44
8.1 – Ensaio de Longevidade Replicativa em Mutantes de Manosiltransferases.....	44
8.2 – Análise da resistência ao estresse térmico nos mutantes de manosiltransferases.....	46
8.3 – Ensaio de resistência da parede celular.....	49
8.4 – Comparação do perfil dos polissomos entre os mutantes de manosiltransferases.....	52
8.5 – Análise de resistência ao composto de Tunicamicina.....	58

8.6 – Comparação da atividade peptidásica proteassomo entre os mutantes nulos de manosiltransferases.....	59
8.7 – Curva de crescimento dos mutantes nulos de manosiltransferases de <i>S. cerevisiae</i>	62
8.8 – Análise do processamento do RNAm de <i>HAC1</i>	63
9 – Conclusões.....	66
10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 - Introdução

1.1 - Epidemiologia do envelhecimento

Sabe-se que, com o envelhecimento, múltiplas alterações refletem no funcionamento do organismo conduzindo ao declínio das funções fisiológicas e, como consequência, à morte (Jin, 2010).

Devido à sua importância, o tema envelhecimento está emergindo como uma política chave, pois, mundialmente, o número de idosos está aumentando. O Departamento Econômico e Social das Nações Unidas, em seu último levantamento de 2019 (tabela 1), projetou que o número de idosos com 65 anos ou mais passará de 703 milhões de pessoas para 1,5 bilhão até 2050. O Envelhecimento está intrinsecamente ligado ao desenvolvimento sustentável, e inclusive é meta da agenda do Desenvolvimento Sustentável de 2030 (ONU, 2019).

Tabela 1 – Aumento da população mundial com mais de 65 anos

Região	Número de pessoas com 65 anos ou mais em 2019(milhão)	Número de pessoas com 65 anos ou mais em 2050 (milhão)	Percentual de mudança entre 2019 a 2050
Mundo	702.9	1548.9	120
África Subsariana	31.9	101.4	218
Norte da África e Oeste Asiático	29.4	95.8	226
Centro e Sul Asiático	119.0	328.1	176
Oriente e Oriente-Sul Asiático	260.6	572.5	120
América Latina e Caribenha	56.4	144.6	156
Austrália e Nova Zelândia	4.8	8.8	84
Oceânia, exceto Austrália e Nova Zelândia	0.5	1.5	190
Europa e América do Norte	200.4	296.2	48

Fonte: *United Nation (Department of economic and Social and Affairs).*

A Organização das Nações Unidas, no relatório de 2017, informou que a população mundial continuará crescendo, porém com taxas menores. Há cerca de uma década atrás, a população global crescia em uma taxa de 1,24%, e, em 2017, a taxa era de 1,10%. De forma relevante, a taxa de fertilidade total (TFT), que é o fator principal para a redução na taxa de crescimento populacional, em 2017, era de 2,5 nascidos, e passará para 2 por mulher em 2100, sendo que em países de menor desenvolvimento, reduzirá de 4,3 para 2,1 (ONU, 2017). Pesquisas já sugerem que futuras ações políticas deverão ser realizadas para o incentivo à fertilidade (Nargund, 2009).

A queda na taxa de fertilidade faz com que os idosos estejam em maior número que a faixa etária jovem da população. Em 1980, crianças de até 9 anos ultrapassaram o número de idosos, sendo 1,1 bilhão contra 0,4 bilhão, respectivamente; porém, para 2050, esta proporção será alterada para, provavelmente, 2,1 bilhões de idosos e 2,0 bilhões de jovens entre 10 e 24 anos de idade. Paralelamente, teremos triplicado o número de idosos com

mais de 80 anos de idade, passando de 137 para 425 milhões (ONU, 2017).

Levando em consideração este fenômeno, anteriormente, no relatório de 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tratou sobre o envelhecimento e saúde, analisando o cenário mundial e apontando que: i) mesmo tendo uma expectativa de vida maior que nossos pais, não temos uma qualidade de vida superior; ii) não podemos afirmar ainda que os custos com a saúde para população com mais de 60 anos será elevado; iii) ressalta que o envelhecimento aumenta a possibilidade do surgimento doenças cardiovasculares, doenças auditivas, doenças respiratórias crônicas, câncer e demência. Considera ainda que, a capacidade funcional intrínseca é um fator variável de indivíduo para indivíduo, sendo necessário o fornecimento de recursos públicos que visem maximizar a capacidade funcional e a promoção para um envelhecimento saudável (OMS, 2015).

2 – *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo de envelhecimento.

S. cerevisiae foi o primeiro organismo a ter seu genoma completamente sequenciado e isto tem colaborado para o entendimento de doenças (Goffeau et al., 1996, Botstein, Chervitz, & Cherry, 1997) e envelhecimento em humanos (Gershon & Gershon, 2000).

Desde 1959, *S. cerevisiae* tem sido utilizado como modelo para a análise do processo de envelhecimento, por ser um organismo de fácil manipulação, rápida reprodução e muitos mecanismos do ciclo celular também já foram bem caracterizados e são conservados entre levedura e humanos (Enserink & Kolodner, 2010). É um modelo bem aceito para estudos do envelhecimento (Bitterman et al., 2003).

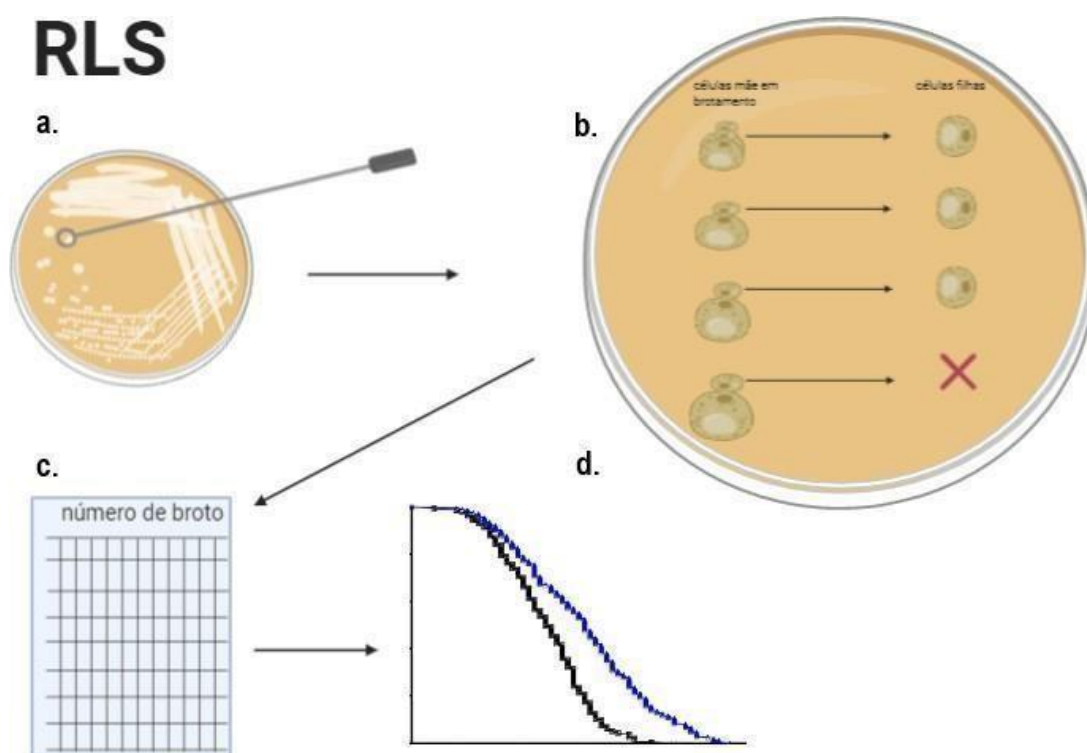
Foram desenvolvidos bancos de dados específicos para armazenamento e consulta de pesquisas sobre o processo de

envelhecimento em levedura, dentre os quais podemos citar o *GenAge* (<http://genomics.senescence.info/genes/>), com mais de 300 genes associados à longevidade e mais de 2000 genes associados ao envelhecimento ou a longevidade em organismos modelo (Tacutu et al., 2018).

Neste contexto, dois métodos, *CLS* e *RLS* (do inglês “*Chronological Lifespan* e *Replicative Lifespan*”, respectivamente, foram propostos para estudar o envelhecimento em *S. cerevisiae* (Longo et al., 2012).

2.1 - Envelhecimento Replicativo (RLS)

O método de Envelhecimento Replicativo é caracterizado pela quantidade de vezes que a célula mãe passa por divisão até entrar em senescência (Mortimer; Johnston, 1959). A técnica RLS está resumida na (figura 1).



Fonte: autoria própria

Figura 1 – Esquema do ensaio de Longevidade Replicativa. O ensaio fornece dados de uma célula mitoticamente ativa, contabilizando-se o número de células produzidas por uma célula mãe antes da senescência. **a)** É realizado em placas frescas de YPD e inicia com cultivo de colônias isoladas. Utiliza-se um microscópio de dissecção, que possui uma agulha que é usada para a dissecção dos brotos. Uma célula virgem (broto) é designada como a célula mãe. **b)** Aproximadamente 50 células virgens são alinhadas verticalmente. É desejável no máximo 3-5 alinhamentos por placa. A célula mãe é visivelmente maior que o broto, desta forma, ambas podem ser separadas. **c)** O número de brotos de cada célula é anotado para contagem. No período noturno, a placa é mantida a 4 °C para que se possa controlar o brotamento. O procedimento é repetido até a célula mãe cessar o brotamento. **d)** Após a contagem dos brotos, o resultado é plotado em gráfico e submetido a posterior análise estatística. Aqui uma curva explicativa de uma linhagem selvagem (*WT*) comparada com outra linhagem.

Análises da divisão celular de *S. cerevisiae* realizadas em 1950 por Barton demonstraram a formação de cicatrizes na parede celular a cada brotamento, conseguindo contabilizar 23 cicatrizes na célula mãe (Barton, 1950). Seguindo com estes dados, em 1959, Mortimer e Johnston, analisaram que as novas células eram menores que a célula mãe, o que facilitava a distinção entre elas, e, além disso, as células tinham replicação finita, sendo que, após algumas divisões, morriam. Estas informações serviram como base para mensurar a longevidade replicativa em *S. cerevisiae*. Porém, não obstante a estes valiosos dados, este modelo não obteve notoriedade na época (Mortimer; Johnston, 1959).

Acreditando que as cicatrizes não eram a única forma de determinar a longevidade em levedura, mas sim que fatores citoplasmáticos a influenciava, em 1989, Egilmez e Jazwinski deram maior complexidade aos experimentos de Mortimer e Johnston, analisando um fenótipo estocástico de senescência (Egilmez & Jazwinski, 1989).

Assim, na década de 90 aliou-se técnicas moleculares e celulares nos estudos de longevidade, o que levou a identificação de genes e vias importantes no processo. Dada a conservação dessas vias entre eucariotos, o modelo *RLS* foi aprimorado para o estudo da longevidade em *S. cerevisiae* (Longo et al., 2012).

Após quatro décadas das primeiras observações em *S. cerevisiae*, é possível compreender, ao menos em parte, os mecanismos moleculares de longevidade em *RLS*. Desta forma, podemos mencionar efetivos contribuintes, como o gene *SIR2* e a formação de ERCs (círculos extracromossomais de DNA ribossômico) na levedura. Estes fatores inter-relacionam-se, porque o gene *SIR2* é um silenciador de heterocromatina atuando, por exemplo, na regulação no cromossomo III dos loci *HMR* e *HML* relacionados aos tipos sexuais de *S. cerevisiae* (Ivy et al., 1986).

Paralelamente, na tentativa de entender as causas efetivas para o envelhecimento em leveduras, um grupo de pesquisa observou que células mães tinham aumento e fragmentação nucleolar, ocasionando senescência e morte (Sinclair et al., 1997) e que este evento era ocasionado por ERCs (Sinclair & Guarente, 1997). Atualmente, sabe-se que Sir2p requer NAD⁺ para desempenhar sua função silenciadora (Landry et al., 2000), e este importante evento retarda o envelhecimento em *S. cerevisiae*, porque reprime a formação de círculos extracromossomais de rDNA (Kaeberlein et al., 1999). O gene de rDNA está localizado no cromossomo XII com cerca de 140 cópias (Petes, 1979). Estes círculos extracromossomais surgem por recombinação homóloga em repetições adjacentes do rDNA, o qual posteriormente são extraídos em forma de círculos. A presença desses círculos não é observado na célula filha, logo após brotamento, indicando que não há padrão de hereditariedade na formação dos círculos (Sinclair & Guarente, 1997).

Outros determinantes para o envelhecimento, que são conservados entre os eucariotos, já foram observados em ensaios RLS. A restrição calórica pode ser empregada em *S. cerevisiae* através da redução da concentração de glicose de 2% para 0,5% no meio de cultura, e é a intervenção mais eficientemente capaz de promover a longevidade. Esta intervenção está associada a muitas mudanças fisiológicas, incluindo mudança da respiração anaeróbica para aeróbica. (Wasko & Kaeberlein, 2014).

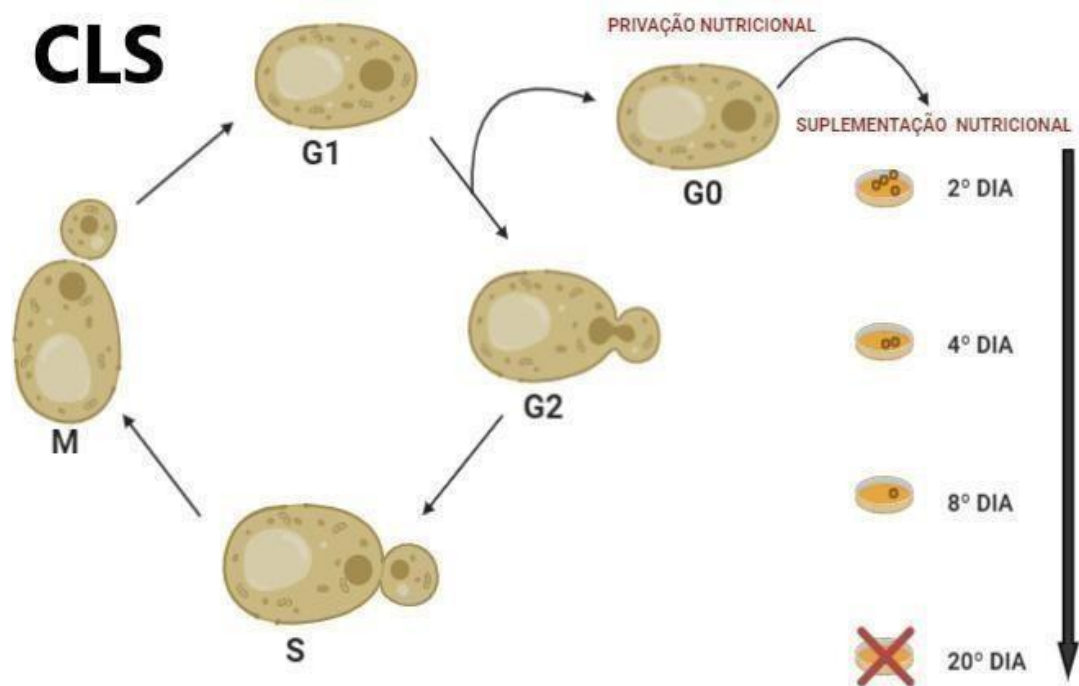
2.2- Envelhecimento Cronológico (CLS)

O método de análise do envelhecimento cronológico em *S. cerevisiae* (figura 2) mensura a capacidade clonogênica de cultura celular de leveduras no estado pós-diáuxico e, posteriormente, pós-mitótico. O crescimento diáuxico inicia após 24 horas, quando se esgota a glicose do meio e ocorre uma alteração do metabolismo fermentativo para um modo respiratório,

dependente de etanol gerado durante a fermentação (Werner-Washburne et al., 1993). Após esgotados todos os substratos, a célula conduz-se para fase estacionária e, em seguida, para quiescência (G_0), mantendo-se em baixa taxa metabólica. Isso torna a célula altamente resistente a múltiplos estresses, podendo manter-se nesta fase por um período superior a três meses. O método de *CLS* foi desenvolvido na década de 90 para complementar o modelo *RLS*, a fim de assemelhar à capacidade de desenvolvimento das células de organismos superiores no estado pós-mitótico, onde fatores de estresse como privação nutricional podem induzir a célula a sair do ciclo celular e entrar na fase estacionária e voltar ao ciclo quando os nutrientes necessários estejam novamente disponíveis (Fabrizio & Longo, 2003), (Longo, 2012).

