

Jorge Fernandes dos Anjos

Transporte membranar de açúcares e sua
regulação em leveduras do género *Saccharomyces*

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
Doutor em Biologia (especialidade Microbiologia), pela
Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e
Tecnologia.

Lisboa

2006

n° de arquivo
"Copyright"

Jorge Fernandes dos Anjos

Transporte membranar de açúcares e sua
regulação em leveduras do género *Saccharomyces*

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
Doutor em Biologia (especialidade Microbiologia), pela
Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e
Tecnologia.

Lisboa

2006

Agradecimentos

Gostaria de aqui manifestar os meus agradecimentos a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para que esta dissertação se pudesse tornar uma realidade.

À Professora Isabel Spencer Martins pelo apoio e orientação demonstrados tanto durante a realização do trabalho experimental como durante a elaboração desta dissertação.

Ao Sector de Biociências da Escola Superior Agrária de Santarém pelas facilidades concedidas e muito em particular à Doutora Ana Neves e à Doutora Marília Henriques pelo apoio incentivo e amizade demonstrados.

A todos aqueles que comigo trabalharam, inicialmente no Laboratório de Microbiologia do Instituto Gulbenkian de Ciência e/ou posteriormente no Laboratório de Microbiologia da Secção Autónoma de Biotecnologia da FCT/UNL e que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho. De um modo muito especial gostaria de agradecer à Doutora Paula Gonçalves, à Doutora Helena Sousa e à Doutora Madalena Oom pela troca de ideias e sugestões que muito contribuíram para ultrapassar algumas das dificuldades surgidas durante este trabalho.

Gostaria de agradecer a todos aqueles que me receberam calorosamente nos seus laboratórios e me transmitiram a sua experiência e ensinamentos, nomeadamente ao Doutor Hans van Dijken, ao Doutor Jack Pronk e à Marijke Luttik (*Kluyver Laboratory of Biotechnology, Delft University of Technology, Holanda*), à Doutora Fernanda Cássio e ao Doutor Hernâni Gerós (Departamento de Biologia da Universidade do Minho).

Resumo

As leveduras do género *Saccharomyces* são utilizadas em várias fermentações industriais com base em matérias primas constituídas por misturas de açúcares. A entrada dos vários açúcares na célula constitui um passo essencial para a sua utilização eficiente pela levedura. Neste trabalho foram estudados diferentes aspectos relacionados com o transporte transmembranar de glucose, maltose e frutose e sua regulação. Esses aspectos são introduzidos no Capítulo 1, no contexto do projecto de investigação desenvolvido.

O Capítulo 2 descreve diferentes efeitos da maltose no transporte de glucose em leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto*. A maltose, mas não outros dissacáridos de glucose tais como celobiose, trealose e isomaltose, funciona como inibidor competitivo do transporte de glucose. Esta inibição, que é gratuita pois a maltose não é transportada para o interior da célula, afectou tanto o sistema de alta como o de baixa afinidade. Em algumas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, e de outras espécies muito próximas, a maltose actua também ao nível da regulação da síntese dos transportadores de glucose. Um estudo mais aprofundado em *Saccharomyces bayanus* PYCC 4565 revelou que durante o crescimento em maltose as células perdem a capacidade para transportar glucose. Esta capacidade é rapidamente recuperada após o consumo total de maltose e a recuperação depende da síntese proteica. Uma análise dos níveis de expressão dos genes *HXT*, que codificam transportadores de glucose, mostrou que a ausência de transporte deste açúcar em células cultivadas em maltose se deve à repressão dos genes *HXT6/7*, associados ao transporte de alta afinidade. Esta observação contraria o que até agora era conhecido para *S. cerevisiae*.

No Capítulo 3 é abordada a repressão do metabolismo da maltose por glucose, fenómeno relevante para fermentações industriais envolvendo hidrolisados de amido. Em mutantes desreprimidos de *S. cerevisiae* que apresentam uma disrupção no gene *MIG1* e/ou expressam os genes *MAL* de forma constitutiva, foram avaliados os efeitos destas mutações nas taxas específicas de fermentação e respiração, bem como no transporte de glucose e maltose. Enquanto as taxas específicas de fermentação e de respiração de glucose foram ligeiramente superiores às observadas para a estirpe selvagem, nos mutantes $\Delta mig1$ verificou-se que a capacidade de transporte de glucose era cerca do dobro da observada para a estirpe selvagem. Uma avaliação dos níveis de transcrição dos genes *HXT* mostrou um aumento significativo dos níveis de expressão dos genes *HXT3* e *HXT4* nestes mutantes. Estes resultados indicam que também o gene *HXT3* se encontra sujeito a

repressão por parte da proteína Mig1, o que nunca tinha sido referido por outros autores. Foi também observado um aumento generalizado das taxas específicas de fermentação e de respiração, bem como da velocidade máxima de transporte de maltose, nos vários mutantes relativamente à estirpe selvagem. Este aumento não está em consonância com a suposta manutenção da taxa específica de crescimento em maltose.

O Capítulo 4 incide sobre os custos energéticos associados à presença de transporte activo de frutose em condições de anaerobiose, quando toda a energia é gerada por fermentação. Foram efectuados ensaios com *S. bayanus* PYCC 4565 num quimiostato anaeróbio a várias taxas de diluição, com frutose ou glucose como nutriente limitante. Para a taxa de diluição mais baixa ($0,025 \text{ h}^{-1}$), verificou-se que o rendimento em biomassa foi 30% inferior e a taxa específica de produção de etanol foi 54% superior em células cultivadas em meio mineral com frutose do que no mesmo meio com glucose. As diferenças encontradas entre as células cultivadas em meio com frutose ou glucose desaparecem gradualmente com o aumento da taxa de diluição, o que está de acordo com o peso relativo decrescente do transporte activo de frutose face à entrada do mesmo açúcar na célula pelo sistema de difusão facilitada.

A caracterização do mecanismo de funcionamento do simporte frutose/ H^+ em células inteiras é prejudicada pela co-existência do sistema de difusão facilitada para frutose e pelo metabolismo intracelular. O Capítulo 5 descreve a reconstituição em vesículas híbridas de membrana plasmática, contendo citocromo c oxidase para gerar um gradiente electroquímico, do transporte activo de frutose. Neste estudo foi utilizado um mutante *hxt-null* de *S. cerevisiae* transformado com o gene *FSY1*, que codifica o sistema de transporte activo e foi isolado da estirpe-tipo de *Saccharomyces carlsbergensis*. Observou-se uma clara acumulação intravesicular de frutose (cerca de 6x) a pH 5,5, dependente tanto do potencial de membrana como do gradiente de prótons. Foi também confirmado que L-sorbose, mas não D-glucose, é substrato do simporte de frutose. A cinética de transporte de ^{14}C -frutose em vesículas energizadas revelou um valor de K_m (0,53 mM) próximo do obtido *in vivo* e uma estequiometria de dois prótons por molécula de frutose transportada. Esta estequiometria tão exigente em termos energéticos nunca antes foi observada em simportes do mesmo tipo descritos para outros organismos.

No último capítulo é feita uma apreciação global dos resultados e apresentadas perspectivas para trabalho futuro.

Abstract

Industrial fermentations based on *Saccharomyces* often make use of sugar mixtures instead of single carbon and energy sources. Sugar transport across the plasma membrane may determine the efficiency of sugar metabolism by the yeast. In the present work different aspects of glucose, maltose and fructose uptake mechanisms and their regulation were studied. Those aspects are outlined in Chapter 1, in the framework of the PhD research project.

Chapter 2 describes some effects of maltose on glucose transport in yeasts belonging to the *Saccharomyces sensu stricto* group. Maltose, unlike other glucose disaccharides like trehalose, cellobiose and isomaltose, was found to be a competitive inhibitor of glucose uptake. This inhibition, which is gratuitous since maltose does not enter the cell, affects both the high-affinity and the low-affinity glucose uptake component. In some strains of *Saccharomyces cerevisiae* and closely related species maltose also regulates glucose transport at the transcription level. An in-depth study with *Saccharomyces bayanus* PYCC 4565 showed that this yeast is unable to transport glucose when growing in maltose medium. The glucose transport capacity rapidly emerged after maltose consumption and this recovery was found to be dependent on *de novo* protein synthesis. Northern blot analysis revealed that loss of glucose transport activity was due to the repression of *HXT6/7* transcription, a finding not in line with present knowledge on *HXT* regulation in *S. cerevisiae*.

Chapter 3 is related to the repression of maltose metabolism by glucose, a complex regulatory phenomenon of interest to industrial fermentations based on starch hydrolysates. The alleviation of glucose control over maltose metabolism can be obtained through the overexpression of the *MAL* gene(s) and/or the disruption of the *MIG1* gene. In this study, we evaluated the effects of these derepressive mutations on the specific respiration and fermentation rates, as well as on glucose and maltose transport activities and expression. Glucose fermentation and respiration rates were only slightly higher in the mutants in comparison to the wild strain. However, glucose transport capacity was two fold higher in the *Δmig1* mutants than in the reference strain. Northern blot analysis of *HXT* expression in these mutants revealed an overexpression of both *HXT3* and *HXT4*. This points to an association between Mig1 and the regulation of *HXT3*, which is apparently not the case in *S. cerevisiae*. With respect to maltose metabolism, all mutants

exhibited higher fermentation and respiration rates than the control strain, as well as an increased maltose transport capacity. These higher values are not reflected, though, in the relative specific growth rates reported by others for the same strains.

Under anaerobic conditions, active sugar transport systems may consume a significant fraction of the ATP generated by the fermentative metabolism. This subject is the focus of Chapter 4. *S. bayanus* PYCC 4565 was grown in a fructose or glucose-limited, anaerobic, chemostat at different dilution rates. At the lowest dilution rate (0.025 h^{-1}), the biomass yield was 30% lower and the specific ethanol production rate was 54% higher on fructose than on glucose. However, these differences gradually decreased as the dilution rate increased, in agreement with results on the repression of the fructose symporter by high fructose concentrations.

The *FSY1* gene isolated from the type strain of *Saccharomyces carlsbergensis* encodes a specific fructose/proton symporter. A *hxt-null* *S. cerevisiae* strain transformed with this gene regained the ability to grow on fructose, but not on glucose, and displays fructose/ H^+ symport activity. In the work described in Chapter 5, such a mutant was used to reconstitute the active fructose transport system in hybrid plasma membrane vesicles containing cytochrome c oxidase, to generate a proton electrochemical gradient. This reconstitution allowed a better characterisation of active fructose transport than in whole cells, where fructose is also taken up by a facilitated diffusion transport system and is further metabolised. An intravesicular 6-fold fructose accumulation ratio was observed at pH 5.5, and this accumulation was found to be dependent on both the membrane potential and the transmembrane pH gradient. L-sorbose, but not glucose, was a substrate of the symporter, confirming what was originally found *in vivo*. The kinetics of fructose transport in energized vesicles provided a K_m of 0.53 mM, similar to values inferred from experiments with intact cells, and a fructose:proton stoichiometry of 1:2, never previously reported for any sugar/proton symport.

The last chapter is dedicated to a global discussion of the results obtained in the above depicted studies, with a final section opening new windows to future work in the context of new knowledge and applications in yeast biotechnology.

Lista de Abreviaturas

ΔpH	gradiente de pH
$\Delta\psi$	potencial de membrana
μ	taxa específica de crescimento
A	Adenina
ATP	Adenosina trifosfato
C	Citosina
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda
CL-PMV	<i>Cytochrome c oxidase Liposomes - Plasma Membranes Vesicles</i>
COV	<i>Cytochrome c Oxidase Vesicles</i>
D	taxa de diluição
D_c	taxa de diluição crítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	densidade óptica
DTT	<i>1,4-Dithiothreitol</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
F	fluxo
FCCP	<i>Carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>
G	Guanina
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
I	concentração de inibidor
K.	<i>Kluyveromyces</i>
K_i	constante de inibição
K_m	constante de Michaelis
K_s	constante do substrato
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMF	força protomotriz
PMSF	<i>Phenylmethylsulphonylfluoride</i>
ppm	partes por milhão
ps	peso seco
PYCC	Portuguese Yeast Culture Collection, FCT/UNL, Monte de Caparica, Portugal
p/v	peso/volume
q	produtividade específica
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
S	concentração de substrato

(cont.)

Lista de Abreviaturas (continuação)

S.	<i>Saccharomyces</i>
S_0	concentração inicial de substrato
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
T	temperatura ou Timina
t	tempo
TE	tampão Tris/EDTA
TMPD	<i>N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylenediamine</i>
TPP ⁺	ião tetrafenilfosfónio
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UV	radiação ultravioleta
V	velocidade de transporte do substrato ou volume do fermentador
V_{max}	velocidade máxima
v/v	volume/volume
X	concentração de biomassa
Y	coeficiente de rendimento
YNB	meio de cultura <i>Yeast Nitrogen Base</i>

Índice de Matérias

Capítulo 1: Introdução geral	1
1.1 Transporte de hexoses em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.1.1 Mecanismo de transporte.....	3
1.1.2 Especificidade e cinética dos sistemas de transporte	5
1.1.3 Genes associados ao transporte de hexoses	8
1.1.4 Regulação do transporte de hexoses	16
1.1.5 Transporte activo de frutose.....	19
1.2 Transporte de maltose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.2.1 Mecanismo de transporte e sua especificidade	20
1.2.2 Caracterização molecular do sistema de transporte de maltose	21
1.2.3 Regulação dos genes <i>MAL</i>	22
1.3 Objectivos do trabalho e plano da dissertação	27
Capítulo 2: Efeitos da maltose no transporte de glucose	31
2.1 Introdução	33
2.2 Materiais e métodos.....	35
2.2.1 Estirpes.....	35
2.2.2 Meio e condições de cultura	35
2.2.3 Doseamento de glucose e maltose no meio de cultura	35
2.2.4 Suspensões celulares e determinação da biomassa	36
2.2.5 Transporte de ¹⁴ C-glucose	36
2.2.6 Identificação dos genes <i>HXT</i> em <i>S. bayanus</i>	37
2.2.7 Expressão dos genes <i>HXT</i>	39
2.3 Resultados e discussão	42
2.3.1 Efeito da maltose na cinética de transporte de glucose.....	42
2.3.2 Influência da maltose na regulação do transporte de glucose.....	46
Capítulo 3: Caracterização do transporte de glucose e maltose em mutantes $\Delta mig1$ e <i>MAL^c</i> 57	
3.1 Introdução	59
3.2 Materiais e métodos.....	61
3.2.1 Estirpes.....	61
3.2.2 Meio e condições de cultura	61
3.2.3 Suspensões celulares e determinação da biomassa	62
3.2.4 Determinação das taxas específicas de fermentação e respiração.....	62
3.2.5 Transporte de ¹⁴ C-glucose e ¹⁴ C-maltose	66
3.2.6 Expressão dos genes <i>HXT</i>	66

3.3	Resultados e discussão	69
3.3.1	<i>Taxas específicas de fermentação e respiração</i>	69
3.3.2	<i>Caracterização do transporte de glucose</i>	71
3.3.3	<i>Caracterização do transporte de maltose</i>	73
3.3.4	<i>Efeito das mutações Δmig1 e MAL^C na expressão dos genes HXT</i>	75

Capítulo 4: Custos energéticos do transporte activo de frutose: estudos em cultura contínua.....81

4.1	Introdução	83
4.1.1	<i>Custos energéticos do transporte activo</i>	83
4.1.2	<i>Crescimento de S. bayanus PYCC 4565 em glucose vs frutose</i>	84
4.1.3	<i>Cultura microbiana em sistema aberto: quimiostato simples</i>	86
4.2	Materiais e métodos.....	91
4.2.1	<i>Estirpe</i>	91
4.2.2	<i>Cultura em quimiostato</i>	91
4.2.3	<i>Meio e condições de cultura</i>	92
4.2.4	<i>Inóculo e sua preparação</i>	92
4.2.5	<i>Determinação da biomassa seca</i>	92
4.2.6	<i>Análise de gases</i>	93
4.2.7	<i>Doseamento de substratos e metabolitos</i>	93
4.3	Resultados e discussão	94

Capítulo 5: Reconstituição do transporte activo de frutose em vesículas.....103

5.1	Introdução	105
5.2	Materiais e métodos.....	107
5.2.1	<i>Estirpe</i>	107
5.2.2	<i>Meio e condições de cultura</i>	107
5.2.3	<i>Isolamento das membranas plasmáticas de levedura</i>	108
5.2.4	<i>Preparação de vesículas híbridas</i>	109
5.2.5	<i>Determinação do volume vesicular</i>	110
5.2.6	<i>Ensaio de transporte de ¹⁴C-frutose em vesículas híbridas</i>	111
5.2.7	<i>Determinação do gradiente de pH</i>	112
5.2.8	<i>Determinação do potencial de membrana</i>	112
5.2.9	<i>Ensaio de transporte em células inteiras</i>	113
5.3	Resultados e discussão	115
5.3.1	<i>Actividade das vesículas híbridas</i>	115
5.3.2	<i>Fracção de vesículas activas</i>	118
5.3.3	<i>Transporte activo de frutose em CL-PMV</i>	120
5.3.4	<i>Transporte activo de frutose em células inteiras</i>	125

Capítulo 6: Considerações finais e perspectivas	129
6.1 Influência da maltose no transporte de glucose	131
6.2 Efeito da desrepressão para a utilização de maltose no transporte de glucose	133
6.3 Transporte activo de frutose em <i>Saccharomyces</i> : novos aspectos	134
6.4 Perspectivas.....	135
 Bibliografia	 139
 Apêndice I: Meios de cultura.....	 157
 Apêndice II: Análise comparativa das sequências de aminoácidos dos transportadores de hexoses de <i>S. bayanus</i>	 161

Índice de Figuras

- Figura 1.1** Relação entre as proteínas associadas ao transporte de hexoses em *S. cerevisiae*. O dendrograma foi obtido com base no alinhamento das sequências de aminoácidos efectuado com o programa Megalign versão 3.14 (DNASTAR Inc.). 9
- Figura 1.2** Organização dos genes *MAL* e regulação da sua expressão. 23
- Figura 2.1** Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -glucose (pH 5; 25°C) em células de *S. bayanus* PYCC 4565 recolhidas na fase exponencial de crescimento. Ensaios efectuados na ausência (■) e na presença de 200 mM de maltose (▲)..... 42
- Figura 2.2** Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -glucose (pH 5; 25°C) em células de *S. bayanus* PYCC 4565 recolhidas na fase estacionária de crescimento. Ensaios efectuados na ausência (■) e na presença de 50 mM de maltose (▲)..... 43
- Figura 2.3** Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -glucose (pH 5; 25°C) em células de *S. bayanus* PYCC 4565 recolhidas na fase estacionária de crescimento. Ensaios efectuados na ausência (■) e na presença de 50 mM de celobiose (▲)..... 44
- Figura 2.4** Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -glucose (pH 5; 25°C) em células de *S. cerevisiae* PYCC 5297 recolhidas na fase estacionária de crescimento. Ensaios efectuados na ausência (■) e na presença de 50 mM de maltose (▲)..... 45
- Figura 2.5** Variação da velocidade de transporte de glucose (pH 5; 25°C; [^{14}C -glucose] = 20 mM) em *S. bayanus* PYCC 4565 após transferência de meio mineral com 2% p/v maltose para meio com 2% p/v glucose. Símbolos: $\text{DO}_{640\text{ nm}}$ (■) velocidade de transporte de glucose (▲)..... 47
- Figura 2.6** Variação da velocidade relativa de transporte de glucose (pH 5; 25°C; [^{14}C -glucose] = 20 mM) em *S. bayanus* PYCC 4565 após transferência de meio com glucose para meio com maltose (símbolos azuis) ou maltose na presença de 50 ppm de cicloheximida. Símbolos: $\text{DO}_{640\text{ nm}}$ (■, ▲) velocidade de transporte de glucose (□, △)..... 48
- Figura 2.7** Variação da velocidade de transporte de glucose (pH 5; 25°C; [^{14}C -glucose] = 20 mM) em *S. bayanus* PYCC 4565 durante o crescimento em meio com maltose. Símbolos: $\text{DO}_{640\text{ nm}}$ (■, □), concentração de maltose (▲), velocidade de transporte de glucose (●, ○). Os símbolos abertos representam os resultados após a adição de 50 ppm de cicloheximida, indicada pela seta. 49
- Figura 2.8** Curvas de crescimento de *S. bayanus* PYCC 4565 em meio mineral com uma mistura de 1,5 % p/v maltose e 0,5 % p/v glucose. O inóculo foi preparado em meio com glucose (A) ou maltose (B). Símbolos: $\text{DO}_{640\text{ nm}}$ (■), concentração de glucose (▲) e concentração de maltose (▼).... 49

Figura 2.9 Produtos de amplificação por PCR, a partir do DNA total de <i>S. bayanus</i> PYCC 4565, usando primers específicos para os diferentes genes <i>HXT</i> .	50
Figura 2.10 Análise por <i>Northern blot</i> dos níveis de expressão dos genes <i>HXT1</i> e <i>HXT3-7</i> nas estirpes de <i>S. bayanus</i> PYCC 4565 e PYCC 4569. As amostras foram recolhidas durante a fase exponencial (A) e fase estacionária (B) do crescimento em meio com glucose, fase exponencial (C) e fase estacionária (D) do crescimento em meio com maltose e fase exponencial do crescimento em meio com sacarose (E).	54
Figura 3.1 Representação esquemática dum manómetro do aparelho de Warburg. A: 1. lóculo central; 2. braço lateral; 3. ventilo; 4. frasco; 5. manómetro; 6. reservatório e mola; 7. torneira. B. Variação do nível do Líquido de Brodie no ramo aberto do manómetro, em condições em que se verifique um consumo de gases (adaptado de Umbreit <i>et al.</i> , 1964).	63
Figura 3.2 Produção de CO ₂ (■) e consumo de O ₂ (▲) em função do tempo por uma suspensão celular de <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5477, em tampão fosfato 0,1 M (pH 4,5) com glucose (0,05 M), a 25°C.	70
Figura 3.3 Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ¹⁴ C-glucose (pH 4,5; 25°C) em <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5477 (■), <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5478 (▲), <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5479 (▼) e <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5480 (◆).	72
Figura 3.4 Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ¹⁴ C-maltose (pH 4,5; 25°C) em <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5477 (■), <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5478 (▲), <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5479 (▼) e <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5480 (◆).	74
Figura 3.5 Avaliação por <i>Southern blot</i> da especificidade das sondas desenhadas para os diferentes genes <i>HXT</i> . Seis filtros idênticos (1 a 6) foram preparados, a partir de géis de agarose, com os diferentes produtos de amplificação (aprox. 150 bp) nas posições indicadas no topo da figura. Cada um desses mesmos fragmentos, tal como indicado à esquerda na figura, foi também marcado radioactivamente e hibridado com cada um dos filtros.	77
Figura 3.6 Análise por <i>Northern blot</i> dos níveis de expressão dos genes <i>HXT1</i> , <i>HXT3</i> e <i>HXT4</i> na estirpe selvagem de <i>S. cerevisiae</i> e respectivos mutantes analisados. As amostras foram recolhidas durante a fase exponencial do crescimento em meio mineral com 2% p/v de glucose. Uma sonda de DNA para o gene <i>S28A</i> foi usada como controlo da quantidade de RNA presente em cada amostra.	78
Figura 4.1 Representação esquemática dos mecanismos de transporte de glucose (A) e frutose (B) em <i>S. bayanus</i> inserido num metabolismo energético fermentativo.	85

- Figura 4.2** Esquema de funcionamento dum quimiostato simples. O meio fresco contendo a concentração S_0 de nutriente limitante é introduzido, através duma bomba (P), no fermentador a um caudal constante (F). A saída de meio do fermentador é também efectuada a um caudal F, igual ao de entrada, permitindo desta forma manter constante o volume de meio (V) no fermentador. Em estado de equilíbrio dinâmico (*steady state*), as concentrações de biomassa (X) e de substrato (S) também se mantêm constantes e independentes do tempo. O meio é agitado para garantir a sua homogeneidade e, se necessário, arejado (adaptado de Fiechter *et al.*, 1987). 86
- Figura 4.3** Representação simplificada da variação da concentração de biomassa (—), do nutriente limitante S (----) e da produtividade (.....) com a taxa de diluição, numa cultura microbiana em quimiostato simples. 89
- Figura 4.4** Efeito da taxa de diluição na concentração de açúcar no fermentador numa cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em quimiostato anaeróbio em meio mineral com frutose (▲) ou glucose (■) como nutriente limitante, a pH 5 e 25°C. 95
- Figura 4.5** Efeito da taxa de diluição no coeficiente de rendimento em biomassa numa cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em quimiostato anaeróbio em meio mineral com frutose (▲) ou glucose (■) como nutriente limitante, a pH 5 e 25°C. 96
- Figura 4.6** Efeito da taxa de diluição nas taxas específicas de produção de etanol (A) e de produção de CO₂ (B) numa cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em quimiostato anaeróbio, em meio mineral com frutose (▲) ou glucose (■) como nutriente limitante, a pH 5 e 25°C. 97
- Figura 4.7** Efeito da taxa de diluição na taxa específica de produção de glicerol numa cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em quimiostato anaeróbio em meio mineral com frutose (▲) ou glucose (■) como nutriente limitante, a pH 5 e 25°C. 98
- Figura 4.8** Variação da razão entre os coeficientes de rendimento (■) e as taxas específicas de produção de etanol (▲) em frutose e glucose com a taxa de diluição numa cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em quimiostato anaeróbio, em meio mineral com frutose ou glucose como nutriente limitante, a pH 5 e 25°C. 99
- Figura 4.9** Morfologia celular de *S. bayanus* PYCC 4565 cultivada em quimiostato anaeróbio a 25°C, pH 5 e $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$ em meio mineral com frutose (A) ou glucose (B) como nutriente limitante. Ampliação 400x 99
- Figura 5.1** Representação esquemática do transporte activo de frutose em vesículas híbridas, obtidas por fusão de membranas plasmáticas duma estirpe de *S. cerevisiae hxt-null* que expressa Fsy1 (PYCC 5624) com proteolipossomas contendo citocromo c oxidase. 116

- Figura 5.2** Acumulação do ião TPP^+ em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* PYCC 5624 utilizando um eléctrodo específico de TPP^+ para estimativa do potencial de membrana. As setas indicam a adição das vesículas, mistura de energização (citocromo c, TMPD e ascorbato) e valinomicina. A calibração foi efectuada aumentando a concentração final de TPP^+ na solução de $1\mu\text{M}$ para $2\mu\text{M}$ 118
- Figura 5.3** Determinação do gradiente de pH gerado em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* PYCC 5624. As vesículas foram preparadas na presença do composto fluorescente piranina e energizadas com citocromo c, TMPD e ascorbato. Após estabelecido o valor máximo de gradiente de pH, foi adicionado o protonóforo FCCP. Os valores de pH foram avaliados em função da fluorescência medida em cada uma das condições indicadas (ver 5.2.7). 119
- Figura 5.4** Transporte de ^{14}C -frutose em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* com (\blacktriangle) o transportador Fsy1 (PYCC 5624) e sem (\blacksquare) o transportador Fsy1 (PYCC 5623). O valor da fracção do equilíbrio em cada ponto foi calculado a partir da razão entre a concentração intravesicular de frutose na amostra e a respectiva concentração no equilíbrio. 120
- Figura 5.5** Efeito da adição de ionóforos na acumulação intravesicular de ^{14}C -frutose (\blacksquare) em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* PYCC 5624 a pH 5,5. A adição da mistura de energização foi efectuada no instante $t = 0$ min. Nigericina (\blacktriangle) e valinomicina (\bullet) foram adicionadas 1 min antes da mistura de energização. FCCP foi adicionado 1 min antes (\blacklozenge) ou 8 min após (\blacktriangledown) a adição da mistura de energização. 121
- Figura 5.6** Acumulação de ^{14}C -frutose (\blacksquare), numa concentração inicial de $30\mu\text{M}$, em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* PYCC 5624. O ensaio foi iniciado com a adição da mistura de energização. A seta indica a adição de frutose 30mM (\blacktriangledown), sorbose 30mM (\blacktriangle) ou glucose 30mM (\blacklozenge) não radioactivas. 123
- Figura 5.7** Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -frutose em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* PYCC 5624 (pH 5,5; 30°C). As vesículas foram energizadas 4 min antes da adição do açúcar radioactivo. 124
- Figura 5.8** Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -frutose (\blacksquare) e do influxo de prótons (\blacktriangle) associado ao transporte de frutose em *S. cerevisiae* PYCC 5624 (pH 5,5; 30°C). 126
- Figura 5.9** Crescimento de *S. cerevisiae* PYCC 5624 (apenas com Fsy1) e da estirpe IH (expressando Fsy1 e Hxt7) em meio de cultura sólido com 1% p/v frutose e $4\mu\text{g/ml}$ antimicina A. As placas foram incubadas a 30°C durante uma semana. O inóculo consistiu numa suspensão celular com $\text{DO}_{640\text{nm}} = 1$ e respectivas diluições até 10^{-4} 128

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 Sequências dos <i>primers</i> específicos para os genes <i>HXT</i>	38
Tabela 2.2 Efeito da maltose nos parâmetros cinéticos do transporte de ¹⁴ C-glucose em <i>S. bayanus</i> PYCC 4565	43
Tabela 2.3 Sequências dos fragmentos de DNA amplificados a partir do DNA total de <i>S. bayanus</i> PYCC 4565 com <i>primers</i> específicos para os genes <i>HXT</i>	52
Tabela 2.4 Análise comparativa das sequências de aminoácidos correspondentes aos fragmentos de DNA isolados de <i>S. bayanus</i> PYCC 4565 com as sequências publicadas para os transportadores respectivos em <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. bayanus</i>	53
Tabela 3.1 Genótipo relevante dos mutantes de <i>S. cerevisiae</i> estudados.....	61
Tabela 3.2 Conteúdo dos frascos de Warburg para a determinação das taxas específicas de fermentação e de respiração das leveduras estudadas.....	64
Tabela 3.3 Sondas de DNA usadas para detectar mRNA dos genes <i>HXT1-7</i>	67
Tabela 3.4 Taxas específicas de fermentação e de respiração das leveduras em estudo.....	70
Tabela 3.5 Parâmetros cinéticos do transporte de ¹⁴ C-glucose nas leveduras em estudo, a pH 4,5 e 25°C ..	71
Tabela 3.6 Parâmetros cinéticos do transporte de ¹⁴ C-maltose nas leveduras em estudo, a pH 4,5 e 25°C ..	73
Tabela 4.1 Análise comparativa dos custos energéticos do transporte activo de frutose em <i>S. bayanus</i> PYCC 4565 ($D = 0,025 \text{ h}^{-1}$) com os do transporte activo de maltose em <i>S. cerevisiae</i> CBS 8066 ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$).....	100
Tabela 5.1 Parâmetros para a determinação da estequiometria do simporte frutose/H ⁺ em vesículas híbridas de <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5624	124
Tabela 5.2 Constantes cinéticas correspondentes ao transporte de ¹⁴ C-frutose e ao influxo de prótons associado à entrada de frutose em células de <i>S. cerevisiae</i> PYCC 5624 (pH 5,5; 30°C).....	125
Tabela 5.3 Efeito do transporte activo de frutose no coeficiente de rendimento em biomassa de <i>S. cerevisiae</i> , em meio mineral com 1% de glucose ou de frutose em condições de semi-anaerobiose em cultura descontínua a 25°C	128

Capítulo 1:

Introdução geral

1.1 Transporte de hexoses em *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae destaca-se entre os organismos eucarióticos pela sua eficiência no metabolismo de hexoses. Consegue multiplicar-se na presença de concentrações de glucose que podem atingir 2 M e revela uma enorme flexibilidade na gama de concentrações usada, o que poderá estar na base da existência dum elevado número de transportadores de hexoses nesta levedura.

1.1.1 Mecanismo de transporte

O mecanismo de transporte de hexoses em *S. cerevisiae* foi, durante bastante tempo, alvo de debate. Esta polémica deveu-se ao confronto entre dois modelos propostos: um deles defendia que o transporte ocorreria através dum mecanismo de difusão facilitada (Cirillo, 1961), enquanto que para o outro a entrada de hexoses na célula dependeria dum sistema de transporte do tipo PTS (*PhosphoTransferase System*), envolvendo a sua fosforilação (Van Steveninck, 1969), à semelhança do que tem sido descrito para bactérias (Kundig *et al.*, 1966; Simoni *et al.*, 1967).

Os argumentos em apoio do modelo do transporte envolvendo a modificação química do substrato basearam-se, fundamentalmente, em estudos de transporte de 2-desoxiglucose, um análogo da glucose fosforilável mas não metabolizável, e no transporte de glucose em presença de iodoacetato, um inibidor da fermentação (Van Steveninck, 1968; 1969; Jaspers e van Steveninck, 1975). Foi observado que apenas se detectava 2-desoxiglucose-6-fosfato no interior da célula. Embora inicialmente tenha sido proposto que o dador de grupos fosfato neste processo fossem os polifosfatos, estudos posteriores apontaram para o ATP como o dador mais provável (Schuddemat *et al.*, 1988; 1990).

Lobo e Maitra (1977), ao demonstrarem que a existência de fosfotransferases extracelulares em *S. cerevisiae* é altamente improvável, apresentaram um forte argumento para invalidar o modelo de transporte proposto por van Steveninck *et al.*, mas não eliminaram a possibilidade de envolvimento das cinases glicolíticas no transporte de hexoses sugerida por Meredith e Romano (1977). A acumulação intracelular de 2-deoxiglucose inicialmente descrita por van Steveninck não foi confirmada por outros autores (Kotyk e Michaljaniková, 1974; Meredith e Romano, 1977), que a atribuíram a um artefacto experimental.