Essa reprogramação do ciclo celular e entrada em quiescência, fica evidente quando células do tipo selvagem são incubadas em meio *SDC* (*synthetic dextrose complete*), e nelas observam-se uma alta taxa metabólica. Após o período de 6 a 7 dias as células morrem. Porém, utilizando este mesmo meio e alternando a cultura com água, as células apresentam uma taxa metabólica reduzida e sua longevidade é aumentada, indicando assim que vias metabólicas alternativas são ativadas (Fabrizio & Longo, 2003). Substituir meio de cultura por água é uma condição de restrição calórica extrema, por isso estende a *CLS*.

O modelo *CLS* atualmente pode ser analisado em larga escala, com uso de técnica "*High-Throughput*", a qual permite a um pesquisador, em um único dia, obter mais de 1000 resultados genotípicos e fenotípicos diferentes de longevidade e viabilidade celular, considerando condições de crescimento diferentes (Sarnoski et al., 2017).



Fonte: autoria própria

Figura 2 – Esquema do ensaio de envelhecimento cronológico. As células são induzidas ao estado pós-diáuxico, pelo esgotamento de nutrientes, saindo do ciclo celular para fase estacionária G0. A cada 48 horas, as células são monitoradas em sua capacidade celular em voltar ao ciclo pelo fornecimento de nutrientes. Repete-se o procedimento a cada dois dias, para uma nova alíquota de células em G0, até não haver mais formação de colônias em placa.

3 – As manosiltransferases em *Saccharomyces cerevisiae* e em humanos

A molécula de manose foi, pela primeira vez, observada na extração da parede celular de levedura (Sentandreu & Northcote, 1968) e em mamíferos, extraída de tecido cerebral (Finne et al., 1979).

3.1 - Glicosilação de proteínas

Glicano é a denominação para carboidratos complexos, os quais são nomeados substituindo o final do nome por “ose” (Moss et al., 1995). Participam do processo celular de glicosilação, que é a modificação pós-traducional de proteínas de membranas e secretórias, ocorrendo na via secretória (FREEZE, Hudson H., 2013).

A glicosilação é definida pelo tipo de ligação glicosídica (Eklund & Freeze, 2005). *S. cerevisiae* possui um largo número de glicoproteínas ricas em manose. O processo de glicosilação é idêntico em células animais. Contudo, a estrutura dos blocos glicosídicos é diferente, resultando em alvos terapêuticos contra fungos (Ernst & Prill, 2018).

Neste trabalho abordaremos nove manosiltransferases com envolvimento no processo de envelhecimento (McCormick et al., 2015), que participam do processo de modificação pós-traducional de proteínas, N-glicosilação, O-glicosilação e O-manosilação (tabela 2).

Tabela 2 - Função das manosiltransferases de *S. cerevisiae* no processo de glicosilação

Gene	ORF	Descrição da proteína	Tipo de ligação	
ALG6	YOR002W	Localizada no lúmen do RE. É uma Alfa-1,3-glicosiltransferase, responsável pela transferência do Dolicol-Fosfato para resíduos de asparagina da proteína durante a N-glicosilação.	Reiss G, et al. (1996)	N-glicosilação
ALG12	YNR030W	Localizada no RE. É uma Alfa-1,6-manosiltransferase, responsável pela adição de alfa-1,6-manose para o Dolicol ligado a Man7GlcNAc2.	Jakob CA, et al. (1998) Grimme SJ, et al. (2001) Burda P, et al. (1999)	N-glicosilação
EOS1	YNL080C	Envolvida na N-glicosilação	Nakamura T, et al. (2007)	N-glicosilação
MNN1	YER001W	Localizada no Complexo de Golgi, é uma Alfa-1,3-manosiltransferase, requerida para adição de alfa-1,3-manose.	Lussier M, et al. (1999) Yip CL, et al. (1994)	O-glicosilação
MNN2	YBR015C	Localizada no Complexo de Golgi, é uma Alfa-1,3-manosiltransferase, requerida para adição de alfa-1,3-manose.	Raschke WC, et al. (1973)	O-glicosilação
PMT1	YDL095W	Localizada na membrana do RE. Transfere a manose do dolicol fosfato para o resíduo de serina e treonina da proteína. É essencial para rigidez da parede celular.	Strahl-Bolsinger S, et al. (1993)	O-manosilação
PMT3	YOR321W	Localizada na membrana do RE. Transfere a manose do Dolicol-Fosfato para o resíduo de serina e treonina da proteína.	Immervoll T, et al. (1995)	O-manosilação
PMT5	YDL093W	Localizada na membrana do RE. Transfere a manose do Dolicol-Fosfato para o resíduo de Serina e Treonina da proteína	Girrbach V and Strahl S (2003)	O-manosilação
YUR1	YJL139C	Localizada no Complexo de Golgi.	Lussier M, et al. (1993)	N-glicosilação

Fonte: <https://www.yeastgenome.org/>

3.2 – N-glicosilação

A N-glicosilação (adição de monossacarídeo no grupo NH₂ da asparagina da proteína) é iniciada na membrana do RE (retículo endoplasmático) do lado citoplasmático com a montagem de um precursor, o oligossacarídeo LLO (*lipid-linked oligossaccharide*) (Breitling & Aebi, 2013), que requer como substrato Dol-P (dolicolfosfato), que está de forma bipartida ancorado

na membrana do RE (Jung & Tanner, 1973). A partir deste substrato, a estrutura do oligossacarídeo é montada pela junção de três tipos de carboidratos, sendo três moléculas de glicose, nove moléculas de manose e duas moléculas de N-acetilglicosamina, representada por Glc3Man9GlcNAc2 . A formação de tal estrutura é catalisada por uma série de glicosiltransferases, codificadas pelos genes *ALG* (*asparagine-linked glycosylation*). A estrutura *LLO* é transferida em bloco para o grupo amina no resíduo de Asparagina (*Asn*) da proteína crescente (Markus Aebi, 2013). A transferência é catalisada pelas *OST* (oligossacariltransferases). Em levedura, as subunidades de *OST* são codificadas por *OST3*, *OST4*, *OST5*, e *OST6*, e os genes essenciais *OST1*, *OST2*, *WBP1*, *SWP1* e *STT3*, (Kelleher & Gilmore, 2006).

3.3 - O-glicosilação

A O-glicosilação é o processo de adição de monossacarídeo no grupo OH da serina e treonina da proteína. Inicia-se no RE com a transferência de um monossacarídeo N-acetil-Galactose, *GalNAc-UDP*, para um resíduo de Serina ou Treonina da proteína alvo. Este processo é controlado pela família de genes *PMT1-7* (Gentzsch & Tanner, 1996). A adição da terceira manose é realizada no Complexo de Golgi (Van Den Steen et al., 1998). O transporte de proteínas é realizado por meio da via exocítica, que compreende o RE, vesículas intermediárias e o Complexo de Golgi. Duas classes distintas de proteínas, *COPI* e *COPII*, são responsáveis pelo tráfego de proteínas entre o RE ao Complexo de Golgi (Duden, 2003).

Embora as cadeias de O-glicosil em *S. cerevisiae* possam ter de dois ou três resíduos de manose, ocasionalmente, pode ser estendida pela α -1,3- manosiltransferase para um tamanho de cinco ou sete resíduos, tendo como doador um açúcar *GPD-Man*. Uma das enzimas responsáveis é a *Mnn1p* estudada neste trabalho (Ernst & Prill, 2018).

3.4.- O-manosilação

A manosilação inicia-se no RE. É um processo menos complexo que a N-glicosilação, porque não necessita de *LLO* e sim da transferência de uma molécula de manose via *Dol-P* para um resíduo de serina ou treonina na proteína crescente (Babczinski & Tanner, 1973). Esta transferência é catalisada pelas proteínas O-manosiltransferases (Lommel & Strahl, 2009).

3.5 - Manosiltransferases e doenças em humanos

Em humanos, mutações nas glicosiltransferases afetam a via de O-manosilação, causando alterações na glicosilação da proteína α -dístroglicano e, por conseqüência, doenças como distrofia muscular congênita (CMD – congenital muscular dystrophy) (Lehle et al., 2006). Mutações nos genes POMT1 e 2 (Protein O-mannosyltransferase 1 e 2), estão associadas à síndrome de *WWS* (*Walker-Warburg Syndrome*). Esta síndrome é caracterizada por sinais presentes em recém-nascidos e na primeira infância, e ocasionalmente pode ser detectado no acompanhamento do pré-natal com exames de imagem. Os sintomas são: hipotonia muscular generalizada, fraqueza muscular, desenvolvimento retardado com hidrocefalia, malformação cerebelar e anormalidade ocular. Estima-se que esta doença afete 1 a cada 60,5 mil recém-nascidos mundialmente, que possivelmente falecerão antes dos três anos de idade (Rhodes, Hatten, & Ellington, 1992, Department of Health & Human Services, 2018).

Os estudos da N-glicosilação têm auxiliado para o entendimento de doenças ocasionadas por falhas de processamentos desta via, caracterizadas como *CDG* (*congenital disorders glycosylation*) (M Aebi & Hennet, 2001). Estas desordens são classificadas de acordo com a localização da falha de processamento, sendo denominadas como CDG1

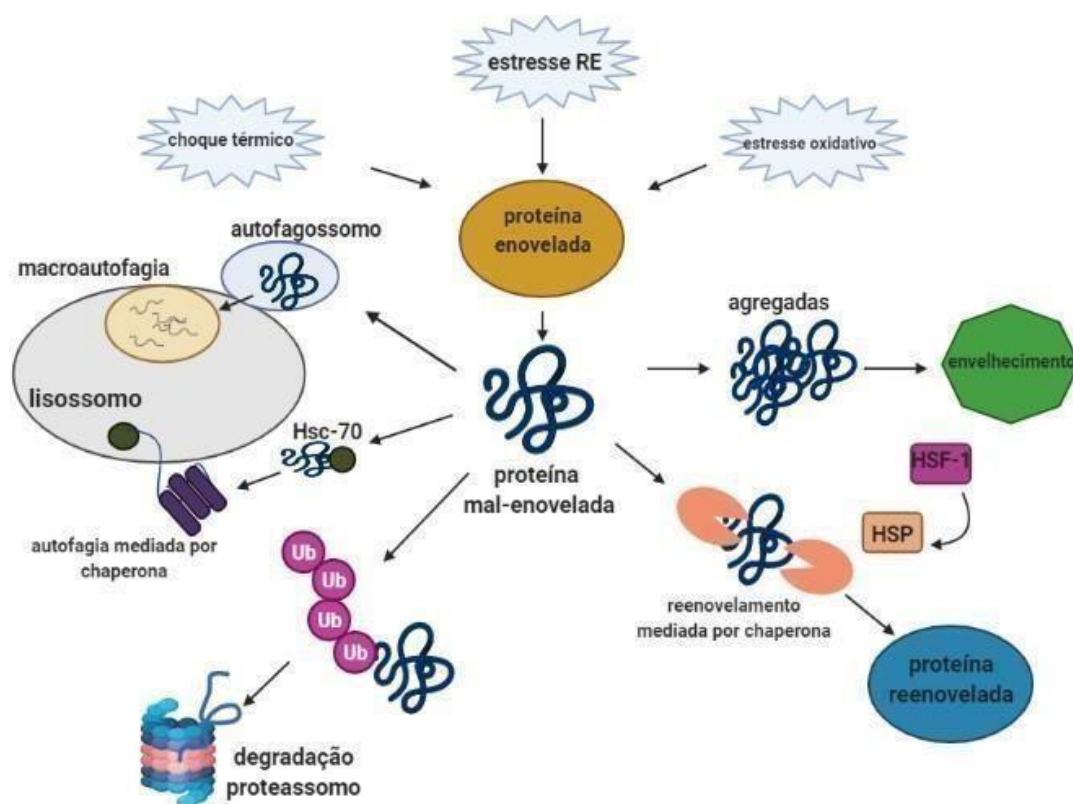
e CDG2 (Jung & Tanner, 1973). Defeitos na montagem de *LLO*, incluindo nas OSTs, são nomeadas como CDG1 com suas subdivisões; já defeitos no processamento de N-glicano são nomeadas como CDG2, também com suas subdivisões (Lehle et al., 2006).

4 - Aspectos biológicos do envelhecimento

Tal qual o câncer, o envelhecimento tem suas particularidades, e este processo deixa suas marcas. Um grupo de pesquisadores propôs que o processo de envelhecimento possui nove marcas a considerar: i) instabilidade genética; ii) encurtamento dos telômeros; iii) alterações epigenéticas; iv) perda da proteostase; v) sensor de nutrientes desregulado; vi) disfunção mitocondrial; vii) senescência celular; viii) exaustão das células-tronco; ix) interação intercelular alterada (López-otín et al., 2013).

Dentre estas alterações celulares e moleculares, interessa para este trabalho a perda de proteostase. A rede de proteostase é definida pela ação coletiva de muitas proteínas para preservar a estabilidade e a funcionalidade do proteoma, envolvendo os mecanismos de síntese proteica, enovelamento, agregação e desagregação de proteínas, que inclui a maquinaria traducional, chaperona molecular e co-chaperonas, o sistema ubiquitina-proteassomo e a maquinaria autofágica. De modo auxiliar à proteostase, incluem-se os fatores de transcrição, remodeladores de cromatina, componentes estruturais, vias de sinalização, fatores metabólicos, maquinaria de importação e exportação e modificadores pós-traducionais (Johnathan & Richard, 2015).

A perda da proteostase é um dos principais fatores envolvidos no processo de envelhecimento (figura 3).



Fonte: autoria própria

Figura 3 – Mecanismos de perda da proteostase – estímulos endógenos e exógenos podem ocasionar a perda da homeostase do enovelamento de proteínas. Este evento pode desencadear a perda da proteostase e induzir várias vias. Proteínas mal enoveladas são geralmente reenovadas pelas *HSP* (*heat shock protein*) ou são degradadas pelo sistema ubiquitina-proteassomo ou pela via autofágica. A via autofágica inclui o reconhecimento de proteínas mal enoveladas pelas chaperonas Hsc-70 e sua importação para dentro do lisossomo, ou sequestra as proteínas e organelas danificadas para dentro do autofagossomo que se funde com o lisossomo num processo de macroautofagia. Falhas no reenvolvimento ou degradação de proteínas levam ao acúmulo e agregação, resultando em efeitos proteotóxicos.

Vias de respostas ao estresse são acionadas para reestabelecer a homeostase de proteínas, sendo a *UPR* (*Unfolded protein response*) uma das vias mais preponderantes (Johnatan & Richard, 2015).