O estudo do transporte de 2-desoxiglucose efectuado em mutantes com apenas uma das hexocinases activa veio demonstrar que a associação entre fosforilação e transporte proposta por Meredith e Romano (1977) não era específica, uma vez que tanto a estirpe selvagem como mutantes contendo apenas uma das hexocinases PI ou PII, ou a glucocinase, activa apresentaram resultados semelhantes.

Bisson e Fraenkel (1983a), ao estudarem o transporte de glucose e frutose em mutantes deficientes nas várias cinases, trouxeram uma nova perspectiva a este tema. Segundo estes autores, existiriam dois sistemas de transporte de hexoses em *S. cerevisiae*: um de baixa afinidade, independente de cinases, e outro de alta afinidade que dependeria da presença de pelo menos uma destas enzimas. Ensaio de transporte efectuados com 6-desoxiglucose, um análogo não fosforilável de glucose, demonstraram que o transporte de 6-desoxiglucose através do sistema de alta afinidade depende da presença de cinases, o que sugere que o envolvimento da(s) cinase(s) no transporte de hexoses não está relacionado com a fosforilação do substrato (Bisson e Fraenkel, 1983b). Foi, então, proposto um novo mecanismo que passaria por uma interacção entre as cinases e a proteína transportadora, possivelmente através do estabelecimento duma ligação entre proteínas. Também Romano (1982), num estudo semelhante efectuado numa estirpe selvagem de *S. cerevisiae* com 6-desoxiglucose, contraria a teoria da fosforilação associada ao transporte de alta afinidade de glucose. Do mesmo modo, Nevado *et al.* (1994) efectuaram estudos de transporte usando manose tritiada (um substrato do transportador de hexoses), tendo detectado a presença de açúcar não fosforilado no interior da célula. Foi, posteriormente, demonstrado que o transporte de alta afinidade dependente de cinase(s) proposto por Bisson e Fraenkel (1983a) não passava dum artefacto. Com efeito, Smits *et al.* (1996) avaliaram o transporte de glucose em mutantes sem cinases durante 5 segundos e 200 milisegundos e verificaram que a ausência do componente de alta afinidade na reacção menos rápida resulta da acumulação intracelular de glucose livre, dado que cinéticas efectuadas, nestes mutantes, em intervalos de tempo muito curtos apresentam o componente de alta afinidade.

Recentemente, Maier *et al.* (2002) estudaram o mecanismo de transporte de glucose em vesículas de membrana plasmática contendo apenas um único transportador de hexoses (Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6 ou Hxt7), tendo verificado que todos os transportadores funcionam, claramente, com base num mecanismo de difusão facilitada.

1.1.2 Especificidade e cinética dos sistemas de transporte

Tanto a D-frutose como a D-manose são substratos naturais do sistema de transporte de glucose (Cirillo, 1962; Heredia *et al.*, 1968). Açúcares não metabolizáveis (2-desoxiglucose, 6-desoxiglucose, glucosamina, D-xilose) foram também usados para avaliar as características estruturais básicas que os substratos devem apresentar para poder ser transportados por este sistema. Os resultados obtidos mostraram que grande parte dos compostos derivados da D-glucopirranose com modificações nos carbonos 1 ou 2 podem facilmente ser transportados, enquanto as alterações nos carbonos 3 e 4 provocam uma redução significativa da afinidade. Resultados semelhantes foram obtidos com os derivados da D-frutofuranose, com a exceção óbvia do carbono 2 (Cirillo, 1968b; Heredia *et al.*, 1968). Embora o sistema de transporte apresente uma elevada estereo-especificidade, não possui qualquer especificidade anomérica, dado que a α e β D-glucose são fermentadas com taxas idênticas (Heredia *et al.*, 1968). Pela mesma altura, foi observado que a D-galactose requer um sistema de transporte específico e induzido pelo próprio substrato (Cirillo, 1968a). Mais recentemente, verificou-se que o transportador de galactose codificado pelo gene *GAL2* é também capaz de transportar glucose (Liang e Gaber, 1996).

O transporte de hexoses, por se tratar dum transporte mediado, apresenta uma cinética de saturação pelo substrato do tipo Michaelis-Menten, que pode ser descrita pela equação:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_M} \quad (1.1)$$

em que V representa a velocidade de transporte para a concentração S de substrato, V_{\max} a velocidade máxima de transporte e K_m a constante que corresponde à concentração de substrato para a qual a velocidade de transporte é metade da velocidade máxima.

As características cinéticas do transporte de glucose em *S. cerevisiae* foram durante bastante tempo motivo de controvérsia. O consenso relativamente a este tópico só foi alcançado após a caracterização cinética individual das várias proteínas transportadoras de glucose (Reifenberger *et al.*, 1997), conforme se poderá ver mais adiante (1.1.3 e 1.1.4). Nos últimos 20 anos, a maioria dos estudos cinéticos de transporte de hexoses foram efectuados em condições de velocidades iniciais (influxo zero-trans), determinando a

entrada do açúcar marcado radioativamente num intervalo de tempo entre 5 e 10 segundos. Tal como referido por vários autores (Walsh *et al.*, 1994b; Coons *et al.*, 1995), a aplicação desta técnica apresenta algumas dificuldades, principalmente quando o metabolismo dos açúcares está inibido ou são usados açúcares não metabolizáveis. Nessas condições poderá ocorrer um efluxo considerável de glucose e, conseqüentemente, levar à determinação de falsas velocidades de transporte (Fuhrmann e Volker, 1992).

Serrano e DelaFuente (1974) determinaram as velocidades de entrada de glucose, frutose e manose radioactivas e verificaram que a afinidade do transportador variava com as condições de crescimento. A análise de representações Eadie-Hofstee das velocidades de transporte de glucose e frutose (Bisson e Fraenkel, 1983a) revelou uma cinética bifásica, o que originou a proposta da existência de dois sistemas de transporte, um de baixa afinidade ($K_m = 10-20$ mM para glucose e 40 mM para frutose) e outro de alta afinidade ($K_m = 1-2$ mM para glucose e 6 mM para frutose). Relativamente à respectiva regulação, o sistema de baixa afinidade apresentava um carácter constitutivo, enquanto que o de alta afinidade se encontrava na sua capacidade máxima em células cultivadas com baixas concentrações de glucose (Bisson e Fraenkel, 1984), sendo sujeito a repressão catabólica e inactivação irreversível por glucose (Bisson, 1988; Ramos *et al.*, 1988).

Esta inferência sobre os dois sistemas de transporte com afinidades diferenciadas foi amplamente contestada por Fuhrmann e Volker (1992) que consideraram incorrecta a análise, com base em gráficos Eadie-Hofstee, das cinéticas bifásicas de transporte de glucose. Estes autores analisaram um grande número de dados experimentais usando métodos computacionais baseados em regressões não-lineares, tendo verificado que, em grande parte dos casos, os resultados se ajustavam melhor a um modelo com um componente de transporte mediado (alta afinidade) e um componente de difusão simples. Assim, foi sugerido que o componente de baixa afinidade do transporte de glucose proposto por Bisson e Fraenkel (1983a) não existiria e resultava numa difusão não-específica. Posteriormente, o mesmo grupo calculou as energias de activação do sistema de transporte de glucose em várias fases da curva de crescimento (Reinhardt *et al.*, 1997). Os resultados obtidos confirmaram a existência de dois componentes cinéticos do transporte, mas excluíram a hipótese anteriormente apresentada de uma difusão simples de glucose para o interior da célula. Estas observações levaram os autores a propôr um novo modelo segundo o qual a glucose entraria na célula por um sistema de difusão facilitada

e, adicionalmente, através dum poro ou canal. A natureza e o mecanismo de funcionamento deste tipo de poro não foi, porém, explicada. A hipótese de haver difusão simples de glucose através da membrana citoplasmática foi também refutada por Gamo *et al.* (1995), após terem calculado o coeficiente de permeabilidade das hexoses em *S. cerevisiae* e verificado que o valor obtido era pelo menos duas ordens de grandeza inferior ao que seria necessário para explicar o componente de baixa afinidade do transporte de glucose.

Walsh *et al.* (1994a) avaliaram possíveis problemas resultantes da metodologia habitualmente usada para efectuar os ensaios de transporte de glucose, tendo constatado que a utilização duma solução com glucose (0,5 M) não radioactiva a -5°C para lavar as células permite praticamente eliminar a ligação não específica de baixa afinidade, possivelmente associada à parede celular ou ao espaço periplasmático. Este trabalho demonstrou também que a capacidade total de transporte de glucose (V_{max}) se mantém praticamente constante em células cultivadas tanto em altas como em baixas concentrações de glucose ou amostradas em várias fases duma curva de crescimento populacional. Por outro lado, a afinidade do sistema de transporte vai variando ao longo da curva de crescimento, sendo menor ($K_m = 26 \text{ mM}$) no início da fase exponencial e maior ($K_m = 1,6 \text{ mM}$) na fase estacionária. Em fases intermédias da curva de crescimento da população é observada uma cinética bifásica composta por dois componentes que correspondem aos valores de K_m indicados. Estas observações levaram os autores a propor um modelo no qual o transporte de glucose apresenta apenas um único componente, com capacidade constante, e cuja afinidade é modulada em resposta à concentração extracelular de glucose. Por hipótese, a conversão entre o transporte de alta e baixa afinidade dependeria da acção duma proteína reguladora, mas não da síntese de diferentes proteínas transportadoras.

Coons *et al.* (1995) efectuaram uma análise comparativa dos vários modelos propostos para o transporte de glucose baseada no método de regressão não-linear. A cinética do transporte de glucose não se ajustava ao modelo composto por um componente de transporte mediado mais uma difusão simples nem ao modelo com um único componente de afinidade variável. De acordo com estes autores, o modelo que melhor se ajusta aos resultados experimentais corresponde a um sistema multicomposto com pelo menos dois

componentes, um correspondente a um transportador de alta afinidade e outro a um transportador de baixa afinidade.

Embora já tivessem sido identificados vários genes *HXT* (*HeXose Transporter*) associados ao transporte de glucose, a sua caracterização individual levou mais tempo por não ter sido logo possível obter uma estirpe de *S. cerevisiae* incapaz de transportar glucose. Reifenberger *et al.* (1995) produziram um mutante que não expressava os genes *HXT1-7* e sem capacidade para transportar ou usar glucose, frutose ou manose como fontes de carbono e energia. A expressão individual de qualquer um dos genes *HXT1-4*, 6 ou 7 neste mutante é suficiente para restaurar o transporte de glucose, o que permitiu a caracterização cinética de cada uma das correspondentes proteínas transportadoras. Todos os mutantes, com excepção de Hxt2, apresentaram uma afinidade para glucose independente das condições de cultura das células. As proteínas Hxt1 e Hxt3 revelaram-se como transportadores de baixa afinidade ($K_m = 50-100$ mM), Hxt2 e Hxt4 mostraram ter uma afinidade moderada para glucose ($K_m \approx 10$ mM) e Hxt6, Hxt7 e Gal2 foram classificadas como transportadores de alta afinidade ($K_m = 1-2$ mM). Surpreendentemente, o transportador Hxt2 originou uma cinética de transporte bifásica com um componente de alta ($K_m = 1,5$ mM) e outro de baixa afinidade ($K_m = 60$ mM) em células cultivadas com baixas concentrações de glucose (Reifenberger *et al.*, 1997). Desta forma, concluiu-se que a modulação da afinidade do transporte de glucose em função da concentração extracelular do açúcar, em estirpes selvagens, não deve ser mais do que o resultado da expressão diferencial dos vários transportadores Hxt com afinidades significativamente diferentes para glucose. Estes resultados mostram ainda que a descrição matemática da cinética de transporte como um sistema mono- ou bifásico constitui uma simplificação, pois não permite avaliar o número total de componentes envolvidos.

1.1.3 Genes associados ao transporte de hexoses

Durante cerca de duas décadas falharam as tentativas de compreensão, a nível molecular, dos sistemas de transporte de hexoses em *S. cerevisiae*, quer devido à incapacidade em obter mutantes deficientes no transporte quer pela dificuldade na identificação e caracterização dos genes associados a esse transporte. Sabemos, hoje, que grande parte destas tentativas não tiveram sucesso devido, fundamentalmente, ao elevado nível de redundância que estes genes apresentam. Estão, actualmente, identificados 20 genes que

codificam proteínas semelhantes a transportadores de glicose - *HXT1* a *HXT17*, *GAL2*, *SNF3* e *RGT2* (Boles e Hollenberg, 1997; Ciriacy e Reifenger, 1997; Özcan e Johnston, 1999).

Estes 20 genes foram agrupados com base na semelhança entre as sequências das proteínas por eles codificadas (Figura 1.1) bem como na sua função. Uma análise comparativa das sequências das proteínas revelou que estas possuem um grau de identidade que varia entre 99,7% (as proteínas Hxt6 e Hxt7 diferem apenas num único aminoácido) e 25% (entre Snf3 e Hxt16 ou Hxt17). Estas proteínas possuem, globalmente, entre 540 e 592 aminoácidos, com excepção de Rgt2 e Snf3 que possuem, respectivamente, mais 200 e 300 aminoácidos do que as restantes. A análise topológica destas proteínas prevê 12 domínios transmembranares, com as extremidades NH₂ e COOH localizadas no lado interno da membrana citoplasmática (Kruckeberg, 1996).

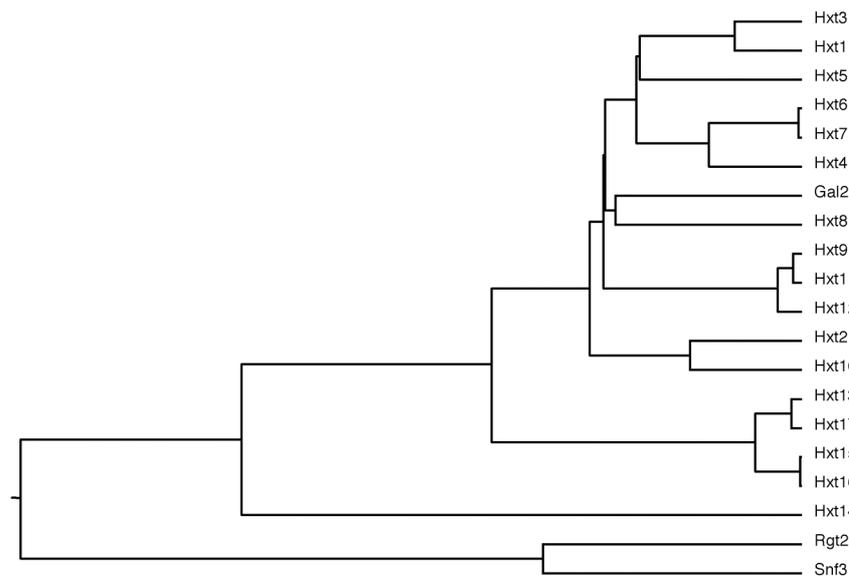


Figura 1.1 Relação entre as proteínas associadas ao transporte de hexoses em *S. cerevisiae*. O dendrograma foi obtido com base no alinhamento das sequências de aminoácidos efectuado com o programa Megalign versão 3.14 (DNASTAR Inc.).

Embora não seja ainda conhecida a estrutura tridimensional das proteínas Hxt, vários autores (Kruckeberg, 1996; Boles e Hollenberg, 1997) sugerem que, dadas as semelhanças entre estas proteínas e o transportador de glicose em eritrócitos Glut1p (42 a 48% de identidade), o modelo molecular desenvolvido para esta poderá ser aplicável.

Segundo este modelo, o transporte de hexoses seria efectuado através dum canal aquoso formado pela agregação de vários domínios transmembranares anfipáticos, capaz de transportar glucose através da ligação por pontes de hidrogénio a aminoácidos com cadeias laterais contendo grupos hidroxilo e amida que formam a parede do canal (Mueckler, 1994; Mueckler *et al.*, 1997).

Estas proteínas associadas ao transporte de glucose e outras hexoses em *S. cerevisiae* pertencem a um grupo mais vasto designado por *Major Facilitator Superfamily* (MFS) (Marger e Saier, 1993; Pao *et al.*, 1998) que inclui ainda uma grande variedade de transportadores de açúcares e outros compostos orgânicos. Dado que grande parte dos transportadores de açúcares em procariontes e mamíferos pertence a esta família, os estudos relativos ao transporte de glucose efectuados em *S. cerevisiae* poderão constituir uma ferramenta valiosa para a compreensão da estrutura, função e regulação destes sistemas de transporte numa grande variedade de organismos.

O primeiro mutante afectado no transporte de glucose foi isolado num rastreio de mutantes deficientes na capacidade de fermentar sacarose e rafinose. Neste estudo foram isolados seis mutantes *snf1-snf6* (*sucrose nonfermenting*) com alterações na regulação do gene *SUC2* que codifica a invertase (Neigeborn e Carlson, 1984). Um destes mutantes (*snf3*), apesar de produzir níveis normais de invertase, apresentava-se fortemente limitado na capacidade de crescimento em sacarose, rafinose e baixas concentrações de glucose (Neigeborn *et al.*, 1986).

Inicialmente, foi considerado que o gene *SNF3* poderia codificar um transportador de glucose de alta afinidade, sendo esta hipótese suportada por várias observações. Em primeiro lugar, o mutante *snf3* não exibia a componente de alta afinidade do transporte de glucose, embora não apresentasse qualquer alteração no componente de baixa afinidade (Bisson *et al.*, 1987). Em segundo lugar, o gene *SNF3* codifica uma proteína de 97 kDa com 12 domínios transmembranares e homóloga a transportadores de glucose em mamíferos. Finalmente, fusões *SNF3-lacZ* mostraram que a proteína se encontra localizada na membrana citoplasmática (Celenza *et al.*, 1988; Marshall-Carlson *et al.*, 1990).

Estudos mais recentes, porém, indicam que a proteína Snf3 não é capaz de transportar glucose (Reifenberger *et al.*, 1995), mesmo quando o gene é inserido num plasmídeo com elevado número de cópias (Liang e Gaber, 1996). Os seus níveis de expressão em estirpes

selvagens são, também, relativamente baixos (Özcan e Johnston, 1995). Estes resultados não são compatíveis com a função inicialmente atribuída a esta proteína, pelo que actualmente se considera que Snf3 tem apenas um papel regulador no transporte de hexoses (Ko *et al.*, 1993; Özcan e Johnston, 1995; Liang e Gaber, 1996; Özcan *et al.*, 1996a; Coons *et al.*, 1997). De acordo com o modelo proposto por Özcan *et al.* (1996a), a proteína Snf3 actua como um sensor de baixas concentrações de glucose.

Os primeiros genes directamente associados ao transporte de hexoses em *S. cerevisiae* foram isolados a partir de plasmídeos de elevado número de cópias capazes de complementar o fenótipo de mutantes *snf3* (Bisson *et al.*, 1987). Esta abordagem permitiu a identificação dos genes *HXT1* (Lewis e Bisson, 1991), *HXT2* (Kruckeberg e Bisson, 1990) e *HXT4* (Theodoris *et al.*, 1994).

O gene *HXT1* encontra-se localizado no cromossoma VIII e codifica uma proteína com 570 aminoácidos que, inicialmente, foi considerada um transportador de alta afinidade específico para glucose e manose, dado que a sua sobreexpressão em mutantes *snf3* restaura o crescimento em rafinose e o transporte de alta afinidade de glucose (Bisson *et al.*, 1987; Lewis e Bisson, 1991). Foi também observado que a disrupção do gene *HXT1* provoca a perda de grande parte do transporte de alta afinidade de glucose e manose, mas não o de frutose. Uma análise mais aprofundada revelou, porém, que o efeito supressor observado em mutantes *snf3* não se deve à própria proteína Hxt1, mas sim à existência dum elevado número de cópias da região promotora de *HXT1* (Özcan *et al.*, 1993; Theodoris *et al.*, 1994). Provavelmente, as sequências DDSE (*DNA sequence Dependent Suppressing Element*) existentes na região promotora do gene *HXT1* e de outros genes (Theodoris *et al.*, 1994; Yang e Bisson, 1996) são capazes de titular factores negativos, nomeadamente o repressor Rgt1, que se encontram sob controlo de Snf3 e que regulam a expressão dos genes *HXT* (Özcan e Johnston, 1995). A análise da cinética de transporte de glucose através de Hxt1, num mutante sem os genes *HXT2* a *HXT7*, revelou que esta proteína corresponde a um transportador com muito baixa afinidade para glucose, frutose e manose (Reifenberger *et al.*, 1997). Estes resultados são consistentes com o facto da expressão de Hxt1 em mutantes *hxt-null* apenas permitir restaurar a capacidade de crescimento em elevadas concentrações de glucose (Reifenberger *et al.*, 1995). A expressão deste gene é induzida cerca de 300x em presença de elevados níveis de glucose, mas não por galactose, maltose ou rafinose (Özcan e Johnston, 1995). Estudos em

quimiostato demonstraram que este gene apenas é expresso quando se opera a taxas de diluição elevadas, o que está de acordo com as observações anteriores em sistema de cultura fechado (Diderich *et al.*, 1999a). Do ponto de vista fisiológico, parece razoável que Hxt1 apenas seja expressa na presença de altas concentrações de glucose, dado que possui uma afinidade muito baixa para este açúcar.

O gene *HXT2* codifica uma proteína com 541 aminoácidos e encontra-se localizado no cromossoma XIII. Estudos efectuados com anticorpos específicos para Hxt2 revelaram que esta é uma proteína integral de membrana, localizada na membrana plasmática e aparentemente não glicosilada (Wendell e Bisson, 1993). Tal como no caso de Hxt1, também o produto do gene *HXT2* foi inicialmente descrito como um transportador de alta afinidade para glucose (Kruckeberg e Bisson, 1990). Porém, verificou-se que, à semelhança do gene *HXT1*, a supressão do fenótipo em mutantes *snf3* estava relacionada com a presença de sequências DDSE na região promotora do gene *HXT2* (Theodoris *et al.*, 1994). Tanto a taxa de crescimento como o transporte de glucose em mutantes *hxt2* são significativamente diferentes do que se observa com a estirpe selvagem quando as células são cultivadas em presença de altas concentrações de glucose. Porém, após a transferência para baixas concentrações de glucose, ou durante o crescimento num meio com 0,05% de glucose, o mutante *hxt2* praticamente não possui o componente de alta afinidade do transporte de glucose e as taxas de crescimento e consumo de glucose encontram-se reduzidas (Kruckeberg e Bisson, 1990; Wendell e Bisson, 1993). Surpreendentemente, e como já foi atrás mencionado, a cinética de transporte de glucose em mutantes *hxt-null* expressando apenas o gene *HXT2* revelou-se dependente das condições em que as células foram cultivadas. Enquanto durante o crescimento em altas concentrações de glucose se observou uma cinética de transporte com um único componente de afinidade intermédia, já durante o crescimento em baixas concentrações de glucose a cinética de transporte apresentou-se bifásica com um componente de alta e outro de baixa afinidade (Reifenberger *et al.*, 1997). Estes resultados sugerem que as características cinéticas de Hxt2 sofrem uma modulação em resposta à concentração de glucose disponível no meio de cultura. A expressão de *HXT2* foi avaliada com base na produção de Hxt2 (Wendell e Bisson, 1994), assim como nos seus níveis de transcrição (Özcan e Johnston, 1995). Em ambos os casos verificou-se que a concentração de glucose no meio influencia a sua expressão, tanto de forma positiva como negativa. De acordo com estes estudos, o gene *HXT2* é induzido por baixas concentrações de glucose mas é

reprimido na presença de altas concentrações do mesmo açúcar. Também os estudos efectuados em cultura contínua confirmaram estes resultados, tendo sido observados elevados níveis de expressão deste gene apenas a taxas de diluição intermédias (Diderich *et al.*, 1999a).

O terceiro gene a ser identificado através da sua capacidade para suprimir o fenótipo característico de mutantes *snf3* foi *HXT4*. Este gene, localizado no cromossoma VIII a jusante de *HXT1*, codifica uma proteína com 576 aminoácidos. Observou-se que a sua expressão com base num plasmídeo de elevado número de cópias provoca um aumento da capacidade de transporte de glucose através dos componentes de alta e baixa afinidade em mutantes *snf3* e em estirpes selvagens (Theodoris *et al.*, 1994). A caracterização da cinética de transporte de glucose através do transportador Hxt4, efectuada em mutantes *hxt-null*, evidenciou que se tratava dum transportador com uma afinidade moderada para glucose ($K_m = 9$ mM) e de baixa afinidade para frutose ($K_m = 50$ mM) (Reifenberger *et al.*, 1997). Estes resultados estão de acordo com observações que indicam que a expressão deste gene é capaz de restabelecer o crescimento em glucose do mutante *hxt-null*, mas não quando o açúcar se encontra em baixas concentrações (Reifenberger *et al.*, 1995). O gene *HXT4* (=LGT1) foi também identificado de forma independente por Prior *et al.* (1993) através da complementação funcional de mutantes de *Kluyveromyces lactis* sem o gene *RGAI*, que nesta levedura codifica um transportador de glucose de baixa afinidade. Segundo Özcan e Johnston (1995), a regulação do gene *HXT4* é semelhante à de *HXT2*, sendo induzido por glucose mas reprimido na presença de concentrações altas, embora a repressão ocorra para concentrações relativamente mais baixas de glucose. Porém, outros autores (Ciriacy e Reifenberger, 1997; Yin *et al.*, 2003) apresentaram resultados distintos, tendo observado uma expressão substancial deste gene em 2% glucose.

Outro gene que em *S. cerevisiae* codifica um transportador de hexoses é o gene *HXT3* que se encontra localizado no cromossoma IV e origina uma proteína com 567 aminoácidos. Este gene foi identificado como um supressor das deficiências no transporte de iões K^+ em células que não possuem os transportadores de potássio TRK1 e TRK2 (Ko *et al.*, 1993). A sobreexpressão, em mutantes *snf3*, de *HXT3* ou das sequências DDSE existentes na região do seu promotor permitem restaurar a capacidade de crescimento deste mutante em meios com rafinose ou baixas concentrações de glucose (Ko *et al.*, 1993; Theodoris *et al.*, 1994). Tal como Hxt1, com o qual apresenta uma identidade de 86,4%, Hxt3

comporta-se como um transportador de baixa afinidade para glucose (Reifenberger *et al.*, 1997) e, quando expresso num mutante *hxt-null*, é capaz de restaurar a capacidade de crescimento em altas concentrações de glucose (Reifenberger *et al.*, 1995). *HXT3* é expresso apenas em presença de glucose, embora a sua indução seja praticamente independente da concentração do substrato no meio de cultura (Özcan e Johnston, 1995; Yin *et al.*, 2003). Os estudos efectuados em cultura contínua demonstram, porém, um padrão de expressão um pouco diferente do observado em sistema de cultura fechado, pois *HXT3* apenas é expresso a elevadas taxas de diluição (Diderich *et al.*, 1999a).

A eliminação simultânea dos quatro genes *HXT1* a *HXT4* provoca alterações significativas na capacidade de utilização de glucose, não sendo, porém, suficiente para impedir o crescimento num meio com glucose, o que sugeriu a existência de outros transportadores de hexoses em *S. cerevisiae* (Ko *et al.*, 1993). Com efeito, um rastreio sistemático efectuado por hibridação com sondas preparadas a partir dum fragmento do gene *HXT3* permitiu a identificação de três novos transportadores de hexoses - *HXT5*, 6 e 7 (Reifenberger *et al.*, 1995).

Ao contrário do que acontece com os outros genes *HXT* previamente descritos, o gene *HXT5* não contribui de forma significativa para o transporte de hexoses presentes no meio de cultura, dado que na presença de glucose os seus níveis de expressão são sempre muito baixos (Reifenberger *et al.*, 1995; Diderich *et al.*, 1999a). Porém, na ausência duma fonte de azoto, após o consumo total da glucose no meio de cultura ou durante o crescimento em etanol apresentam níveis de expressão elevados (Diderich *et al.*, 1999a). Ao efectuarem a sobreexpressão de *HXT5* num mutante *hxt1-17Δ gal2Δ*, Wieczorke *et al.* (1999) verificaram que é possível o crescimento em glucose, frutose e manose. A capacidade de transporte de hexoses por parte de Hxt5 foi avaliada num mutante *hx-null* em que o gene *HXT5* foi inserido sob acção dum promotor constitutivo, tendo-se verificado que esta proteína é um transportador de glucose com uma afinidade superior a Hxt1, mas inferior a Hxt7 (Buziol *et al.*, 2002). A proteína Hxt5 é constituída por 592 aminoácidos e o seu gene estrutural encontra-se localizado no cromossoma VIII, a montante dos genes *HXT1* e *HXT4* (Reifenberger *et al.*, 1995).

Os genes *HXT6* e *HXT7* encontram-se localizados em tandem no cromossoma IV, a jusante do gene *HXT3*. As proteínas codificadas por estes genes são muito semelhantes, possuindo ambas 570 aminoácidos e diferindo apenas em dois aminoácidos: na posição

293 (Val/Ile) e 556 (Thr/Ala) (Reifenberger *et al.*, 1995). Estes dois resíduos encontram-se localizados fora dos 12 domínios transmembranares e nenhum deles parece ser conservado nos restantes membros desta família. Foram, contudo, encontradas estirpes laboratoriais que não têm estes dois genes mas possuem um único gene quimérico *HXT6/7* resultante da sua fusão (Liang e Gaber, 1996). De acordo com Reifenberger *et al.* (1997), ambas as proteínas Hxt6 e Hxt7 correspondem a transportadores de glucose de alta afinidade. Estes autores verificaram também que a expressão de qualquer destes genes num mutante *hxt-null* permite às células retomar o crescimento em meio com glucose. A expressão de *HXT6* e *HXT7* é reprimida por elevadas concentrações de glucose e, contrariamente ao que acontece com os genes *HXT1* a *HXT4*, praticamente não se observa indução por glucose, i.e., os níveis basais de expressão são bastante elevados mesmo em fontes de carbono não fermentáveis, tais como glicerol ou etanol (Liang e Gaber, 1996; Schulte *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2003). Se avaliarmos, de forma independente, os níveis de expressão dos genes *HXT6* e *HXT7* verificamos que, numa forma geral, os níveis de expressão de *HXT6* são muito mais baixos do que os observados para *HXT7* (Reifenberger *et al.*, 1997; Diderich *et al.*, 1999a).

A sequenciação sistemática do genoma de *S. cerevisiae* e vários rastreios efectuados por diversos autores permitiram identificar mais 10 genes pertencentes à família *HXT*, que foram designados por *HXT8* a *HXT17* (ver Kruckeberg, 1996; Boles e Hollenberg, 1997). Quando sobreexpressos num mutante *hxt1-17Δ gal2Δ*, todos estes genes (com excepção de *HXT12*) produzem proteínas capazes de transportar hexoses, embora com diferentes especificidades. Enquanto as proteínas Hxt8, Hxt13, Hxt15, Hxt16 e Hxt17 são capazes de restaurar o crescimento do mutante *hxt-null* em glucose, frutose e manose, as proteínas Hxt9 a Hxt11 também são capazes de transportar galactose. A proteína Hxt14 parece ser um transportador específico para galactose (Wieczorke *et al.*, 1999). A sequência do gene *HXT12* encontra-se interrompida por uma inserção de 2 pb, o que faz com que este seja na realidade um pseudogene incapaz de produzir uma proteína funcional (Kruckeberg, 1996; Wieczorke *et al.*, 1999). A função destes genes não é clara. Embora codifiquem proteínas capazes de transportar hexoses, os seus níveis de expressão são bastante baixos (Özcan e Johnston, 1999; Yin *et al.*, 2003) e, provavelmente, pouco relevantes do ponto de vista fisiológico. Alguns destes genes (*HXT9* e *11*) encontram-se, aparentemente, envolvidos em mecanismos de resistência a drogas (Nourani *et al.*, 1997).

O último gene envolvido no transporte de glucose a ser identificado foi o *RGT2*. Este gene encontra-se localizado no cromossoma IV, 100 kb a jusante de *SNF3*, e codifica uma proteína com 763 aminoácidos e 60% de identidade com Snf3. Este gene foi inicialmente clonado como um alelo dominante, *RGT2-1*, que suprime a necessidade de Snf3 durante o crescimento em baixas concentrações de glucose (Marshall-Carlson *et al.*, 1991; Özcan *et al.*, 1996a). Tal como Snf3, Rgt2p é, aparentemente, uma proteína de membrana com 12 domínios transmembranares e uma longa região C-terminal que deverá estar localizada no lado interno da membrana citoplasmática. A semelhança entre as extremidades C-terminal destas duas proteínas é, no entanto, baixa, com excepção duma sequência de 17 aminoácidos que é praticamente idêntica. Rgt2p parece ter uma função semelhante a Snf3, actuando como um sensor da concentração de glucose extracelular capaz de gerar um sinal que induz a expressão dos genes *HXT* (Özcan *et al.*, 1996a; 1998).

1.1.4 Regulação do transporte de hexoses

A levedura *S. cerevisiae* usa glucose como fonte de carbono e energia preferencial. A glucose não só reprime a expressão de genes necessários para o metabolismo de outras fontes de carbono e energia alternativas, como também induz a transcrição dos genes essenciais para a sua utilização eficiente (Gancedo, 1998; Carlson, 1999; Johnston, 1999).

Vários dos componentes da via de indução por glucose responsável pela regulação da expressão dos genes *HXT* encontram-se indentificados, nomeadamente os já referidos sensores de glucose Snf3 e Rgt2, responsáveis por detectar a concentração de glucose extracelular e gerar o sinal intracelular correspondente (Özcan *et al.*, 1996a; 1998). A natureza do sinal intracelular gerado por Snf3 e Rgt2 em resposta à presença de glucose no meio é desconhecida. Porém, este sinal primário não deverá ser a glucose nem nenhum dos produtos do seu metabolismo. A principal justificação para esta afirmação resulta da observação de que as mutações dominantes *SNF3-1* e *RGT2-1* são capazes de gerar um sinal de indução por glucose, mesmo na ausência do indutor (Özcan *et al.*, 1996a). Estes autores demonstraram ainda que um mutante deficiente nos dois sensores (*snf3Δ rgt2Δ*) não é capaz de produzir qualquer indução da expressão dos genes *HXT* na presença de glucose, sendo, portanto, incapaz de crescer nestas condições (Özcan *et al.*, 1998). Snf3 é necessário para a indução da transcrição dos genes *HXT2*, *HXT3* e *HXT4* (Özcan e Johnston, 1995), enquanto Rgt2 é responsável pela indução de *HXT1* em presença de

elevadas concentrações de glucose (Özcan *et al.*, 1996a). Estes resultados indicam que Snf3 deverá estar envolvido na resposta a baixas concentrações de glucose, enquanto Rgt2 actua como um sensor de altas concentrações de glucose.

Existem evidências de que as regiões na extremidade C-terminal destas proteínas (mas não noutros membros desta família) se encontram envolvidas na geração do sinal para a indução dos genes *HXT* em presença de glucose. Foi demonstrado que essas regiões são essenciais para a indução da expressão dos genes *HXT* (Coons *et al.*, 1997; Özcan *et al.*, 1998; Vagnoli *et al.*, 1998). A sobreexpressão da região C-terminal de Snf3 traduziu-se na capacidade de suprimir as deficiências de crescimento dum mutante *snf3* em baixas concentrações de glucose (Coons *et al.*, 1997). De acordo com Özcan e Johnston (1999), o mais provável será que a ligação da glucose aos domínios transmembranares provoque uma alteração conformacional que é transmitida à região C-terminal e afecta a sua interacção com o componente seguinte na cadeia de transdução de sinal. Embora este(s) componente(s) não esteja(m) completamente identificado(s), foram descritas duas proteínas, Std1 e Mth1, capazes de interagir com as extremidades de Snf3 e Rgt2. Uma análise genética sugere que estas proteínas se encontram envolvidas na transdução do sinal que regula a expressão dos transportadores de glucose (Schmidt *et al.*, 1999; Lafuente *et al.*, 2000; Schulte *et al.*, 2000).

Um outro elemento aparentemente muito importante desta via de transdução de sinal é a proteína Rgt1. Esta é uma proteína de dedos de zinco com capacidade de ligação ao DNA e que pertence à família dos factores de transcrição Gal4 (Özcan *et al.*, 1996b). Rgt1 é um factor de transcrição bifuncional que apresenta três formas distintas em função da quantidade de glucose no meio de cultura. Na ausência de glucose actua como um repressor da transcrição dado que promove a ligação do complexo repressor Ssn6-Tup1 aos promotores dos genes *HXT1* a *HXT4*. Para baixas concentrações de glucose, Rgt1 tem um papel neutro na transcrição. Em presença de elevadas concentrações de glucose, Rgt1 é convertido num activador da transcrição que é necessário para a indução plena da expressão de *HXT1* (Özcan e Johnston, 1995). A inibição da função repressora de Rgt1, em presença de baixas concentrações de glucose, depende aparentemente do sensor de glucose Snf3. Por outro lado, a conversão de Rgt1 num activador da transcrição, em presença de altas concentrações de glucose, depende de Rgt2 (Özcan *et al.*, 1996b). De acordo com estudos mais recentes em presença de elevadas concentrações de glucose

Rgt1 é hiperfosforilado e, desta forma, é convertido num activador da transcrição de *HXT1*. Este efeito positivo na expressão de *HXT1* é provavelmente indirecto, dado que Rgt1 é incapaz de se ligar ao promotor de *HXT1*, em presença de glucose. É possível que Rgt1, em presença de elevadas concentrações de glucose, seja necessário para a expressão dum activador da transcrição ainda não identificado de *HXT1* (Mosley *et al.*, 2003).

De acordo com vários autores (Flick *et al.*, 2003; Polish *et al.*, 2005), na ausência de glucose as proteínas Std1 e Mth1 ligam-se à proteína Rgt1 impedindo a sua fosforilação. Nestas condições, Rgt1 consegue ligar-se ao DNA impedindo a transcrição dos genes *HXT1* a *HXT4*. A presença de glucose no meio activa os sensores de glucose Snf3 e Rgt2 que desencadeiam um sinal que conduz à degradação da proteína Mth1, o que impede a ligação de Std1 e Mth1 a Rgt1. Assim, Rgt1 é fosforilada e deixa de se conseguir ligar ao DNA e, conseqüentemente, é activada a transcrição dos genes *HXT1* a *HXT4*. A modulação da actividade de Rgt1 depende da presença da proteína Grr1 (Özcan e Johnston, 1995; Özcan *et al.*, 1996b). Esta proteína faz parte dum complexo multiproteico que promove a ubiquitinação de outras proteínas e sua posterior degradação (Li e Johnston, 1997; Skowrya *et al.*, 1997; Kishi *et al.*, 1998). Vários trabalhos demonstram, porém, que Grr1 é necessário tanto para a inibição do repressor Rgt1 em resposta a baixas concentrações de glucose como para a conversão num activador da transcrição em presença de altas concentrações de glucose (Özcan *et al.*, 1996b; Mosley *et al.*, 2003).

A expressão dos genes *HXT2* e *HXT4* é regulada por duas vias de sinalização distintas (Özcan e Johnston, 1995; 1996): a via de indução por glucose anteriormente descrita (dependente de Snf3 e Rgt1p) reprime a transcrição na ausência de glucose, enquanto a via geral de repressão por glucose (dependente de Mig1) impede a sua expressão na presença de elevadas concentrações de glucose. É, desta forma, possível explicar que estes genes apenas sejam expressos em baixas concentrações de glucose.

De acordo com o modelo proposto por Özcan e Johnston (1995), a regulação da transcrição do gene *HXT3* depende apenas do repressor Rgt1.

A regulação da transcrição dos genes *HXT6* e *HXT7*, que codificam transportadores de alta afinidade para glucose, não tem sido objecto de estudos tão detalhados como outros transportadores de hexoses (*HXT1* a *HXT4*) e os poucos resultados existentes são algo contraditórios. De acordo com Liang e Gaber (1996), a expressão dos genes *HXT6/7* é constitutiva em mutantes *snf3Δ*, enquanto na estirpe selvagem se encontra sujeita a

repressão não só por Snf3 mas também pela via geral de repressão por glucose. Porém, segundo Dulgai *et al.* (2001), a expressão de *HXT7* é completamente abolida em mutantes *snf3Δ*, tanto em condições de indução como em presença de etanol. Os resultados destes autores demonstram que Snf3 é capaz de produzir um sinal independentemente da concentração extracelular de glucose, embora esse sinal seja mais forte na presença de baixas concentrações de glucose. Em qualquer dos casos, este sinal seria transmitido através da via de indução por glucose (dado que depende tanto de Rgt1 como de Grr1) e na ausência de glucose apenas actuaria sobre promotores altamente sensíveis como o de *HXT7*.

É geralmente aceite que a regulação dos transportadores de hexoses se efectua ao nível da transcrição. Existem, contudo, alguns estudos que referem outras formas de regulação, nomeadamente no que respeita à degradação dos transportadores Hxt2 (Wendell e Bisson, 1994) e Hxt6 e Hxt7 (Krampe *et al.*, 1998; Penalver *et al.*, 1998; Krampe e Boles, 2002).

1.1.5 Transporte activo de frutose

Conforme promenorizado atrás, actualmente encontram-se identificados 17 genes que codificam transportadores de hexoses em *S. cerevisiae* (*HXT1-11*, *HXT13-17* e *GAL2*). Todas estas proteínas transportadoras não distinguem, aparentemente, glucose de frutose e operam através dum mecanismo de difusão facilitada (ver 1.1.3).

Entre as espécies de leveduras que constituem o grupo que tem sido designado por *Saccharomyces sensu stricto*, encontra-se *S. cerevisiae* e três outras espécies muito próximas (*Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces pastorianus* e *Saccharomyces paradoxus*). De realçar que *S. pastorianus* é, geralmente, considerada um híbrido de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. *S. bayanus* e *S. pastorianus* (*carlsbergensis*) possuem um sistema de transporte activo específico para frutose, do tipo simporte com protão (Cason *et al.*, 1986; Rodrigues de Sousa *et al.*, 1990; 1995; Rodrigues de Sousa, 1998). Este sistema de transporte activo para frutose coexiste com o sistema de difusão facilitada para glucose e frutose presente em todas as leveduras do mesmo grupo. A caracterização deste sistema específico revelou que se trata dum transporte de alta afinidade ($K_m \approx 0,2$ mM) que aceita, para além de frutose, L-sorbose como substrato, mas não D-glucose (Cason *et al.*, 1986; Rodrigues de Sousa, 1998).

Posteriormente, Gonçalves *et al.* (2000) identificaram o gene *FSY1* (*Fructose SYmport*) correspondente ao simporte frutose/H⁺ em *S. pastorianus*, por complementação funcional dum mutante *hxt-null* de *S. cerevisiae* com uma biblioteca genómica da estirpe-tipo de *S. carlsbergensis*. Os transformantes obtidos desta forma apenas são capazes de crescer em frutose, mas não em glucose, e transportam frutose apenas através do sistema de transporte activo. A especificidade e as características cinéticas do transportador codificado pelo gene *FSY1*, quando expresso num mutante *hxt-null*, são semelhantes às observadas em estirpes selvagens de *S. pastorianus* e *S. bayanus*.

A regulação deste transportador é fortemente dependente da fonte de carbono disponível no meio de cultura, bem como da sua concentração. Na presença de concentrações muito baixas de frutose ou glucose verifica-se uma indução da expressão de *FSY1*. Porém, o aumento da concentração destes açúcares tem um efeito repressor, impedindo a transcrição deste gene (Rodrigues de Sousa *et al.*, 2004).

1.2 Transporte de maltose em *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.1 Mecanismo de transporte e sua especificidade

Contrariamente ao que acontece com o transporte de hexoses, a maltose entra na célula de *S. cerevisiae* e espécies relacionadas através dum sistema de transporte activo (Harris e Thompson, 1961; Delafuente e Sols, 1962). Este transportador também aceita turanose, mas não transporta maltotriose, α -metilglucosídeos ou melezitose (Chang *et al.*, 1989).

Os primeiros estudos sobre o mecanismo de transporte sugerem a existência duma entrada simultânea de protões com a maltose (Seaston *et al.*, 1973). Os resultados foram posteriormente confirmados por Serrano (1977), tendo este investigador verificado que o simporte de maltose com protões depende do gradiente electroquímico de protões mas não dos níveis intracelulares de ATP. Foi ainda demonstrado que, independentemente dos valores de pH extracelular (Loureiro-Dias e Peinado, 1984), a estequiometria do influxo maltose/protão é de 1:1 e que, para manter a electroneutralidade, existe um efluxo de iões K⁺ para o meio circundante (Serrano, 1977).

Relativamente à cinética de transporte, vários autores detectaram uma cinética bifásica possivelmente devida a dois componentes: um de alta afinidade, induzido pelo substrato, com um K_m de 4 mM, e outro de baixa afinidade, constitutivo, com um K_m de 70 mM

(Busturia e Lagunas, 1985; Novak *et al.*, 1990; Cheng e Michels, 1991). Porém, foi posteriormente demonstrado por Benito e Lagunas (1992) que o chamado componente de baixa afinidade apresenta características atípicas, sem qualquer semelhança com outros mecanismos de transporte descritos para esta levedura, tendo sido proposto que este componente resulta dum artefacto experimental e que é consequência, possivelmente, da ligação inespecífica do açúcar à parede ou à membrana celular.

A existência de apenas um componente, com alta afinidade para maltose, foi reforçada através de estudos de transporte efectuados em vesículas híbridas nas quais foi observada uma cinética de transporte monofásica com um K_m de cerca de 5 mM (Van Leeuwen *et al.*, 1992; Van der Rest *et al.*, 1995a).

1.2.2 Caracterização molecular do sistema de transporte de maltose

A utilização de maltose em *S. cerevisiae* requer a presença do produto de três genes: o da permease de maltose (*MALx1* ou *MALT*), que transporta esta molécula para o interior da célula; o da maltase (*MALx2* ou *MALS*), que promove a hidrólise da ligação α -glucosídica dando origem a duas moléculas de glucose; e, finalmente, o gene dum activador de transcrição (*MALx3* ou *MALR*), que regula a expressão dos outros dois genes (Needleman *et al.*, 1984; Cohen *et al.*, 1985b; Charron *et al.*, 1986). Estes três genes encontram-se associados num *locus* do qual são conhecidas cinco cópias distribuídas por diferentes cromossomas: *MAL1* (cromossoma VII), *MAL2* (cromossoma III), *MAL3* (cromossoma II), *MAL4* (cromossoma IX) e *MAL6* (cromossoma VIII) (Charron *et al.*, 1989). Uma análise genética e funcional destes agrupamentos de genes demonstrou que todos eles possuem um elevado grau de homologia entre si numa região com aproximadamente 9 kb que contém os três genes envolvidos na utilização da maltose (Charron *et al.*, 1986; 1989). Embora seja frequente uma estirpe capaz de usar maltose ter vários destes *loci*, pode acontecer que apenas um se encontre completamente funcional. As restantes cópias, quando presentes, serão contituídas por um conjunto de genes parcial ou totalmente não funcionais (Chow *et al.*, 1983; Michels e Needleman, 1984; Cohen *et al.*, 1985a; Naumov *et al.*, 1994).

O gene que codifica o transportador da maltose no *locus MAL6* (*MAL61*) foi clonado e sequenciado, tendo-se verificado que este contém uma única ORF (*Open Reading Frame*) com 1842 pb que codifica uma proteína com cerca de 68 kDa (Cheng e Michels, 1989;

Yao *et al.*, 1989). A análise da sua estrutura secundária indica que se trata duma proteína altamente hidrofóbica, contendo 12 domínios transmembranares e com um grau de homologia significativo com outros transportadores de açúcares (Cheng e Michels, 1989), tais como a permease de lactose de *K. lactis* (codificada pelo gene *LAC12*), o transportador de glucose humano HepG2, os transportadores de xilose e arabinose de *Escherichia coli* (codificados pelos genes *xyIE* e *araE*) e transportadores de outros açúcares em *S. cerevisiae* (Horak, 1997). Resultados semelhantes obtiveram van den Broek *et al.* (1994) que, a partir de membranas citoplasmáticas de células cultivadas em meio com maltose, isolaram uma proteína de 64 kDa com uma sequência de aminoácidos idêntica à prevista para o produto do gene *MAL61*.

1.2.3 Regulação dos genes *MAL*

A expressão dos genes estruturais *MALx1* e *MALx2* é induzida por maltose e reprimida por glucose (Figura 1.2). A indução destes genes na presença de maltose depende do activador de transcrição codificado pelo gene *MALx3*. Mal63 é uma proteína de dedos de zinco com capacidade de ligação ao DNA (Chang *et al.*, 1988; Kim e Michels, 1988). Embora não apresentando regiões acídicas ou ricas em glutamina, características de outros activadores de transcrição, esta proteína dimérica activa a transcrição dos genes *MAL61* e *MAL62* (Sirenko *et al.*, 1995). A sequência de DNA reconhecida por Mal63 não se encontra ainda identificada de forma inequívoca. Inicialmente, foi proposto que a sequência GAAA(A/T)TTTCGC, da qual existem duas cópias na região com 68 pb entre os genes *MAL61* e *MAL62*, desempenharia um papel importante na indução dos genes estruturais em presença de maltose (Levine *et al.*, 1992). Porém, estudos posteriores revelaram a existência de três sequências alvo existentes na região do promotor divergente destes genes, nenhuma das quais correspondendo às sequências anteriormente referidas (Sirenko *et al.*, 1995). Foi ainda encontrado um outro local de ligação de Mal63 na região do seu próprio promotor, o que sugere a existência dum mecanismo de auto-regulação (Needleman, 1991).

Embora o mecanismo de activação da proteína Mal63 em presença de maltose não seja conhecido, foi sugerido por Wang e Needleman (1996) que a maltose poderia ligar-se a esta proteína provocando uma alteração conformacional responsável pela sua activação. Tanto mutantes constitutivos no gene *MAL63* como estirpes selvagens com o alelo

MAL43 apresentam substituições múltiplas de aminoácidos na região C-terminal, o que poderá permitir que estas proteínas adotem a conformação activa mesmo na ausência de maltose (Wang e Needleman, 1996; Gibson *et al.*, 1997). Foi demonstrado que a indução dos genes *MAL* depende também do transportador de maltose (Charron *et al.*, 1986). Este comportamento não se deve ao facto da maltose permease poder actuar como um sensor da maltose extracelular, mas sim devido à necessidade duma pequena concentração intracelular de maltose para desencadear a expressão destes genes (Wang *et al.*, 2002), o que está de acordo com o mecanismo de activação de *MAL63* proposto por Wang e Needleman (1996).

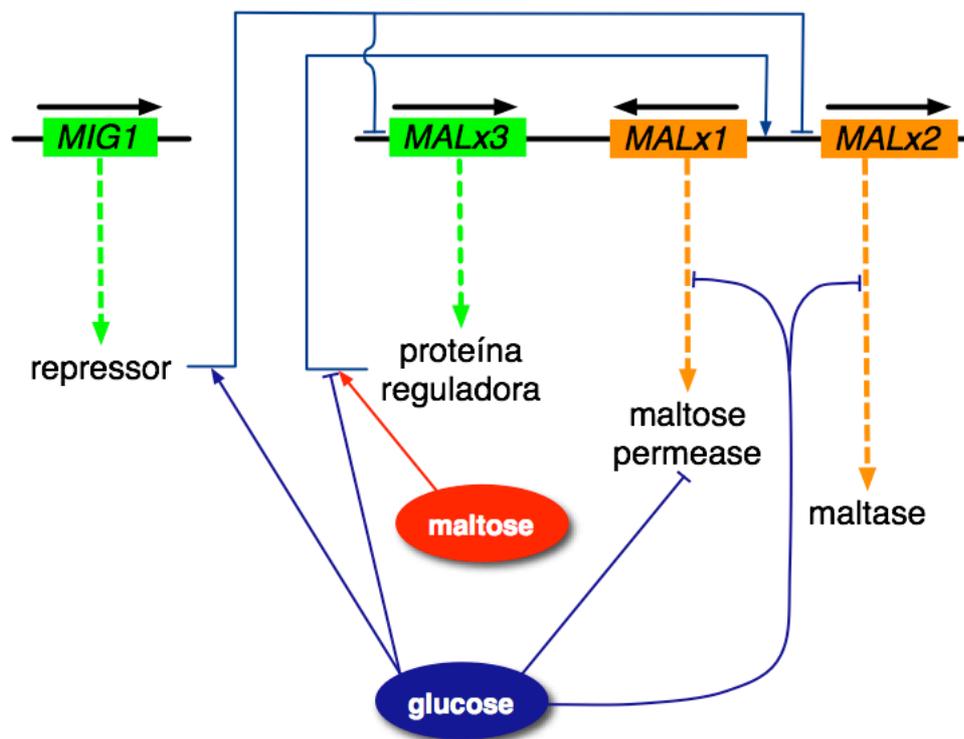


Figura 1.2 Organização dos genes *MAL* e regulação da sua expressão.

A glucose reprime a expressão dos genes *MAL*, mesmo quando a maltose está presente no meio de cultura. Esta repressão é, em parte, dependente do produto do gene *MIG1*, dado que a disrupção do gene (Hu *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1996) ou a deleção do local de ligação ao promotor do gene *MAL63* (Wang e Needleman, 1996) removem parcialmente a repressão provocada pela glucose. Mig1 é uma proteína de dedos de zinco capaz de se ligar ao promotor de vários genes repressíveis, tais como os genes *SUC* e *GAL*,

reprimindo a sua transcrição durante o crescimento em glucose (Nehlin e Ronne, 1990; Nehlin *et al.*, 1991). A sua ligação ao DNA requer a existência duma sequência (G/C)(C/T)GGGG com uma região rica em AT do lado 5' (Lundin *et al.*, 1994) e envolve a formação dum complexo com duas outras proteínas: Tup1p e Cyc8p (Ssn6p) (Vallier e Carlson, 1994; Treitel e Carlson, 1995). A análise da região promotora do complexo *MAL6* demonstrou a existência de três zonas de ligação de Mig1, uma no promotor do gene *MAL63* (Wang e Needleman, 1996) e duas na região do promotor divergente dos genes *MAL61-MAL62* (Lundin *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1995), o que indica que Mig1 é capaz de reprimir não só a transcrição do gene regulador *MAL63*, mas também a dos genes estruturais *MAL61* e *MAL62* (Hu *et al.*, 1995).

Wang *et al.* (1997) estudaram *in vivo* o efeito de Mig1 na regulação do gene *MAL62* em presença de diferentes fontes de carbono, tendo observado que na repressão por glucose se encontram envolvidos dois mecanismos distintos, embora relacionados: por um lado, a existência duma modulação da capacidade de ligação de Mig1 em função da fonte de carbono e, por outro lado, a competição directa entre Mig1 e Mal63p na ligação ao DNA, devida à proximidade entre os dois locais de reconhecimento na região do promotor do gene *MAL62*. Estes resultados estão de acordo com observações anteriores de que, em mutantes que expressam o gene regulador *MAL63* constitutivamente, a eliminação do local de reconhecimento de Mig1 apenas alivia parcialmente a repressão por glucose (Wang e Needleman, 1996). A modulação da capacidade de ligação de Mig1 ao DNA não está relacionada com variações da quantidade total de proteína (Wang *et al.*, 1997), mas sim com a sua localização dentro da célula. A adição de glucose faz com que a proteína seja rapidamente transportada para o núcleo, enquanto que, após a remoção da glucose, esta retorna novamente ao citoplasma (De Vit *et al.*, 1997). A translocação de Mig1 do núcleo para o citoplasma é regulada pela sua fosforilação, catalisada pela cinase Snf1 (De Vit *et al.*, 1997; Ostling e Ronne, 1998; Treitel *et al.*, 1998) e mediada pela proteína Msn5 (De Vit e Johnston, 1999).

A repressão por glucose não depende, porém, apenas de Mig1, dado que estirpes *mig1Δ* não se encontram completamente desreprimidas (Hu *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1996). Este efeito não é devido a uma acção residual da proteína homóloga Mig2 nem a outros mecanismos pós-transcricionais, e levou Hu *et al.* (2000) a proporem a existência dum outro mecanismo de repressão por glucose independente de Mig1.

A regulação por glucose do metabolismo da maltose não é efectuada apenas ao nível da transcrição, mas depende também de mecanismos pós-transcricionais que influenciam a estabilidade dos mRNA, das proteínas e a inactivação das enzimas associadas ao metabolismo da maltose. Esta ideia é apoiada pelo trabalho de Klein *et al.* (1997) que verificaram que o controlo por glucose está mais aliviado em mutantes *Amig1* do que em mutantes *MAL^c*. A explicação apresentada para estas observações reside no facto da sobreexpressão dos genes *MAL* provocar um grande aumento dos níveis de mRNA destes genes, o que permitirá contrariar numa forma mais geral os efeitos induzidos pela glucose, enquanto que a disrupção do gene *MIG1* apenas contraria a acção da glucose ao nível da transcrição.

O efeito da glucose no aumento da taxa de degradação de alguns mRNAs não tem sido estudado com a mesma atenção que outros mecanismos de regulação, tais como a repressão ou a inactivação catabólica. Porém, existem evidências que demonstram que a degradação do mRNA da maltase é estimulada em presença de glucose (Federoff *et al.*, 1983).

A glucose é também responsável pela inactivação catabólica do transportador de maltose (Gorts, 1969; Lagunas *et al.*, 1982; Busturia e Lagunas, 1985). Esta degradação é devida à proteólise do transportador (Lucero *et al.*, 1993) que tem lugar no vacúolo após a sua internalização por endocitose (Riballo *et al.*, 1995; Medintz *et al.*, 1996). Esta degradação é, segundo estes autores, independente do proteossoma. A endocitose da maltose permease depende da via da ubiquitina (Lucero e Lagunas, 1997; Medintz *et al.*, 1998), sendo a mono-ubiquitinização suficiente para desencadear o processo de internalização (Lucero *et al.*, 2000). Relativamente ao papel desempenhado pelo citosqueleto no processo de endocitose, Penalver *et al.* (1997) demonstraram que este depende, em parte, dos microfilamentos de actina, mas é independente dos microtúbulos. Este processo é, contudo, inibido por concentrações moderadas de etanol (2 a 6% v/v) que impede o funcionamento do mecanismo de internalização do transportador por endocitose (Lucero *et al.*, 1997).

O trabalho efectuado por Medintz *et al.* (1996) demonstrou que, na inactivação induzida por glucose, estão envolvidas não uma mas duas vias de sinalização distintas. A primeira depende de Rgt2p como sensor da glucose extracelular e induz a degradação da proteína transportadora de maltose. A segunda via de sinalização depende do transporte de glucose

e provoca a degradação da proteína transportadora, assim como uma perda de actividade do transportador da maltose muito mais rápida do que o que seria de esperar tendo em conta apenas a degradação proteolítica (Jiang *et al.*, 1997; 2000a). Esta última observação foi explicada através dum mecanismo de fosforilação da permease induzido por glucose que reduz rapidamente a capacidade do transportador (Brondijk *et al.*, 1998). Nesta segunda via de transdução de sinal estão envolvidas as subunidades regulatórias Reg1p e Reg2p da fosfatase de proteínas tipo 1 (Glc7p-Reg1 e Glc7p-Reg2), embora apenas Glc7-Reg1 seja capaz de provocar a inactivação da maltose permease (Jiang *et al.*, 2000b).

A forma como é desencadeada esta segunda via de inactivação catabólica é ainda motivo de controvérsia. Embora inicialmente tenha sido proposto que o transporte de hexoses através dos transportadores codificados pelos genes *HXT* seria necessário para activar a segunda via de sinalização (Jiang *et al.*, 1997; 2000a), posteriormente verificou-se que o transporte de glucose através do transportador da galactose, ou até o transporte de vários outros açúcares fermentáveis tais como a frutose, a galactose e a própria maltose, podem desencadear este mecanismo (Penalver *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2000a). Estas observações, tal como é proposto por Penalver *et al.* (1998), podem ser explicadas pelo facto destes estudos serem normalmente efectuados na ausência duma fonte de azoto. Assim, nestas condições, a inactivação da maltose permease, tal como a de outras proteínas de membrana, observada em células em repouso poderá ser devida ao aumento da taxa de degradação das proteínas em geral. Este aumento será provocado pela ausência de azoto no meio e incapacidade de fornecer à célula os aminoácidos de que esta necessita para sintetizar proteínas, e não devido a um mecanismo de controlo específico destinado a garantir a utilização preferencial de glucose.

Vários estudos confirmam que a maltose e a 2-deoxiglucose são capazes de provocar a inactivação catabólica do transportador de maltose. A inactivação é desencadeada não pelo próprio açúcar mas sim por um dos intermediários das primeiras etapas da glicólise, possivelmente a trealose ou a trealose-6-fosfato (Brondijk *et al.*, 2001).

A produção de mutantes com alterações nos domínios citoplasmáticos C e N-terminal da maltose permease permitiu identificar uma sequência do tipo PEST (rica em prolina, glutamato, aspartato serina e treonina) na região N-terminal, entre os aminoácidos 49 e 78, essencial para activar a degradação da proteína transportadora e consequente inactivação da maltose permease. Relativamente ao domínio C-terminal, não foram

encontrados indícios do seu envolvimento em nenhuma destas vias de sinalização (Medintz *et al.*, 2000).

Para além dos mecanismos acima descritos, encontram-se também referenciadas alterações da afinidade do transportador induzidas por glucose. Segundo alguns autores, esta redução da afinidade teria um carácter irreversível (Gorts, 1969), embora segundo outros o fenómeno fosse reversível (Peinado e Loureiro-Dias, 1986). Contudo, estudos posteriores não permitiram observar qualquer alteração na afinidade do transportador (Medintz *et al.*, 1996), pelo que a questão permanece em aberto.

A proteína cinase Snf1 desempenha também, aparentemente, um papel importante na regulação pós-transcricional da maltose permease. Esta conclusão é baseada no facto de, em condições de desrepressão, mutantes *snf1Δ mig1Δ* apresentarem uma capacidade de transporte reduzida quando comparados com estirpes em que o gene *SNF1* se encontra intacto, embora o nível de mRNA do gene *MAL61* seja idêntico nos dois mutantes (Hu *et al.*, 2000).

Apesar da existência de todos estes mecanismos regulatórios, vários autores referem que *S. cerevisiae* tem alguma dificuldade em lidar com mudanças súbitas na concentração extracelular de maltose. Segundo Postma *et al.* (1990), a adição dum excesso de maltose a uma cultura aeróbia num quimiostato com maltose como substrato limitante provoca a libertação de glucose para o meio extracelular associada a uma morte celular induzida por maltose. Estudos posteriores revelaram que o efluxo de glucose observado é mediado pelos transportadores de glucose (Hxt) e não devido à lise celular ou à hidrólise extracelular da maltose (Jansen *et al.*, 2002). A libertação de glucose quando as células são colocadas num meio com maltose foi também observada em mutantes deficientes nas vias de repressão catabólica (Entian e Loureiro-Dias, 1990).

1.3 Objectivos do trabalho e plano da dissertação

As fontes de carbono e energia preferidas pela maior parte das leveduras são hexoses, nomeadamente glucose, frutose e manose. A sua entrada para o interior da célula constitui o primeiro passo do seu metabolismo e, pelo menos em certas condições, parece exercer um elevado nível de controlo sobre o fluxo glicolítico. Pela sua importância biotecnológica, o transporte de hexoses em *S. cerevisiae* e a sua regulação têm sido alvo

de inúmeros estudos (para uma revisão sobre o tema, ver Boles e Hollenberg, 1997; Özcan e Johnston, 1999; Rolland *et al.*, 2002). Embora, actualmente, os transportadores de hexoses em *S. cerevisiae* se encontrem bem identificados e caracterizados do ponto de vista bioquímico e genético, persistem ainda algumas dúvidas sobre a função de alguns destes transportadores e a sua regulação. Este trabalho teve como objectivo esclarecer alguns aspectos da regulação do transporte de hexoses em *S. cerevisiae* e noutra espécie que lhe é muito próxima (*S. bayanus*), bem como as suas possíveis implicações fisiológicas.

Estudos preliminares com uma estirpe de *S. bayanus* (PYCC 4565) revelaram que, ao contrário do que é habitualmente considerado, a maltose regula o transporte de glucose e de duas formas distintas. Por um lado, é um inibidor competitivo do transporte de glucose (Diderich *et al.*, 1999b) e, por outro lado, actua como repressor, impedindo que a glucose seja transportada em células que são cultivadas num meio com maltose como única fonte de carbono e energia (Anjos, 1996). Na primeira parte deste trabalho (Capítulo 2) procedeu-se a uma caracterização fisiológica e bioquímica destes mecanismos regulatórios. Com o objectivo de compreender as bases moleculares do fenómeno de repressão observado, foi também efectuada uma análise comparativa entre *S. bayanus* e *S. cerevisiae* no que respeita aos genes (*HXT*) que codificam os transportadores de hexoses. Esta análise permitiu a identificação, em *S. bayanus*, de vários genes com um elevado grau de homologia com os correspondentes genes em *S. cerevisiae*. Em seguida, foram desenvolvidas sondas específicas para os vários genes identificados a fim de avaliar o efeito da maltose na regulação da transcrição dos genes *HXT*.

Na presença de glucose, a levedura *S. cerevisiae* reprime, ao nível da transcrição, a expressão dum elevado número de genes, nomeadamente os que se encontram envolvidos na utilização de fontes de carbono alternativas e vários genes gluconeogénicos e da via respiratória (Gancedo, 1998; Rolland *et al.*, 2002). A principal via de transdução de sinal envolvida na regulação destes genes designa-se por via geral de repressão por glucose e tem o repressor da transcrição Mig1 como um componente central (Treitel e Carlson, 1995). Dado que mutantes que apresentam um disrupção no gene *MIG1* e/ou expressam os genes *MAL* de forma constitutiva não só se encontram parcialmente desreprimidos mas também crescem mais rapidamente em glucose (Klein *et al.*, 1997), procurámos (Capítulo 3) elucidar por que razão estes mutantes apresentam esta última alteração de fenótipo.

Para tal, procedeu-se a uma análise comparativa da capacidade fermentativa e respiratória em glucose e em maltose. Foi, em seguida, estudada a influência das mutações no transporte de glucose e de maltose. Visto que a proteína Mig1 regula a transcrição de alguns dos genes associados a transportadores de glucose através da sua ligação à região promotora desses genes (Özcan e Johnston, 1995), foram também avaliados os níveis de transcrição de genes *HXT* nos mutantes e na estirpe selvagem cultivados em glucose.