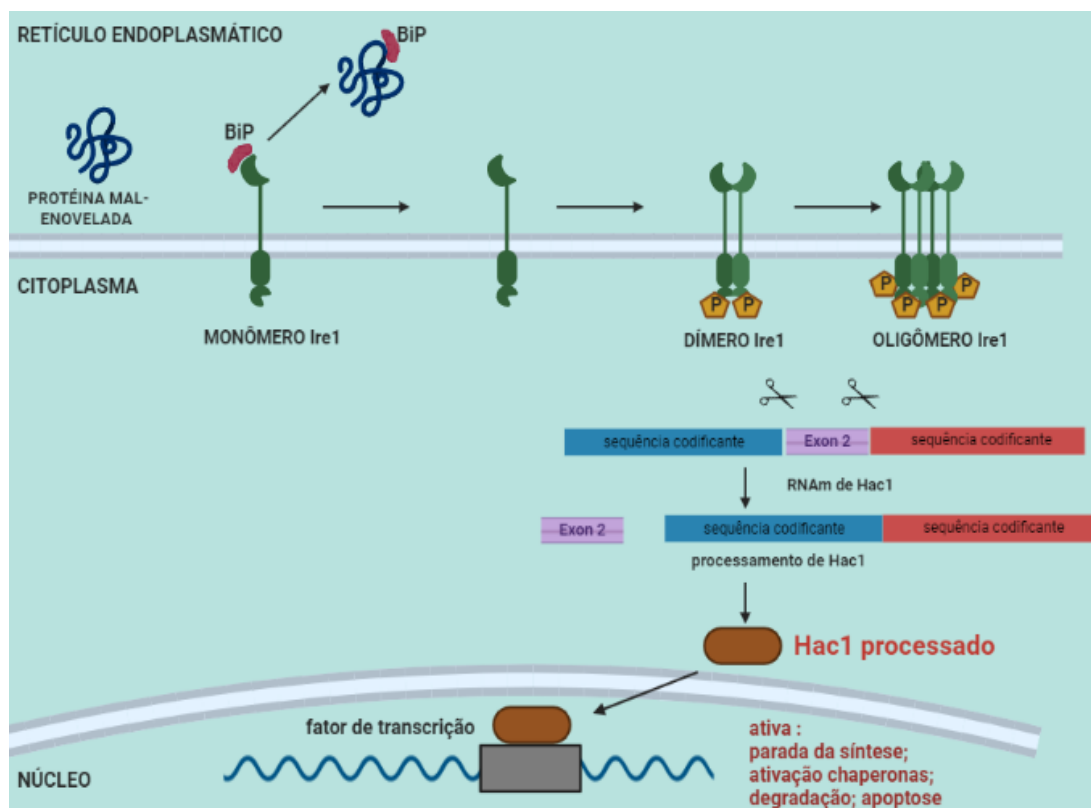
4.1 - *Unfolded Protein Response (UPR)* como resposta para perda de homeostase de proteínas

A via *UPR* é ativada em resposta ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do retículo endoplasmático. O Retículo Endoplasmático (RE) é uma organela com diversas e importantes funções celulares, tais como armazenamento de cálcio, síntese de lipídeos, síntese e transporte de proteínas e metabolismo de carboidratos (Schwarz & Blower, 2016). Neste trabalho interessa-nos a síntese de proteínas.

A alteração da homeostase no RE, pode gerar um estresse nesta organela, como, por exemplo, o mau enovelamento de proteínas, as quais tendem a se acumular no lúmen do RE. Desta forma, é necessário mecanismos para reestabelecer a homeostase, a fim de aliviar o estresse e evitar a morte celular (Bravo et al., 2013). Para tanto, a célula ativa as respostas por meio da via *UPR* sendo: i) temporária inibição da síntese de proteínas, ii) degradação das proteínas mal-enoveladas ou iii) aumento na expressão de chaperonas. Para gerar esta resposta alguns sensores são ativados, tais como *PERK* (protein kinase RNA (*PKR*)-like ER kinase), *ATF6* (*activating transcription factor-6*) e uma proteína transmembrana, *IRE1* (inositol- requiring enzyme-1), esta última é a única conservada entre eucariotos (Ron & Walter, 2007). Na primeira descrição da proteína *IRE1*, relatou-se seu papel de proteger a célula, evitando o acúmulo de proteínas mal- enoveladas (Cox et al., 1993).

Dentro da via *UPR*, *Ire1p* passa por oligomerização e auto-fosforilação (Shamu & Walter, 1996). Esta modificação possibilita a ativação de outro gene, *HAC1*. Após a transcrição, o RNAm de *HAC1* permanece na forma inativa, até que o *spliceossomo* (*Ire1p* e tRNA ligase) promovam a clivagem da região intrônica do RNAm, removendo 252 nucleotídeos e substituindo a região carboxi-terminal de 10 aminoácidos (forma não induzida) por 18 aminoácidos (forma induzida), a qual confere à

proteína Hac1p o papel de ativador transcrricional, dez vezes mais eficiente (figura 4). Sendo assim, Hac1p transloca-se para do núcleo e ativa a transcrição de vários outros genes que codificam chaperonas, tais como *KAR2* (Back et al., 2005). Este evento pode ser induzido com o uso de tunicamicina, um inibidor de glicosilação e ao mesmo tempo um indutor de estresse no RE (Takatsuki et al., 1975).



Fonte: autoria própria

Figura 4 – Ativação da via UPR em leveduras. *BiP* (Binding immunoglobulin protein) mantém a proteína transmembrana Ire1p na forma inativa. Proteínas mal-enoveladas recrutam a proteína *BiP* e induz mudanças conformacionais em Ire1p e sua auto-oligomerização e fosforilação, propiciando a atividade RNase, que medeia o *splicing* do RNAm de *HAC1*. O fator de transcrição maduro Hac1p ativa a via UPR.

4.2 - Manosiltransferases e a via *UPR* na extensão de longevidade em *Saccharomyces cerevisiae*

Em 2015, McCormick e colaboradores, através do ensaio de longevidade replicativa, identificaram grupos gênicos funcionais, capazes de extensão de longevidade replicativa em linhagens BY4741/BY4742 de *S. cerevisiae*, (McCormick et al., 2015). Nove mutantes nulos de manosiltransferases (tabela 3) estenderam a longevidade.

Tabela 3 – Significância do aumento da longevidade replicativa em *S. cerevisiae* (BY4741) com a deleção das manosiltransferases em relação ao tipo selvagem.

Gene	(<i>RLS</i>) média	% de aumento
<i>alg6Δ</i>	30.36	15.3
<i>alg12Δ</i>	31.75	16.6
<i>eos1Δ</i>	35.03	23.9
<i>mnn1Δ</i>	30.54	14.7
<i>mnn2Δ</i>	30.47	15.5
<i>pmt1Δ</i>	35.08	38.1
<i>pmt3Δ</i>	31.88	26.8
<i>pmt5Δ</i>	29.07	20.6
<i>yur1Δ</i>	31.18	19.2

Fonte: McCormick et al., 2015.

Anteriormente, constatou-se que a deleção individual dos genes *IRE1* e *HAC1*, que ativam a via de *UPR*, reduz a longevidade da célula. Porém, nos mutantes *alg12Δ* e *bst1Δ*, uma manosiltransferase e um regulador negativo de *COPII* na formação de vesículas do RE para Complexo de Golgi, respectivamente, houve um aumento na longevidade da célula. Continuando os estudos, constataram que nos mutantes *alg12Δ* e *bst1Δ* a

via *UPR* é ativada através do *splicing* do RNAm de *HAC1*. Com estes dados, concluiu-se que a extensão da longevidade é dependente de Ire1p funcional e ativação de Hac1p. Com tunicamicina, um composto estressor do RE, os mutantes *hac1Δ* e *ire1Δ*, as células não foram resistentes, sugerindo que a indução da via *UPR* e vias de resposta ao estresse agem por mecanismos distintos na extensão de longevidade. Ao todo, pelo menos 380 genes são ativados pela via de *UPR* (Labunskyy et al., 2014).

Um outro grupo analisou a capacidade de indução da via *UPR* e extensão da longevidade em mutantes *pmt1Δ* (*BY4742*), que também foi capaz de promover a extensão de longevidade e indução da via *UPR*. Sugerindo mais uma vez que a deleção das manosiltransferases está associada à extensão de longevidade em *S. cerevisiae* (Cui et al., 2015).

5 – Justificativa

Levando em consideração o aumento mundial do contingente de pessoas acima de 65 anos, tornam-se urgentes medidas de maior inclusão dos idosos em políticas sociais, uma vez que este tema, o envelhecimento, impacta diretamente no desenvolvimento sustentável.

Abordando de maneira mais individual, faz-se necessário, também, a compreensão dos mecanismos biológicos do envelhecimento intrínseco a cada indivíduo, no sentido de minimizar as doenças acarretadas por este complexo processo. Mecanismos genéticos, moleculares e celulares já estão sendo elucidados, porém o fenômeno do envelhecimento está longe de ser inteiramente compreendido.

A rede de proteostase compreende todo o proteoma, incluindo a glicosilação de proteínas. A perda da proteostase é uma das marcas encontradas no processo de envelhecimento, porém, não são conhecidos todos os fatores causais. Vias de sinalização são acionadas em resposta ao

processo de envelhecimento, como no caso da *UPR* (*Unfolded Protein Response*). Mutantes de duas manosiltransferases, *ALG12* e *PMT1* ativam a *UPR*, e este mecanismo estende a longevidade replicativa em levedura. Outro grupo de pesquisadores caracterizou um grupo de mutantes nulos de nove manosiltransferases: *alg6Δ*, *alg12Δ*, *eos1Δ*, *mnn1Δ*, *mnn2Δ*, *pmt1Δ*, *pmt3Δ*, *pmt5Δ* e *yur1Δ*, e verificou que essas deleções estendem a *RLS*, porém, ainda não se sabe o mecanismo celular que conduz a este fenótipo. Sendo assim, este trabalho propôs-se prosseguir com os estudos e analisar se, em conjunto, este grupo de mutantes de manosiltransferases utilizam-se da via *UPR* para estender longevidade.

6 - Objetivos

6.1- Objeto Geral

Caracterizar o papel de proteínas manosiltransferases no processo de envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

6.2- Objetivos Específicos

- I. Confirmar se as deleções em manosiltransferases (*alg6Δ*, *alg12Δ*, *eos1Δ*, *mnn1Δ*, *mnn2Δ*, *pmt1Δ*, *pmt3Δ*, *pmt5Δ* e *yur1Δ*) estendem a longevidade replicativa em *Saccharomyces cerevisiae*;
- II. Verificar se as deleções das manosiltransferases ativam a resposta à proteínas não-enoveladas pela via *UPR*;
- III. Verificar se os mutantes de manosiltransferases são resistentes à tunicamicina;

- IV. Comparar o perfil dos polissomos entre os mutantes em manosiltransferases;
- V. Avaliar a atividade peptidásica do proteossoma nos mutantes de manosiltransferases;
- VI. Avaliar se os mutantes nulos de manosiltransferases interferem no crescimento das células;
- VII. Avaliar a resposta ao estresse da parede celular;
- VIII. Avaliar a resposta ao estresse térmico.

7– Materiais e métodos

As linhagens empregadas neste trabalho foram derivadas da cepa *BY4741* (Mata *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) com as seguintes deleções individuais: *alg6Δ::KanMX*, *alg12Δ::KanMX*, *eos1Δ::KanMX*, *mnn1Δ::KanMX*, *mnn2Δ::KanMX*, *pmt1Δ::KanMX*, *pmt3Δ::KanMX* *pmt5Δ::KanMX* e *yur1Δ::KanMX*, gentilmente fornecidas pelo Professor.Doutor Luís Eduardo Soares Netto do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

7.1 - Condições gerais de esterilização, solidificação dos meios de cultivo e crescimento dos microrganismos:

Os meios de cultura listados abaixo foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Ao meio sólido foi acrescentado ágar bacteriológico a 2% (concentração final).

Meio de cultura:

YPD	
REAGENTE	%
Glicose	2
Peptona	2
Extrato de levedura	1
Água q.sp.	1L

YPG	
REAGENTE	%
Glicerol	2
Peptona	2
Extrato de levedura	1
Água q.sp.	1L

YNB	
REAGENTE	%
Glicose	2
Yeast Nitrogen	0,67
Água q.sp.	1L

7.2 - Identificação das linhagens

Devido às linhagens WT, *alg6Δ*, *alg12Δ*, *eos1Δ*, *mnn1Δ*, *mnn2Δ*, *pmt1Δ*, *pmt5Δ* e *yur1Δ*, terem sido cedidas por outro laboratório, iniciamos as análises confirmando o rompimento destes genes. Para isso realizamos a extração do DNA genômico. Originalmente, os mutantes nulos foram construídos com a inserção do cassete de resistência à geneticina (*KanMX*). Para identificação do locus de integração de *KanMX* (figura 5), foi necessário um par de oligos (tabela 4). Os produtos de PCR que foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação.

Tabela 4 - Oligos utilizados para amplificação do cassete de *KanMX*

Mutante Nulo	Sequência (5' - 3')	Cp (pb)	Tm (°C)	Produto de Amplificação
<i>alg6Δ</i>	A: AGCTAGAGGAGATTAAGACAG	21	50,6	1412
	B: CATGCATCATCAGGAGTACG	20		
<i>alg12Δ</i>	A: CTC AATGCAGACATTCTTCCG	21	53,9	3692
	B: CATGCATCATCAGGAGTACG	20		
<i>eos1Δ</i>	A: ATTGCTGCATCTCTGGAAAAC	21	53,7	733
	B: CATGCATCATCAGGAGTACG	20		
<i>mnn1Δ</i>	A: CGTGTACCATACCGATTCTAG	21	55	1582
	B: CATGCATCATCAGGAGTACG	20		
<i>mnn2Δ</i>	A: AGTAGCAAGTCTGACCAAAG	21	52,5	1324
	B: CATGCATCATCAGGAGTACG	20		
<i>pmt1Δ</i>	A: ACCCATAGTCACGTATAACTG	21	51,4	1422
	B: CATGCATCATCAGGAGTACG	20		
<i>pmt3Δ</i>	A: GCATTCCA ACTCTTCCTTTTCG	21	54,1	822
	B: CATGCATCATCAGGAGTACG	20		
<i>pmt5Δ</i>	A: TAAACGTGAATCTCAACCTGC	21	53	1342
	B: CATGCATCATCAGGAGTACG	20		
<i>yur1Δ</i>	A: AAAGAGACACCATCATGAAGG	21	52,4	1652
	B: CATGCATCATCAGGAGTACG	20		

Cp = comprimento. Tm = Temperatura de melting

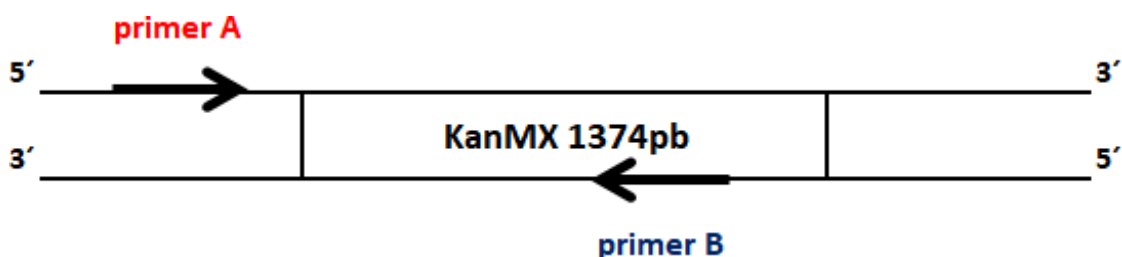


Figura 5 – Sequência *KanMX*. Amplificação do cassete de *KanMX* para identificação dos mutantes nulos de manosiltransferases cedidos ao nosso laboratório.

7.3- Extração de DNA genômico

O isolamento do DNA genômico foi feito a partir de uma cultura de células crescidas em 5 mL de meio YPD a 30 °C por 16h a 150 rpm. Foi transferido 1,5mL da cultura para tubo de microcentrífuga. As células foram centrifugadas por 2 min, a 14000 rpm em temperatura ambiente. O meio foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 0,2 mL de tampão de lise (2% Triton X- 100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Foi adicionado 100 µL de *glass beads* (0,5 mm de diâmetro) e adicionado 0,2 mL de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 pH 8,0). As células foram agitadas por 5 min em vórtex e centrifugadas por 5 min por 14000 rpm em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microtubo de 1,5 mL. Foi adicionado 1 mL de etanol absoluto, o qual foi misturado por inversão. O tubo foi novamente centrifugado por 2 min a 14000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 0,4 mL de TE (Tris 10 mM pH 8,0, 1 mM EDTA) com 30 µg de RNase, incubando-se a mistura por 30 min a 37 °C. Transcorrido o tempo, foi adicionado na suspensão 10 µL de acetato de amônia 4 M e 1 mL de etanol absoluto. O DNA foi centrifugado por 2 min a 14000 rpm em temperatura ambiente. O DNA foi lavado com etanol 70% e concentrado a 30 °C. Em seguida o DNA foi ressuspendido em 70 µL de TE.