O Capítulo 4 descreve a avaliação dos custos energéticos derivados do funcionamento dum transporte activo de frutose em *S. bayanus* PYCC 4565. Na presença dum metabolismo estritamente fermentativo, o consumo de hexoses produz um rendimento energético de 2 ATP/mol hexose. Porém, no caso da maltose este rendimento é apenas de 1,5 ATP/mol hexose. Esta diferença resulta da maltose ser co-transportada com um protão, o que consome o equivalente a um ATP por molécula de maltose transportada (Weusthuis *et al.*, 1993). Em *S. bayanus*, o transporte de frutose para o interior da célula utiliza, em simultâneo, um mecanismo de difusão facilitada, capaz de transportar também glucose e manose, e um simporte com protão específico para frutose (Rodrigues de Sousa *et al.*, 1995). Dado que o simporte requer energia para poder operar, é previsível que num meio em que a frutose seja a única fonte de carbono e energia o rendimento em ATP seja mais baixo do que se for usada glucose. Estes requisitos energéticos levam a um aumento da fracção de açúcar que é dissimilado e, conseqüentemente, a um aumento da produtividade específica em etanol. Para testar esta hipótese, *S. bayanus* PYCC 4565 foi cultivada num quimiostato em anaerobiose a várias taxas de diluição usando como nutriente limitante frutose ou glucose.

O gene *FSY1* isolado da estirpe-tipo de *Saccharomyces carlsbergensis* (PYCC 4457) codifica um transportador específico para frutose do tipo simporte com protão. Transformantes do mutante *hxt-null* de *S. cerevisiae* com este gene recuperam a capacidade de crescer em frutose, mas não em glucose, e apresentam um simporte frutose/H⁺ (Gonçalves *et al.*, 2000). No Capítulo 5 é descrita a reconstrução do sistema de transporte activo de frutose em vesículas híbridas de membrana plasmática, utilizando um mutante *hxt-null* de *S. cerevisiae* com o gene *FSY1* num plasmídeo de elevado número de cópias. As membranas plasmáticas contendo Fsy1p, isoladas a partir de células cultivadas em meio com frutose, foram fundidas com lipossomas contendo citocromo c oxidase, que permite gerar a força protomotriz necessária ao funcionamento do transporte activo. Foi

possível, então, proceder a uma caracterização deste transporte sem interferência do metabolismo.

No Capítulo 6 são feitas considerações de carácter global sobre os resultados obtidos no decurso deste trabalho. Por fim, são apresentadas algumas perspectivas de trabalho futuro no âmbito do tema desta dissertação.

**Capítulo 2:
Efeitos da maltose no
transporte de glucose**

2.1 Introdução

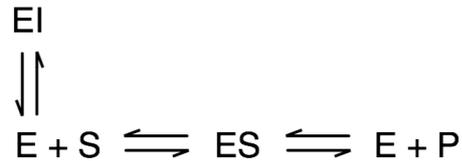
Em *Saccharomyces cerevisiae*, tal como na generalidade dos organismos que conseguem utilizar vários compostos como única fonte de carbono e energia, a glucose é utilizada preferencialmente na presença de outros substratos. Isto deriva dum processo de regulação complexo, designado por repressão catabólica, que faz com que as enzimas necessárias à utilização de outros açúcares e à gluconeogénese se encontrem reprimidas sempre que a glucose está presente no meio de cultura (Gancedo, 1998).

O transporte de glucose em *S. cerevisiae* e espécies muito próximas é geralmente considerado constitutivo, embora haja variações da expressão das proteínas transportadoras presentes na membrana com as condições de crescimento (ver 1.1.4). Porém, no decurso de estudos anteriores verificámos que, quando cultivadas em meio mineral com maltose, algumas estirpes apresentavam uma capacidade muito reduzida de transporte de glucose (Anjos e Spencer-Martins, 1994; Anjos, 1996). Neste trabalho procurámos aprofundar este fenómeno e identificar os mecanismos moleculares que estão na sua origem.

Neste estudo procurámos também averiguar se a maltose inibe a actividade dos transportadores de glucose em leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto*, uma vez que se sabe que o sistema de transporte de glucose em leveduras do género *Saccharomyces* é pouco específico e é capaz de transportar vários tipos de hexoses, entre as quais se encontram a D-glucose, a D-frutose, a D-manose e um conjunto de outros açúcares não metabolizáveis: 2-desoxiglucose, 6-desoxiglucose, glucosamina e D-xilose (Cirillo, 1962; Heredia *et al.*, 1968). Contudo, estes trabalhos não referem a possibilidade da maltose ou outros dissacáridos de glucose poderem impedir a entrada de glucose, tal como acontece em outros organismos.

Tanto em eritrócitos humanos (Bowyer, 1957; Lacko e Burger, 1962) como em células de fígado de rato (Ibu e Short, 1986), a maltose funciona como um inibidor competitivo do transporte de glucose. Segundo Curruthers e Helgerson (1991), a maltose, embora não sendo transportada para o interior da célula, liga-se ao transportador no mesmo local da glucose, bloqueando o influxo desta para o interior da célula.

Uma inibição competitiva resulta da inespecificidade do centro activo em relação ao substrato. Esta falta de especificidade permite a ligação de outros compostos, normalmente com afinidades estruturais com o substrato, que vão dificultar o acesso do substrato à enzima. Este mecanismo pode ser representado pelo seguinte esquema:



A cinética deste tipo de inibição pode ser descrita pela seguinte equação:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S} \quad (2.1)$$

em que V representa a velocidade de transporte para a concentração S de substrato, V_{\max} a velocidade máxima de transporte, K_m a constante de Michaelis (semi-saturação) para o substrato, I é a concentração de inibidor e K_i a constante de inibição. Esta equação também pode ser escrita sob a forma duma equação do tipo Michaelis-Menten:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_m^{\text{ap}} + S} \quad (2.2)$$

na qual K_m^{ap} representa uma constante aparente para o substrato:

$$K_m^{\text{ap}} = K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \quad (2.3)$$

No mesmo contexto, tentámos avaliar se a inibição seria provocada exclusivamente pela maltose ou também poderia ser causada por outros dissacáridos de glucose. Questionámos também se essa característica seria específica de determinadas estirpes ou ocorreria duma forma geral em leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto*.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Estirpes

Os estudos sobre os efeitos da maltose no transporte de glucose foram efectuados usando a levedura *Saccharomyces bayanus* PYCC 4465. Para efeitos comparativos, foram também utilizadas as estirpes *S. cerevisiae* PYCC 5297 e *S. bayanus* PYCC 4569.

2.2.2 Meio e condições de cultura

O meio de cultura usado foi o meio mineral I (Apêndice I), suplementado com 2 % p/v de glucose, maltose ou sacarose.

As leveduras foram cultivadas em balões Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio, incubados num agitador orbital a 250 rpm e à temperatura de 25°C. As células foram recolhidas na fase exponencial ($DO_{640\text{ nm}}$ entre 0,5 e 0,6) ou no início da fase estacionária de crescimento. Nas culturas efectuadas em meio mineral com glucose, o início da fase estacionária foi determinada seguindo o consumo da glucose presente no meio de cultura. Para este efeito, a glucose foi doseada com o *kit* GOD-Pedrid (Boehringer Mannheim), de acordo com as instruções do fabricante.

Nos ensaios em que foram efectuadas transferências de células entre meios de cultura com diferentes fontes de carbono e energia (glucose para maltose, ou vice-versa), as células foram recolhidas na fase exponencial de crescimento ($DO_{640\text{ nm}}$ entre 0,5 e 0,6), centrifugadas a 25°C, lavadas com água desmineralizada à temperatura ambiente e ressuspensas no novo meio de cultura na concentração desejada. Estas manipulações foram sempre efectuadas em condições de assépsia.

2.2.3 Doseamento de glucose e maltose no meio de cultura

A quantificação de glucose e maltose no meio de cultura, em ensaios relativos à capacidade de transporte de glucose ao longo da curva de crescimento em maltose e ao consumo simultâneo de glucose e maltose, foi efectuada por HPLC usando uma coluna Polyspher OA KC (Merck) a 40°C. A coluna foi eluída com uma solução de ácido sulfúrico (0,0085 N), utilizando um detector de índice de refacção LKB 2142 ligado a um registador integrador Waters 740.

2.2.4 Suspensões celulares e determinação da biomassa

As células, recolhidas nas condições descritas em 2.2.2, foram centrifugadas (4°C) e lavadas duas vezes com água desmineralizada fria. Em seguida, foram ressuspensas em água desmineralizada de modo a obter uma concentração de biomassa (peso seco – ps) de, aproximadamente, 30 mg ps/mL.

A quantificação da biomassa seca foi efectuada colocando 200 μ l da suspensão celular final num pequeno quadrado de papel de alumínio previamente pesado, incubado numa estufa a 70°C durante pelo menos 24 h (período de tempo necessário para atingir peso constante) e novamente pesado. Os valores obtidos foram usados para calcular o peso seco da biomassa.

2.2.5 Transporte de ¹⁴C-glucose

Num tubo de plástico com 5 ml de capacidade, foram adicionados 20 μ L da suspensão celular e 20 μ L de tampão Tris-citrato, pH 5,0. O tubo foi incubado a 25°C durante cerca de 5 min. Na parede do tubo, junto ao fundo, foram colocados 10 μ L duma solução aquosa de glucose radioactiva (D-[U-¹⁴C]-glucose, Amersham, UK) na concentração desejada e com uma actividade específica apropriada (AE \approx 600 cpm/nmol para concentrações > 20 mM e AE \approx 8000 cpm/nmol para concentrações \leq 20 mM). A reacção foi iniciada misturando a suspensão de células com o açúcar radioactivo num agitador tipo *Vortex*. Após 5 s, a reacção foi interrompida com a adição de 2 ml de água desmineralizada fria (4°C) e procedeu-se rapidamente à filtração do conteúdo total do tubo, sob vácuo, através duma membrana Whatman GF/C previamente humedecida. A membrana foi imediatamente lavada com 2 ml de água desmineralizada fria e colocada num frasco com 2 ml de líquido de cintilação (OptiPhase “HiSafe 2”, Wallac, Finlândia). A quantidade de glucose radioactiva incorporada foi avaliada utilizando um contador de cintilações (Packard Instrument Co. Inc., USA). Todos os ensaios foram realizados em duplicado e a adsorção inespecífica de glucose radioactiva às membranas de filtração ou à parede das células foi quantificada usando uma suspensão celular processada da mesma maneira mas sem ter sido misturada previamente com o açúcar radioactivo por agitação (tempo de reacção: 0 s).

Os ensaios de inibição do transporte de glucose radioactiva por outros açúcares (maltose, celobiose, trealose e isomaltose) foram efectuados com base no protocolo acima descrito,

com algumas alterações. O tampão Tris-citrato foi substituído por uma solução, no mesmo tampão, do inibidor em estudo e na concentração desejada. A 20 μL desta solução foram adicionados 10 μL duma solução aquosa de glucose radioactiva a cada uma das concentrações testadas. Vinte microlitros da suspensão celular, previamente incubados a 25°C durante 5 min, foram colocados na parede do tubo e a reacção de incorporação foi iniciada misturando a suspensão de células com os açúcares num agitador tipo *Vortex*.

A determinação dos parâmetros cinéticos do transporte foi efectuada por regressão não-linear, usando como modelo a equação de Michaelis-Menten (equação 1.1). Todos os cálculos foram efectuados com o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.), tendo sido utilizado uma ponderação em função de $1/y^2$.

2.2.6 Identificação dos genes *HXT* em *S. bayanus*

A pesquisa dos genes correspondentes aos transportadores de hexoses *HXT1-7* em *S. bayanus* foi realizada através de amplificação por PCR usando DNA total de *S. bayanus* PYCC 4565 como molde e *primers* específicos para cada um destes genes, desenhados com base nas sequências dos genes homólogos existentes em *S. cerevisiae*.

Para este efeito, foi efectuado um alinhamento das sequências nucleotídicas de todos os genes *HXT* de *S. cerevisiae* usando o programa DNASIS™ v3.7 (Hitachi Software Engineering). Com base neste alinhamento, foi identificada uma região com elevada variabilidade correspondente aos primeiros 200 bp da extremidade 5' destes genes, seguida duma região muito conservada. Esta análise permitiu o desenho dum *primer* directo, específico para cada um dos genes *HXT1-5* e um *primer* inverso comum (*CON*) a todos os genes *HXT*. Devido ao elevado grau de homologia que apresentam, não foi possível desenhar *primers* específicos que permitissem diferenciar os genes *HXT6* e *HXT7*, pelo que foi construído um único *primer* para estes dois genes. As sequências dos *primers* usados estão indicadas na Tabela 2.1.

O programa de amplificação por PCR consistiu num passo inicial de desnaturação a 95°C durante 4 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 55°C e 40 s a 72°C, com um passo de extensão final a 72°C durante 5 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose 2% p/v e purificados com o *kit* QIAEX II (QIAGEN) de acordo com as indicações do fabricante.

Os fragmentos obtidos foram clonados em *Escherichia coli* (DH5 α) usando o *kit* pGEM®-T *vector systems* (Promega) de acordo com as indicações do fabricante.

Tabela 2.1 Sequências dos *primers* específicos para os genes *HXT*

Gene	Sequências	Sentido
<i>HXT1</i>	5'-CCTCAGAAATCCAATTCATCC	Directo
	5'-ACCTTTTCCGGTGTTTGGAG	Inverso
<i>HXT2</i>	5'-AATTCGCTACTAGCCGCGTT	Directo
	5'-GAAAGTGGCTCTCAACAAANN	Directo
	5'-TCTGAATTCGCTACTAGCCNN	Directo
<i>HXT3</i>	5'-CTCCACAAAAGTCAAGTGAGA	Directo
	5'-CTAAGTAACCCAAACACAGG	Inverso
<i>HXT4</i>	5'-TCTGAAGAAGCTGCCTATCA	Directo
	5'-GTGATTCTCGTCGAAATCT	Inverso
<i>HXT5</i>	5'-GAAGGGTCTGCTACTGTGAGT	Directo
	5'-AGGACCGCCATGGGAAGAGTA	Inverso
<i>HXT6/7</i>	5'-ATGTCACAAGACGCTGCTAT	Directo
	5'-TCGTGCTCTTCACCTTCACC	Inverso
CON*	5'-CCAGAAATGGTACCAGTATCCA	Inverso

* Sequência de consenso comum a todos os genes *HXT*.

Para cada um dos fragmentos clonados, foram sequenciadas as duas cadeias de DNA complementares. A reacção de sequenciação foi efectuada usando o *kit Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences) e nucleótidos marcados com o fluorocromo Cy5 (Amersham Biosciences). Como DNA molde foram usados os fragmentos dos genes *HXT* inseridos no plasmídeo PGEM-T e os *primers* T7 e SP6, que correspondem a sequências presentes, próximo do local de inserção, no vector de clonagem usado. Os produtos das reacções de sequenciação foram analisados num sequenciador automático ALF Express II (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Para obter as sequências dos fragmentos clonados, as sequências nucleotídicas das duas cadeias complementares de DNA foram alinhadas entre si utilizando o programa *Alfwin analyser* (Amersham Biosciences).

2.2.7 Expressão dos genes *HXT*

Isolamento do RNA total

Para o isolamento do RNA total, as células foram cultivadas tal como indicado em 2.2.2. Quando as células atingiram a densidade óptica pretendida, foi recolhida uma amostra da cultura que foi imediatamente congelada em azoto líquido e posteriormente mantida a - 80°C até ao momento em que foi efectuada a extracção do RNA total. Cada amostra foi descongelada lentamente à temperatura ambiente, centrifugada durante 3 min (13.000 rpm, 4°C) para remover o meio de cultura, lavada com água desmineralizada (4°C) e novamente centrifugada. O sedimento obtido foi ressuscitado em 0,5 mL de tampão de lise (LiCl 0,1 M; LiDS 0,5%; EDTA 10 mM; pH 7,5) e transferido para um tubo Eppendorf de 2,2 mL com 0,5 g de esferas de vidro (0,43-0,60 mm diâmetro). A suspensão foi em seguida homogeneizada num agitador tipo *Vortex* à velocidade máxima durante 4 × 30 s, tendo o tubo sido mantido em gelo durante períodos intercalares de 1 min. A suspensão final foi, então, misturada com 400 µl de fenol (saturado com TE; 0,1% hidroxiquinolina; pH 8) e centrifugada (5 min, 13.000 rpm). A fase aquosa foi transferida para um tubo Eppendorf limpo e a extracção fenólica repetida duas vezes. À fase aquosa foi, então, adicionado um volume idêntico de clorofórmio, o tubo foi agitado e em seguida centrifugado durante 1 min (13.000 rpm). A fase aquosa foi novamente transferida para um tubo Eppendorf limpo, ao qual foi adicionado 1/10 volume de Acetato de sódio (3 M) e 2,5 volumes de etanol absoluto (arrefecido a -20°C). O tubo foi mantido durante 1 h a

-20°C para precipitar o RNA. A suspensão correspondente a cada amostra foi, então, centrifugada durante 15 min (13.000 rpm), o sedimento obtido foi lavado com uma solução 70% (v/v) de etanol e deixado a secar à temperatura ambiente. O RNA precipitado foi dissolvido em 30-50 µl de água desmineralizada.

Preparação de sondas específicas

Sondas de DNA específicas para os genes *HXT1* a *HXT6/7* de *S. bayanus* foram concebidas a partir do alinhamento dos fragmentos sequenciados, tal como descrito em 2.2.6. Com base nesta análise, foram definidas sequências mais pequenas (cerca de 150 bp) correspondentes a uma região menos conservada entre os vários genes *HXT*, que foram seleccionadas para serem usadas como sondas. De forma a avaliar a sua especificidade e a minimizar qualquer possibilidade de hibridação não específica, cada uma das sequências escolhidas foi então comparada com o genoma completo de *S. cerevisiae* disponível em *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>) usando o algoritmo BLAST.

As sondas foram obtidas através de amplificação por PCR, usando como molde DNA total de *S. bayanus* PYCC 4565 e os *primers* específicos (directo e inverso) indicados na Tabela 2.1. O programa de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 95°C durante 4 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 54°C e 40 s a 72°C, com um passo de extensão final a 72°C durante 5 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados num gel de agarose 2% p/v e purificados com o *kit* QIAEX II (QIAGEN) de acordo com as indicações do fabricante.

Análise por *Northern blot*

Para a análise dos níveis de expressão dos genes *HXT1* a *HXT6/7*, foi preparado um gel de agarose (1,2 % p/v) em tampão NBC (0,05 M ácido bórico; 1 mM citrato de sódio; 5 mM NaOH; pH 7,5) com formaldeído (0,925 % v/v). Em cada poço foram colocados 10 µg de RNA total de levedura, previamente desnaturado a 65°C durante 5 min numa mistura de tampão NBC, formaldeído 5 % (v/v) e formamida 50 % (v/v). O gel foi, então, colocado numa tina de electroforese com tampão NBC e submetido a uma diferença de potencial de 80 V durante 90 min.

O RNA foi, então, transferido por capilaridade do gel para uma membrana de *nylon* (Hybond-N, Amersham) com tampão SSC 20x (NaCl, 175,3 g/L; citrato de sódio, 82,2 g/L; pH 7,0) e fixado à membrana por acção de radiação UV.

As sondas específicas para os genes *HXT* foram marcadas com [α -³²P]ATP pelo método dos *primers* de sequência aleatória usando o *kit Prime-a-Gene* (Promega), e purificadas numa coluna de Sephadex G50. A especificidade das sondas foi analisada por *Southern blot*, tendo sido verificado que não existia hibridação cruzada entre os vários fragmentos (ver 3.3.4).

As membranas contendo as amostras de RNA foram pré-hibridadas durante 2 h a 65°C com uma solução de hibridação (SDS 7%; Na₂HPO₄ 0,5 M; EDTA 1mM; pH 7,2). A hibridação foi efectuada durante a noite, a 65°C, em 10 mL de solução de hibridação aos quais foi adicionada a sonda marcada (previamente desnaturada durante 5 min a 90°C). As membranas foram, então, lavadas durante alguns segundos, à temperatura ambiente, com uma solução de lavagem (SSC 2x, SDS 0,1 %) e, posteriormente, durante 5 a 10 min a 65°C.

As membranas assim tratadas foram usadas para impressionar uma chapa de autorradiografia (Sterling Diagnostic Imaging Inc), na presença dum ecrã intensificador, a -80°C. Os tempos de exposição variaram entre 24 e 48 h, para otimizar os sinais de hibridação.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Efeito da maltose na cinética de transporte de glucose

Para esclarecer qual o efeito da maltose nos componentes do sistema de transporte de glucose em leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto*, foram efectuados ensaios de transporte de ^{14}C -glucose, na ausência e na presença de maltose, em células de *S. bayanus* PYCC 4565 recolhidas a meio da fase exponencial ou no início da fase estacionária de crescimento. Os resultados mostram que a maltose inibe competitivamente tanto o componente de baixa afinidade (Figura 2.1) como o componente de alta afinidade (Figura 2.2) do transporte de glucose. As constantes de Michaelis (K_m e K_m^{ap}) calculadas para o transporte de glucose permitem, com base na equação 2.3, estimar o valor da contante de inibição por maltose (K_i). Os valores de K_i estimados por este processo (Tabela 2.2), tanto para a componente de alta afinidade como para a componente de baixa afinidade, são cerca de 10 vezes superiores ao respectivo valor de K_m para a glucose.

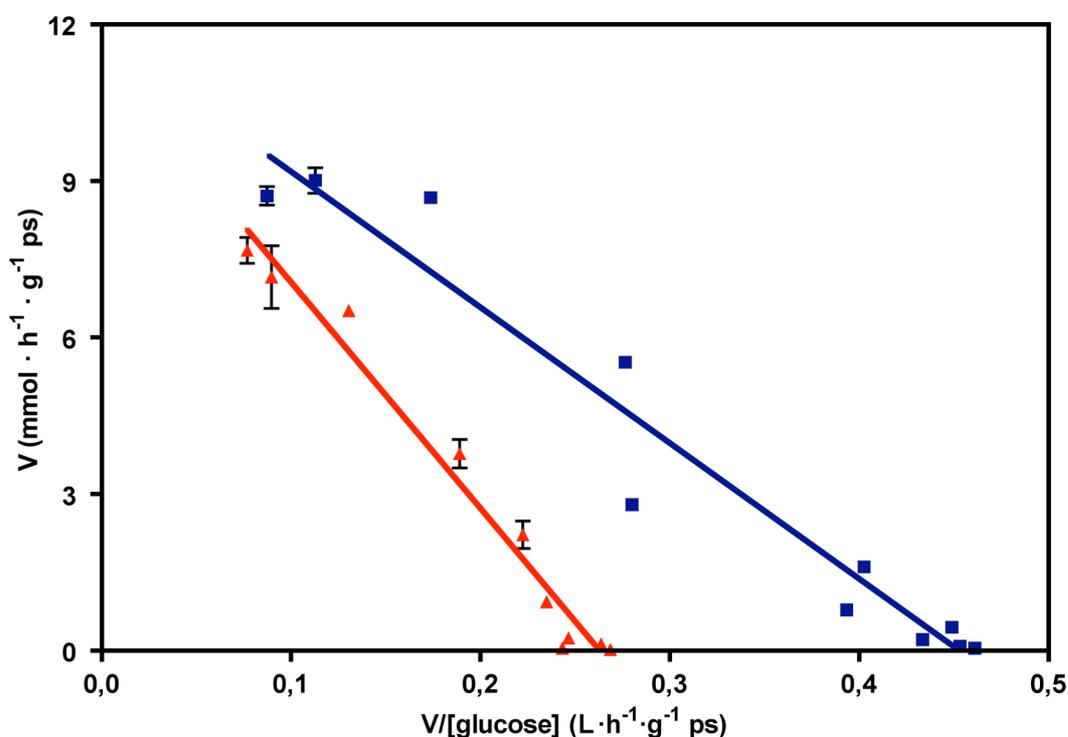


Figura 2.1 Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -glucose (pH 5; 25°C) em células de *S. bayanus* PYCC 4565 recolhidas na fase exponencial de crescimento. Ensaios efectuados na ausência (■) e na presença de 200 mM de maltose (▲).

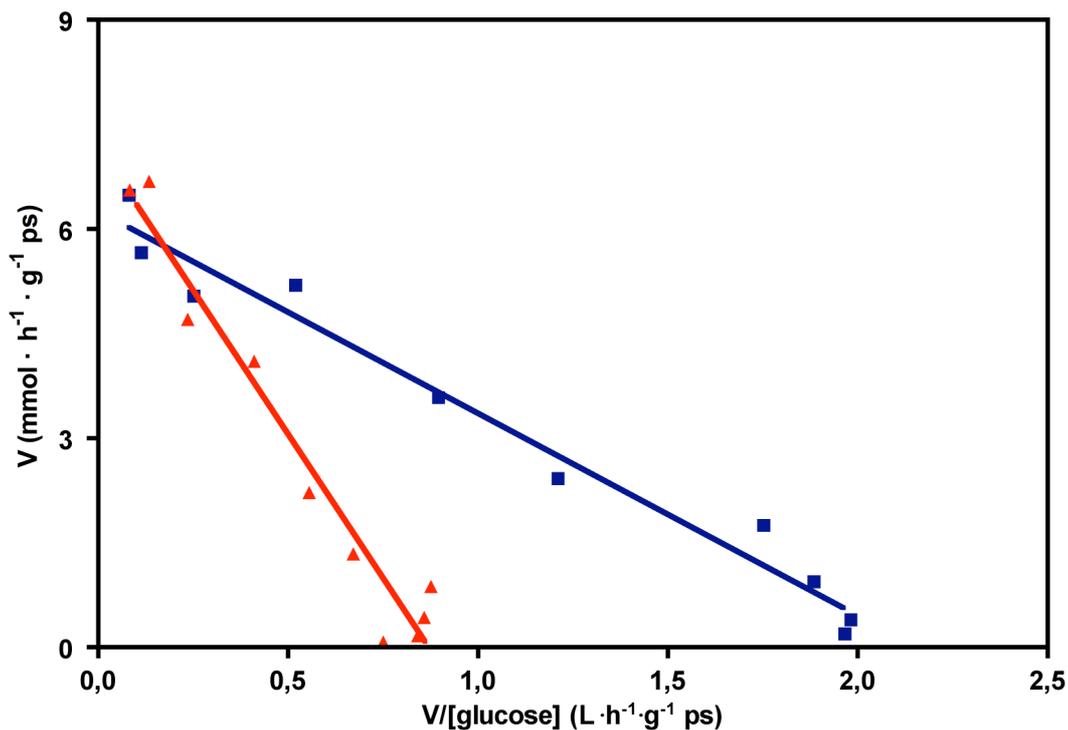


Figura 2.2 Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -glucose (pH 5; 25°C) em células de *S. bayanus* PYCC 4565 recolhidas na fase estacionária de crescimento. Ensaio efectuado na ausência (■) e na presença de 50 mM de maltose (▲).

Tabela 2.2 Efeito da maltose nos parâmetros cinéticos do transporte de ^{14}C -glucose em *S. bayanus* PYCC 4565

	Parâmetros cinéticos ^a	Fase exponencial	Fase estacionária
Sem inibidor	V_{\max} ($\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ps)	$11,8 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,2$
	K_m (mM)	$26,5 \pm 1,5$	$2,9 \pm 0,2$
Com maltose ^b	V_{\max} ($\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ps)	$11,3 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,3$
	K_m^{ap} (mM)	$43,8 \pm 2,6$	$8,7 \pm 0,6$
	K_i (mM)	307	25

^a Ensaio efectuado a pH 5 e 25°C . As células foram recolhidas em fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento em meio mineral com 2 % p/v de glucose.

^b Concentração de maltose: células em fase exponencial – 200 mM; fase estacionária – 50 mM.

Uma vez que o tipo de inibição por maltose do sistema de transporte de glucose em *S. bayanus* PYCC 4565 é idêntico ao descrito para eritrócitos humanos (Carruthers e Helgerson, 1991), parece-nos razoável supor que o mecanismo seja semelhante nos dois casos.

A fim de averiguar se este tipo de inibição ocorreria também com outros dímeros de glucose, foram efectuados ensaios de transporte de ^{14}C -glucose na presença de 50 mM de celobiose (β -1,4 glu-glu), trealose (α -1,1 glu-glu) e isomaltose (α -1,6 glu-glu), em células de *S. bayanus* PYCC 4565 recolhidas no início da fase estacionária. Os resultados obtidos são ilustrados com a celobiose (Figura 2.3), tendo sido observados resultados semelhantes com trealose e isomaltose. Estes três dissacáridos não são, na concentração usada, capazes de inibir significativamente o transporte de glucose. A ausência duma inibição sugere que a geometria do dímero de glucose condiciona fortemente a sua capacidade de ligação ao

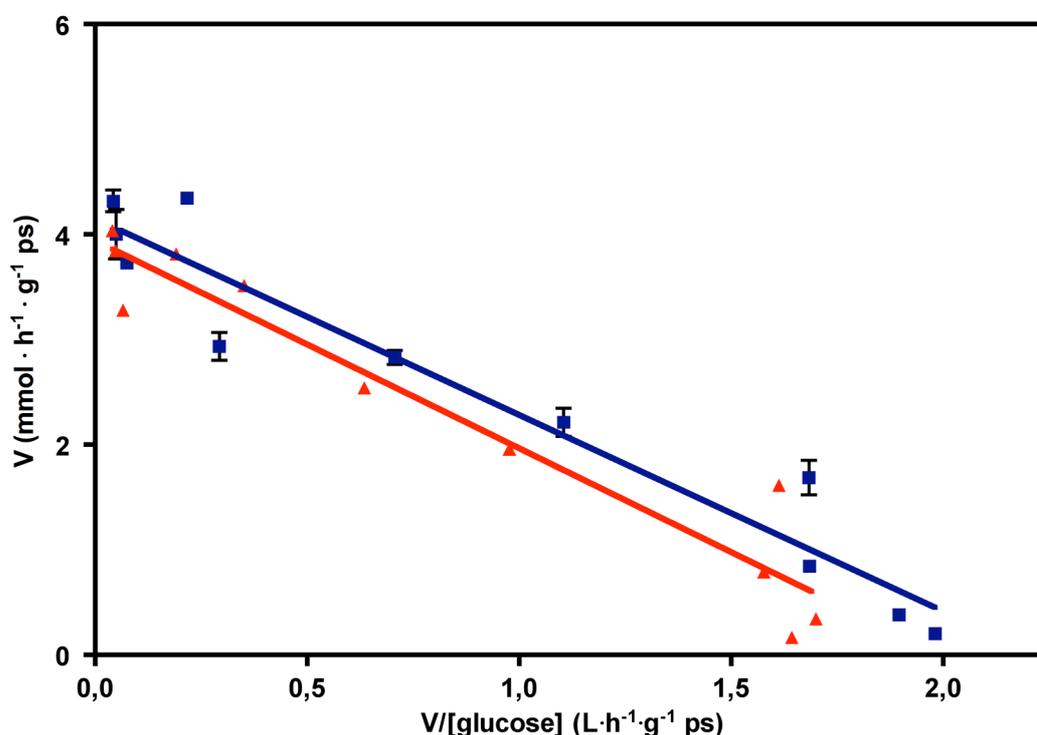


Figura 2.3 Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -glucose (pH 5; 25°C) em células de *S. bayanus* PYCC 4565 recolhidas na fase estacionária de crescimento. Ensaios efectuados na ausência (■) e na presença de 50 mM de celobiose (▲).

transportador e que apenas a maltose (α -1,4 glu-glu) apresenta uma conformação favorável para se ligar ao transportador de forma a inibir eficazmente a entrada de glucose.

A inibição do transporte de glucose por maltose não é uma característica exclusiva desta estirpe (*S. bayanus* PYCC 4565), dado que foi observado um efeito semelhante em estirpes de *S. cerevisiae*, nomeadamente PYCC 5297 (Figura 2.4) e CEN.PK 113-7D (Diderich *et al.*, 1999b). É de referir que os valores de K_m para o transporte de alta afinidade de glucose e de K_i da inibição por maltose foram, no caso de *S. cerevisiae* PYCC 5297, 1,1 mM e 23,7 mM, respectivamente. Com base nos resultados obtidos, parece provável que a maltose seja, numa forma geral, um inibidor do transporte de glucose em leveduras do género *Saccharomyces* e, possivelmente, em outras leveduras.

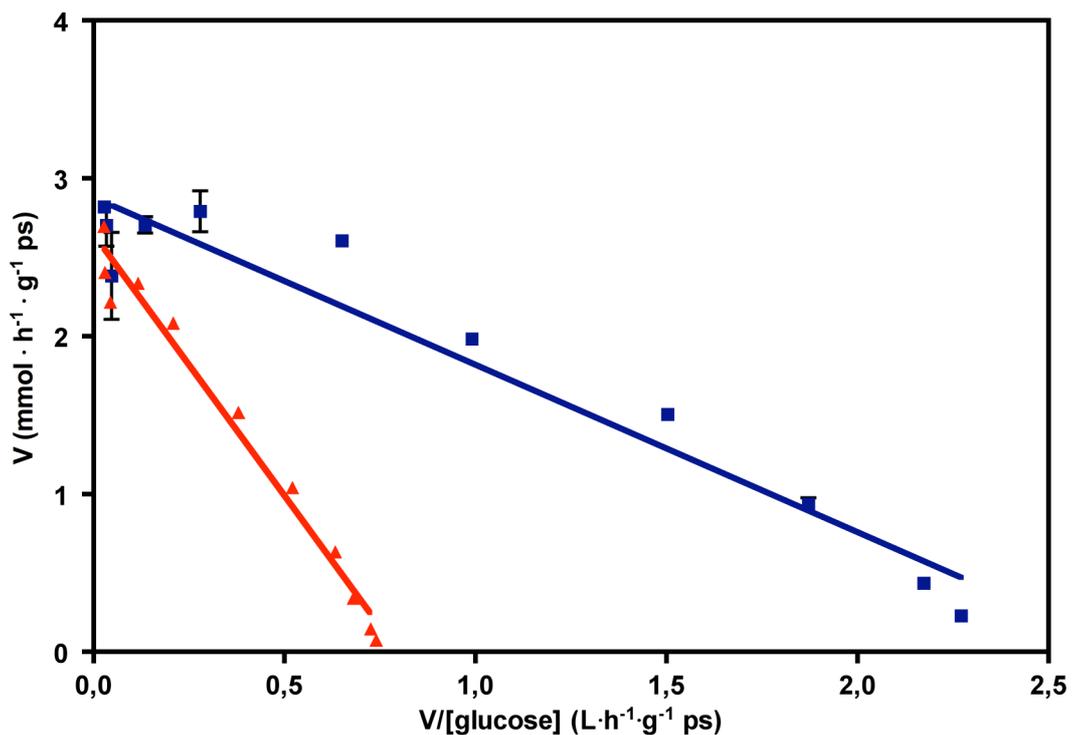


Figura 2.4 Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -glucose (pH 5; 25°C) em células de *S. cerevisiae* PYCC 5297 recolhidas na fase estacionária de crescimento. Ensaio efectuado na ausência (■) e na presença de 50 mM de maltose (▲).

Devido ao efeito de repressão catabólica dos genes *MAL* pela glucose (Gancedo, 1992; Lagunas, 1993), em misturas de glucose e maltose a glucose é consumida antes da maltose. Uma vez que a maltose inibe o transporte de glucose e que este é um passo que pode limitar o fluxo glicolítico, é de esperar que se verifique uma pequena diminuição na taxa de consumo de glucose quando as células são cultivadas numa mistura de glucose e maltose, face a células cultivadas apenas na presença de glucose. Esta redução deverá ser mais notória à medida que baixa a concentração de glucose no meio, uma vez que a afinidade do transportador para glucose aumenta e a concentração de maltose mantém-se.

2.3.2 Influência da maltose na regulação do transporte de glucose

Efeito na capacidade de transporte de glucose

Quando cultivadas em meio mineral com maltose, algumas estirpes de *S. cerevisiae* e *S. bayanus* apresentaram uma redução na capacidade de transporte de glucose. O grau de redução observado variou entre as estirpes testadas, sendo máximo no caso de *S. bayanus* PYCC 4565 para a qual não foi detectado qualquer transporte de glucose durante o crescimento em meio com maltose (Anjos e Spencer-Martins, 1994; Anjos, 1996). Por este motivo, esta estirpe foi seleccionada para, neste trabalho, caracterizar o fenómeno anteriormente descrito.

Ao transferirmos uma cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em fase exponencial num meio mineral com maltose para um meio com glucose (Figura 2.5), verificámos que as células rapidamente (1 h) atingem a capacidade máxima de transporte de glucose.

Uma alteração efectuada em sentido contrário (transferência de meio com glucose para meio com maltose) revelou que, na presença de maltose, a capacidade de transporte de glucose diminui ao longo do tempo, sendo esta redução proporcional ao aumento da biomassa. Num ensaio semelhante realizado com a adição de cicloheximida (50 ppm) ao meio com maltose, a fim de inibir a síntese proteica, a capacidade de transporte de glucose manteve-se constante, assim como a biomassa (Figura 2.6).

Foi também avaliada a capacidade de transporte de glucose ao longo duma curva de crescimento em meio mineral com maltose (Figura 2.7). O facto das células se apresentarem praticamente sem capacidade para transportar glucose logo no instante inicial é explicada pelo inóculo ter sido preparado no mesmo meio de cultura (fase

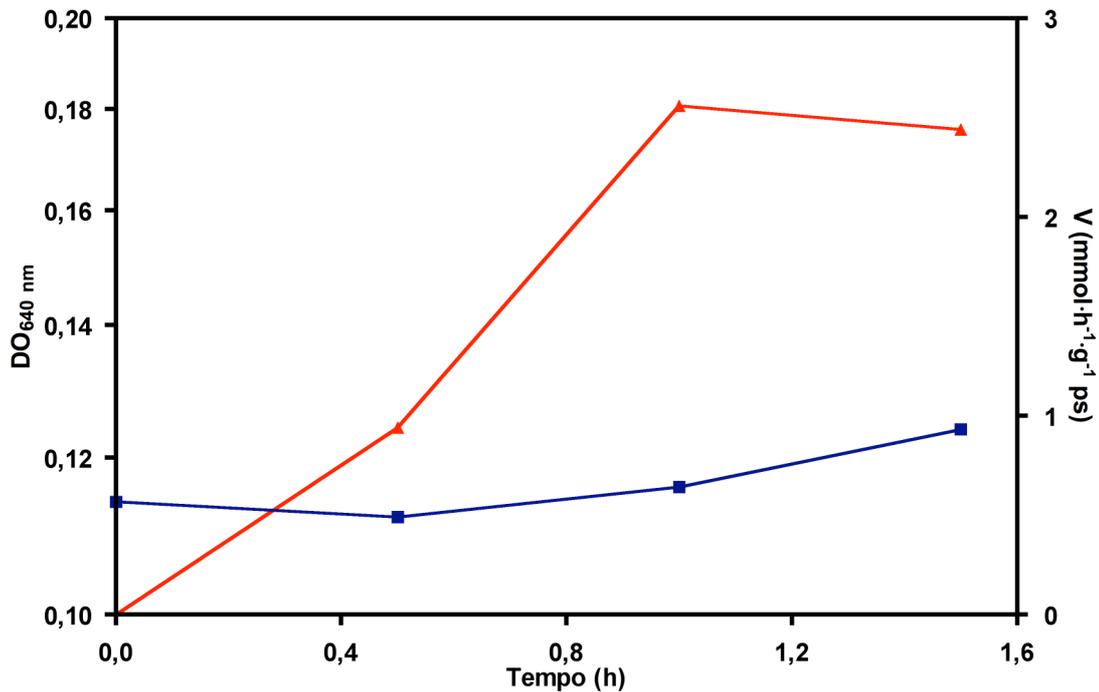


Figura 2.5 Variação da velocidade de transporte de glucose (pH 5; 25°C; [¹⁴C-glucose] = 20 mM) em *S. bayanus* PYCC 4565 após transferência de meio mineral com 2% p/v maltose para meio com 2% p/v glucose. Símbolos: DO_{640 nm} (■) velocidade de transporte de glucose (▲).

exponencial de crescimento). Até a maltose ser completamente consumida a capacidade de transporte de glucose permanece muito baixa ($< 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1} \text{ ps}$). A partir do momento em que já não existe maltose no meio, observou-se que as células recuperam a capacidade para transportar glucose, mesmo na ausência de glucose no meio de cultura. Contudo, esta recuperação não ocorre se for inibida a síntese proteica através da adição de cicloheximida.

Estes resultados sugerem que, na ausência de glucose, a maltose actua como um inibidor da expressão dos genes *HXT*, uma vez que: *i*) a recuperação da capacidade de transporte de glucose, após o consumo da maltose, depende da síntese proteica (Figura 2.7), o que indica que deverá ocorrer a síntese de novos transportadores; *ii*) não existe, aparentemente, um mecanismo de inactivação do(s) transportador(es) de glucose quando as células são colocadas na presença de maltose, uma vez que a perda de capacidade de transporte é devida a um efeito de diluição resultante do aumento da biomassa (Figura 2.6).

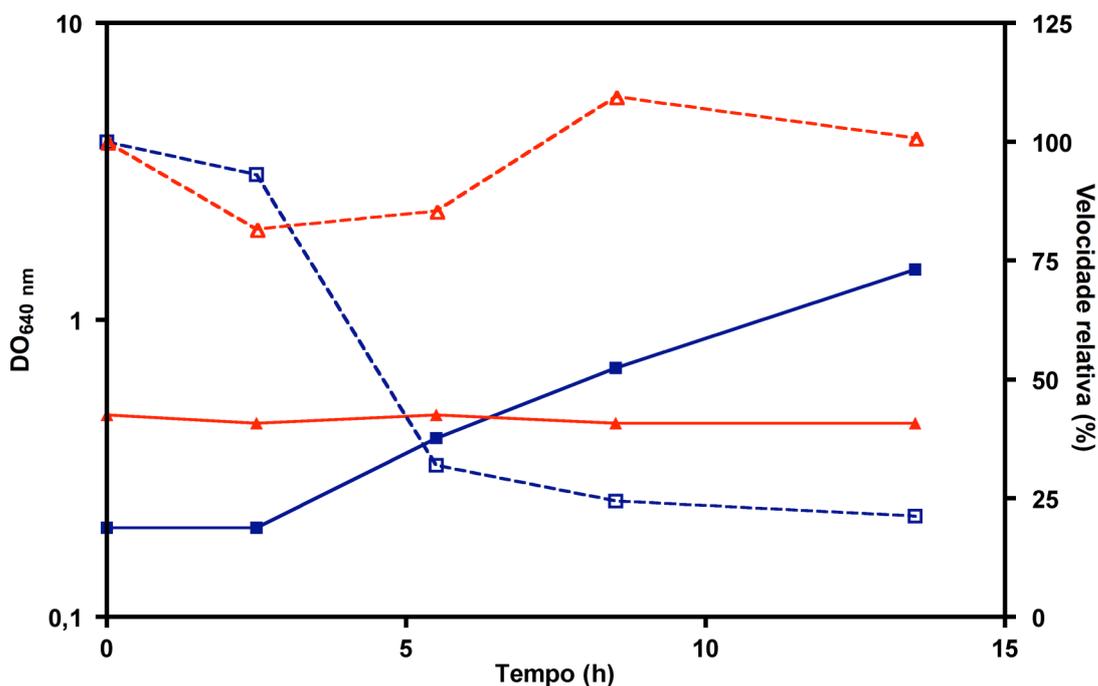


Figura 2.6 Variação da velocidade relativa de transporte de glucose (pH 5; 25°C; [¹⁴C-glucose] = 20 mM) em *S. bayanus* PYCC 4565 após transferência de meio com glucose para meio com maltose (símbolos azuis) ou maltose na presença de 50 ppm de cicloheximida. Símbolos: DO_{640 nm} (■, ▲) velocidade de transporte de glucose (□, △).

As observações também indicam que a expressão do(s) transportador(es) de glucose nesta estirpe não depende(m) da presença de indutor (glucose) no meio de cultura, pois desde que o repressor (maltose) esteja ausente as células apresentam níveis normais de transporte de glucose (Figura 2.7).

Para avaliar se este fenómeno ocorreria mesmo na presença de glucose e com uma concentração relativamente elevada de maltose, *S. bayanus* PYCC 4565 foi cultivada em meio mineral com uma mistura de 0,5 % p/v de glucose e 1,5 % p/v de maltose. A experiência foi efectuada em paralelo, usando como inóculo células cultivadas em meio com glucose (Figura 2.8A) ou com maltose (Figura 2.8B). Em qualquer dos casos, a glucose foi sempre consumida antes da maltose, o que indica que a repressão do transporte de glucose por maltose só ocorre se a glucose não estiver presente no meio de cultura.

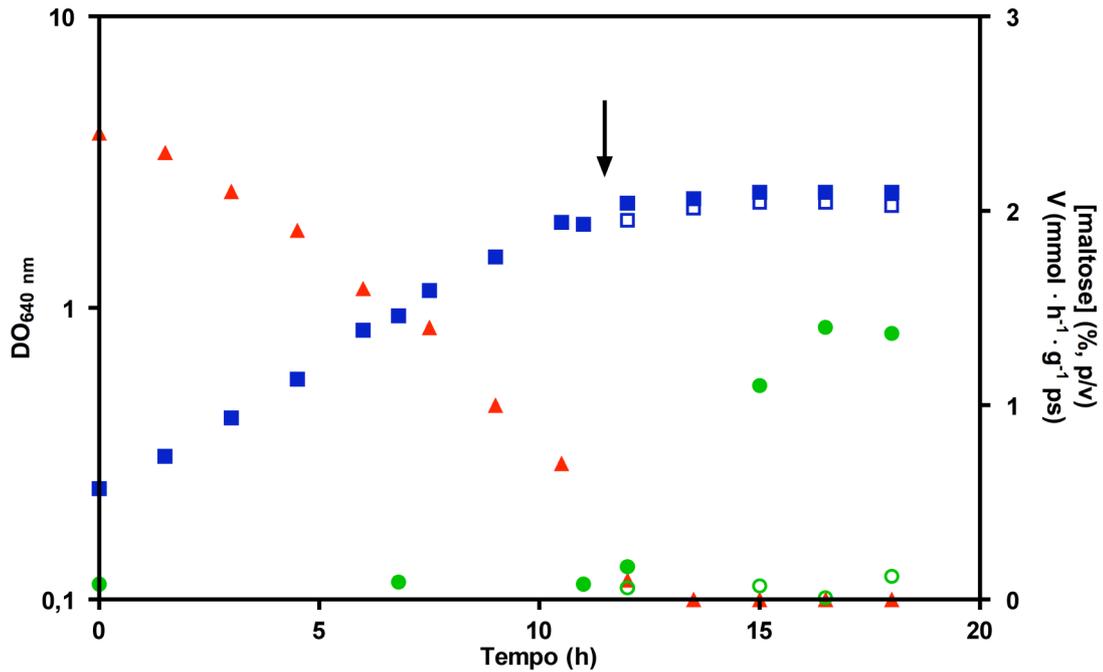


Figura 2.7 Variação da velocidade de transporte de glicose (pH 5; 25°C; [¹⁴C-glicose] = 20 mM) em *S. bayanus* PYCC 4565 durante o crescimento em meio com maltose. Símbolos: $DO_{640\text{ nm}}$ (■, □), concentração de maltose (▲), velocidade de transporte de glicose (●, ○). Os símbolos abertos representam os resultados após a adição de 50 ppm de cicloheximida, indicada pela seta.

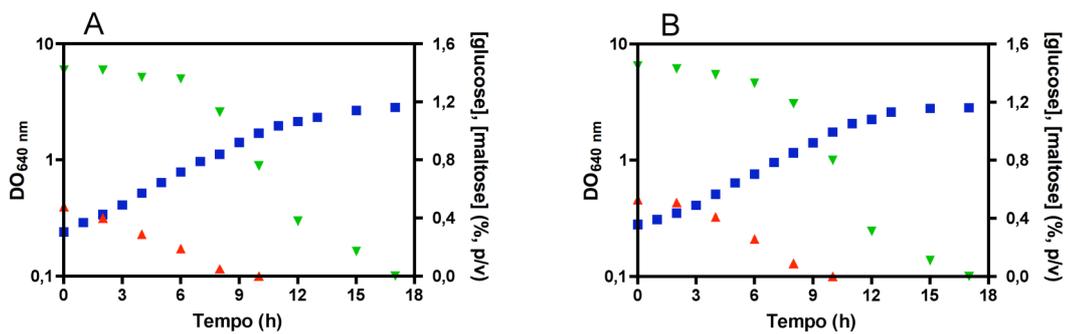


Figura 2.8 Curvas de crescimento de *S. bayanus* PYCC 4565 em meio mineral com uma mistura de 1,5 % p/v maltose e 0,5 % p/v glicose. O inóculo foi preparado em meio com glicose (A) ou maltose (B). Símbolos: $DO_{640\text{ nm}}$ (■), concentração de glicose (▲) e concentração de maltose (▼).

Transportadores Hxt em *Saccharomyces bayanus* PYCC 4565

Dado que na altura em que este trabalho foi iniciado não se encontravam ainda identificados quaisquer genes associados a transportadores de glucose em *S. bayanus*, foi necessário proceder à sua identificação antes de podermos caracterizar o efeito da maltose na regulação da sua transcrição.

Considerando a enorme semelhança entre as espécies *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, começámos por investigar se *S. bayanus* também possuiria genes homologos aos dos transportadores de hexoses (*HXT*) de *S. cerevisiae*. Essa investigação foi efectuada por PCR, tendo para esse efeito sido desenhados *primers* directos específicos para cada um dos genes *HXT* envolvidos no transporte de glucose (*HXT1-7*) e um *primer* inverso comum a todos os genes *HXT* (ver 2.2.6). As reacções de amplificação com os *primers* específicos para os genes *HXT1*, *HXT3*, *HXT4* e *HXT6/7*, utilizando como molde o DNA total de *S. bayanus* PYCC 4565, produziram apenas um único fragmento de DNA. No caso da reacção com um *primer* específico para o gene *HXT5* foram amplificados dois fragmentos de DNA de dimensões muito semelhantes (Figura 2.9). Todos os fragmentos de DNA obtidos apresentavam dimensões próximas do valor esperado (250 a 300 bp).

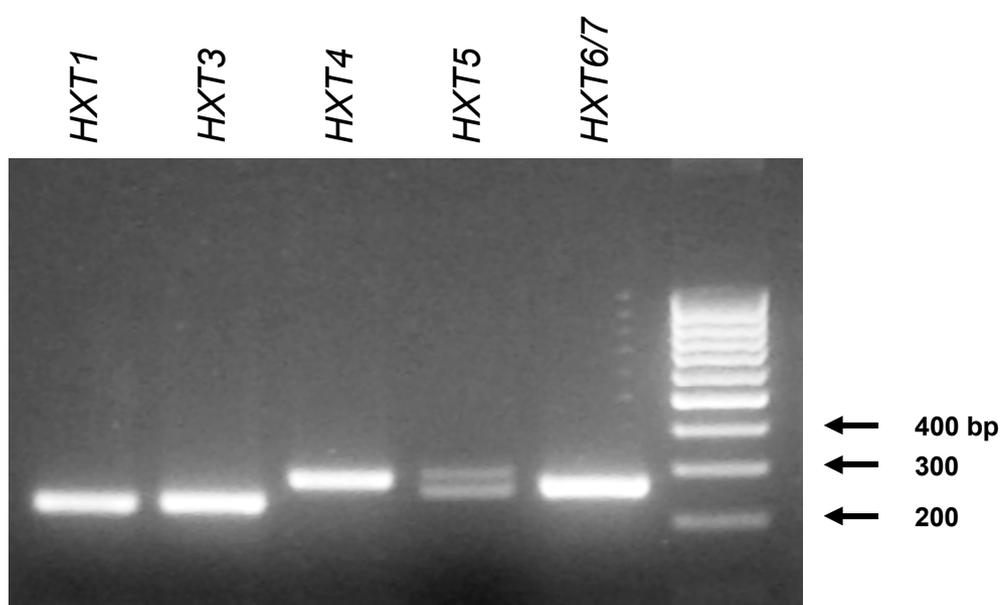


Figura 2.9 Produtos de amplificação por PCR, a partir do DNA total de *S. bayanus* PYCC 4565, usando *primers* específicos para os diferentes genes *HXT*.

Embora tenham sido testados vários *primers* específicos para o gene *HXT2* (Tabela 2.1), não nos foi possível visualizar qualquer fragmento de DNA correspondente a este gene. Este resultado sugere que o genoma de *S. bayanus* PYCC 4565 não possui este gene ou, em alternativa, que na estirpe estudada o gene *HXT2*, na região usada para construir os *primers*, tem uma sequência de bases significativamente diferente da que é conhecida para este gene em *S. cerevisiae*.

Os fragmentos amplificados foram clonados em *E. coli* e sequenciados (ver 2.2.7). As sequências de DNA obtidas encontram-se na Tabela 2.3. A fim de avaliar se os fragmentos de DNA obtidos correspondiam, efectivamente, a sequências parciais dos genes que codificam transportadores de hexoses de *S. bayanus*, cada uma das sequências foi traduzida numa cadeia de aminoácidos e, posteriormente, comparada com a sequência de aminoácidos disponível na internet (<http://www.yeastgenome.org/>) para o transportador homólogo de glucose de *S. cerevisiae* (Cherry *et al.*, 1997). Uma vez que, actualmente, o genoma de *S. bayanus* já se encontra quase completamente sequenciado (Cliften *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2003), foi efectuada uma análise comparativa entre as sequências obtidas por nós e as sequências de aminoácidos inferidas para os transportadores Hxt nesta levedura. O resultado dos alinhamentos efectuados encontra-se no Apêndice II.

A nível da sequência das cadeias peptídicas, o grau de homologia entre os fragmentos obtidos e os respectivos transportadores de glucose é muito elevado ($\geq 86\%$), como se pode ver na Tabela 2.4. Como seria de esperar, para qualquer dos fragmentos obtidos, o grau de homologia é maior quando a comparação é feita com a sequência de aminoácidos conhecida de *S. bayanus* do que com a de *S. cerevisiae*, uma vez que a levedura por nós estudada (PYCC 4565) é uma estirpe de *S. bayanus*. Quanto às pequenas diferenças encontradas entre as sequências dos fragmentos obtidas para alguns dos transportadores Hxt e as sequências publicadas (Cliften *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2003) é possível que resultem do facto de terem sido analisadas estirpes diferentes. Um aspecto em que *S. bayanus* PYCC 4565 parece diferir das estirpes de *S. cerevisiae* e *S. bayanus* sequenciadas por outros reside na aparente presença de duas cópias do gene *HXT5* com tamanhos diferentes na estirpe investigada neste trabalho. Esta conclusão resulta da comparação entre as sequências de aminoácidos correspondentes aos dois fragmentos de DNA obtidos na reacção de PCR em que foi usado um *primer* específico para o gene

HXT5. O fragmento menor apresenta uma deleção correspondente a 12 aminoácidos quando comparado com o fragmento mais longo ou com as sequências conhecidas deste gene em *S. bayanus* ou *S. cerevisiae*.

Tabela 2.3 Sequências dos fragmentos de DNA amplificados a partir do DNA total de *S. bayanus* PYCC 4565 com *primers* específicos para os genes *HXT*

Gene	Sequências
<i>HXT1</i>	5' - CCTCAGAAAT CCAATTCATC CAATTCATAT GATTTGGAAT CTAAGGCTAT GAACGCCCCA GAAGGTAAAA ATGAAAGCTT TCACGACAAC TTAAGTGAAA GTCAAGCACA ACCTGCTGTC CCATCTCCAA AACTGGTAA AGGTGCTTAT GTTACCGTCT CCATCTGTTG TATTATGGTT GCCTTTGGTG GTTTCGTTTT CGGTTGGGAT ACTGGTACCA TTTCTGG
<i>HXT3</i>	5' - CTCCACAAAA GTCAAGTGAG AACTCTAATG CTGAGTTGCC TTCCAGTAGT TCACAGGTAA TGAACATGCC TGATGAAAAA GGTGTTCAAG ATGACTTCCA AGCTGAAGCC GACCAAATCC TAAGTAACCC AAACACAGGT AAAGGTGCTT ATGTCACCGT CTCCATCTGT TGTGTTATGG TTGCCTTTGG TGGTTTCGTT TTCGGTTGGG ATACTGGT
<i>HXT4</i>	5' - TCTGAAGAAG CTGCCTATCA AGAGGATACA GCCGTCCAAA ATACTCCAGC AGAAGGTTTG TCACCAAGTTG AATCTGACTC CAACTCAGCT TTATCTACTC CATCTAACAA AGCTGAAAGA GATGACTTGA AAGATTTTCA CGAGAACCAT GAAGAATCAA ACAATTATGT TGAGATTCCA AAAAAGCCAG CCTCCGCTTA CGTTACTGTC TCCATCATGT GTATCATGAT CGCCTTTGGT GGTTCGTTTT TCGGTTGGGA TACTGGTACC ATTTCTGG
<i>HXT5</i> (longo)	5' - GAAGGGTCTG CTA CTACTGTGAG TACGAATTCT AACTCTTATA ATGAGAAGTC AGGCAACTCT ACCGCACCGG GCGCCGCCCG TTACAACGAT GACTCGCCAC AGGTCAAACC TGTGTCAAGT TACTCTTCCC ATGGCGGTCC TCCCAAGGAT GAACTGGAAG AACTGCAAAG AGAAGCTGAC AACCAGTTGG AAACCAAATC CAAGTCGGAT CTGTTATTTCG TGTCATCTG CTGTTTGATG GTTGCTTTTTG GTGGGTTTCGT TTTTGGATGG GATACTGGTA CGATCTCTGG
<i>HXT5</i> (curto)	5' - GAAGGGTCTG CTA CTACTGTGAG TACGAACTCT AACTCTTATA ACGAGAAATC AGGCAACTCT ACCGCACCTG GCGCCGCCCG TTATAACGCT CCACATGGTG GTCTCCCAA GGACGAAC TGAGAGCTAC AAAGAGAAGC TAACAACCAG TTGGAAACCA AATCCAAGTC AGATTTGCTG TTCGTGTCCA TCTGCTGTTT AATGGTGGCT TTCGGTGGGT TCGTCTTTGG ATGGGATACT GGTACGATGT CTGG
<i>HXT6/7</i>	5' - ATGTCACAAG ACGCTGCTAT TGCAGAGAAT ACTCCTGTGG AGCATCTCTC TCCAGTTGAC TCGGCATCCA ACTCGATGCT ATCCACTCCC ACCAATAAGG CTGAAAGAGA TGAACATAAG GCCTACGGTG AAGATGAAGA CCAGGAGCCT ACCGTTGAAA TTCCAAAGAG ACCTGCCTCC GCCTACGTTA CTGTCTCTAT CATGTGTATC ATGATTGCTT TCGGTGGTTT CGTTTTCGGT TGGGATACTG GTAATCCCGC

Tabela 2.4 Análise comparativa das sequências de aminoácidos correspondentes aos fragmentos de DNA isolados de *S. bayanus* PYCC 4565 com as sequências publicadas para os transportadores respectivos em *S. cerevisiae* e *S. bayanus*

Transportador	Comprimento da cadeia	Homologia (%)	
		<i>S. cerevisiae</i> S288C	<i>S. bayanus</i> MCYC623
Hxt1	75 aa	89	100
Hxt3	72 aa	93	96
Hxt4	92 aa	93	100
Hxt5 (frag. longo)	96 aa	86	99
Hxt5 (frag. curto)	84 aa	87	93
Hxt6/7	86 aa	86	91

Estes resultados indicam que os fragmentos de DNA obtidos correspondem a sequências parciais dos genes *HXT* de *S. bayanus*, pelo que foram usados como base para o desenvolvimento das sondas de DNA (ver 2.2.7.2) aplicadas ao estudo do efeito da maltose na regulação da transcrição dos genes *HXT* em *S. bayanus* PYCC 4565.

Efeito da maltose na expressão dos genes *HXT*

Com o objectivo de avaliar a influência da maltose nos níveis de expressão dos vários genes *HXT*, procedeu-se ao isolamento do mRNA de células de *S. bayanus* PYCC 4565 cultivadas em meio mineral com glucose, maltose ou sacarose como única fonte de carbono e energia. No caso das culturas em meios com glucose ou maltose, foram recolhidas amostras em fase exponencial e em fase estacionária de crescimento. Em meio com sacarose apenas foi recolhida uma amostra de células durante a fase exponencial de crescimento. A quantificação dos níveis de mRNA correspondentes aos genes *HXT* foi efectuada por *Northern blot*. Para efeitos comparativos, foi também usada uma estirpe de *S. bayanus* (PYCC 4569) que apresenta uma capacidade de transporte de glucose semelhante quando cultivada em meio com glucose ou maltose (Anjos, 1996).

Ao compararmos os níveis de expressão dos vários genes *HXT* durante o crescimento em glucose (fase exponencial e fase estacionária), ou durante a fase estacionária em maltose,

podemos observar um padrão idêntico para as duas estirpes (Figura 2.10A). Contudo, durante a fase exponencial do crescimento em maltose não se observa expressão de qualquer dos genes *HXT* estudados para *S. bayanus* PYCC 4565, enquanto que na outra estirpe (PYCC 4569) o(s) gene(s) *HXT6/7* apresenta(m) um elevado nível de expressão. É também possível observar na Figura 2.10 que os níveis de expressão do(s) gene(s) *HXT6/7* durante a fase estacionária do crescimento, tanto em glucose como em maltose, são significativamente mais baixos na estirpe PYCC 4565 do que na estirpe PYCC 4569.

Durante a fase exponencial do crescimento em glucose, o principal gene expresso foi o *HXT3*, embora também seja possível observar alguma expressão do gene *HXT1*, mais forte em PYCC 4569 do que em PYCC 4565. Durante a fase estacionária do crescimento em glucose *HXT6/7* foi o(s) único(s) gene(s) expresso(s). Estes resultados estão de acordo com as características cinéticas do transporte de glucose observadas nestas condições (Figura 2.1 e Figura 2.2), uma vez que os genes *HXT1* e *HXT3* codificam transportadores de baixa afinidade e os genes *HXT6* e *HXT7* codificam transportadores de alta afinidade (Reifenberger *et al.*, 1997).

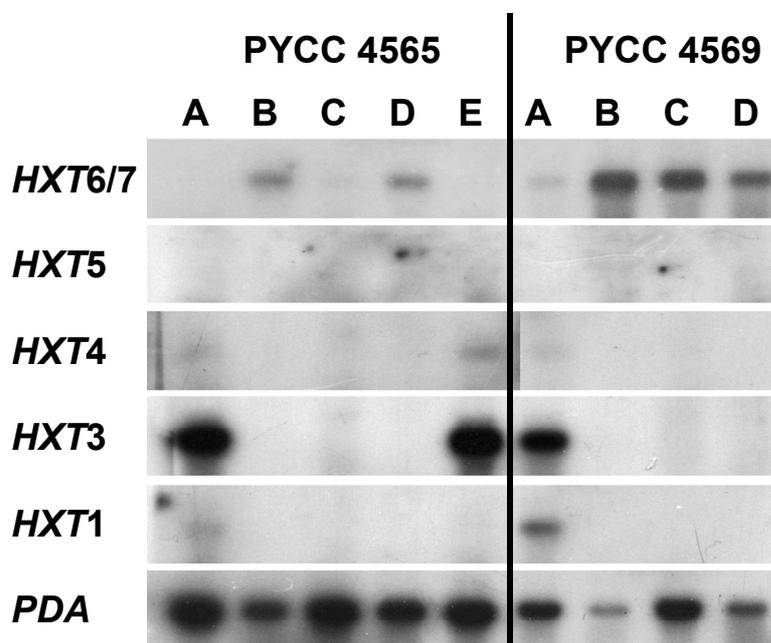


Figura 2.10 Análise por *Northern blot* dos níveis de expressão dos genes *HXT1* e *HXT3-7* nas estirpes de *S. bayanus* PYCC 4565 e PYCC 4569. As amostras foram recolhidas durante a fase exponencial (A) e fase estacionária (B) do crescimento em meio com glucose, fase exponencial (C) e fase estacionária (D) do crescimento em meio com maltose e fase exponencial do crescimento em meio com sacarose (E).

Duma forma geral, os resultados obtidos para qualquer das estirpes estudadas, durante o crescimento em glucose, são semelhantes ao padrão de expressão dos genes *HXT* em *S. cerevisiae* descritos na literatura (Diderich *et al.*, 1999a; Petit *et al.*, 2000).

Estes resultados mostram que, em *S. bayanus* PYCC 4565, a ausência de capacidade de transporte de glucose durante o crescimento em maltose se deve à maltose actuar como um inibidor da transcrição do(s) gene(s) *HXT6/7*. Para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes a esta regulação pela maltose serão necessários estudos mais aprofundados.

Segundo Jansen *et al.* (2002), na presença dum excesso de maltose e em condições de anaerobiose, ocorre em *S. cerevisiae*, um efluxo de glucose mediado por transportadores, que conduz a uma redução do rendimento em ATP. O fenómeno por nós observado poderá constituir um mecanismo de adaptação desenvolvido por algumas estirpes de leveduras do género *Saccharomyces* para impedir a saída de glucose durante a fermentação da maltose.

Capítulo 3:
**Caracterização do transporte
de glucose e maltose em
mutantes $\Delta mig1$ e MAL^c**

3.1 Introdução

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tal como a grande maioria dos microrganismos, dispõe de mecanismos de regulação que garantem uma utilização preferencial da glucose quando numa mistura de substratos. Um desses mecanismos consiste na repressão da transcrição de vários genes dispensáveis para o crescimento em glucose, mas essenciais para a utilização de outras fontes de carbono e energia alternativas, *e.g.* *SUC*, *GAL*, *MAL*, necessários para a utilização de sacarose, galactose e maltose, respectivamente (para uma revisão sobre este tema ver Gancedo, 1998; Carlson, 1999). Como já foi referido (ver 1.2.3), um dos componentes-chave deste mecanismo de repressão por glucose é a proteína Mig1.

Mig1 é uma proteína de dedos de zinco capaz de se ligar ao DNA e que impede a transcrição dos genes através do recrutamento dos repressores Ssn6 e Tup1 (Treitel e Carlson, 1995). A acção de Mig1 é regulada através da sua localização na célula: na ausência de glucose encontra-se localizada no citoplasma; a adição de glucose provoca a sua rápida translocação para o núcleo (De Vit *et al.*, 1997). A proteína cinase Snf1, na ausência de glucose, fosforila Mig1 o que leva a que esta seja translocada para fora do núcleo por acção de Msn5 (De Vit e Johnston, 1999).