7.4 – Ensaio de longevidade replicativa em mutantes de manosiltransferases

A longevidade replicativa das células foi determinada conforme procedimento descrito já estabelecido (Park, Mcvey, Guarantee, 2002). A partir do estoque -80 °C riscou-se as células em uma placa de YPD, deixou-se crescer a 30 °C e, depois de 48 h, riscou-se em uma placa de YPG, incubando-se por 48 h. Repetiu-se o procedimento em YPG, a fim de remover quaisquer petite (células com deficiência mitocondrial) da população.

Selecionaram-se as células aparentemente funcionais e riscou-se em uma nova placa YPD para dar início à dissecação das células. Usando uma agulha de vidro fixada a um micromanipulador, alinhou-se 50 células em YPD, com espaçamento de 50 μm entre elas. O ágar foi perfurado com a agulha entre cada 10 células-mãe para produzir pontos de referência na placa. Isolou-se a célula filha da segunda divisão, denominada “célula-mãe” fundadora virgem. As células mães-virgens foram incubadas a 30 °C, para ocorrer a divisão celular. As células filhas foram separadas das células-mães fundadoras utilizando-se o micromanipulador. Após cada micromanipulação, registrou-se o número de vezes que cada célula-mãe gerou uma nova célula-filha. A placa foi incubada a 4 °C durante à noite, a fim de controlar o brotamento. Quando as células-mães não produziram mais brotos, o ensaio de longevidade replicativa chegou ao fim. A significância estatística dos ensaios foi analisada pelo teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

7.5 - Ensaio de estresse térmico

As células foram inoculadas em 10 mL de YPD e incubadas a 30 °C sob agitação contínua, a 300 rpm, por 16 h. Após o período de incubação, foi transferido 1 mL da cultura principal para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e incubado a 30, 37, 46, 50, 51 e 52 °C durante 30 min a 150 rpm, em um termomixer (*Eppendorf Thermomixer R Mixer*). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas destas suspensões de células e subsequentemente alíquotas de 3 μL da diluição final foram semeadas em meio sólido YPD e as placas foram incubadas a 30 °C por 48 h. Depois deste período, as imagens foram capturadas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

7.6 - Ensaio de resistência ao estresse da parede celular pela ação dos antifúngicos Calcofluor White e Vermelho do Congo

As células foram inoculadas em 10 mL de YPD e incubadas a 30 °C sob agitação contínua, a 150 rpm, por 16 h. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas destas suspensões de células e, subsequentemente, alíquotas de 3 µL de cada diluição foram semeadas em meio sólido YPD com antifúngicos *Calcofluor White* na concentração final de 10 µg/mL e 20 µg/mL e Vermelho do Congo na concentração final de 100 µg/mL. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h e depois deste período as imagens foram capturadas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

7.7 - Comparação do perfil dos polissomos entre os mutantes de manosiltransferases

Este experimento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Microbiologia Molecular, coordenado pela pesquisadora Lysangela Ronalte Alves da Fundação Oswaldo Cruz, no Instituto Carlos Chagas (ICC), unidade técnico-científica da Fiocruz no Paraná.

7.7.1 - Preparo do extrato de células

As células de levedura foram crescidas em 125 mL de YPD até uma $OD_{600}=0,8-1$. Adicionou-se cicloheximida, um inibidor da tradução citoplasmática em uma concentração final de 100 µg/mL e deixou-se crescer por mais 15 min. O tampão de lise (80 µg/ml de cicloheximida, 200 µg/ml de heparina, 0,2% de DEPC – dietilpirocarbonato, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M NaCl, 30 mM $MgCl_2$) foi preparado quinze minutos antes do término da agitação das células. Após o término da agitação, as células foram

transferidas para um frasco de centrífuga de 250 mL contendo 200 mL de gelo e submetidas à centrifugação 7500 rpm (*Beckman Coulter Avanti J-26 XP* - rotor JA-20) por 5 min a 4 °C. O sedimento foi lavado com 10 mL de tampão de lise gelado e transferido para tubo Falcon de 15 mL. Centrifugou-se as células novamente a 6000 rpm por 3 min a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em 0,5 mL de tampão de lise e transferido para microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 0,5 mL de *glass beads acid-washed* (0,5 mm de diâmetro) e a solução foi submetida à 8 sessões de agitação de 30 s intercalando a cada sessão com 30 s em gelo. Adicionou-se mais 0,5 mL de tampão de lise dentro do microtubo de 1,5 mL. Centrifugou-se a 14000 rpm por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. A concentração dos ácidos nucleicos foi medida utilizando *Nanodrop* (razão OD₂₆₀/OD₂₈₀) e a integridade das amostras foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%. O extrato foi imediatamente utilizado para ultracentrifugação.

7.7.2 - Preparação do gradiente de Sacarose

O gradiente de sacarose foi preparado no dia mesmo da lise celular. A etapa do gradiente se iniciou com o preparo de duas soluções de 7% e 47% de sacarose. A estas soluções foram adicionados: 50 mM de MgCl₂, 50 mM de Tris-OAc pH 7,0, NH₄Cl 12 mM. Foram preparadas, para um volume final de 12 mL, em tubo de centrífuga de 15 mL, as soluções 7%, 17%, 27%, 37% e 47%, considerando a ordem e volumes conforme (tabela 5).

Tabela 5 – Preparo do gradiente de sacarose

Concentração final	7% sacarose	47% sacarose
7%	4,8 mL	0
17%	3,6 mL	1,2 mL
27%	2,4 mL	2,4 mL
37%	1,2 mL	3,6 mL
47%	0	4,8 mL

7.7.3 - Centrifugação dos gradientes

Com a ponta da ponteira colocada contra a parede do tubo perto da superfície do gradiente, gentilmente, adicionou-se 25 OD₂₆₀ unidades do lisado no topo do gradiente. Utilizando uma pinça, cuidadosamente, o gradiente foi transferido para um rotor de caçamba móvel e os tubos centrifugados a 39.000 rpm por 2 h a 4 °C em ultracentrífuga *Hitachi CP100NX*. A absorbância do gradiente foi lida a 254 nm em aparelho fracionador de gradiente (*Teledyne Isco – Dendity Gradient Fractionation System*), gerando picos de leitura das subunidades 40S, 60S, dos monossomos 80S e polissomos. Estes picos foram representados em gráficos pelo próprio aparelho.

7.7.4 - Análise das imagens

Com a obtenção dos gráficos impressos, estes foram subsequentemente escaneados e as imagens foram plotadas a fim de obter picos mais definidos. Para isso foi utilizada a ferramenta *online webplotdigitizer*, disposta em <https://automeris.io/WebPlotDigitizer/>. A ferramenta possibilitou a extração das coordenadas XY dos gráficos impressos. Após a obtenção dos dados (picos de polissomos e monossomos), as imagens foram reproduzidas no programa de *Origin* versão

8, que obteve o valor da área de picos de polissomos e monossomos, assim a razão entre as áreas foram calculadas. As informações das áreas foram analisadas no programa Minitab, utilizando o teste t-*Student*.

7.8 – Ensaio de estresse no Retículo Endoplasmático com o composto Tunicamicina

As células de levedura foram crescidas em meio líquido YPD a 30 °C por 16 h a 150 rpm, em seguida cinco diluições seriadas 1:10 foram plaqueadas em meio YPD Agar, acrescido de Tunicamicina 0,2 µg/mL. Posteriormente, as placas foram mantidas em estufa a 30 °C e, após 48 h de incubação, as imagens foram capturadas.

7.9 - Análise da atividade peptidásica dos mutantes de manosiltransferases

As células de levedura foram inoculadas em 10 mL de meio líquido YPD a 30 °C sob agitação contínua a 150 rpm por 12 h. Posteriormente foi realizado outro inóculo em 100 mL de meio YPD com OD₆₀₀=0,1 inicial e incubadas a 30 °C sob agitação contínua a 150 rpm por 16h. As células foram centrifugadas e lisadas com *glass beads* (0,5 mm de diâmetro) e tampão de lise (Tris 50 mM pH 7,5, MgCl 5 mM) com agitação contínua em vórtex a 1800 rpm por 60 min. O lisado foi centrifugado a 10.000 x g a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 mL. O volume de 10 µL foi coletado acrescentado a 490 µL de água ultrapura. Em sequência, a quantidade de proteína total dos lisados foi quantificada pelo método de *Bradford*, em placas 96 poços, no aparelho *FlexStation3* (*Molecular Devices*). Após a quantificação proteica, as amostras foram submetidas à quantificação da atividade do proteassomo. Utilizou-se 1 mg/ml de proteínas em tampão (Tris 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 5 mM). O volume

de 50 μ L da solução tampão e proteínas foi depositado em placa de 96 poços opaca e acrescido de mais 50 μ L de tampão de atividade (Tris 50 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 5 mM). Também foi acrescido 5 μ L substrato fluorogênico do proteassomo LLVY 2,5 mM. Para amostras controle, foi adicionado 1 μ L de solução 5 mM de Bortezomib, um inibidor de proteassomo. Após o preparo da placa, esta foi colocada em leitor de placa *FlexStation3* (*Molecular Devices*) a 30 °C. As leituras foram realizadas a cada 1 min por 30 min a 595 nm.

7.10 – Ensaio de curva de crescimento

As células de levedura foram crescidas em meio líquido YPD a 30 °C por 16h a 150 rpm. Foi realizado outro inóculo em 10 mL de YPD com $OD_{600} = 0,1$ inicial. A cultura foi monitorada a cada duas horas e analisada a densidade óptica em espectrofotômetro *Eppendorf BioPhotometer*. Os valores foram anotados, tabulados e plotados em gráfico. Aos dados obtidos com células mutantes que apresentaram comportamentos de crescimento diferente da cepa selvagem, aplicou-se o teste *t de Student* no programa Minitab.

7.11 - Extração de RNATotal de *Saccharomyces cerevisiae* para RT-PCR

As células de levedura foram cultivadas em meio YPD em 150 rpm por 16 h a 30 °C. Após o crescimento, as células foram centrifugadas em microtubos de 2 mL a 4000 rpm por 5 min em temperatura ambiente. O extrato celular foi acrescido de 300 μ L de Trizol e aquecido a 65 °C por 15 min. Após foi acrescido às amostras 200 μ g de *glass beads* (0,5mm de diâmetro). Nas etapas seguintes, as amostras foram mantidas sempre no gelo. A lise foi realizada com agitação vigorosa. Na agitação houve intervalos intercalados 30 s no gelo e 30 s em vortex. O lisado foi centrifugado a 15 000 rpm por 15

min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo de 1,5 mL e foi acrescido 200 µL de Clorofórmio (*RNAse-free*), agitou-se por 15 s e mantido em temperatura ambiente por 10 min. Centrifugou-se novamente 15 000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Ao lisado acrescentou-se novamente 500 µL de Clorofórmio (*RNAse-free*) e agitou-se por 15 s. Novamente as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e foi acrescido de 500 µL de Isopropanol (*RNAse-free*) e agitou-se por 15 s. A solução foi mantida em freezer -80 °C por uma 1 h. Após a precipitação, novamente as amostras foram centrifugadas a 15 000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 1 mL de Etanol 75% (*RNAse-free*). Centrifugou-se 10 000 rpm por 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o RNA foi concentrado a 30 °C no *Eppendorf Concentrator 5301*. Ao final o RNA foi ressuspendido com 30 µL de DEPC e utilizado no mesmo dia para quantificação e tratamento com DNase.

7.11.1 – Síntese da fita do DNA complementar

A síntese da fita do DNA complementar iniciou-se com a padronização do RNA extraído em 6µg. Após a padronização, tratou-se a amostra com DNase I, RNA-free (1 U/µL) da Thermo Fisher para digestão de DNA. A digestão foi realizada em temperatura 37 °C por 30 minutos. Para confirmação da digestão, foi realizada uma amplificação de DNA por PCR e posterior análise em gel de agarose 1%. Quando negativou-se a amplificação de DNA da amostra, seguiu-se com o experimento para síntese da fita do DNA complementar. Para síntese, foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit – Thermo Fisher, seguindo as especificações do protocolo do kit. Para confirmação, foi utilizado 1µL do produto da síntese de cDNA para análise por eletroforese em gel de agarose 2%.

8 - Resultados e discussão

8.1 - Ensaio de Longevidade Replicativa em Mutantes de Manosiltransferases

O ensaio de longevidade replicativa é empregado para determinação da capacidade finita de uma célula mãe de levedura em gerar brotos (Mortimer; Johnston, 1959). Neste trabalho, este método foi utilizado a fim de analisar se os mutantes de manosiltransferases *alg6Δ*, *alg12Δ*, *eos1Δ*, *mnn1Δ*, *mnn2Δ*, *pmt1Δ*, *pmt3Δ*, *pmt5Δ* e *yur1Δ* apresentam aumento na *RLS* média e máxima em relação ao tipo selvagem (figura 6).

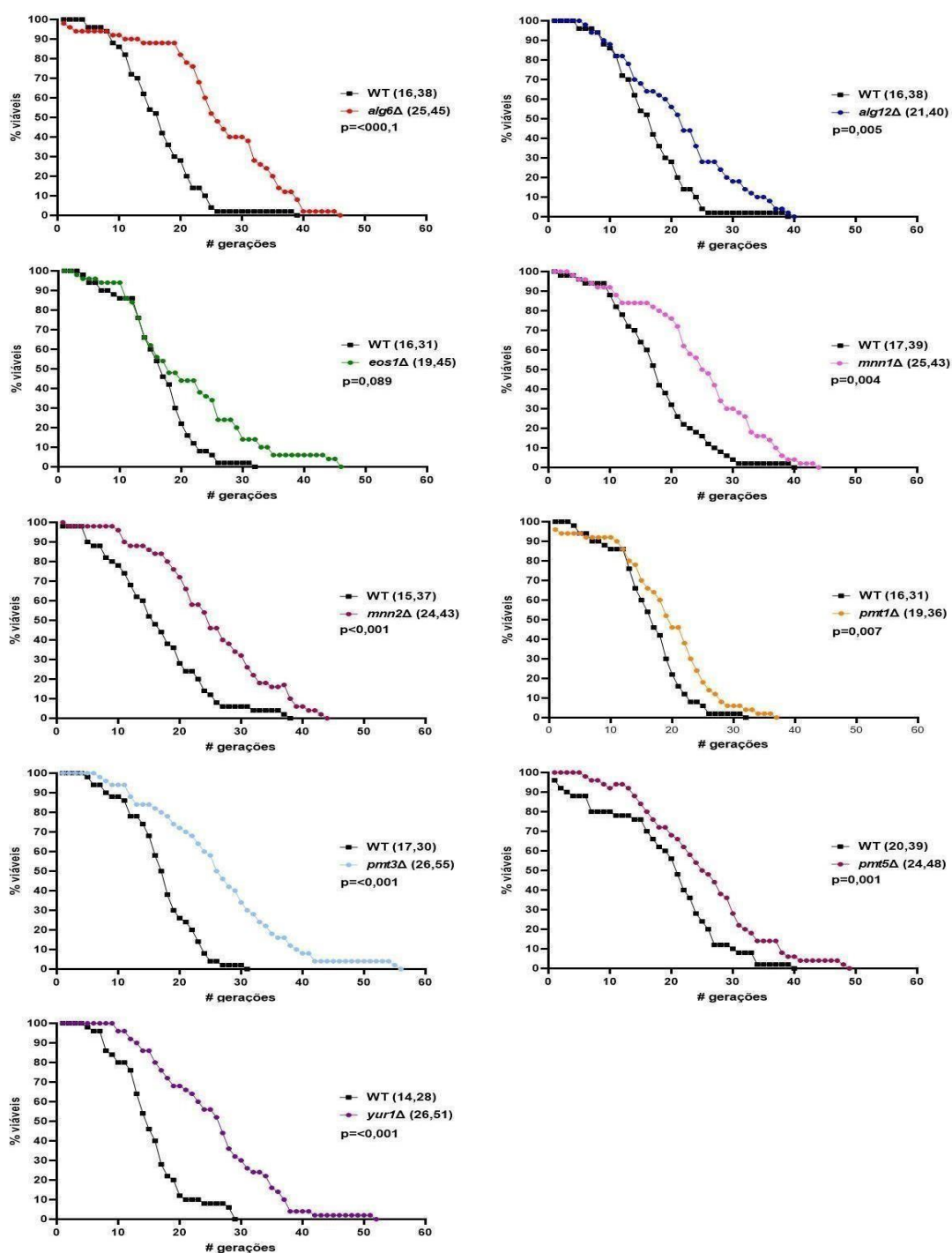


Figura 6 - Mutantes nulos de manosiltransferase apresentam extensão na longevidade replicativa. Para cada cepa, dissecou-se um total de 50 células de *S. cerevisiae* com uso de micromanipulador. As gerações correspondem ao número de brotos produzidos pelas células mãe ao longo do experimento. As curvas representam o melhor de dois experimentos com resultados similares. A longevidade média e máxima de cada linhagem está indicada em parênteses, nesta ordem. p-valor obtidos com o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

Todas as linhagens apresentaram extensão na longevidade replicativa em comparação à cepa selvagem: *alg6Δ*, *alg12Δ*, *mnn1Δ*, *mnn2Δ*, *pmt1Δ*, *pmt3Δ* e *pmt5Δ* e *yur1Δ* ($p < 0,05$), exceto para *eos1Δ* que apresentou uma significância $p = 0,089$.

Pesquisas anteriores demonstraram que dois mutantes aqui apresentados, *alg12Δ* (Labunskyy et al., 2014) e *pmt1Δ* (Cui et al., 2015), apresentaram extensão da longevidade, sendo que para ambos a via de *UPR* foi ativada.

Este resultado sugere que deleção individual de manosiltransferases é capaz de estender a longevidade replicativa, exceto para o mutante *eos1Δ*.

8.2 – Análise da resistência ao estresse térmico nos mutantes de manosiltransferases

O ensaio de resistência ao estresse térmico é realizado a fim de observar a resposta da célula à variação de temperatura. Essa resposta altera a síntese de proteínas, ativando fatores de transcrição que vão coordenar a síntese de moléculas com a finalidade de proteger proteínas e funções celulares resultando em um efeito citoprotetivo.

A principal família de proteínas induzidas na resposta ao estresse térmico são as *HSP* (*Heat Shock Protein*). Essa família é constituída por diversas proteínas de diferentes pesos moleculares: Hsp10, Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp110. Porém, as principais *HSP* que auxiliam no dobramento de polipeptídeos ou proteínas no citosol, são as proteínas Hsp70 e Hsp90. No processo de envelhecimento estas proteínas protegem a célula contra proteotoxicidade, apoptose e proteínas agregadas (Murshid, A et. al., 2013).

Para analisar o quanto as linhagens *alg6Δ*, *alg12Δ*, *eos1Δ*, *mnn1Δ*, *mnn2Δ*, *pmt1Δ*, *pmt3Δ*, *pmt5Δ* e *yur1Δ* resistem ao estresse térmico, estas foram submetidas às temperaturas de 30, 37, 46, 50, 51 e 52 °C (figura 7).

Podemos observar que até 46 °C, todos os mutantes responderam tolerando a variação de temperatura de forma semelhante ao tipo selvagem, tornando-se sensíveis em 52 °C, exceto para o mutante *eos1Δ* que a 50 °C já se tornou sensível, sendo totalmente deletério em 52 °C e observa-se também efeito moderado em *alg6Δ* a partir de 51 °C.

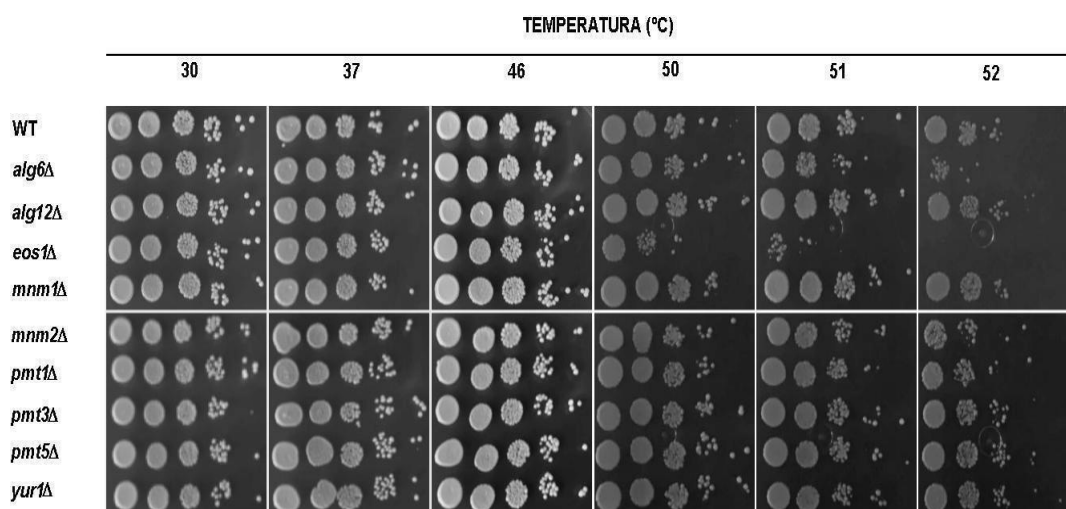


Figura 7 – Mutantes nulos de manosiltransferases respondem diferentemente ao ensaio de estresse térmico. Primeiramente, as células de levedura foram crescidas em meio YPD a 30 °C por 16 h. Posteriormente, foram submetidas ao choque térmico às temperaturas mencionadas por 30 min. Em seguida, com auxílio de uma pipeta multicanal, alíquotou-se 3 µL de cinco diluições seriadas 1:10 em placas contendo meio YPD, que foram incubadas a 30 °C e, depois 48 h de incubação, as imagens foram capturadas.

Durante os experimentos, observou-se que a 46 °C, as células apresentavam uma melhora no fenótipo. Provavelmente, isto se deva a ativação da via de *HSR* (*heat shock response*). Em análise de transcriptoma de levedura, com variação de temperaturas, um outro grupo de trabalho observou que a 37 °C, com 15 minutos de exposição, houve um aumento na expressão cerca de 1800 genes. Já com um aumento mais severo de

temperatura, para 42 °C, observou-se uma mudança em 3100 genes. Esse trabalho sugeriu que há uma adaptação da célula para esta resposta, pois a 37 °C, especificamente, a expressão de genes reduzem, porém, a 42 °C, a célula suporta maior tempo de exposição à temperatura elevada. Em um estresse subletal de 46 °C, a expressão de cerca de 1000 genes ainda manteve-se aumentada, demonstrando a capacidade de manter a resposta ao estresse para garantir a sobrevivência celular (Mühlhofer et al., 2019).

Uma outra possibilidade de sobrevivência da célula ao estresse térmico está na resposta da via de integridade da parede celular. Em trabalho realizado com genes *WSC* (*Wall Sensor Cell*), os mutantes nulos *wsc1Δ*, *wsc2Δ* e *wsc3Δ*, foram submetidos à variação de temperatura, sendo que em YPD a 28 °C na combinação de *wsc1Δ/wsc3Δ* houve crescimento semelhante ao tipo selvagem, porém na combinação *wsc1Δ/wsc2Δ*, não houve crescimento e igualmente para a combinação *wsc1Δ/wsc2Δ/wsc3Δ*, sugerindo que a deleção do gene *WSC2* interfere na viabilidade celular mesmo em condições normais de temperatura. Quando a temperatura é elevada a 37 °C, as células não sobrevivem em nenhuma das combinações, demonstrando que são deletérias (Verna et al., 1997). Já demonstrou-se que a via *CWI* é ativada pela via *UPR* e promove a extensão de longevidade em *alg12Δ* (Labunskyy et al., 2014).

O resultado aqui apresentado indica que, os mutantes nulos *eos1Δ* (50 °C) e *alg6Δ* (51 °C) apresentam sensibilidade ao desafio térmico, enquanto os demais mutantes de manossiltransferases não apresentam alteração na resposta ao choque térmico.

8.3- Ensaio de resistência da parede celular

A parede celular de *S. cerevisiae* é composta principalmente por β -1,3-glicano, contendo cerca de 1500 unidades de glicose por cadeia. Além disso, 30% do peso seco desta levedura é composto de 85% de polissacarídeos e 15% de proteínas. Manoproteínas podem ligar-se à cadeia β -1,6-glicose através de glicosilfosfatidilinositol (GPI). A via de sinalização *CWI* (*Cell Wall Integrity*) é compreendida por uma família de sensores de superfície celular altamente manosilados, acoplados a uma pequena proteína G, *Rho1p*, a qual ativa efetores. Coletivamente, os efetores regulam diversos mecanismos de resposta celular, como a síntese de β -glicano para remodelagem da parede celular, genes relacionados à síntese da parede celular, organização da actina do citoesqueleto, síntese de vesícula secretória para o local de crescimento (Levin, 2005).

Em *S. cerevisiae*, a via PKC1-MPK1 regula a biossíntese da parede celular que responde ao estresse na parede, brotamento e crescimento celular. *Rho1p* ativa *Pkc1p*, a qual desencadeia a atividade de uma cascata de quinases, tais como *Bck1p/Slk1p*, *Mkk1p* e *Mkk2p*, *Mpk1p/Slk2p* (Verna et al., 1997).

Os antifúngicos Vermelho do Congo e *Calcofluor White* (CFW) são conhecidos por causar estresse à parede celular, interferindo na síntese de quitina e β 1,3-glicano (Roncero & Duran, 1985). Portanto, utilizamos estes dois compostos para analisar a resistência da parede celular dos mutantes de manosiltransferases (figuras 8A e 8B).

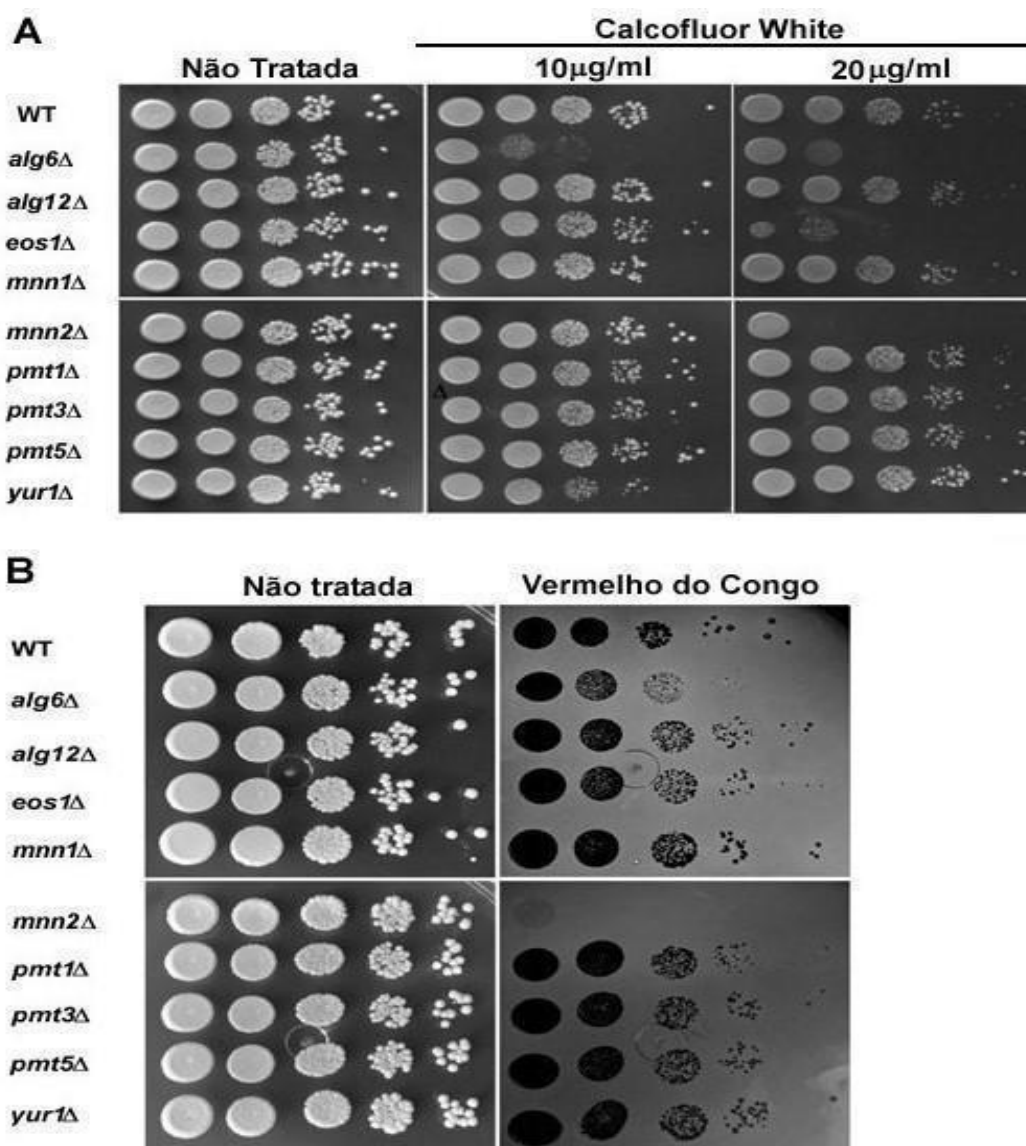


Figura 8 – Mutantes nulos de manosiltransferases respondem diferentemente ao ensaio de resistência da parede celular – A e B. As linhagens de mutantes de manosiltransferases foram crescidas em YPD a 30 °C por 16 h, em seguida cinco diluições de 1:10 foram plaqueadas em YPD ágar acrescidas de *Calcofluor White* 10 µg/mL e 20 µg/mL (A), ou de Vermelho do Congo a 100 µg/mL (B). Posteriormente, as placas foram mantidas em estufa a 30 °C e, após 48 h de incubação, as imagens foram capturadas.

O ensaio com *Calcofluor White*, figura 8A, de modo geral, os mutantes responderam similarmente ao tipo selvagem, exceto para os mutantes *alg6*Δ, *eos1*Δ e *mnn2*Δ os quais tiveram sua viabilidade celular reduzida, sendo que para *mnn2*Δ a redução foi mais severa na concentração 20µg/mL. Normalmente, o gene *MNN2* é responsável pela adição inicial de α1,2-manose ao esqueleto de α1,6-manose na parede celular de *S.*

cerevisiae. Em *Candida albicans*, a mutação *mnn2Δ* reduz a capacidade de virulência desta levedura em *Galleria mellonella*, permitindo um aumento no tempo de sobrevivência da larva de 3 para 7 dias. (Hall, R. A, et al., 2013). Para este trabalho podemos associar este fenótipo à redução do crescimento desta linhagem, quando exposta ao CFW e Vermelho do Congo, justificando que a deleção da manosiltransferase apresenta um fenótipo mais severo. É possível que a via de *CWI* tenha sido afetada, porém não houve ativação de alguma via que pudesse recuperar o fenótipo.

No ensaio de Vermelho do Congo, figura 8B, a resposta das linhagens mutantes foi bastante similar a do antifúngico CFW. A maioria das linhagens mutantes apresentou um fenótipo similar ao tipo selvagem, exceto os mutantes *alg6Δ* e *mnn2Δ*, sendo que para este último a redução no crescimento celular foi mais severa, assim como no experimento com CFW (figura 8A).