A proteína Mig1 actua como um repressor dos genes *MAL* (Hu *et al.*, 1995) e reprime também a transcrição de muitos outros genes sujeitos a repressão por glucose (Klein *et al.*, 1998). Vários genes associados ao transporte de glucose (*HXT2*, *HXT3*, *HXT4* e *SNF3*) são também reprimidos por este açúcar devido à acção de Mig1 (Özcan e Johnston, 1995; 1996).

O metabolismo da maltose em *S. cerevisiae* é fundamental em processos industriais que se baseiam na fermentação de hidrolisados de amido. Nesta levedura, a desrepressão da utilização de maltose na presença de glucose deverá permitir o consumo simultâneo dos dois açúcares e, desta forma, reduzir o tempo de fermentação.

Na tentativa de obter estirpes com o metabolismo da maltose menos sujeito a repressão por glucose, Klein *et al.* (1996; 1997) produziram mutantes nos quais o gene *MIG1* se encontra interrompido e/ou os genes *MALT* e *MALS* são sobreexpressos. Observou-se em alguns destes mutantes o aumento das taxas específicas de crescimento em glucose e

maltose (Klein *et al.*, 1997). Decidimos investigar se esta observação estava relacionada com alterações nas velocidades de transporte de glucose e/ou maltose e se haveria uma desregulação da expressão dos genes correspondentes aos transportadores.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Estirpes

Os mutantes de *S. cerevisiae* usados neste trabalho foram construídos por Klein *et al.* (1996; 1997) a partir da estirpe industrial B224, com origem na empresa dinamarquesa Danisco Biotechnology. A disrupção do gene *MIG1* foi obtida através da inserção do gene *MEL1*. A expressão constitutiva dos genes *MAL* foi conseguida transformando as estirpes com um plasmídeo integrativo contendo o gene *MALT*, que codifica a maltose permease, sob controlo do promotor do gene *ADH* (álcool desidrogenase) e o gene *MALS*, codificante da maltase, sob controlo do promotor do gene *TEF* (factor de alongação da tradução) (Klein *et al.*, 1997). As estirpes usadas e os respectivos genótipos relevantes estão listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Genótipo relevante dos mutantes de *S. cerevisiae* estudados

Estirpe (Nº PYCC*)	Designação original [#]	Genótipo
5477	B224	<i>MIG1 MAL</i>
5478	T408	<i>Δmig1 MAL</i>
5479	T433	<i>Δmig1 MAL^c</i>
5480	T442	<i>MIG1 MAL^c</i>

*PYCC – Portuguese Yeast Culture Collection, FCT/UNL, Caparica, Portugal

[#] Klein *et al.* (1997)

3.2.2 Meio e condições de cultura

Como meio de cultura foi utilizado o meio mineral I (Apêndice I), suplementado com 2 % p/v de glucose ou maltose e aminoácidos (50 mg/L histidina e 100 mg/L uracilo).

As leveduras foram cultivadas em balões Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio, incubados num agitador orbital a 250 rpm e à temperatura de 25°C. As células foram recolhidas na fase exponencial de crescimento ($DO_{640\text{ nm}}$ entre 0,5 e 0,6).

3.2.3 Suspensões celulares e determinação da biomassa

As células, recolhidas nas condições descritas em 3.2.2, foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água desmineralizada fria. Para a determinação das taxas específicas de fermentação e respiração, as células foram ressuspensas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 4,5), de forma a obter uma concentração final de biomassa de aproximadamente 2 mg ps/mL. Para os ensaios de transporte de glucose e maltose, as células foram ressuspensas em água desmineralizada de modo a obter uma concentração de biomassa de aproximadamente 30 mg ps/mL.

A biomassa seca para os ensaios no aparelho de Warburg foi quantificada filtrando 10 mL da suspensão celular usada através duma membrana com 0,45 μm de diâmetro de poro (GN6-Metriciel, Gelman Sciences), previamente pesada. Para os ensaios de transporte, a biomassa foi determinada colocando 200 μl das suspensões celulares usadas em papel de alumínio previamente pesado. Em qualquer dos casos, procedeu-se à incubação numa estufa a 70°C durante pelo menos 24 h (período de tempo necessário para eliminar toda a água da amostra). Os valores obtidos após secagem foram usados para calcular a biomassa seca.

3.2.4 Determinação das taxas específicas de fermentação e respiração

O método manométrico de Warburg

O método de Warburg utiliza uma técnica manométrica baseada nas leis dos gases perfeitos e permite medir a produção ou consumo de gases em sistemas biológicos. O aparelho de Warburg utilizado neste trabalho (B. Braun Melsungen) é constituído por um manómetro ligado a um frasco (Figura 3.1A), o qual é imerso num banho a temperatura constante regulada por um termostato. Este sistema é agitado para promover uma troca constante e homogénea de gás entre a fase líquida e a fase gasosa, bem como uma saturação permanente em gás do líquido contido nos frascos.

Cada frasco está munido dum braço lateral e no compartimento principal tem um lóculo central destinado à solução utilizada para a absorção de gases. O manómetro ligado a cada frasco consiste num tubo em U com escalas graduadas nos dois ramos, ambos ligados a um reservatório de borracha que contém um líquido de densidade conhecida (foi utilizado o Líquido de Brodie). Este reservatório pode ser comprimido por uma mola que permite

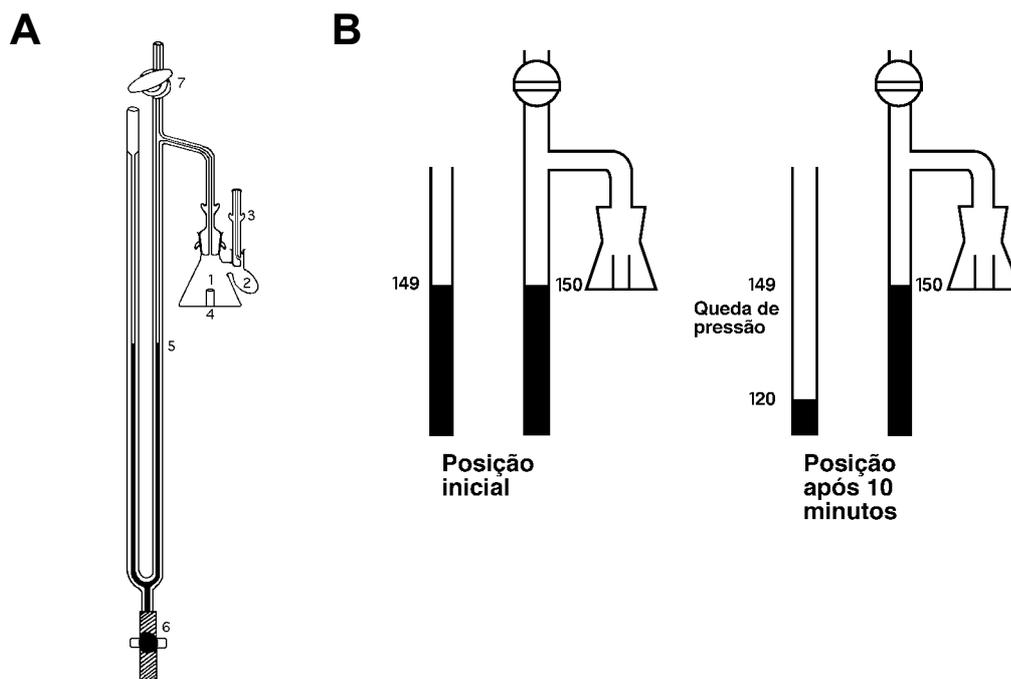


Figura 3.1 Representação esquemática dum manómetro do aparelho de Warburg. A: 1. lóculo central; 2. braço lateral; 3. ventilo; 4. frasco; 5. manómetro; 6. reservatório e mola; 7. torneira. B. Variação do nível do Líquido de Brodie no ramo aberto do manómetro, em condições em que se verifique um consumo de gases (adaptado de Umbreit *et al.*, 1964).

ajustar o nível do líquido no manómetro. Um dos ramos do manómetro está sempre aberto. O outro ramo, que comunica com o frasco, pode ou não estar em contacto com o exterior através duma torneira. Quando a torneira está aberta, a pressão nos dois ramos é idêntica e o líquido fica ao mesmo nível. Ao fechar a torneira, corta-se a comunicação com o exterior do ramo que comunica com o frasco. Quando no frasco há produção ou consumo de gás isso traduz-se numa variação de volume que faz alterar o nível do líquido no manómetro. A essência do método consiste em medir a variação de pressão que resulta do aumento ou diminuição da quantidade de gás, mantendo o seu volume contante. Esta produção ou consumo de gás pode ser medida pela diferença de nível do líquido nos dois ramos do manómetro.

Determinação da produção de CO_2 e consumo de O_2

O conteúdo dos frascos usados nos ensaios encontra-se descrito na Tabela 3.2. Como tampão foi utilizado fosfato de potássio 0,1 M pH 4,5. O frasco designado por termobarómetro é um controlo destinado a avaliar as alterações nas condições ambientais

(pressão atmosférica e temperatura). Nos frascos em que se pretendia avaliar apenas o consumo de O₂ utilizou-se KOH para absorver o CO₂ produzido. Todos os ensaios para determinar o consumo de O₂ e a produção de CO₂ foram realizados em duplicado.

Os frascos foram ligados aos respectivos manómetros de forma estanque (para tal foi usada uma camada de silicone uniformemente distribuída nas zonas esmeriladas) e imersos no banho (previamente ajustado a 25°C). Deixou-se equilibrar a temperatura, com agitação e as torneiras abertas, durante 10 minutos. Após este intervalo de tempo, o líquido de Brodie foi ajustado em ambos os ramos do manómetro a meio da escala e as torneiras foram fechadas.

Tabela 3.2 Conteúdo dos frascos de Warburg para a determinação das taxas específicas de fermentação e de respiração das leveduras estudadas

Frasco	Suspensão de células (ml)	Tampão fosfato (ml)	Glucose 0,3 M (ml)	KOH 20% p/v* (ml)
Termobarómetro	-	3,0	-	-
Consumo de O ₂	0,5	2,0	0,5	0,2
Produção de CO ₂	0,5	2,0	0,5	-

*Solução colocada no lóculo central, embebendo um harmónio de papel de filtro Whatman n°1.

Periodicamente, a cada cinco minutos e durante o período experimental desejado, interrompeu-se a agitação e procedeu-se a uma nova leitura. Para o efeito, o Líquido de Brodie foi ajustado na marca situada a meio da escala (150 mm) do ramo manométrico ligado ao frasco. Em seguida, foi feita a leitura da altura de líquido no ramo manométrico em comunicação com o exterior (Figura 3.1B).

A quantidade de O₂ consumida, decorrido o intervalo de tempo t, foi calculada de acordo com a equação 3.1 (para um desenvolvimento teórico dos princípios básicos deste método ver Umbreit *et al.*, 1964):

$$Q_{O_2} = h \cdot k_{O_2} \quad (3.1)$$

em que h representa a diferença de nível observada (mm) entre os dois ramos do manómetro, num dado intervalo de tempo t (Figura 3.1) e k a constante do frasco, dada pela seguinte expressão:

$$k = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_l \cdot \alpha}{P_0} \quad (3.2)$$

em que V_g é o volume da fase gasosa do frasco (μl), V_l o volume do líquido no frasco (μl), T a temperatura absoluta a que a experiência foi realizada, α a solubilidade do gás no líquido (ml gás/ml líquido) à temperatura T para uma pressão atmosférica de 760 mm Hg, e P_0 a pressão normal ($P_0 = 10\,000$ mm Líquido de Brodie = 760 mm Hg).

Uma vez que a solubilidade de cada um dos gases é praticamente independente da pressão dos outros gases, é possível determinar a quantidade de CO_2 produzida, considerando que no frasco sem KOH:

$$h = h_{\text{O}_2} + h_{\text{CO}_2} = Q_{\text{O}_2}/k_{\text{O}_2} + Q_{\text{CO}_2}/k_{\text{CO}_2} \quad (3.4)$$

Rearranjando, temos que:

$$Q_{\text{CO}_2} = \left(h - \frac{Q_{\text{O}_2}}{k_{\text{O}_2}} \right) \cdot k_{\text{CO}_2} \quad (3.5)$$

Considerando que $Q_{\text{O}_2} = h' \cdot k'_{\text{O}_2}$, em que h' e k'_{O_2} se referem ao frasco com KOH, temos que:

$$Q_{\text{CO}_2} = \left(h - \frac{h' \cdot k'_{\text{O}_2}}{k_{\text{O}_2}} \right) \cdot k_{\text{CO}_2} \quad (3.6)$$

Os valores de Q_{CO_2} e Q_{O_2} obtidos nos frascos experimentais, depois de corrigidos com os valores obtidos no termobarómetro, permitem calcular a produção específica (por unidade de biomassa seca presente no frasco) e avaliar a sua evolução em função do tempo. A relação obtida foi linear e o valor dos declives das rectas correspondem às taxas

específicas de consumo de O₂ (V_{O₂}) e de produção de CO₂ (V_{CO₂}). A taxa específica de fermentação é determinada pela diferença entre a taxa específica de produção de CO₂_{total} e a taxa específica de consumo de O₂, assumindo que na respiração a estequiometria entre o consumo de O₂ e a produção de CO₂ é de 1:1.

3.2.5 Transporte de ¹⁴C-glucose e ¹⁴C-maltose

O transporte de ¹⁴C-glucose foi efectuado tal como descrito em 2.2.5 alterando o do tampão Tris-citrato para 4,5, uma vez que foi esse o valor de pH usado nos ensaios efectuados no aparelho de Warburg.

Os ensaios de transporte de ¹⁴C-maltose foram efectuados de forma semelhante à descrita para a glucose marcada, tendo sido utilizadas soluções de maltose radioactiva (D-[U-¹⁴C]-maltose, Amersham, UK) nas concentrações e actividades específicas desejadas.

3.2.6 Expressão dos genes *HXT*

Isolamento do RNA total

Para o isolamento do RNA total, as células foram cultivadas tal como indicado em 3.2.2. Quando atingiram a densidade óptica pretendida (DO_{640 nm} entre 0,5 e 0,6), foi recolhida uma amostra da cultura que foi imediatamente congelada em azoto líquido. Todos os passos subsequentes foram efectuados tal como descrito em 2.2.7.

Preparação de sondas específicas

As sondas moleculares específicas para os genes *HXT1-7* de *S. cerevisiae* foram desenhadas a partir da análise visual dos alinhamentos das sequências de nucleótidos de todos os genes *HXT* efectuado com o programa DNASIS™ v3.7 (Hitachi Software Engineering). Esta análise revelou que a região com maior variabilidade entre estes genes se situa entre os primeiros 200 bp da extremidade 5'. Foram, então, escolhidas nesta região sequências com o tamanho pretendido (cerca de 150 bp), tendo o cuidado de procurar minimizar qualquer possibilidade de hibridação entre cada sonda e os restantes genes *HXT* (Tabela 3.3). Devido ao seu elevado grau de homologia, não foi possível desenhar sondas específicas que permitissem diferenciar os genes *HXT6* e *HXT7*, pelo que foi criada uma única sonda para estes dois genes. Cada uma das sequências obtidas foi

então comparada com o genoma completo de *S. cerevisiae* disponível na *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>) usando o algoritmo BLAST, a fim de avaliar a sua especificidade.

As sondas foram obtidas através de amplificação por PCR, usando como molde DNA total de *S. cerevisiae* PYCC 5477. As sequências dos *primers* específicos usados na síntese de cada uma das sondas estão indicados na Tabela 3.3. O programa de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 95°C durante 4 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 55°C e 40 s a 72°C, com um passo de extensão final

Tabela 3.3 Sondas de DNA usadas para detectar mRNA dos genes *HXT1-7*

Gene	Sequência*	Posição 5'
<i>HXT1</i>	5'-CCTCAGAAATCCAATTCATCCA AACTCATATGAATTGGAATCTGGTCGTTCA AAGGCCATGAATACTCCAGAAGGTA AAAATGAAAGTTTT CACGACA ACTTAA GTGAAAGTCAAGTGCAACCCGCCGTTGCCCTCCAACACCGGAAAAGGT	28
<i>HXT2</i>	5'-AATTCGCTACTAGCCGCGTTGAAAGTGGCTCTCAACAACTTCTATCCACT CTACTCCGATAGTGCAGAAATTAGAGACGGATGAATCTCCTATTCAAACCAA ATCTGAATACACTAACGCTGAACTCCCAGCAAAGCCAATCGCCGCATATT	8
<i>HXT3</i>	5'-CTCCACAAAAGTCAAGTGAGAAATTCGAATGCTGACCTGCCTTCGAATAG CTCTCAGGTAATGAACATGCCTGAAGAAAAAGGTGTTCAAGATGATTTCCAA GCTGAGGCCGACCAAGTACTTACCAACCCAAATACAGG	26
<i>HXT4</i>	5'-TCTGAAGAAGCTGCCTATCAAGAGGATACAGCAGTCCAAAATACTCCAGC TGATGCTTTGTGCCAGTTGAATCCGATTCTAATTCGGCTTTGTCTACTCCA TCCAACAAAGCTGAAAGAGATGACATGAAAGATTTGACGAGAATCAGC	4
<i>HXT5</i>	5'-AAACGCTCATCAAGGCCCTTGGAAAGGGTCTGCTACTGTGAGCACAAT TCTAACTCATAACGAGAAGTCAGGAACTCGACTGCTCCTGGTACCGC CGTTACAACGATAATTTGGCACAAGCTAAACCCGTCTCAAGTTACATTTCC CCATGAAGGCCCT	15
<i>HXT6/7</i>	5'-ATGTCACAAGACGCTGCTATTGCAGAGCAAACCTCCTGTGGAGCATCTCT CTGCTGTTGACTCAGCCTCCCACTCGGTTTTATCTACCCATCAAACAAG GCTGAAAGAGATGAAATAAAAGCTTATGGTGAAGGTGAAGAGCACGA	1

* As letras assinaladas a azul indicam a sequência dos *primers* directos usados nas reacções de PCR para produzir as sondas específicas. As letras assinaladas a verde indicam a sequência complementar da dos *primers* inversos.

de 72°C durante 5 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados num gel de agarose 2% p/v e purificados com o *kit* QIAEX II (QIAGEN) de acordo com as indicações do fabricante.

Análise por Northern blot

A análise dos níveis de expressão dos genes *HXT1* a *HXT6/7* foi efectuada por *Northern blot*, tal como foi descrito em 2.2.7.

3.3 Resultados e discussão

Os mutantes de *S. cerevisiae* usados neste estudo expressam os genes *MAL* de forma constitutiva e/ou apresentam uma disrupção no gene *MIG1*. Estes mutantes foram produzidos por Klein *et al.* (1996; 1997) com o objectivo de conseguir aliviar a repressão que a glucose exerce sobre o metabolismo da maltose em *S. cerevisiae*. De acordo com estes autores (1997), os três mutantes em estudo apresentam, em misturas de glucose e maltose, uma taxa específica de crescimento ($\mu = 0,24-0,25 \text{ h}^{-1}$) mais elevada do que a estirpe selvagem ($\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$). Também segundo os mesmos autores, num meio com glucose os mutantes *MAL^c* e *Amig1 MAL^c* apresentam uma taxa específica de crescimento cerca de 25% superior à da estirpe selvagem.

Embora experiências efectuadas no nosso laboratório, nas mesmas condições, não tivessem confirmado estes aumentos significativos das taxas específicas de crescimento (C. Fonseca, comunicação pessoal), neste trabalho procurámos investigar possíveis efeitos da introdução na levedura industrial das mutações acima indicadas, nomeadamente na velocidade de fermentação e no transporte de glucose e maltose.

3.3.1 Taxas específicas de fermentação e respiração

As taxas específicas de fermentação e respiração para a estirpe selvagem e para os três mutantes foram determinadas a 25° C e pH 4,5 com glucose ou maltose como fonte de energia, utilizando o aparelho de Warburg. Os mesmos substratos foram também utilizados para cultivar as células usadas nestes ensaios. Na Figura 3.2 podemos observar, a título ilustrativo, a variação da quantidade de CO₂ produzido e da quantidade de O₂ consumido ao longo do tempo para a estirpe selvagem em glucose. Os resultados obtidos para todas as estirpes analisadas são apresentados na Tabela 3.4.

No caso do mutante *MIG1 MAL^c*, na presença de glucose, observámos uma redução da taxa específica de fermentação e, simultaneamente, um aumento da taxa específica de respiração relativamente à estirpe selvagem. Estas alterações no metabolismo energético sugerem que este mutante, quando cultivado num meio com glucose como fonte de carbono e energia, deverá apresentar um coeficiente de rendimento em biomassa superior ao da estirpe selvagem. Contudo, os resultados obtidos por Klein *et al.* (1997) mostram que o coeficiente de rendimento em biomassa é igual para as duas estirpes.

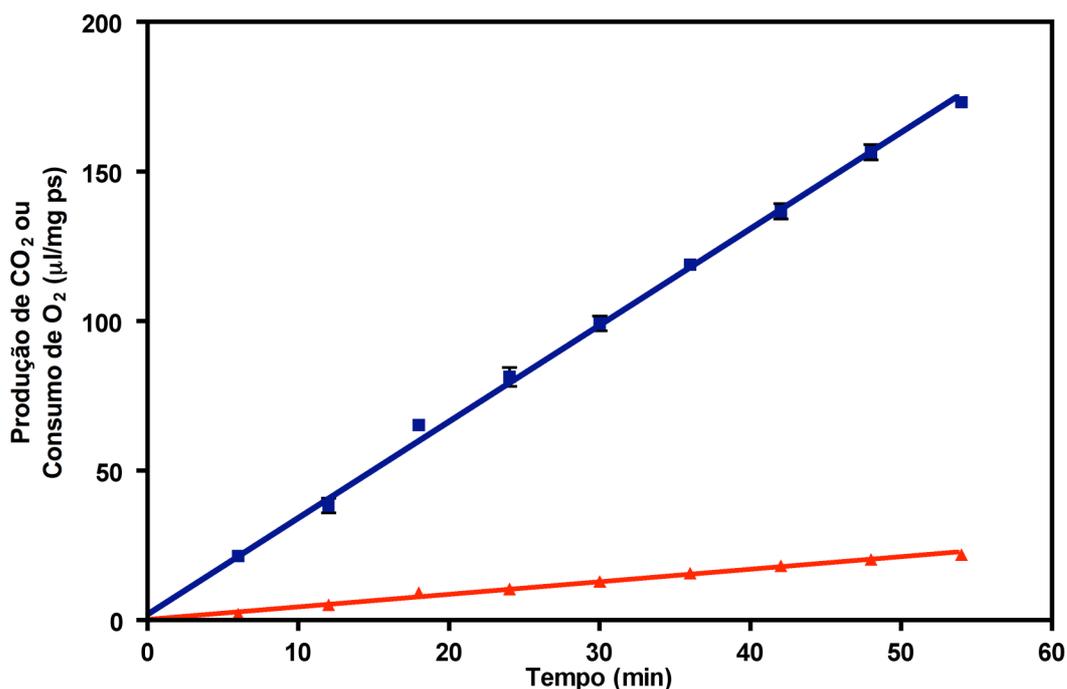


Figura 3.2 Produção de CO₂ (■) e consumo de O₂ (▲) em função do tempo por uma suspensão celular de *S. cerevisiae* PYCC 5477, em tampão fosfato 0,1 M (pH 4,5) com glucose (0,05 M), a 25°C.

Tabela 3.4 Taxas específicas de fermentação e de respiração das leveduras em estudo

Estirpe (Nº PYCC)	Genótipo	Fermentação (μl CO ₂ ·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ ps)		Respiração (μl O ₂ ·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ ps)	
		glucose	maltose	glucose	maltose
5477	<i>MIG1 MAL</i>	3,3 ± 0,5	2,8 ± 0,2	0,61 ± 0,17	0,87 ± 0,06
5478	<i>Δmig1 MAL</i>	3,7 ± 0,1	3,3 ± 0,3	0,63 ± 0,06	1,02 ± 0,13
5479	<i>Δmig1 MAL^c</i>	3,7 ± 0,2	3,2 ± 0,1	0,69 ± 0,12	1,05 ± 0,12
5480	<i>MIG1 MAL^c</i>	3,0 ± 0,3	3,6 ± 0,9	0,87 ± 0,02	0,99 ± 0,06

Todos os ensaios foram efectuados em tampão fosfato (0,1 M; pH 4,5) com glucose (0,05 M) ou maltose (0,05 M).

Duma forma geral, os valores obtidos para as taxas específicas de respiração e de fermentação, tanto em glucose como em maltose, não apresentam diferenças estatisticamente muito significativas entre a estirpe selvagem e qualquer dos mutantes

testados. Embora os valores obtidos para a generalidade dos mutantes sejam superiores aos calculados para a estirpe selvagem, nas mesmas condições, as diferenças observadas encontram-se dentro do erro experimental. É, no entanto, de salientar que no caso da estirpe selvagem e dos mutantes *Δmig1* o quociente respiratório ($R_Q = \text{CO}_2 \text{ total} / \text{O}_2$) varia entre 6,4 e 6,9 para a glucose e entre 4,0 e 4,2 quando a maltose é usada como substrato, o que está de acordo com o maior peso relativo da respiração no metabolismo da maltose. A estirpe *MIG1 MAL^c* constitui a exceção a esta regra, pois o valor de R_Q é semelhante em glucose e maltose (4,4 e 4,6, respectivamente). Este resultado deveria implicar coeficientes de rendimento em biomassa idênticos nos dois substratos, o que como já foi referido não se verificou (Klein *et al.*, 1997).

3.3.2 Caracterização do transporte de glucose

A cinética do transporte de glucose nos três mutantes e na estirpe original foi caracterizada a partir das velocidades iniciais de incorporação de ¹⁴C-glucose. Todos os ensaios foram realizados com células cultivadas em meio mineral com glucose e recolhidas a meio da fase exponencial. As cinéticas de transporte de glucose para as leveduras estudadas estão representadas na Figura 3.3, e na Tabela 3.5 podemos apreciar as respectivas constantes cinéticas.

Os resultados obtidos mostram que os mutantes que possuem uma disrupção no gene *MIG1* apresentam uma capacidade de transporte de glucose quase três vezes superior à da estirpe selvagem, enquanto o mutante que expressa os genes *MAL* constitutivamente apresenta um aumento de 50% da capacidade de transporte de glucose.

Tabela 3.5 Parâmetros cinéticos do transporte de ¹⁴C-glucose nas leveduras em estudo, a pH 4,5 e 25°C

Estirpe (N° PYCC)	Genótipo	V_{\max} (mmol·h ⁻¹ ·g ⁻¹ ps)	K_s (mM)
5477	<i>MIG1, MAL</i>	4,2 ± 0,3	6,3 ± 0,7
5478	<i>Δmig1, MAL</i>	11,3 ± 0,5	6,1 ± 0,4
5479	<i>Δmig1, MAL^c</i>	11,0 ± 0,5	6,5 ± 0,4
5480	<i>MIG1, MAL^c</i>	6,3 ± 0,3	6,2 ± 0,5

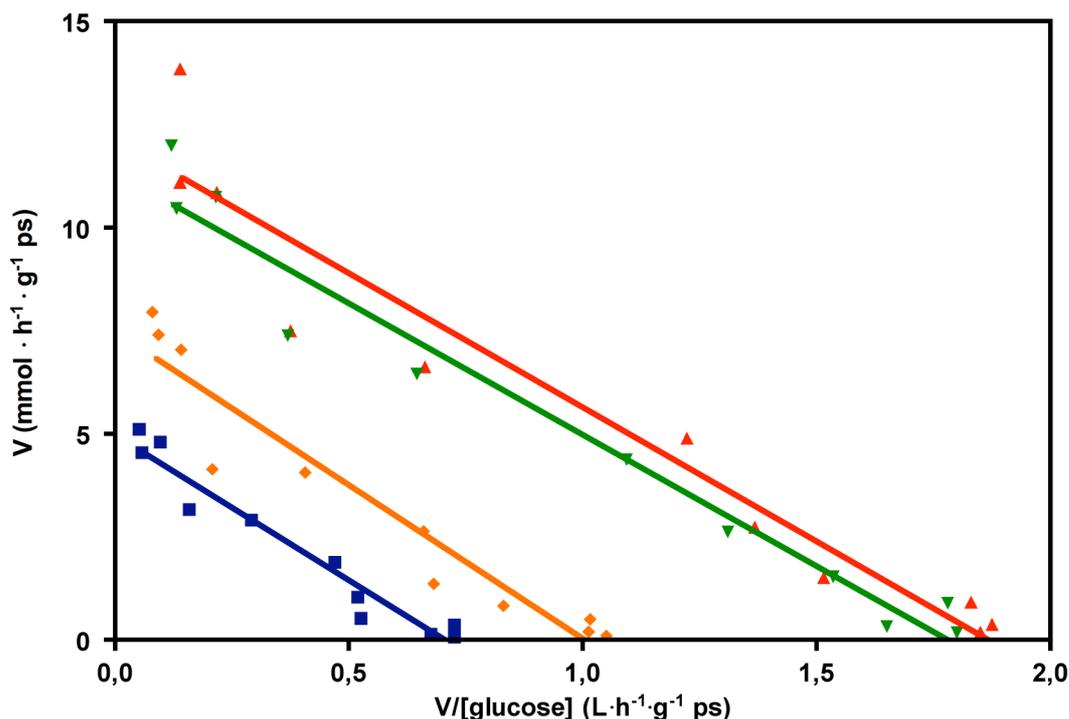


Figura 3.3 Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ¹⁴C-glucose (pH 4,5; 25°C) em *S. cerevisiae* PYCC 5477 (■), *S. cerevisiae* PYCC 5478 (▲), *S. cerevisiae* PYCC 5479 (▼) e *S. cerevisiae* PYCC 5480 (◆).

Devido ao elevado número de transportadores de glucose já identificados em *S. cerevisiae* (Reifenberger *et al.*, 1995; Boles e Hollenberg, 1997; Reifenberger *et al.*, 1997), e dado que vários desses transportadores se encontram sujeitos à regulação pela proteína Mig1 (Özcan e Johnston, 1999; Rolland *et al.*, 2002), o aumento da capacidade de transporte de glucose observada nos mutantes *Δmig1* poderá ser o resultado de pelo menos um de dois factores: *i*) o aumento dos níveis de expressão dos genes *HXT* que já são transcritos na estirpe selvagem, nas condições ensaiadas; *ii*) a desrepressão de outro(s) gene(s) *HXT* que, nas condições em que os ensaios foram efectuados, se encontrem sujeitos a repressão por Mig1 na estirpe selvagem. Uma vez que qualquer das quatro estirpes testadas apresenta uma cinética de transporte essencialmente monofásica (Figura 3.3), em que predomina uma componente de afinidade intermédia, ambas as hipóteses são plausíveis. Só uma análise dos níveis de expressão dos diferentes transportadores de glucose poderá elucidar o peso relativo de cada uma das hipóteses avançadas.

Foi demonstrado que o transporte de glucose exerce um elevado nível de controlo sobre o fluxo glicolítico em *S. cerevisiae* (Diderich *et al.*, 1999b; Ye *et al.*, 1999; Reijenga *et al.*, 2001). Também Rossel *et al.* (2002) mostraram que a diminuição da capacidade fermentativa em *S. cerevisiae* pode ser, em parte, atribuída a uma redução da capacidade de transporte. Seria, então, lógico pensar que o aumento da capacidade de transporte de glucose observada em mutantes *Δmig1* (Tabela 3.5) conduzisse a um aumento significativo do fluxo glicolítico. Porém, embora nestes mutantes se tenha observado um aumento da capacidade fermentativa (Tabela 3.4) relativamente à estirpe selvagem, este aumento foi ligeiro. Este tipo de extrapolações deve ser sempre encarado com algumas reservas, pois um aumento tão pronunciado da capacidade de transporte poderá levar a uma diminuição substancial do nível de controlo que o transporte geralmente exerce sobre o fluxo glicolítico, anulando grande parte do efeito que o aumento da capacidade de transporte possa produzir.

3.3.3 Caracterização do transporte de maltose

Tal como para a glucose, foi também efectuada a caracterização cinética do transporte de maltose na estirpe selvagem e nos três mutantes com base nas velocidades iniciais de incorporação de ¹⁴C-D-maltose. Todos os ensaios foram efectuados com células cultivadas em meio mineral com maltose e recolhidas a meio da fase exponencial. Na Figura 3.4 estão representadas as cinéticas de transporte de maltose para as quatro estirpes estudadas, e na Tabela 3.6 podemos observar as respectivas constantes cinéticas, determinadas tal como descrito em 3.2.5.