O mutante *alg12Δ* apresentou uma ligeira melhora no fenótipo e resistência aos antifúngicos CFW e Vermelho do Congo (Labunskyy et al., 2014), porém, neste trabalho o resultado foi semelhante ao tipo selvagem, sugerindo que a via de *CWI* não foi afetada, mesmo que todas as condições de ensaio tenham sido semelhantes, a triplicata biológica não apresentou o mesmo resultado.

Com estes dados, sugerimos que as mutações individuais em manosiltransferases não formam um grupo homogêneo, pois nem todas interferem na via de integridade da parede celular.

8.4 – Comparação do perfil dos polissomos entre os mutantes de manossiltransferases

A análise de polissomos é uma técnica para estudar o processo de tradução, o qual é um dos níveis de regulação da expressão gênica (Chassé et al., 2017). O citoplasma contém duas populações de ribossomos, os polissomos e monossomos. Os polissomos consistem de RNAm ocupados de dois ou mais ribossomos, já nos monossomos o RNAm ocupa-se de apenas um ribossomo (Heyer & Moore, 2016). A composição de ribossomos durante a tradução tende a alterar em resposta a estímulos de estresse celular, processo de envelhecimento e extensão da longevidade (Gonskikh & Polacek, 2017). Estudos com aminoácidos radioativos indicam que a maioria das novas ligações peptídicas são realizadas nos polissomos, indicando que estes representem a porção ativa da tradução. Os monossomos representam a porção recém montada nos ribossomos e, portanto, estes correspondem à porção inativa da tradução (Heyer & Moore, 2016).

A Potenciação é um fenômeno temporário que ocorre nas células, a qual visa reduzir a tradução em resposta a estresses. Os fatores de iniciação da tradução são afetados induzindo tal redução. Tratamento com rapamicina demonstrou que, após sessenta minutos, em ensaio de *Western Blotting*, há a redução dos níveis da proteína eIF4G. Em eucariotos e em condições normais, eIF4G faz parte do complexo eIF4F que está na iniciação da tradução (Preiss et al., 2003).

Deleções de componentes da tradução estendem a longevidade entre as diversas espécies, sugerindo que há ligação causal entre longevidade e redução da tradução, a qual foi demonstrada com a deleção e análise sistemática das proteínas ribossomais (*r-proteins*) rpl3, rpl6b, rpl10, rps10 e rps18 em levedura e *Caenorhabditis elegans* (Gonskikh &

Polacek, 2017). Outro grupo de pesquisa, por meio de uma análise sistemática de deleção de genes, a qual inclui subunidades do ribossomo citosólico e mitocondrial, também demonstrou extensão de longevidade replicativa em *S. cerevisiae* (McCormick et al., 2015).

Outros fatores, em caso de privação de glicose, também estão presentes e atuando na redução da tradução, como é o caso de RNAs helicases eIF4A e Ded1p (Crawford & Pavitt, 2019).

Desta forma, no sentido de analisar se os mutantes de manosiltransferases também são capazes de interferir no processo de tradução, as linhagens foram submetidas à análise do perfil de polissomos, (figura 9).

Analisando-se o gráfico do tipo selvagem (figura 9), é possível visualizar que há um aumento na área do monossomo 80S da linha selvagem (*WT*) quando comparado com a área do monossomo 80S das linhagens mutantes. Isto sugere que a linhagem tipo selvagem estava com o processo de tradução ativo e mais significativo que as linhagens mutantes. Este resultado sugere também que a extensão de longevidade ocorre por redução na tradução (Hansen et al., 2007).

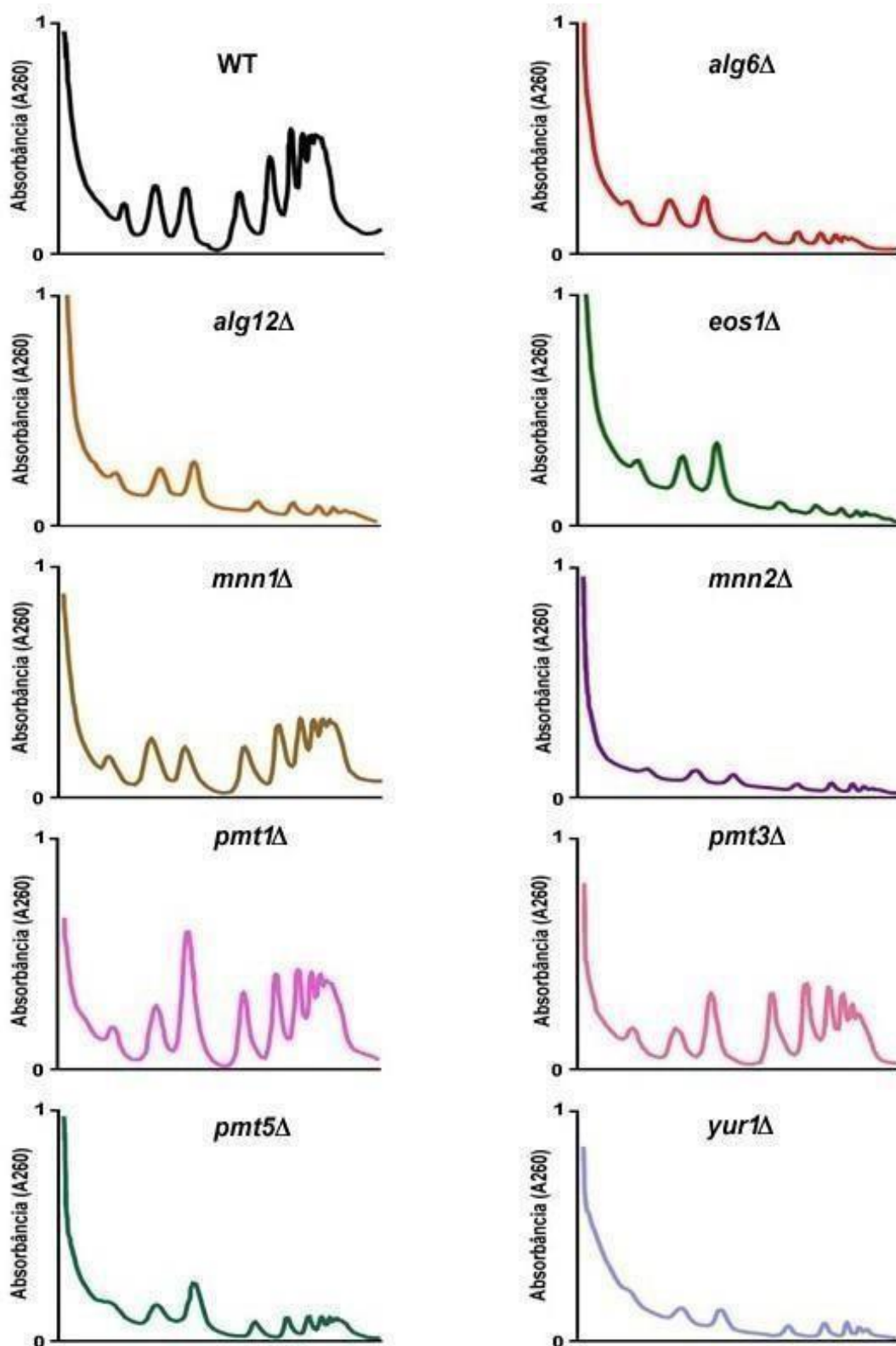


Figura 9 – Análise do perfil de polissomos dos mutantes de manosiltransferases. As linhagens foram crescidas em YPD a 30 °C e lisadas para obtenção do RNA total. O RNA foi submetido à ultracentrifugação em gradiente de sacarose. As frações do gradiente foram lidas em 254 nm.

Para certificar-se de que houve alteração na tradução das linhagens mutantes, foi necessário calcular a área dos picos, obtendo a razão da área de polissomos:monossomos (figuras 10A e 10B). Exceto para *pmt3Δ* ($p=0,051$), em que houve redução na tradução, porém não significativa, todas as demais linhagens apresentaram redução significativa no processo de tradução quando comparado ao selvagem ($p<0,05$).

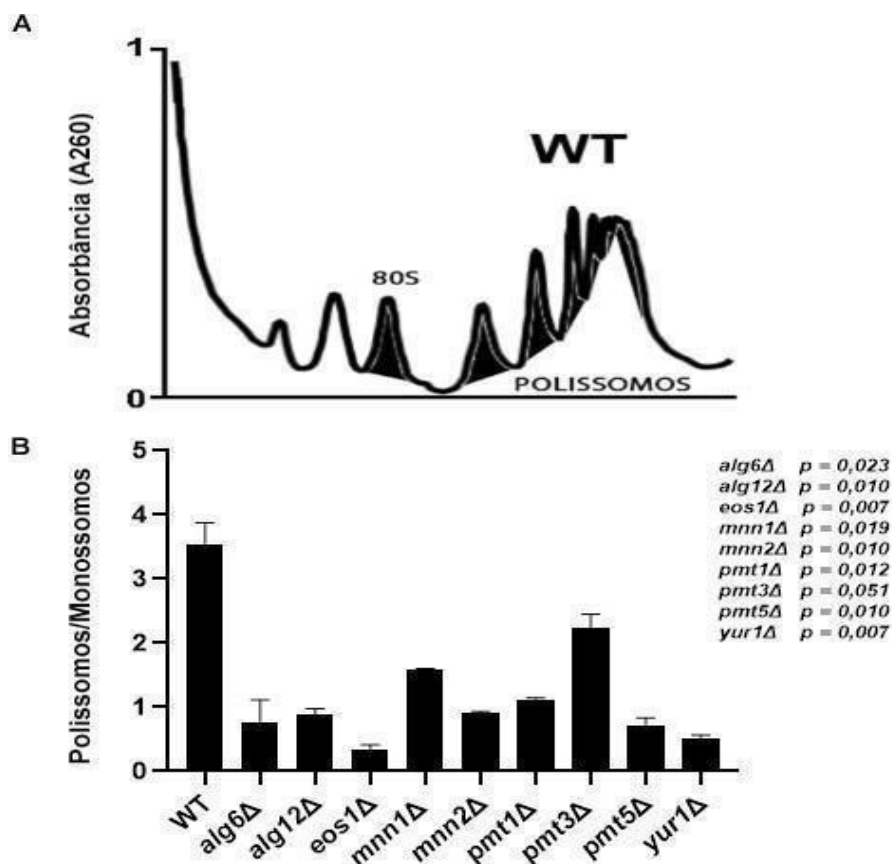


Figura 10 - Comparação da razão polissomos/monossomos do perfil dos polissomos dos mutantes de manossiltransferases – A) Área abaixo da curva do perfil polissomal utilizada para obtenção de dados numéricos. B) Comparação das razões polissomos/monossomos de cada mutante. A razão resultante de cada mutante foi utilizada para análise estatística utilizando test *t*-Student.

Para entender como este evento de redução da tradução estaria ocorrendo neste trabalho, realizamos uma busca no *yeastgenome.org*, e observamos que as manossiltransferases deste trabalho, possuem interação física com a enzima Dhh1p (tabela 6). Dhh1p é uma DEAD-box RNA helicase, localizada no citoplasma. Esta foi a primeira proteína cujo envolvimento na

modulação do quepe 5' (*7-metilguanosina*) do RNAm em levedura foi demonstrado. Este processo é importante como controle da síntese proteica. Em *Xenopus* também pode ser caracterizada como um repressor traducional, por meio da proteína ortóloga *Xp54*. Em *Drosophila melanogaster*, a proteína ortóloga de Dhh1, a *Me31b* é requerida para silenciamento traducional (Sweet et al., 2012). Em *S. cerevisiae*, Dhh1p interage fisicamente também com Hac1p, indutor da via de *UPR*. Esta enzima não possui interação com Alg12p, porém interage com Alg6p, Eos1p, Mnn1p, Mnn2p, Pmt3p e Yur1p. As enzimas Pmt1p e Pmt5p também não interagem com Dhh1p. Entretanto, Pmt5p é encontrada ligada à Pmt3p, e, em certas ocasiões, Pmt1p também liga-se à Pmt3p, o que pode justificar, o motivo de não haver uma interação direta com a enzima Dhh1p (Girrbach & Strahl, 2003).

Tabela 6 – Interação física entre manosiltransferases e Dhh1p. Cada coluna contém uma lista de genes, cujas proteínas interagem fisicamente com uma dada manosiltransferase (destacadas em azul claro).

ALG1 2	ALG6	EOS1	MNN1	MNN2	PMT1	PMT3	PMT5	YUR1	IRE1	HAC1
BFR1	BFR1	CCR4	ANP1	BFR1	ERP1	BFR1	BFR1	DHH1	AZF1	CCR4
GIS2	CCR4	DHH1	BFR1	DHH1	ERV25	DHH1	ISW1	HEK2	BZZ1	CDC4
GTT1	DHH1	MPT5	BUL2	ERV2 5	GUS1	GTT1	PMT2	ISW1	CUZ1	CYC8
HEK2	HEK2	WHI3	CCT3	PSG1	HHF1	MEP1	PMT3	LSM6	DCR2	DHH1
KAR2	ISW1	YCK2	COG3	SEC2 2	HRD1	PMT1	RUB1		GCN5	ESA1
MGA2	MPT5		DHH1	SEC6 1	HSP10 4	PMT5	SND3		GLO3	GCN5
NAB2	PKP2		DPH1	SED5	HTA2		TCM6 2		GUS1	IRE1
PUF2	RSP5		DPH2	SSB1	OST1				HAC1	KSP1
PUF3	SRO9		ISW1	SVP2 6	OST3				HSP3 1	MPT5
WHI3	TPK3		MPS3	TNA1	PDR5				ISA2	NAB2
			PSG1		PHO86				KAR2	PUF2
			PUF3		PMT2				LYS2 1	RHO3
			SBP1		SCS2				MSB2	RPD3
			SSB1		SEC62				PRC1	SBP1
			YCR06 1 W		SEC63				PTC1	SIN3
					SSC1				PTC2	SRP5 4
					SSH1				RRP5	SSB2
					STT3				SLA1	YCK1
					TDH2				SRO7	YPT1
					WBP1				VPS2 7	YPT3 2
E			Proteínas envolvidas na degradação de RNAm							

Fonte: <https://www.yeastgenome.org/>

A redução da tradução também é conduzida pela perda da homeostase de proteínas, que conduz a célula à formação de proteínas mal enoveladas e à formação agregados proteicos tóxicos, causadores de doenças degenerativas como na doença de Parkinson e Alzheimer. É interessante para a célula reduzir a tradução, servindo de controle para a formação de proteínas defeituosas. Por outro lado, há mobilização da célula

para síntese de outras moléculas, como chaperonas, que auxiliam no reparo de proteínas mal enoveladas ou condução ao sistema ubiquitina-proteassomo. A síntese de proteínas consome cerca de 75% da energia celular, logo, é razoável pensar que, a redução da taxa de síntese de proteína possa levar à extensão de longevidade (Gonskikh & Polacek, 2017).

Deste modo, podemos sugerir que os mutantes de manosiltransferases induzem a extensão de longevidade por meio da redução da tradução.

8.5 – Análise de resistência ao composto Tunicamicina

Isolada primeiramente a partir da bactéria *Streptomyces lysosuperficus*, a tunicamicina é um antibiótico que inibe a replicação de vírus envelopados (Elbein, 1987). Atualmente, este composto também pode ser isolado a partir da bactéria *Streptomyces clavuligerus* e sabe-se que também é inibidor da formação do Dolicol-Fosfato, acarretando a inibição da glicosilação e acúmulo de proteínas mal-enoveladas dentro do Retículo Endoplasmático (Adel & Abduljabar, 2020).

Ensaio com tunicamicina foi utilizado anteriormente com *alg12Δ*, a fim de analisar se há alterações fenotípicas quando ocorre estresse no RE, o que neste caso o grupo considerou um prejuízo no fenótipo da célula mutante (Labunskyy et al., 2014).

Para o nosso trabalho, a tunicamicina foi utilizada com o mesmo intuito. De acordo com os resultados, a tunicamicina não foi capaz de alterar o fenótipo das células mutantes quando comparado ao tipo selvagem (*WT*) (figura 11), sugerindo que o estresse no retículo endoplasmático não ocasionou prejuízos às células mutantes, mesmo para a linhagem *alg12Δ*.

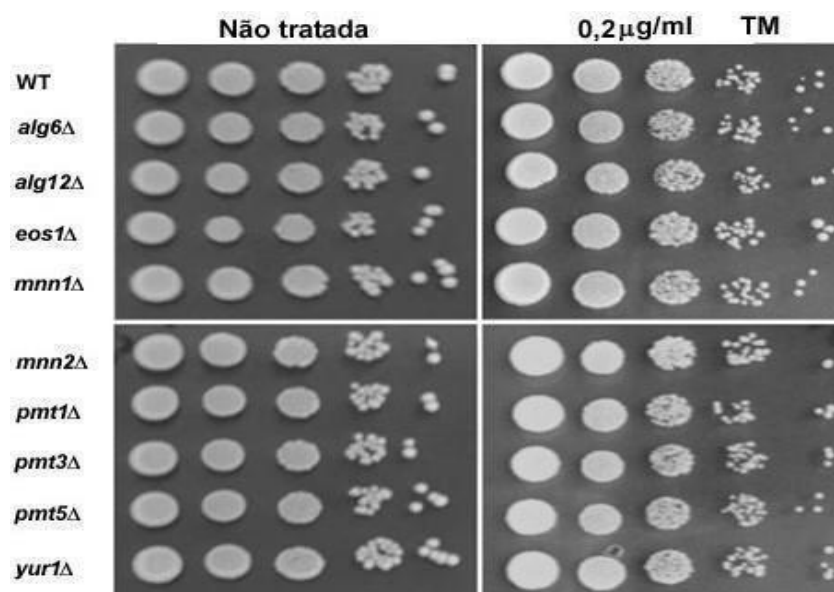


Figura 11 – Estresse do Retículo Endoplasmático causado por Tunicamicina não afeta negativamente o crescimento das células mutantes de manosiltransferases. As linhagens mutantes de manosiltransferases foram crescidas em meio YPD a 30 °C por 16 h. Em seguida, cinco diluições de 1:10 foram plaqueadas em placas YPD ágar acrescidas de 0,2 μg/mL de Tunicamicina. Posteriormente, as placas foram mantidas em estufa a 30 °C e, após 48 h de incubação, as imagens foram capturadas.

Sendo assim, conclui-se que pelo menos com o uso do composto Tunicamicina, as células mutantes mantêm normal o seu crescimento quando comparado com ao tipo selvagem (*WT*).

8.6 – Comparação de atividade peptidásica proteassomo entre mutantes nulos de manosiltransferases

O sistema Ubiquitina-Proteassomo é composto por dois subcomplexos: um catalítico, o qual é a subunidade 20S ou também conhecida como partícula essencial e subunidade 19S, também conhecida como partícula regulatória, as quais juntas formam o proteassomo 26S em eucariotos. O primeiro passo da degradação proteica é a conjugação de ubiquitinas, um polipéptido com 76 aminoácidos, à proteína-alvo. A enzima ubiquitina E1, ativa o resíduo de glicina de uma ubiquitina ATP-dependente. A ubiquitina

ativada é transferida para uma cisteína da ubiquitina conjugada, a enzima E2. Posteriormente a ubiquitina ligase E3, liga-se à ubiquitina da enzima E2 em seu amino carboxi-terminal, o qual se liga ao resíduo de lisina das proteínas-alvo. A ubiquitina E3 ligase é responsável pela seletividade das proteínas que serão degradadas pelo proteassomo (Saez & Vilchez, 2014).

O sistema Ubiquitina-Proteassomo está integrado à rede de proteostase. Embora seja uma fonte primária de degradação com limitações biosféricas, este sistema exerce um papel fundamental na degradação de proteínas em estado mal-enovelado e agregado, individualmente ou em massa (Tanaka, 2009). O acúmulo de proteínas mal-enoveladas propicia o surgimento de doenças degenerativas como: Alzheimer, Parkinson e Huntington. O declínio da proteostase é uma das marcas do envelhecimento, afetada também pelo declínio na atividade do proteassomo (Saez & Vilchez, 2014).

O processo de degradação das proteínas associadas ao RE depende da função das manosiltransferases, em exclusividade da família das PMTs. Mutação em *PMT1* e *PMT2* afetam diretamente a via Ubiquitina-Proteassomo, sendo que nesta atividade de degradação passa a ser direcionada para o vacúolo (Hirayama et al., 2008).

A análise de comparação da atividade peptidásica do proteassomo, foi realizada a fim de verificar se há um padrão de atividade peptidásica entre os mutantes nulos de manosiltransferases e se esta função celular pode estar exercendo um papel de colaboração na extensão de longevidade.

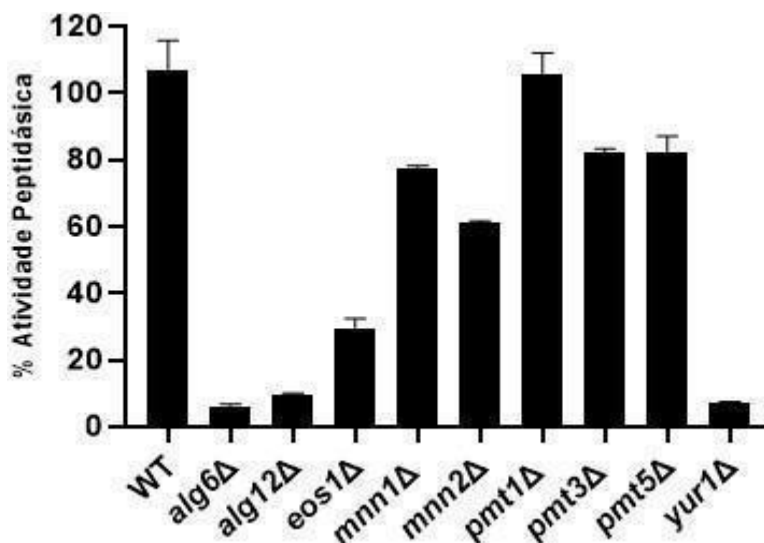


Figura 12 – Mutantes de manosiltransferase apresentam atividade peptidásica do proteassomo reduzida. Células foram lisadas. Proteína total foi quantificada por *Bradford*. Utilizando placa opaca, a atividade do proteassoma foi realizada em leitor de placa em 595 nm.

Como podemos analisar na figura 12, os mutantes possuem comportamentos diferentes quanto à atividade do proteassomo, sendo que a maioria das deleções em manosiltransferases interferiram negativamente, reduzindo a atividade do proteassomo, exceto *pmt1Δ* que manteve a função semelhante ao tipo selvagem (WT). Nota-se que as mutações não colaboram com o *UPS*, sugerindo-se aqui, que as proteínas possam ter sido recicladas pelo vacúolos (Hirayama et al., 2008); ou ainda a redução da atividade pode ter ocorrido devido o *UPS (20S)* degradar os fatores de iniciação da tradução iniciais *eIF4G*, uma subunidade de *eIF4F*, e *eIF3a*, uma subunidade de *eIF3*, sendo assim responsável pela inibição da tradução (Baugh & Pilipenko, 2004).

Com este resultado, conclui-se que a extensão de longevidade que ocorre nos mutantes nulos de manosiltransferases de *S. cerevisiae* não se dá por aumento da atividade do sistema ubiquitina-proteassomo. Contudo, como é sugerido pela literatura, que os fatores de iniciação da tradução são

degradados pelo *UPS*, seria necessário elucidar se com os mutantes nulos de manosiltransferase também ocorre o mesmo evento, ou é um efeito causal para esta condição.

8.7 – Curva de crescimento dos mutantes nulos de manosiltransferases de *S. cerevisiae*

Cerca de 80-90% da parede celular de *S. cerevisiae* é composta por resíduos de manose. As manoproteínas (proteínas que são glicosiladas por manosiltransferases da família das PMTs) estão ligadas às β -1,3 glicose do polissacarídeo da parede celular, que constitui um importante componente que influencia na formação do broto e do septo de separação da célula mãe e célula filha (Lesage & Bussey, 2006).

Neste sentido foi analisada a curva de crescimento dos mutantes de manosiltransferases figura 13, para verificar se as mutações comprometem o crescimento das células.

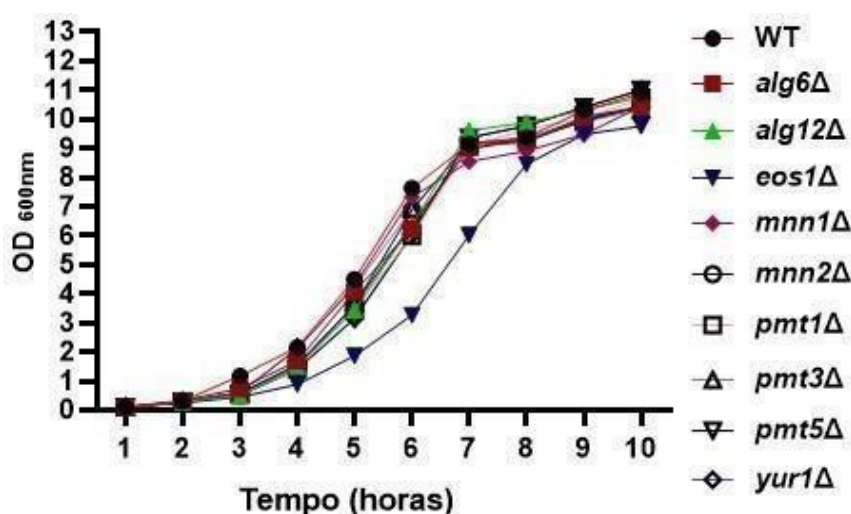


Figura 13 – Deleção em manosiltransferases não altera o crescimento de *S. cerevisiae* em meio rico. Após pré-cultura em meio YPD a 30 °C, por 16 h, inoculou-se as células em meio rico com OD₆₀₀ inicial de 0,1. A cada duas horas o crescimento era mensurado pela densidade óptica da cultura em 600nm. Os dados foram plotados em gráfico e posterior análise estatística utilizando-se o teste *t*-Student.

Visivelmente notamos que as células mutantes possuem um padrão de crescimento semelhante ao tipo selvagem (*WT*), exceto *eos1Δ*, o qual em sua fase Log apresenta um atraso no crescimento. Porém, analisando estatisticamente, considera-se não significativo pois o valor foi superior a $p=0,045$.

Sendo assim, considera-se que os mutantes de manosiltransferases deste trabalho não interferem no crescimento celular em meio rico.

8.8 – Análise do processamento do RNAm de *HAC1*

A via *UPR* é ativada como resposta ao surgimento de proteínas mal-enoveladas dentro do lúmen do RE. Dois efetores são importantes neste processo, a proteína transmembrana Ire1p (um sensor de estresse do RE) e Hac1p (um fator de transcrição) (Back et al., 2005).

Na literatura, mutantes *alg12Δ* e *ptm1Δ* (BY4742) induzem a extensão da *RLS* em *S. cerevisiae*, provavelmente, pela capacidade destes mutantes ativarem a via *UPR*, (Cui et al., 2015), (Labunsky et al., 2014).

O principal objetivo deste trabalho é verificar se mutantes nulos de manosiltransferases, *alg6Δ*, *alg12Δ*, *eos1Δ*, *mnn1Δ*, *mnn2Δ*, *pmt1Δ*, *pmt3Δ*, *pmt5Δ* e *yur1Δ*, também são capazes de induzir a via *UPR*, que poderia colaborar para o fenótipo de extensão da *RLS*. Para satisfazer este objetivo, utilizamos a estratégia de analisar o processamento do RNAm de *HAC1* (Cui et al., 2015).

No processamento do RNAm de *HAC1*, utilizamos como controle positivo o composto Tunicamicina 1 µg/mL, o qual é capaz de induzir a formação de proteínas mal-enoveladas dentro do lúmen do RE (Adel & Abduljabar, 2020) e assim ativar a via *UPR*.

Como resultado na figura 14B, podemos verificar que, em todos os mutantes nulos de manosiltransferase, não houve o processamento do RNAm de *HAC1*, sugerindo que estes mutantes nulos não são capazes de induzir a ativação da via *UPR*.

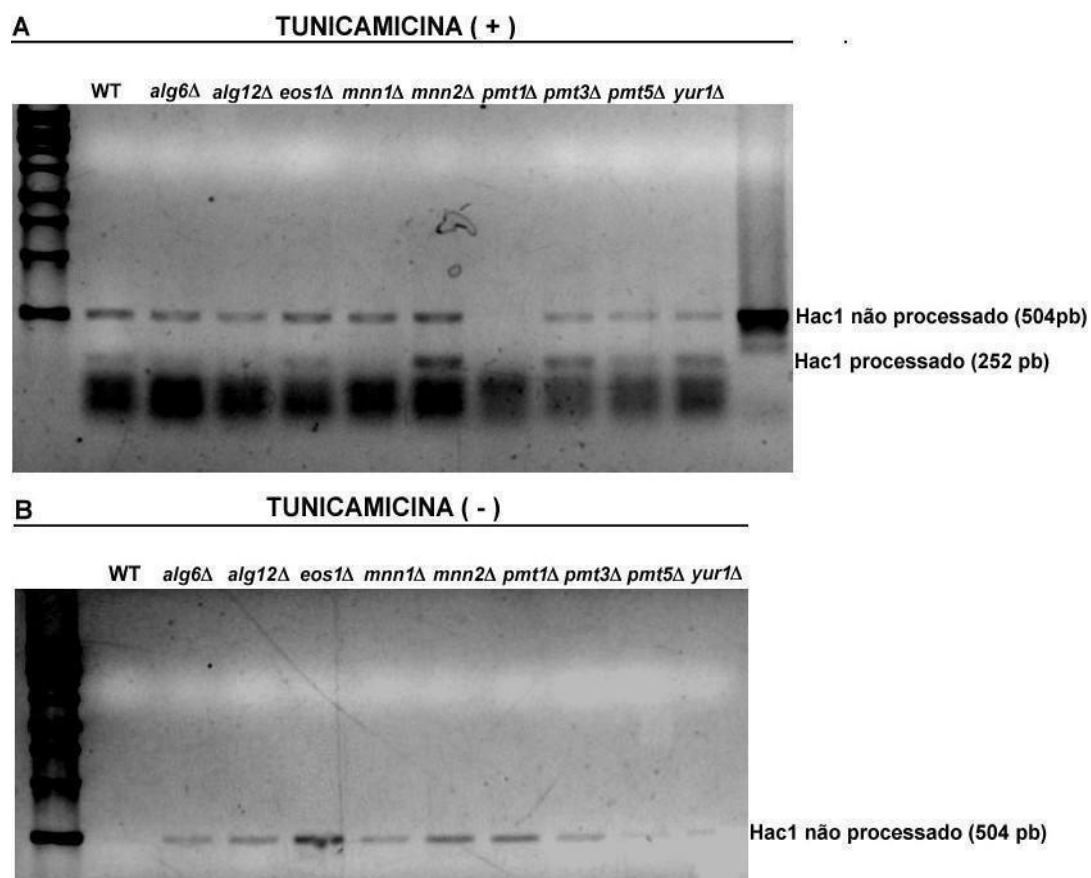


Fig. 14 - Os mutantes nulos de manosiltransferases de *S. cerevisiae* não induzem a ativação da via *UPR*. (A) células tratadas com 1 μ g/mL do composto Tunicamicina. (B) células não tratadas. As células foram crescidas por 16h em meio YPD a 150rpm. Após esse período, extraiu-se o RNA total com Trizol. Em seguida, o RNA foi quantificado, normalizado em 6 μ g e tratado com DNase. Posteriormente ao tratamento, a síntese de cDNA foi realizada. O cDNA foi utilizado para amplificação do gene de *HAC1* 504pb.