Tabela 3.6 Parâmetros cinéticos do transporte de ¹⁴C-maltose nas leveduras em estudo, a pH 4,5 e 25°C

Estirpe (Nº PYCC)	Genótipo	V _{max} (mmol·h ⁻¹ ·g ⁻¹ ps)	K _s (mM)
5477	<i>MIG1 MAL</i>	2,0 ± 0,1	2,8 ± 0,3
5478	<i>Δmig1 MAL</i>	2,8 ± 0,1	2,9 ± 0,2
5479	<i>Δmig1 MAL^c</i>	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,2
5480	<i>MIG1 MAL^c</i>	2,6 ± 0,2	2,8 ± 0,3

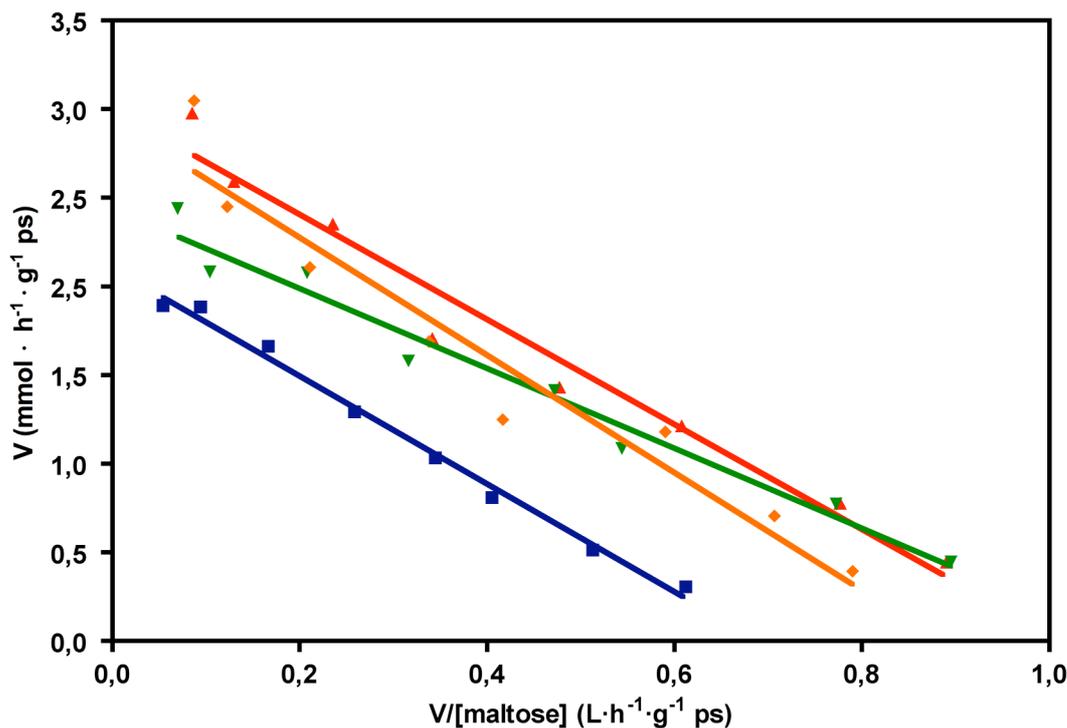


Figura 3.4 Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -maltose (pH 4,5; 25°C) em *S. cerevisiae* PYCC 5477 (■), *S. cerevisiae* PYCC 5478 (▲), *S. cerevisiae* PYCC 5479 (▼) e *S. cerevisiae* PYCC 5480 (◆).

Uma análise dos resultados obtidos mostra que todos os mutantes apresentam um aumento da capacidade de transporte de maltose relativamente à estirpe selvagem. Em particular, nos mutantes $\Delta mig1 MAL$ e $MIG1 MAL^c$ o aumento chega a atingir 40% e 30%, respectivamente. Estes resultados não deixam de ser algo surpreendentes, uma vez que as células foram cultivadas em condições de desrepressão (ausência de glucose) e na presença do indutor (maltose).

O aumento da capacidade de transporte de maltose no mutante $MIG1 MAL^c$ pode ser explicada pelo facto de, neste caso, o gene *MALT* se encontrar sob controlo do promotor do gene *ADH*, o que leva à produção duma quantidade anormalmente elevada do seu mRNA (Klein *et al.*, 1997). Desta forma, os níveis mais elevados de mRNA presentes no mutante, mesmo em condições de desrepressão, fazem com que uma maior quantidade de proteínas transportadoras seja sintetizada e incorporada na membrana citoplasmática, levando ao aumento da capacidade de transporte observada. O facto de, duma forma

geral, não terem sido observadas quaisquer alterações na afinidade do transportador está de acordo com esta explicação.

A disrupção do gene *MIG1* parece provocar um aumento da capacidade de transporte de maltose ligeiramente mais pronunciada do que a sobreexpressão do gene *MALT*. Contudo, esta observação é incompreensível à luz do que se sabe sobre o mecanismo de regulação dos genes *MAL* pela proteína Mig1. Na presença de glucose, a proteína Mig1 reprime a transcrição dos genes *MAL* ligando-se à região promotora deste genes (Hu *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1996). Na ausência de glucose, a proteína Mig1 é fosforilada, o que provoca a sua translocação para o citoplasma, deixando desta forma de actuar como repressor (De Vit *et al.*, 1997; Treitel *et al.*, 1998). De acordo com este mecanismo, a disrupção do gene *MIG1* não deveria afectar a capacidade de transporte de maltose na ausência de glucose. Os resultados obtidos, contudo, indiciam que Mig1 também influencia o transporte de maltose na ausência de glucose. Vale a pena recordar que a disrupção do gene *MIG1* neste mutante foi efectuada através da inserção do gene *MEL1*, que codifica uma α -galactosidase extracelular. Embora nos pareça pouco provável, não podemos excluir completamente a hipótese da expressão deste gene poder de alguma forma interferir no transporte de maltose nestes mutantes.

O aumento da capacidade de transporte observado no duplo mutante ($\Delta mig1 MAL^c$) é menor do que em qualquer dos outros dois mutantes ($\Delta mig1 MAL$ e $MIG1 MAL^c$), o que sugere que, de alguma forma, o efeito destas duas mutações se pode anular. Outro aspecto interessante reside no facto do duplo mutante apresentar uma maior afinidade do transportador para maltose ($K_M = 2,0$ mM) do que a estirpe selvagem ($K_M = 2,8$ mM). De acordo com Klein *et al.* (1996; 1997), as mutações introduzidas devem aumentar os níveis de expressão dos genes *MALT* e *MALS*, pelo que não seria de esperar qualquer alteração na afinidade da proteína transportadora. Uma vez que, individualmente, nenhuma das mutações provoca alterações neste parâmetro, não é possível, apenas com base nos resultados experimentais obtidos, avaliar o significado do aumento aparente da afinidade do transportador de maltose observado no duplo mutante.

3.3.4 Efeito das mutações $\Delta mig1$ e MAL^c na expressão dos genes *HXT*

Com o objectivo de identificar os transportadores de glucose responsáveis pelo aumento da capacidade de transporte de glucose observado nos mutantes $\Delta mig1$, foi efectuada uma

análise dos níveis de expressão dos diferentes genes *HXT* usando a técnica de *Northern blot*.

Foram identificados em *S. cerevisiae* 17 genes correspondentes a transportadores de glucose (Kruckeberg, 1996; Boles e Hollenberg, 1997). Embora todos esses genes codifiquem transportadores de glucose funcionais, com exceção de *HXT12* (Wieczorke *et al.*, 1999), apenas sete parecem ser fisiologicamente relevantes para a levedura (Reifenberger *et al.*, 1995; 1997; Diderich *et al.*, 1999a; Luyten *et al.*, 2002). Por este motivo, apenas foram produzidas sondas específicas para os genes *HXT1-7*. Tal como referido em 2.2.6, devido ao elevado grau de homologia entre os genes *HXT6* e *HXT7* (as respectivas ORFs apenas diferem em três nucleótidos) não foi possível desenhar sondas que permitissem diferenciar estes dois genes, pelo que foi apenas usada uma única sonda para ambos.

A especificidade das sondas foi confirmada por *Southern blot*. Para este efeito, foram preparados seis filtros contendo, cada um, os mesmos seis produtos de amplificação obtidos por PCR, usando como molde o DNA total da estirpe de referência (PYCC 5477) e os *primers* específicos para cada um dos genes *HXT* analisados. Estes fragmentos amplificados foram marcados radioativamente e também foram utilizados como sondas. Cada um dos filtros foi então hibridado com cada uma das sondas preparadas. Os resultados obtidos (Figura 3.5) mostram que todas as sondas são efectivamente específicas, dado que não foi detectado qualquer tipo de hibridação cruzada entre os vários fragmentos.

A fim de avaliar uma possível relação entre as alterações da capacidade de transporte de glucose observadas nos mutantes *Δmig1* e os níveis de expressão dos genes *HXT*, as células usadas para o isolamento do RNAtotal foram cultivadas em condições idênticas às utilizadas para os ensaios de transporte (crescimento em meio mineral com 2% glucose, células recolhidas a meio da fase exponencial). Nestas condições, não foi detectada a expressão dos genes *HXT2*, *HXT5* e *HXT6/7* na estirpe selvagem ou em qualquer dos mutantes (resultados não apresentados). Estes resultados são análogos aos obtidos por Diderich *et al.* (1999a), que também verificaram que células de *S. cerevisiae* recolhidas na fase exponencial numa cultura em meio mineral com glucose apenas expressam os genes *HXT1*, *HXT3* e *HXT4*.

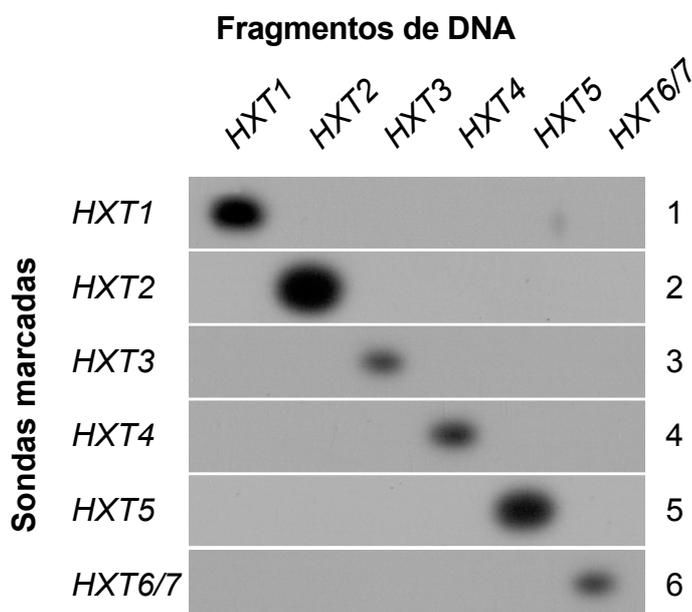


Figura 3.5 Avaliação por *Southern blot* da especificidade das sondas desenhadas para os diferentes genes *HXT*. Seis filtros idênticos (1 a 6) foram preparados, a partir de géis de agarose, com os diferentes produtos de amplificação (aprox. 150 bp) nas posições indicadas no topo da figura. Cada um desses mesmos fragmentos, tal como indicado à esquerda na figura, foi também marcado radioactivamente e hibridado com cada um dos filtros.

Quando comparamos os níveis de expressão dos genes *HXT1*, *HXT3* e *HXT4* nos vários mutantes com os da estirpe selvagem (Figura 3.6), podemos observar que o gene *HXT1* apresenta níveis de expressão idênticos em todas as estirpes enquanto os genes *HXT3* e *HXT4* apresentam níveis de expressão substancialmente mais elevados nos mutantes com uma disrupção no gene *MIG1* (*Δmig1 MAL* e *Δmig1 MAL^c*). O mutante *MIG1 MAL^c* apresenta um padrão de expressão semelhante ao da estirpe selvagem. Os resultados obtidos apontam para que o aumento da capacidade de transporte de glucose observado nos mutantes *Δmig1* resulte dum forte aumento dos níveis de expressão dos genes *HXT3* e *HXT4*. Na estirpe não mutada estes genes encontram-se parcialmente reprimidos pela proteína Mig1 nas condições de cultura ensaiadas.

Quando confrontamos os resultados obtidos com o modelo proposto por Özcan e Johnston (1995; 1999) para a regulação da transcrição dos genes *HXT*, verificamos que, em geral, os nossos resultados se encaixam no perfil de expressão previsto por esse modelo.

Segundo estes autores, a expressão do gene *HXT1* é reprimida por Rgt1p e induzida por uma outra via não completamente identificada, na qual estão envolvidas as proteínas Hxk2 e Reg1 mas não Mig1. De acordo com este modelo, o gene *HXT1* deveria ser expresso nas condições experimentais usadas e a disrupção do gene *MIG1* não deveria provocar quaisquer alterações no seu padrão de expressão, o que efectivamente corresponde aos resultados por nós obtidos. Sabe-se que o gene *HXT4* na presença de concentrações elevadas de glucose encontra-se sujeito à repressão parcial por Mig1, pelo

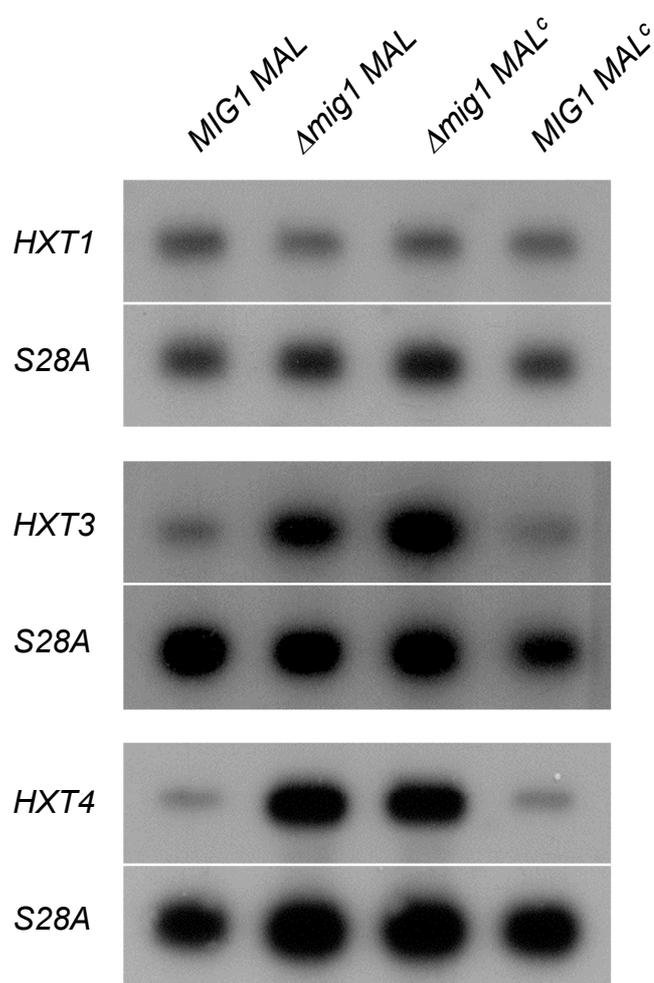


Figura 3.6 Análise por *Northern blot* dos níveis de expressão dos genes *HXT1*, *HXT3* e *HXT4* na estirpe selvagem de *S. cerevisiae* e respectivos mutantes analisados. As amostras foram recolhidas durante a fase exponencial do crescimento em meio mineral com 2% p/v de glucose. Uma sonda de DNA para o gene *S28A* foi usada como controlo da quantidade de RNA presente em cada amostra.

que nas condições em que as células foram obtidas (cultura em meio com glucose e recolhidas a meio da fase exponencial) a transcrição deste gene ainda se encontra parcialmente reprimida pela proteína Mig1. Nestas condições, seria de esperar que nos mutantes *Δmig1* os níveis de expressão do gene *HXT4* fossem mais elevados do que os observados para a estirpe selvagem, tal como se veio a verificar.

Quando comparamos os níveis de expressão do gene *HXT3* nos mutantes *Δmig1* com os da estirpe selvagem, os resultados obtidos não são os esperados, pois no modelo de Özcan e Johnston (1995; 1999) o gene *HXT3* não está sujeito a repressão por Mig1. Porém, uma análise cuidada dos resultados descritos por estes mesmos autores (Özcan e Johnston, 1995) mostra que, usando fusões *HXT3::lacZ*, os níveis de expressão deste gene em mutantes *Δmig1*, cultivados em meio com glucose, são cerca de três vezes superiores aos da estirpe selvagem. Este resultado, embora não tenha sido tomado em consideração na construção do modelo final proposto por estes investigadores, sugere claramente que, em conjunto com os outros mecanismos regulatórios propostos, a proteína Mig1 também controla a expressão de *HXT3*. Consideramos, portanto, que o modelo de Özcan e Johnston (1995; 1999) deve ser revisto relativamente à regulação da expressão de *HXT3* de forma a incorporar um mecanismo de repressão dependente de Mig1.

Capítulo 4: Custos energéticos do transporte activo de frutose: estudos em cultura contínua

(O trabalho apresentado neste capítulo foi realizado no *Department of Microbiology and Enzymology, Kluyver Laboratory of Biotechnology, Delft University of Technology, The Netherlands*)

4.1 Introdução

4.1.1 Custos energéticos do transporte activo

O transporte de nutrientes para o interior da célula depende da existência dum gradiente de concentração desse nutriente através da membrana plasmática (transporte passivo) ou pode ainda ser efectuado à custa dum gradiente electroquímico transmembranar gerado pela própria célula (transporte activo). Os custos energéticos do transporte podem ser particularmente importantes em termos da fisiologia celular global se a fonte de carbono e energia entrar na célula através dum sistema de transporte activo. Neste caso, a eficácia do crescimento é afectada de duas formas: o rendimento energético líquido resultante do catabolismo é mais baixo e, por isso, o dispêndio em ATP para a produção da mesma quantidade de biomassa torna-se mais elevado. Caso o rendimento do metabolismo energético seja baixo, os requisitos energéticos do transporte poderão consumir uma parte significativa dos recursos disponíveis. Um exemplo deste tipo de situação é o crescimento de *Pseudomonas oxalaticus* em oxalato. Neste caso, metade da energia obtida a partir da respiração do substrato é consumida no seu transporte para o interior da célula (Dijkhuizen *et al.*, 1977a; 1977b). Também com leveduras existem situações em que o custo energético do transporte é substancial. Uma dessas situações pode ser observada quando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é cultivada num quimiostato, em condições de anaerobiose, com maltose como nutriente limitante (Weusthuis *et al.*, 1993). Nestas condições, um quarto do ATP produzido durante a fermentação é gasto para transportar a maltose para o interior da célula através dum simporte com protões cuja estequiometria é 1:1. Este custo energético do transporte faz com que o rendimento em biomassa seja 25% inferior ao obtido, em condições semelhantes, quando a fonte de carbono e energia é glucose em vez de maltose. Devido ao aumento relativo do fluxo glicolítico, verifica-se também um aumento das taxas específicas de produção de etanol e CO₂.

Em *S. bayanus* e *S. pastorianus* a frutose é transportada para o interior da célula por um sistema de difusão facilitada, que também transporta glucose e outras hexoses, e por um sistema de transporte activo do tipo simporte com protões (ver 1.1.5). Células cultivadas num meio em que a única fonte de carbono e energia é frutose possuem simultaneamente os dois sistemas de transporte, embora a capacidade relativa de cada um dos sistemas

varie de acordo com a concentração de frutose residual no meio de cultura (Rodrigues de Sousa, 1998).

Se o crescimento da população microbiana tiver por base um metabolismo exclusivamente fermentativo (o que pode facilmente ser conseguido cultivando as células em condições de anaerobiose), o rendimento energético obtido é de apenas 2 mol ATP/mol hexose. Nestas condições, o custo energético do simporte de frutose poderá ser substancial, uma vez que parte significativa do ATP produzido é gasta com o funcionamento do simporte frutose/H⁺.

O impacto do simporte no rendimento energético global da célula deverá depender de dois factores: o peso relativo do transporte activo na capacidade total de transporte de frutose e a estequiometria do simporte frutose/H⁺. Segundo Rodrigues de Sousa (1998), o primeiro factor depende da estirpe e qualquer um destes dois factores varia de acordo com as condições fisiológicas da célula, o que significa que uma avaliação correcta dos custos energéticos do simporte só poderá ser alcançada se estas condições se mantiverem constantes e bem definidas. O método de cultura em sistema aberto, do tipo quimiostato, permite não só manter a cultura em condições controladas e independentes do tempo, como também manipular facilmente os parâmetros do crescimento que afectam o transporte de frutose, o que faz com que esta seja a forma de cultura mais adequada para o tipo de estudos que pretendemos efectuar.

4.1.2 Crescimento de *S. bayanus* PYCC 4565 em glucose vs frutose

Em condições de anaerobiose, *S. bayanus*, tal como *S. cerevisiae*, é capaz de usar hexoses como fonte de carbono e energia, embora nestas condições a única forma de obtenção de energia disponível seja a fermentação alcoólica. Através desta via metabólica a levedura converte os açúcares em etanol e CO₂, produzindo energia através dum mecanismo de fosforilação ao nível do substrato. No caso da glucose, o transporte para o interior da célula ocorre através dum mecanismo de difusão facilitada (Figura 4.1A), i.e., sem consumo de energia. Portanto, nessas condições o rendimento energético líquido da fermentação será de 2 moles de ATP por mole de glucose consumida. Porém, para a frutose existem, nesta levedura, dois sistemas de transporte que podem ser usados: um sistema de difusão facilitada e/ou um sistema de transporte activo do tipo simporte com protões (Figura 4.1B). Nesta situação, parte do ATP produzido durante a fermentação será

consumido pelo funcionamento do simporte de frutose, o que deverá conduzir a uma redução do rendimento energético global da fermentação.

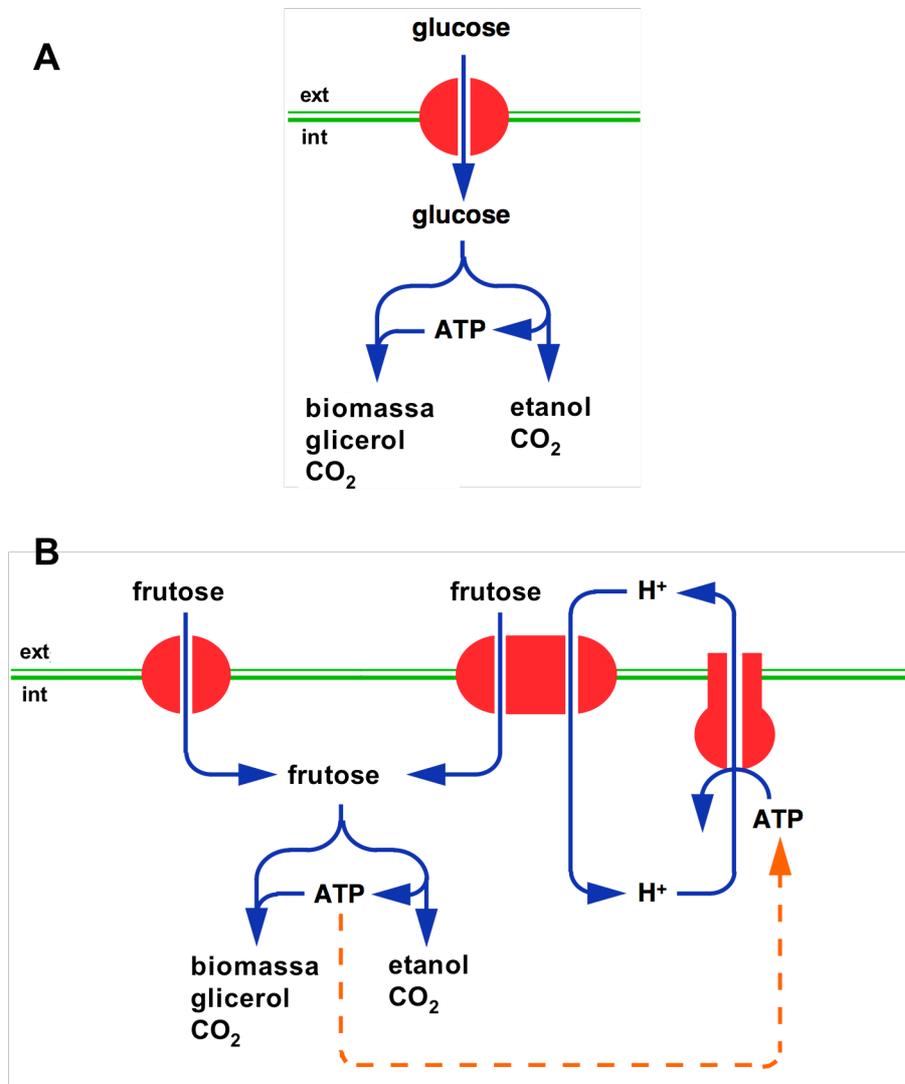


Figura 4.1 Representação esquemática dos mecanismos de transporte de glucose (A) e frutose (B) em *S. bayanus* inserido num metabolismo energético fermentativo.

Considerando, por hipótese, que apenas o simporte se encontra activo e, por outro lado, se assumirmos que é consumido um ATP para transportar uma molécula de frutose, resultado duma estequiometria frutose/H⁺ de 1:1 (Cason *et al.*, 1986), então teremos um rendimento energético dum ATP por molécula de frutose fermentada, ou seja 50% do valor obtido com glucose. Estudos em quimiostato efectuados com uma estirpe de *S. pastorianus* (Rodrigues de Sousa, 1998) indicam, contudo, que o sistema de difusão

facilitada se encontra sempre presente. Isto significa que apenas uma parte da frutose entra na célula através do simporte, pelo que os custos energéticos do transporte não deverão ser tão elevados como antecipado. Por outro lado, a mesma autora mostrou que a estequiometria do simporte pode aproximar-se de valores de 1:2 (frutose:protão) para as taxas de diluição mais altas, o que deverá provocar um aumento dos custos energéticos de transporte com o aumento da concentração de frutose extracelular.

4.1.3 Cultura microbiana em sistema aberto: quimiostato simples

A cultura em quimiostato é continuamente alimentada com meio fresco que entra no fermentador com um caudal constante (F). O volume de meio no fermentador (V) é mantido constante através da saída contínua do fermentador, com o mesmo caudal, de meio contendo células, produtos de fermentação e nutrientes não consumidos (Figura 4.2).

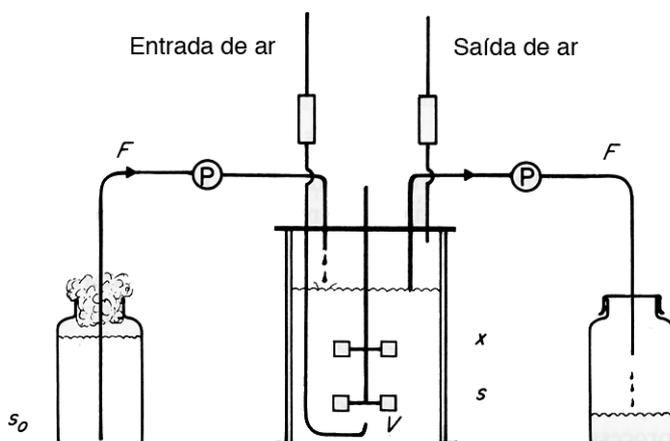


Figura 4.2 Esquema de funcionamento dum quimiostato simples. O meio fresco contendo a concentração S_0 de nutriente limitante é introduzido, através duma bomba (P), no fermentador a um caudal constante (F). A saída de meio do fermentador é também efectuada a um caudal F , igual ao de entrada, permitindo desta forma manter constante o volume de meio (V) no fermentador. Em estado de equilíbrio dinâmico (*steady state*), as concentrações de biomassa (X) e de substrato (S) também se mantêm constantes e independentes do tempo. O meio é agitado para garantir a sua homogeneidade e, se necessário, arejado (adaptado de Fiechter *et al.*, 1987).

O meio de cultura utilizado é formulado de modo a que um dos nutrientes se esgota enquanto os restantes se encontram ainda em condições que saturam a capacidade

metabólica das células. Este nutriente é designado por nutriente limitante e a taxa específica de crescimento depende da sua concentração no meio de cultura, de acordo com a equação de Monod (para uma revisão mais detalhada sobre este assunto, ver Van Uden, 1971):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \quad (4.1)$$

em que S representa a concentração de nutriente limitante e K_s a constante do substrato, que corresponde à concentração para a qual a taxa específica de crescimento (μ) é metade de μ_{\max} . Para valores de S não saturantes a taxa específica de crescimento diminui com S seguindo a curva hiperbólica correspondente à equação de Monod.

A variação da biomassa ao longo do tempo (dX/dt) num sistema contínuo é determinada pelo balanço entre a quantidade de biomassa formada no fermentador (μX) e a quantidade de biomassa removida do fermentador, por unidade de tempo. Esta relação pode ser descrita como:

variação da biomassa = crescimento – saída

ou seja,

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F}{V} X = \mu X - DX \quad (4.2)$$

em que D representa a taxa de diluição, ou seja, a quantidade de meio que entra (ou sai) do fermentador por unidade de tempo e por unidade de volume de meio de cultura no fermentador. O sistema tende para um estado de equilíbrio dinâmico (*steady state*), no qual a densidade populacional no fermentador se mantém constante ($dX/dt = 0$), o que significa que $\mu = D$.

Da mesma forma, a variação da concentração de substrato limitante no fermentador é determinada por um balanço entre a concentração do substrato no meio fresco, a quantidade de substrato removido do fermentador e a quantidade de substrato consumido pelas células:

variação da concentração de nutriente limitante = entrada – consumo – saída

ou seja,

$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - \frac{\mu X}{Y} - DS \quad (4.3)$$

em que S_0 representa a concentração do nutriente limitante no meio fresco e Y representa o coeficiente de rendimento em relação à biomassa.

No equilíbrio, também $dS/dt = 0$ e a equação anterior pode ser escrita da seguinte forma:

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu X}{Y} \quad (4.4)$$

Uma vez que $\mu = D$, então:

$$X = Y(S_0 - S) \quad (4.5)$$

A partir da equação de Monod (4.1), podemos facilmente deduzir que:

$$S = \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D} \quad (4.6)$$

Esta equação mostra que a cada valor de D corresponde uma determinada concentração de substrato limitante no fermentador. Substituindo S , na equação 4.5, pela equação 4.6, verificamos que:

$$X = Y\left(S_0 - \frac{DK_s}{\mu_{\max} - D}\right) \quad (4.7)$$

A taxa de diluição crítica (D_c) representa a taxa de diluição máxima a que, teoricamente, um quimiostato pode funcionar com um determinado microrganismo, em condições bem definidas, sem que ocorra o que se designa por *wash-out*. Este corresponde à remoção completa da biomassa do fermentador ($X = 0$) devido ao facto do crescimento do

microrganismo não conseguir compensar a saída de biomassa do fermentador. Este parâmetro pode ser calculado se substituirmos S por S_0 na equação 4.1, pelo que:

$$D_c = \mu_{\max} \frac{S_0}{S_0 + K_s} \quad (4.8)$$

Quando $S_0 \gg K_s$ o valor de D_c aproxima-se do valor da taxa específica de crescimento máxima.

Na Figura 4.3 estão representadas as variações da concentração de biomassa e substrato limitante em função da taxa de diluição aplicada a um quimiostato simples.

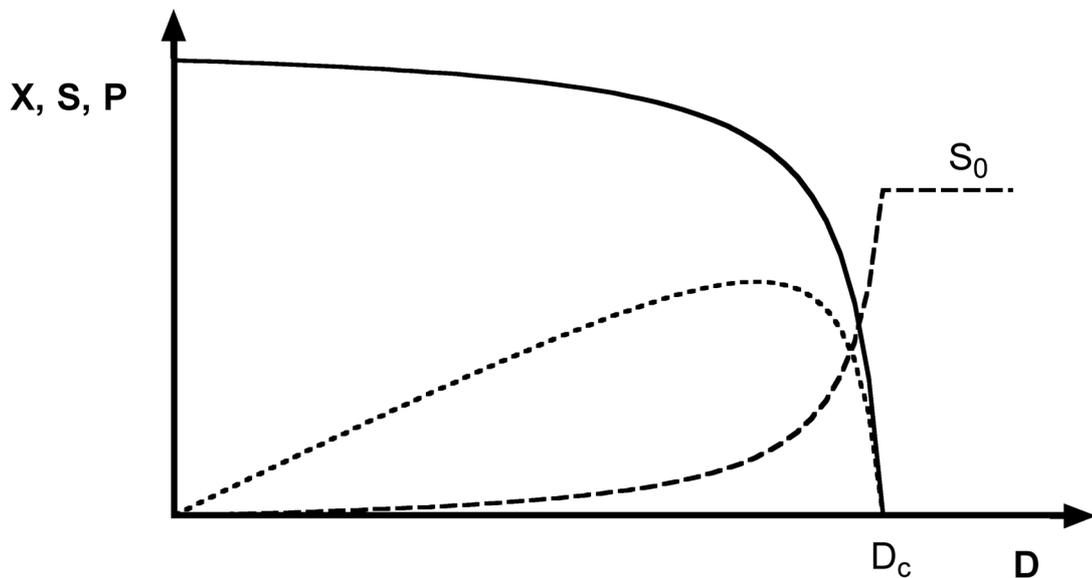


Figura 4.3 Representação simplificada da variação da concentração de biomassa (—), do nutriente limitante S (- - - - -) e da produtividade (.....) com a taxa de diluição, numa cultura microbiana em quimiostato simples.

A cultura em sistema aberto permite manter a cultura em condições fisiológicas bem definidas e reprodutíveis, mantendo constante a taxa específica de crescimento e outras variáveis (e.g. teor de oxigénio dissolvido). Com este tipo de cultura é possível estudar a regulação do metabolismo pela concentração de substrato limitante.

A teoria que sustenta o funcionamento do quimiostato simples pode, em certas circunstâncias, apresentar desvios relativamente ao modelo descrito e baseado na equação de Monod (Van Uden, 1971). O desvio mais frequente verifica-se quando o nutriente limitante é simultaneamente fonte de carbono e de energia. Nestas condições, observa-se uma diminuição, para taxas de diluição baixas, da biomassa formada e do coeficiente de rendimento. Este decréscimo relativamente aos valores previstos pelo modelo teórico é devido ao aumento do peso relativo do gasto energético das células em funções de manutenção, tais como o *turnover* de macromoléculas, manutenção do potencial osmótico, transporte de solutos e adaptação a condições adversas para a célula.