Embora o mutante *pmt1Δ* (BY4742) tenha apresentado tal fenótipo, o mesmo não ocorreu para *pmt1Δ* (BY4741) deste trabalho. Diferentemente do esperado, o mutante *alg12Δ* também não apresentou processamento do RNAm de *HAC1*, o que precisa ser confirmado em novos ensaios.

Também não houve amplificação do mRNA de *HAC1* do mutante *pmt1Δ* figura 14 A, o que não invalida o experimento, já que os demais foram amplificados de acordo com o tamanho específico do gene *HAC1* (504pb). Contudo, esses resultados precisam ser confirmados em novas replicatas.

9 - Conclusões

1. Os mutantes nulos de manosiltransferase induzem ao fenótipo de extensão de longevidade, exceto para *eos1Δ*;
2. Os mutantes nulos de manosiltransferase, exceto *alg6Δ eos1Δ*, não resultam em alteração na resposta à via de choque térmico;
3. Apenas os mutantes *alg6Δ*, *eos1Δ* e *mnn1Δ* tiveram sensibilidade aos compostos antifúngicos Vermelho do Congo e *Calcofluor White*, o que sugere que a via *CWI* foi afetada negativamente para estes mutantes. Os demais apresentaram resultados semelhantes ao tipo selvagem, o que sugere que a via *CWI* não foi afetada;
4. A redução na tradução pode ser considerada um efeito causal da extensão da longevidade, porém, o fenótipo não é observado em todos os mutantes de manosiltransferases analisados;
5. O estresse no Retículo Endoplasmático induzido por Tunicamicina nas não altera o fenótipo das células mutantes quando comparado ao tipo selvagem (WT);
6. A extensão de longevidade nos mutantes nulos de manosiltransferases de *S. cerevisiae*, não se dá pela ativação do sistema Ubiquitina-Proteassomo;
7. Os mutantes nulos das manosiltransferase em *S. cerevisiae* apresentam crescimento similar ao da cepa selvagem em meio rico;
8. Os mutantes nulos das manosiltransferases não são capazes de ativar a via de *UPR* e não é por este mecanismo que se dá a extensão de longevidade em *S. cerevisiae*, diferentemente do grupo controle, com a indução da via pelo composto tunicamicina.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adel, A. Abduljabar, M. Inhibition of N-linked Glycosylation by Tunicamycin May Contribute to The Treatment of SARS-CoV-2. January, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104586>

Aebi, M. Hennet, T. Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends in Cell Biology*. Vol. 11, p. 136–141, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)01925-0](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)01925-0)

Aebi, Markus. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Vol. 1833, p. 2430–2437, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.001>

Babczinski, P. Tanner, W. Involvement of dolicholmonophosphate in the formation of specific mannosyl-linkages in yeast glycoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 54, p. 1119–1124, 1973. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)90808-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)90808-5)

Back, S. H. Schröder, M. Lee, K. Zhang, K. Kaufman, R. J. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods*. Vol. 35, p. 395–416, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.03.001>

Barton, A. A. Some Aspects of Cell Division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*. Vol. 4, 84–86, 1950. <https://doi.org/10.1099/00221287-4-1-84>

Baugh, J. M. Pilipenko, E. V. *Molecular Cell*. Vol. 16, p. 575-586, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10017>

Bitterman, K. J. Medvedik, O. Sinclair, D. A. Longevity Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. Vol. 67, 376–399, 2003. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.376>

Botstein, D. Chervitz, S. A. Cherry, J. M. Yeast as a model organism. *Science*. Vol. 277, p. 1259–1260, 1997. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1259> Braunstein, M. Rose, A. B. Holmes, S. J. Allis, C. D. Broach, J. R. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced histone acetylation, 1993. *Genes & Dev*. Vol. 7, p. 592–604. <https://doi.org/10.1101/gad.7.4.592>

Bravo, R. Parra, V. Gatica, D. Rodriguez, A. E. Torrealba, N. Paredes, F. Wang, Z. V. Zorzano, A. Hill, J. A. Jaimovich, E. Quest, A. F. G. & Lavandero, S. *Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration*. Vol. 35, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1>.

Breitling, J. Aebi, M. N-Linked Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1–16, 2013. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013359>

Chassé, H. Boulben, S. Costache, V. Cormier, P. Morales, J. Analysis of translation using polysome profiling. *Nucleic Acids Research*. Vol. 45, e15. 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw907>

Cox, J. S. Shamu, C. E. Walter, P. Transcriptional Induction of Genes Encoding Endoplasmic-Reticulum Resident Proteins Requires a Transmembrane Protein-Kinase. *Cell*. Vol. 73, p. 1197–1206, 1993. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90648-a](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90648-a)

Crawford, R. A., & Pavitt, G. D. Translational regulation in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. Vol. 36, p. 5–21, 2019. <https://doi.org/10.1002/yea.3349>

Cui, H. J. Liu, X. G. McCormick, M. Wasko, B. M. Zhao, W. He, X. Yuan, Y. Fang, B. X. Sun, X. R. Kennedy, B. K. Suh, Y. Zhou, Z. J. Kaeberlein, M. Feng, W. L. PMT1 deficiency enhances basal UPR activity and extends replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Age*. Vol. 37, p. 1–8, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9788-7>

Duden, R. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function. *Molecular Membrane Biology*. Vol. 20, p. 197–207, 2003. <https://doi.org/10.1080/0968768031000122548>

Egilmez, N. K. Jazwinski, S. M. *Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast Saccharomyces Evidence for the Involvement of a Cytoplasmic Factor in the Aging of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. Vol. 171, p. 37–42, 1989. <http://doi.org/10.1128/jb.171.1.37-42.1989>

Eklund, E. A. Freeze, H. H. Essentials of glycosylation. *Seminars in Pediatric Neurology*. Vol. 12, p. 134–143, 2005.

Elbein, A. D. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 56, p. 497–534, 1987. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.56.1.497>

Enserink, J. M., & Kolodner, R. D. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Division*. Vol. 5, p. 1–41, 2010. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-5-11>

Ernst, J. F., & Prill, S. K. *O-Glycosylation*. May, p. 67–74, 2018. Fabrizio, P. Longo, V. D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cel*. Vol. 371, p. 89–95, 2003. <https://doi.org/10.1385/1-59745-361-7:89>

Finne, J. Krusius, T. Margolis, R. K. Margolis, R. U. Novel Mannitol-containing Borohydride Treatment Brain Oligosaccharides Obtained by Mild of a Chondroitin Sulfate Proteoglycan Alkaline from. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 254, p. 20, p. 10295–10300, 1979.

Freeze, Hudson H., B. G. N. Glycosylation - an review. *Genomic and Personalized Medicine*. Vol. 1, p. 173–191, 2013.

Gentzsch, M. Tanner, W. The PMT gene family: Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO Journal*. Vol. 15, p. 5752–5759, 1996. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00961.x>

Gershon, H. Gershon, D. The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: A critical review. *Mechanisms of Ageing and Development*. Vol 120, p. 1–22, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(00\)00182-2](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(00)00182-2)

Girrbach, V. Strahl, S. Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278, p. 12554–12562, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212582200>

Goffeau, A. Barrell, B. G. Bussey, H. Davis, R. W. Durjon, B. Feldmann, H. Galibert, F. Hoheisel, J. D. Jacq, C. Johnston, M. Louis, E. J. Mewes, H. W. Murakami, Y. Philippsen, P. Tettelin, H. & Oliver, S. G. *Life With 6000 Genes*, 1996. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>

Gonskikh, Y., & Polacek, N. Alterations of the translation apparatus during aging and stress response. *Mechanisms of Ageing and Development*. Vol. 168, p. 30–36, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.04.003>

Hansen, M., Taubert, S., Crawford, D., Libina, N., Lee, S. J. Kenyon, C. Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. Vol. 6, p. 95–110, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00267.x>

Heyer, E. E. Moore, M. J. Redefining the Translational Status of 80S Monosomes. *Cell*. Vol. 164, p. 757–769, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.003>

Hirayama, H. Fujita, M. Yoko-o, T. Jigami, Y. O-mannosylation is required for degradation of the endoplasmic reticulum-associated degradation substrate Gas1 via the ubiquitin/proteasome pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemistry*. Vol. p. 143, p. 555–567, 2008. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm249>

Ivy, J. M. Klar, A. J. Hicks, J. B. Cloning and characterization of four SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 6, p. 688–702, 1986. <https://doi.org/10.1128/MCB.6.2.688>

Johnathan, L. Richard, M. The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annual Rev. Biochemistry*. Vol. 1, p. 435–464, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>.

Jung, P. Tanner, W. Identification of the Lipid Intermediate in Yeast Mannan Biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 37, p. 1–6, 1973. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02949.x>

Kaeberlein, M. McVey, M. Guarente, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes and Development*. Vol. 13, p. 2570–2580, 1999. <https://doi.org/10.1101/gad.13.19.2570>

Kelleher, D. J. Gilmore, R. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*. Vol. 16 4, p. 47–62, 2006. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj066>

Labunskyy, V. M. Gerashchenko, M. V. Delaney, J. R. Kaya, A. Kennedy, B.

K. Kaeberlein, M. Gladyshev, V. N. Lifespan Extension Conferred by Endoplasmic Reticulum Secretory Pathway Deficiency Requires Induction of the Unfolded Protein Response. *PLoS Genetics*. Vol. 10, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004019>

Landry, J. Sutton, A. Tafrov, S. T. Heller, R. C. Stebbins, J. Pillus, L. Sternglanz, R. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 97, p. 5807–5811, 2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.110148297>

Lehle, L. Strahl, S. Tanner, W. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: A model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angewandte Chemie - International Edition*. Vol. 45, p. 6802–6818, 2006. <https://doi.org/10.1002/anie.200601645>

Lesage, G. Bussey, H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 70, p. 317–343, 2006. <https://doi.org/10.1128/membr.00038-05>

Levin, D. E. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol*. Vol. 25, p. 262–291, 2005. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.2.262>

Lommel, M., & Strahl, S. Protein O-mannosylation: Conserved from bacteriatohumans. *Glycobiology*. Vol. 19, p. 816–8, 2009. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp066>

Longo, V. D. *Chronological Aging in Saccharomyces cerevisiae*. Vol. 57, p. 101–121, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2561-4>

Longo, V. D. Shadel, G. S. Kaelelein, M. Kennedy, B. Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab.* Vol. 16, p. 18– 31, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.002.Replicative>

López-otín, C. Blasco, M. A. Partridge, L. Serrano, M. Kroemer, G. The Hallmarks of Aging Longevity. *Cell.* Vol. 153, p. 1194–1217, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

McCormick, M. A. Delaney, J. R. Tsuchiya, M. Tsuchiyama, S. Shemorry, A. Sim, S. Chou, A. C. Z. Ahmed, U. Carr, D. Murakami, C. J. Schleit, J. Sutphin, G. L. Wasko, B. M. Bennett, C. F. Wang, A. M. Olsen, B. Beyer, R. P. Bammler, T. K. Prunkard, D. Kennedy, B. K. A Comprehensive Analysis of Replicative Lifespan in 4,698 Single-Gene Deletion Strains Uncovers Conserved Mechanisms of Aging. *Cell Metabolism.* Vol. 22, p. 895–906, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.008>

Mijaljica, D. Prescott, M. Devenish, R. J. A fluorescence microscopy assay for monitoring mitophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Visualized Experiments.* Vol. 53, p. 1–5, 2011. <https://doi.org/10.3791/2779>

Moss, G. P. Smith, P. A. S. Tavernier, D. Glossary of class names of organic compounds and reactive intermediates based on structure (IUPAC recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry.* Vol. 67, p. 1307–1375, 1995. <https://doi.org/10.1351/pac199567081307>

Mühlhofer, M. Berchtold, E. Stratil, C. G. Csaba, G. Kunold, E. Bach, N. C. Sieber, S. A. Haslbeck, M. Zimmer, R. Buchner, J. The Heat Shock Response in Yeast Maintains Protein Homeostasis by Chaperoning and Replenishing Proteins. *Cell Reports.* Vol. 29, p. 4593–4607, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.109>

Petes, T. D. Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Vol. 76, p. 410–414, 1979. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.410>

Preiss, T. Baron-Benhamou, J. Ansorge, W. Hentze, M. W. Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. *Nature Structural Biology.* Vol. 10, p. 1039–1047, 2003. <https://doi.org/10.1038/nsb1015>

Ron, D. Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Vol. 8, p. 519–529, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>

Roncero, C. Duran, A. Effect of Calcofluor White and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: In vivo activation of chitin polymerization. *Journal of Bacteriology*. Vol. 163, p. 1180–1185, 1985.

<https://doi.org/10.1128/jb.163.3.1180-1185.1985>

Rosado, C. J. Mijaljica, D. Hatzinisiriou, I. Prescott, M. Devenish, R. J. Rosella: A fluorescent pH-biosensor for reporting vacuolar turnover of cytosol and organelles in yeast. *Autophagy*. Vol. 4, p. 205–213, 2008.

<https://doi.org/10.4161/auto.5331>

Saez, I. Vilchez, D. The Mechanistic Links Between Proteasome Activity, Aging and Age-related Diseases. *Current Genomics*. Vol. 15, p. 38–51, 2014.

<https://doi.org/10.2174/138920291501140306113344>

Sarnoski, E. A., Liu, P. Acar, M. A High-Throughput Screen for Yeast Replicative Lifespan Identifies Lifespan-Extending Compounds. *Cell Reports*. Vol. 21, p. 2639–2646, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.002>

Schachter, J. V. H. Walker-Warburg syndrome. *American Journal of Neuroradiology*. Vol. 13, p. 123–126, 2006. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-29>

Schwarz, D. S., & Blower, M. D. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Science*. Vol. 73, p. 79–94, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>

Sentandreu, R. Northcote, D. H. The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall. *The Biochemical Journal*. Vol. 109, p. 419–432, 1968. <https://doi.org/10.1042/bj1090419>

Shamu, C. E., & Walter, P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *The EMBO Journal*. Vol. 15, p. 3028–3039, 1996.

<http://doi.org/10.1128/MCB.18.4.1967>

Sinclair, D. A. Guarente, L. Extrachromosomal rDNA circles - A cause of aging in yeast. *Cell*. Vol. 91, p. 1033–1042, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80493-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80493-6)

Sinclair, D. A. Mills, K. Guarente, L. Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast SGS1 mutants. *Science*. Vol. 277, p. 1313–1316, 1997. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1313>

Sweet, T. Kovalak, C. Collier, J. The dead-box protein dhh1 promotes decapping by slowing ribosome movement. *PLoS Biology*. Vol. 10, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001342>

Tacutu, R. Thornton, D. Johnson, E. Budovsky, A. Barardo, Di. Craig, T. Diana, E. Lehmann, G. Toren, D. Wang, J. Fraifeld, V. E. De Magalhães, J. P. Human Ageing Genomic Resources: New and updated databases. *Nucleic Acids Research*. Vol. 46 p. D1083–D1090, 2018.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1042>

Takatsuki, A. Kohno, K. Tamura, G. Inhibition of biosynthesis of polyisoprenol sugars in chick embryo microsomes by tunicamycin. *Agricultural and Biological Chemistry*. Vol. 39, p.2089–2091,1975.

<https://doi.org/10.1080/00021369.1975.10861914>

Van Den Steen, P. Rudd, P. M. Dwek, R. A. Opdenakker, G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 33, p. 151–208, 1998.

<https://doi.org/10.1080/10409239891204198>

Verna, J. Lodder, A. Lee, K. Vagts, A. Ballester, R. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 94, p. 13804–13809, 1997.

<https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13804>

Wasko, B. M. Kaeberlein, M. Yeast replicative aging: A paradigm for defining conserved longevity interventions. *FEMS Yeast Research*. Vol. 14, p. 148–159, 2014. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12104>

Werner-Washburne, M. Braun, E. Johnston, G. C. Singer, R. A. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*. Vol.57, p. 383–401, 1993. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr782>