Como já foi referido, o metabolismo energético de *S. cerevisiae* em anaerobiose é exclusivamente fermentativo e, nestas condições, o rendimento energético da célula é baixo. O facto de parte do ATP produzido ser usado no transporte activo de frutose poderá fazer diminuir de forma significativa o rendimento energético global da fermentação, levando a uma redução do rendimento em biomassa e a um aumento da produtividade específica em etanol. Neste estudo procurámos avaliar os custos energéticos do simporte frutose/H⁺ na levedura *S. bayanus* PYCC 4565 usando para este efeito uma cultura anaeróbia em quimiostato a várias taxas de diluição, assim fazendo variar a contribuição relativa do simporte para o transporte global de frutose.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Estirpe

Para a realização deste estudo foi usada a estirpe de *Saccharomyces bayanus* PYCC 4565.

4.2.2 Cultura em quimiostato

As culturas em quimiostato foram realizadas num fermentador ADI de dois litros (Applikon Dependable Instruments, Holanda). Este fermentador possui uma camisa exterior com recirculação de água que permite o controlo da temperatura a partir dum criostato. A homogeneização do meio de cultura foi conseguida através dum agitador de pás ligado a um motor de agitação externo. A entrada de meio fresco no fermentador foi efectuada por meio duma bomba peristáltica e o caudal ajustado através dum sistema constituído por uma pipeta graduada colocada em série entre a bomba e o reservatório de meio fresco. O volume de meio de cultura no fermentador foi mantido constante através dum tubo que permite a remoção de líquido por meio duma bomba peristáltica accionada por um sensor eléctrico de contacto. Para o controlo do pH utilizou-se um eléctrodo de pH ligado a um biocontrolador ADI 1020, que permite manter o pH constante através da adição automática de KOH (2 M). As condições de anaerobiose no fermentador foram mantidas graças à injeção de azoto com um caudal constante e regulado por um controlador Brooks 5876. Todas as ligações do equipamento experimental foram efectuadas com tubagem de norprene (Cole-Palmer Corp.). A percentagem relativa de oxigénio dissolvido no meio de cultura foi monitorizada com um eléctrodo de oxigénio (Ingold), tendo sido sempre mantida abaixo de 0,1% do valor de saturação.

Do *set up* experimental usado constaram ainda dois reservatórios de 20 L, um contendo meio de cultura fresco e o outro destinado à recolha do efluente.

4.2.3 Meio e condições de cultura

Temperatura: 25°C

pH 4,5

Volume de cultura: \approx 1 L

Agitação: 750 rpm

Caudal de azoto: 0,5 L·min⁻¹

Taxa de diluição: entre 0,025 e 0,15 h⁻¹

Meio de cultura: meio mineral II (ver Apêndice I) com frutose ou glucose (2,5%, p/v) suplementado com anti-espuma de silicone (0,15 mL/L). O meio de crescimento foi também suplementado com Tween 80 (420 mg/L) e ergosterol (10 mg/L), dissolvidos em etanol, para possibilitar o crescimento em anaerobiose.

Substrato limitante: fonte de carbono e energia (frutose ou glucose)

4.2.4 Inóculo e sua preparação

O inóculo do meio de cultura no fermentador consistiu em, aproximadamente, 50 ml duma cultura preparada na véspera em meio com glucose (2% p/v), extracto de levedura (0,5% p/v) e peptona (0,5% p/v) e incubada a 25°C num incubador orbital (150 rpm).

Após a inoculação, o fermentador foi mantido a funcionar em sistema fechado aeróbio durante cerca de 24 h. Decorrido este período de adaptação, e sendo visível um aumento da densidade celular no fermentador, este passou a ser operado em modo contínuo, em condições anaeróbias, à taxa de diluição pretendida.

4.2.5 Determinação da biomassa seca

Para determinação da biomassa seca, 10 mL de cultura foram filtrados através de membranas de nitrocelulose (0,45 μ m de poro), lavados abundantemente com água desmineralizada, e a membrana seca num forno micro-ondas durante 20 min.

4.2.6 Análise de gases

Os gases à saída do fermentador foram arrefecidos num condensador (2°C) e desidratados num *Perma Pure Dryer* (PD-625-12P). A concentração de CO₂ foi determinada num detector de infravermelhos Beckman Model 864. A concentração de O₂ foi determinada com um analisador de oxigénio (Taylor Servomex Co., UK) e esteve sempre abaixo do limite de detecção do equipamento. O fluxo de gás à saída do fermentador foi medido tal como descrito por Weusthuis *et al.* (1994). A taxa de produção de CO₂ foi determinada tal como descrito por van Urk *et al.* (1988).

4.2.7 Doseamento de substratos e metabolitos

A concentração de glucose no meio de cultura fresco e no fermentador foi determinada com a enzima glucose-oxidase (*kit* Merck). A concentração de frutose, por seu lado, foi determinada com o *kit* de doseamento de glucose/frutose (Boehringer).

As concentrações de etanol, glicerol e ácidos orgânicos (ácido pirúvico, ácido succínico, ácido fumárico e ácido láctico) no fermentador foram determinadas por HPLC usando uma coluna de exclusão iónica Aminex HPX-87H (BioRad) a 60°C. A coluna foi eluída com uma solução de ácido sulfúrico (0,5 g/L). Para a detecção de etanol e de glicerol foi utilizado um detector de índice de refração ERMA ERC-7515A ligado a um integrador Hewlett Packard 3390A. A detecção dos ácidos orgânicos foi realizada com um espectrofotómetro Water 441 UV-meter a 241 nm, ligado a um módulo de aquisição de dados Waters 741. A concentração de etanol no fermentador foi confirmada através de ensaios colorimétricos (EK 003, Leeds Biochemicals, UK) e corrigida tendo em conta a concentração de etanol no meio de cultura (alterada pela adição da solução de Tween e ergosterol).

O teor proteico das células foi determinado com base no método de biureto modificado (Verduyn *et al.*, 1990). A concentração total de carbono orgânico foi efectuada por meio dum aparelho Beckman 915 TOC-analyser.

4.3 Resultados e discussão

A estirpe de *S. bayanus* PYCC 4565 possui as duas características necessárias a este estudo sobre os custos energéticos do transporte activo de frutose. Para além de, tal como as outras estirpes desta espécie, apresentar um transportador específico para frutose do tipo simporte com protões (Rodrigues de Sousa *et al.*, 1995; Rodrigues de Sousa, 1998), tem capacidade de crescimento em condições de anaerobiose em meio mineral com glucose ou frutose suplementado com Tween 80 e ergosterol.

A avaliação dos referidos custos energéticos do transporte activo de frutose foi efectuada por comparação entre o crescimento anaeróbio de *S. bayanus* em meio mineral com frutose e no mesmo meio com glucose. Para efectuar este tipo de comparação é fundamental que as células se encontrem num estado fisiológico bem definido e facilmente reprodutível como acontece em cultura contínua. Uma vez que não se conhecem as condições óptimas de expressão do simporte nesta estirpe, a comparação entre os crescimentos em frutose e em glucose foi efectuada variando a taxa de diluição entre 0,025 e 0,15 h⁻¹.

Na Figura 4.4 encontra-se representada a variação da concentração de frutose e glucose no fermentador em função da taxa de diluição. Os resultados obtidos mostram que a concentração de substrato limitante aumenta com o aumento da taxa de diluição, tal como previsto pela equação (4.6). A quantidade de pontos experimentais disponíveis não permite obter uma estimativa razoável para as constantes μ_{\max} e K_S . Contudo, o valor de μ_{\max} em cultura descontínua aeróbia no mesmo meio de cultura e à mesma temperatura é de cerca de 0,28 h⁻¹. Este valor foi confirmado para uma cultura em quimiostato aeróbio em trabalho recente realizado no mesmo grupo (C. Roca, comunicação pessoal).

A variação do coeficiente de rendimento em biomassa com a taxa de diluição para o crescimento em meio com frutose ou com glucose encontra-se representada na Figura 4.5. Considerando os resultados relativos à cultura com glucose, verificámos que para taxas de diluição iguais ou superiores a 0,075 h⁻¹ foi obtido um rendimento constante de 0,084 e que para taxas de diluição inferiores a 0,075 h⁻¹ se observou uma diminuição do coeficiente de rendimento. Este comportamento está de acordo com o esperado aumento dos custos de manutenção (Van Uden, 1971). Para as culturas com frutose como nutriente

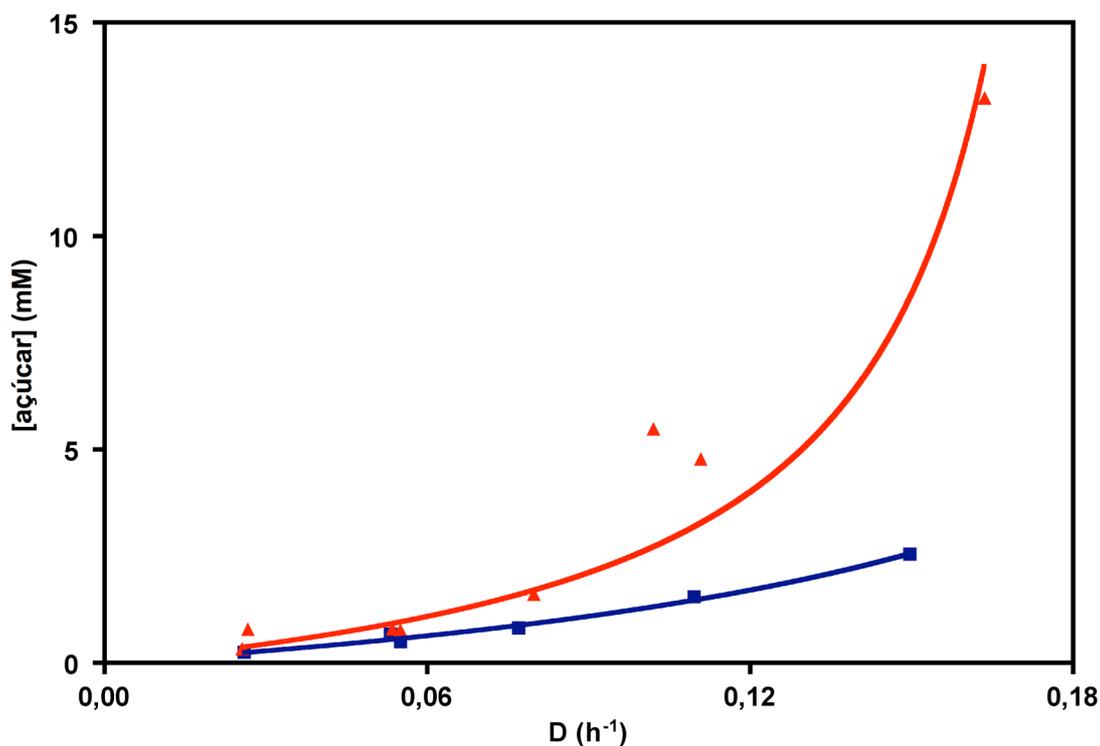


Figura 4.4 Efeito da taxa de diluição na concentração de açúcar no fermentador numa cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em quimiostato anaeróbio em meio mineral com frutose (\blacktriangle) ou glucose (\blacksquare) como nutriente limitante, a pH 5 e 25°C.

limitante, o valor do coeficiente de rendimento em biomassa à taxa de diluição de $0,16 h^{-1}$ é idêntico ao valor obtido em glucose para a mesma taxa de diluição (Figura 4.5). Porém, para taxas de diluição inferiores, o coeficiente de rendimento em frutose é sempre menor do que em glucose, sendo a diferença entre os dois tanto maior quanto mais baixa é a taxa de diluição.

Se observarmos a variação das taxas específicas de produção de etanol (Figura 4.6A) e CO_2 (Figura 4.6B), verificamos que estes parâmetros aumentam linearmente em função da taxa de diluição. Contudo, se compararmos os valores obtidos num quimiostato com frutose e com glucose a taxas de diluição idênticas, podemos observar que, principalmente para as taxas de diluição mais baixas, os fluxos destes metabolitos em frutose são significativamente mais elevados do que em glucose. Estas diferenças vão, contudo, desaparecendo com o aumento da taxa de diluição.

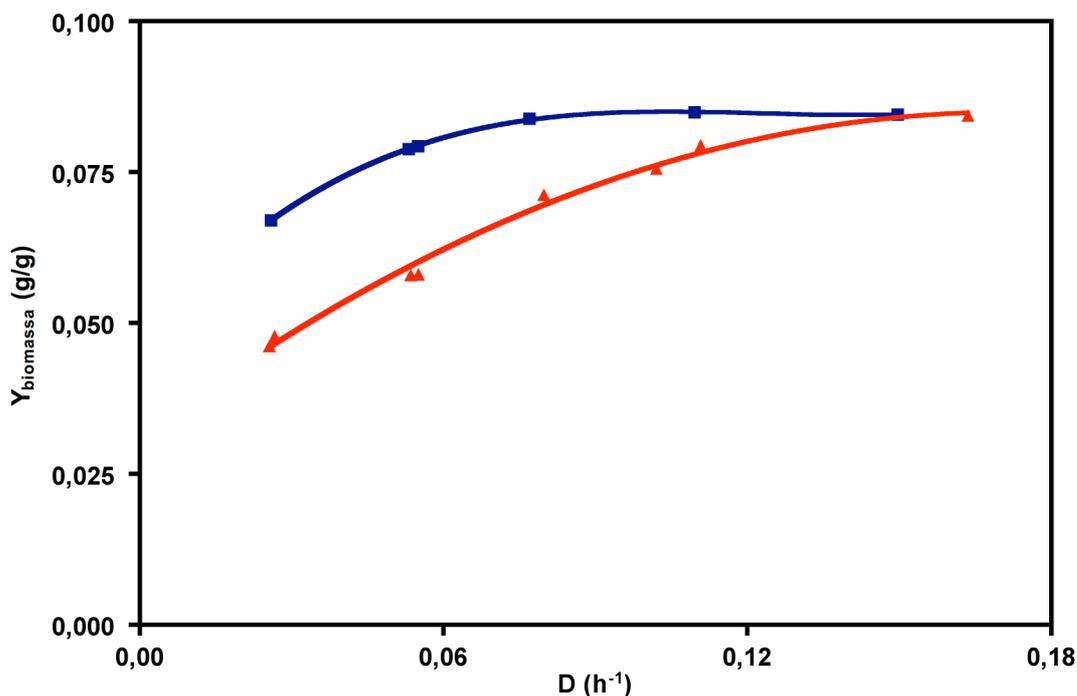


Figura 4.5 Efeito da taxa de diluição no coeficiente de rendimento em biomassa numa cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em quimiostato anaeróbio em meio mineral com frutose (▲) ou glucose (■) como nutriente limitante, a pH 5 e 25°C.

Na Figura 4.7 encontra-se representada a variação da taxa específica de produção de glicerol em função da taxa de diluição. Embora neste caso também se verifique um aumento de q_{glicerol} em função de D , não foram observadas diferenças entre os quimiostatos com glucose e frutose. Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez que a produção de glicerol não está directamente relacionada com o metabolismo energético da célula.

Uma análise comparativa do conjunto de resultados obtidos para a taxa de diluição mais baixa ($0,025 \text{ h}^{-1}$) mostra que, em frutose, o rendimento em biomassa é 30% inferior e a taxa específica de produção de etanol 54% superior (Figura 4.8). Com o aumento da taxa de diluição estas diferenças dissipam-se, de tal modo que para a taxa de diluição mais elevada ($0,15 \text{ h}^{-1}$) já não se observam diferenças significativas entre as culturas em glucose e frutose.

Tal como foi salientado por Weusthuis *et al.* (1993), a interpretação deste tipo de resultados deve ser efectuada com algum cuidado dado que vários factores, tais como

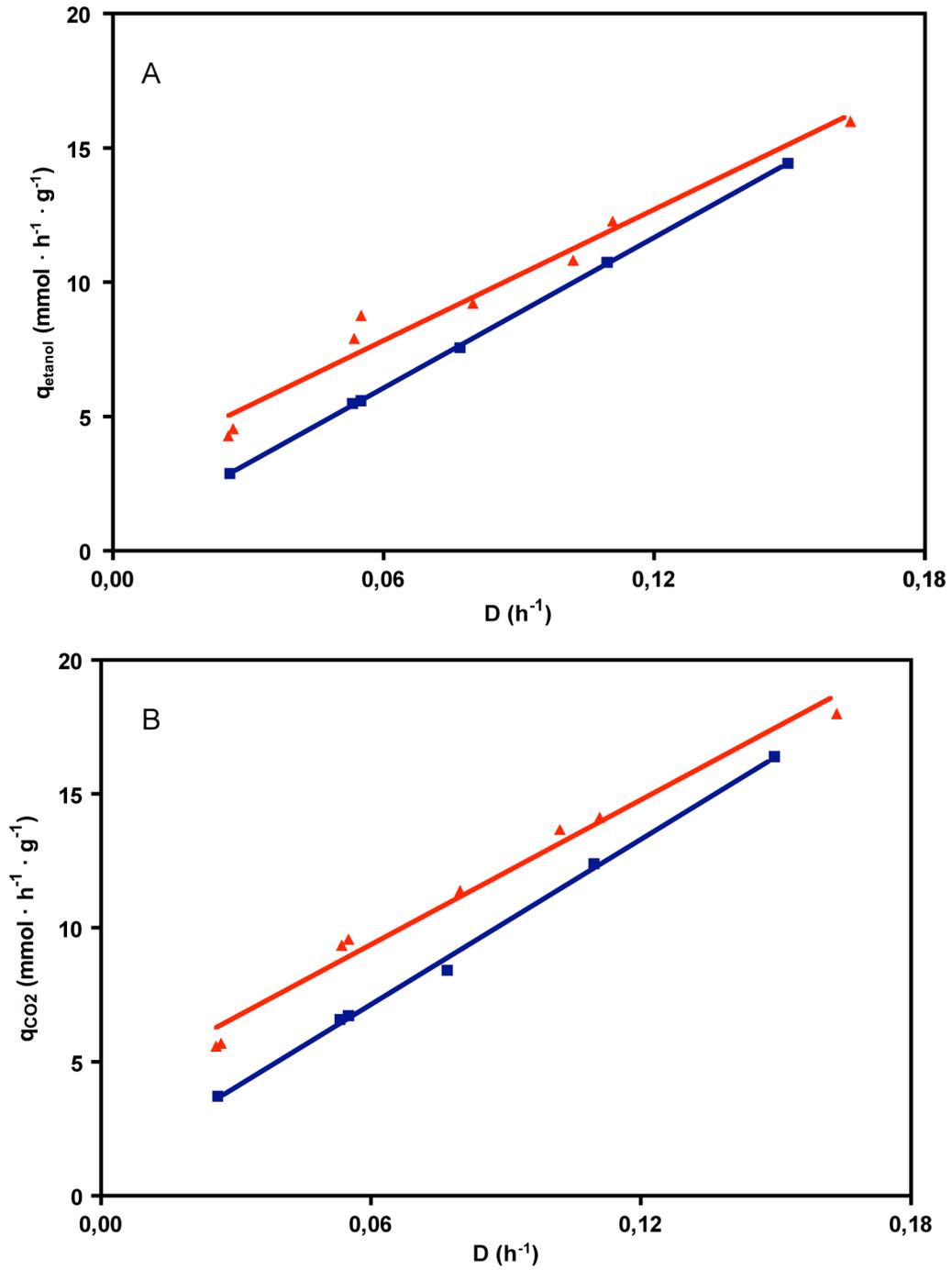


Figura 4.6 Efeito da taxa de diluição nas taxas específicas de produção de etanol (A) e de produção de CO₂ (B) numa cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em quimiostato anaeróbico, em meio mineral com frutose (▲) ou glucose (■) como nutriente limitante, a pH 5 e 25°C.

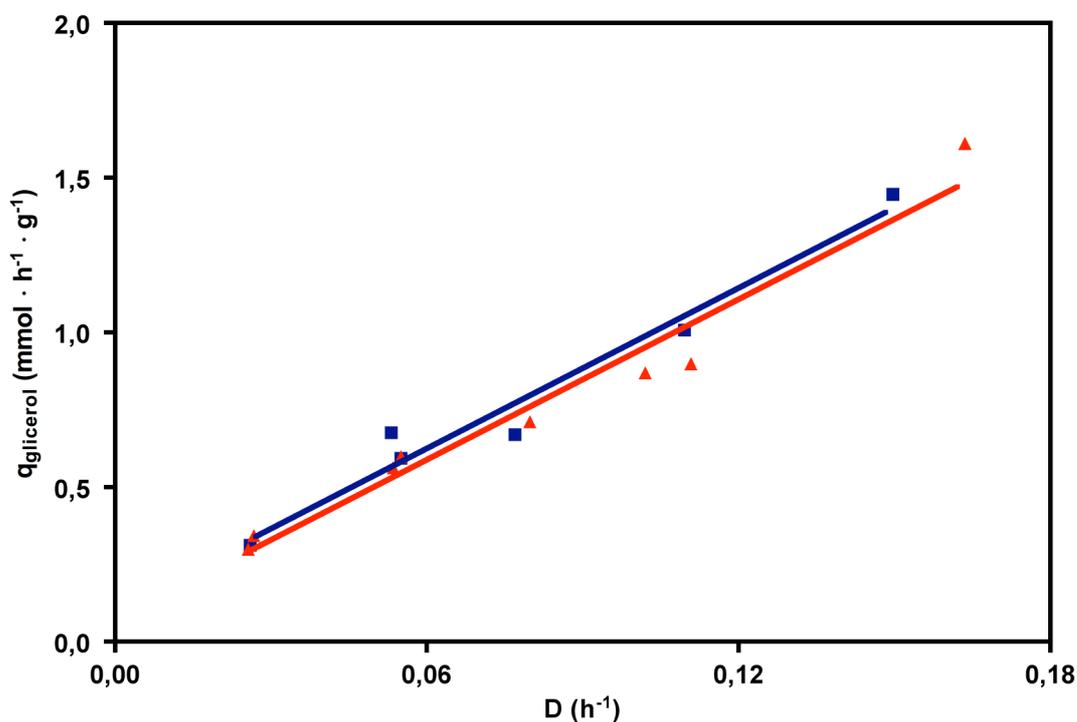


Figura 4.7 Efeito da taxa de diluição na taxa específica de produção de glicerol numa cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em quimiostato anaeróbico em meio mineral com frutose (▲) ou glucose (■) como nutriente limitante, a pH 5 e 25°C.

alterações na composição ou morfologia celular e a produção de metabolitos secundários, podem afectar o rendimento em biomassa. Embora não tenha sido efectuada uma análise elementar à biomassa, foi contudo determinado o teor em proteína das células nas várias amostras recolhidas do quimiostato. Esta determinação não revelou diferenças significativas entre as células cultivadas em glucose ($50 \pm 5\%$ do peso seco) e frutose ($53 \pm 7\%$). Também ao nível da morfologia celular (Figura 4.9), não foram observadas diferenças entre as células cultivadas em glucose e frutose à mesma taxa de diluição.

Durante o crescimento em anaerobiose são produzidos vários ácidos orgânicos fracos que podem actuar como desacopladores (Verduyn *et al.*, 1990). Caso se tivesse obtido taxas específicas de produção de alguns destes compostos significativamente diferentes em glucose e em frutose, estas diferenças teriam que ser tidas em consideração ao interpretar as Figuras 4.5 e 4.6. Porém, os principais ácidos orgânicos encontrados (ácidos láctico, pirúvico e succínico) apresentaram taxas específicas de produção praticamente iguais em

glucose e em frutose. Aliás, as concentrações encontradas no meio de cultura foram muito baixas (resultados não apresentados), pelo que o seu efeito desacoplador deverá ser insignificante.

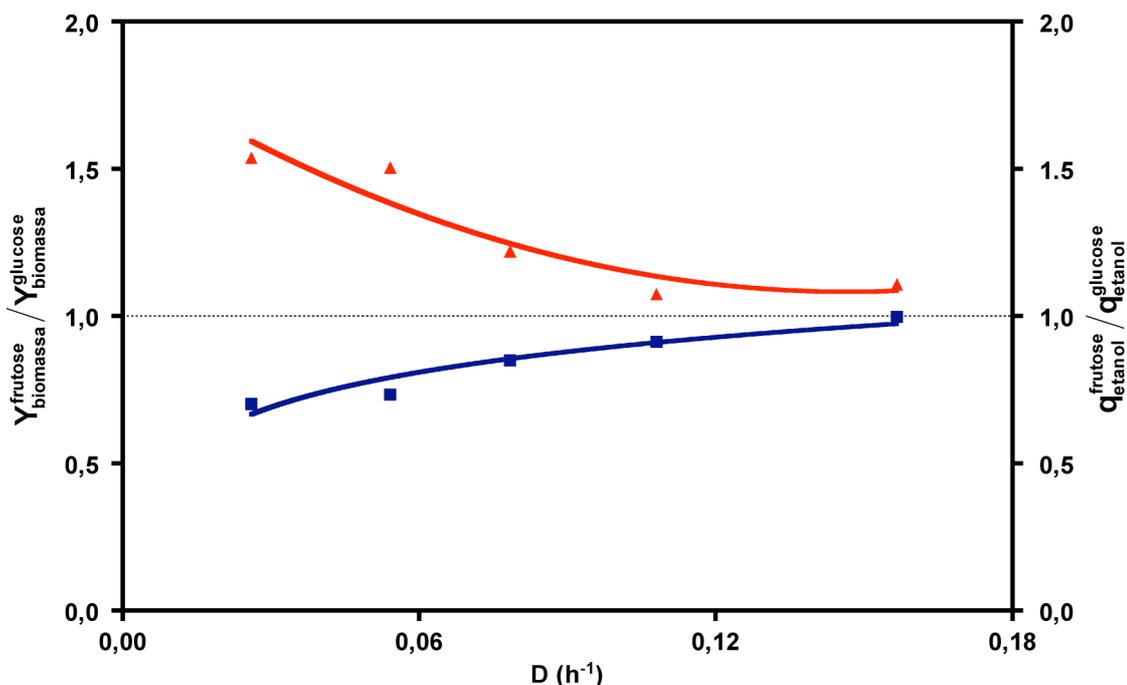


Figura 4.8 Variação da razão entre os coeficientes de rendimento (■) e as taxas específicas de produção de etanol (▲) em frutose e glucose com a taxa de diluição numa cultura de *S. bayanus* PYCC 4565 em quimiostato anaeróbio, em meio mineral com frutose ou glucose como nutriente limitante, a pH 5 e 25°C.

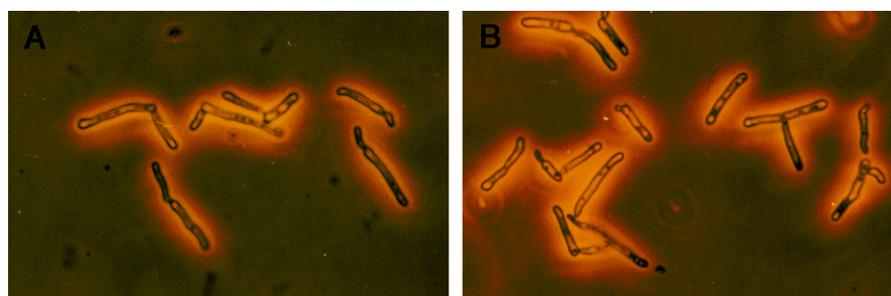


Figura 4.9 Morfologia celular de *S. bayanus* PYCC 4565 cultivada em quimiostato anaeróbio a 25°C, pH 5 e $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$ em meio mineral com frutose (A) ou glucose (B) como nutriente limitante. Ampliação 400x

Se avaliarmos os resultados obtidos considerando o modelo de transporte apresentado na Figura 4.3, deduz-se que para as taxas de diluição mais baixas o transporte activo de frutose tem, efectivamente, um custo energético elevado para as células.

O desaparecimento gradual das diferenças no coeficiente de rendimento e taxas específicas de produção de etanol e CO₂ observadas à medida que a taxa de diluição aumenta deverá ser o resultado da diminuição do peso relativo do simporte na capacidade total de transporte de frutose. Para taxas de diluição mais elevadas, a concentração residual de frutose aumenta (Figura 4.4) e exerce repressão no transporte activo de frutose (Rodrigues de Sousa, 1998). A favor desta hipótese estão os resultados doutros estudos (Rodrigues de Sousa *et al.*, 2004) que mostram que em *S. bayanus* PYCC 4565 o simporte de frutose é fortemente regulado pela concentração de frutose no meio de cultura, sendo observada uma repressão para concentrações superiores a 0,05% p/v (2,8 mM).

Embora não tenha sido possível construir um modelo metabólico detalhado para avaliar os custos energéticos do simporte de frutose, uma vez que não se determinou as constantes cinéticas dos transportadores de frutose e a estequiometria do simporte para *S. bayanus* nas condições utilizadas neste estudo, efectuámos uma comparação (Tabela 4.1) entre os resultados obtidos e os descritos por outros autores num estudo semelhante em que foi avaliado o custo energético do simporte de maltose em *S. cerevisiae* (Weusthuis *et al.*, 1993). De salientar que se pretende apenas comparar os efeitos relativos

Tabela 4.1 Análise comparativa dos custos energéticos do transporte activo de frutose em *S. bayanus* PYCC 4565 ($D = 0,025 \text{ h}^{-1}$) com os do transporte activo de maltose em *S. cerevisiae* CBS 8066 ($D = 0,1 \text{ h}^{-1}$)

	frutose/glucose (%)	maltose/glucose (%)*
Y _{biomassa}	70	75
Y _{etanol}	107	115
q _{etanol}	154	152
q _{CO₂}	152	149
q _{glicerol}	103	105

Adaptado de Weusthuis *et al.* (1993)

e não os valores absolutos.

Com base na Tabela 4.1, podemos concluir que os resultados obtidos com frutose para uma taxa de diluição de $0,025 \text{ h}^{-1}$ são semelhantes aos obtidos por Weusthuis *et al.* (1993) para a maltose. Esta semelhança sugere que, nestas condições, os custos energéticos do simporte de frutose representam cerca de 25% da energia produzida na fermentação. É de realçar, no entanto, que esta semelhança de valores pode resultar duma mera coincidência, pois os dois casos constituem exemplos diferentes. No caso da maltose só existe um tipo de transporte, com uma estequiometria maltose:protão constante e igual a 1:1. O mesmo não acontece, pelas razões já apontadas, para a frutose no caso em apreço.

Capítulo 5:

Reconstituição do transporte activo de frutose em vesículas

(O trabalho apresentado neste capítulo foi parcialmente realizado no Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Braga)

5.1 Introdução

Grande parte dos estudos relativos ao transporte de solutos em leveduras foram efectuados em células inteiras. Porém, devido à complexidade do funcionamento celular os resultados obtidos nem sempre são de fácil interpretação. Possíveis interferências resultantes do metabolismo, compartimentalização do substrato e/ou alterações do estado energético das células fazem com que se torne difícil retirar conclusões claras, principalmente em sistemas de transporte activo.

Com o intuito de ultrapassar estas limitações, vários investigadores usaram vesículas de membrana plasmática para estudar o transporte de açúcares e de aminoácidos em leveduras (Franzussoff e Cirillo, 1983; Ongjoco *et al.*, 1987; Ramos *et al.*, 1989; Van Leeuwen *et al.*, 1991; 1992; Van der Rest *et al.*, 1995a; Gerós *et al.*, 1996; Pinson *et al.*, 1997; Van den Broek *et al.*, 1997).

O isolamento de membranas citoplasmáticas para este tipo de estudos requer que essas membranas sejam separadas dos outros componentes celulares. O primeiro passo desta separação consiste na remoção da parede celular, o que pode ser alcançado através de métodos enzimáticos ou mecânicos. No primeiro caso são usadas enzimas líticas que destroem as ligações das moléculas de glucano e de outros polímeros que constituem a parede celular, enquanto no segundo caso são usadas esferas de vidro para destruir a parede. Após o rebentamento das células, as membranas são separadas dos restantes componentes celulares por centrifugação num gradiente de densidade e/ou centrifugação diferencial. O grau de pureza das membranas obtidas pode ser avaliado através da determinação da actividade ATPásica em presença de inibidores específicos para a ATPase citoplasmática ou mitocondrial (Van der Rest *et al.*, 1995b).

As membranas citoplasmáticas isoladas de levedura não formam, por si só, vesículas bem seladas. Este problema pode, no entanto, ser facilmente ultrapassado através da formação de vesículas híbridas por fusão das membranas citoplasmáticas de levedura com lipossomas (Franzussoff e Cirillo, 1983). As vesículas obtidas desta forma, embora sejam adequadas para estudos de difusão facilitada de solutos, não possuem a capacidade de gerar uma força protomotriz (PMF – *Proton Motive Force*) estável com as características (interior negativo e alcalino) necessárias para estudos de transporte activo de nutrientes. A

ATPase existente na membrana citoplasmática não pode ser usada para este fim dado que, na sua orientação normal, o domínio catalítico se encontra localizado na superfície interna das membranas sem acesso ao ATP adicionado. Em vesículas invertidas a PMF gera um interior positivo e ácido, o que não é adequado para estudos de influxo zero-trans. A obtenção duma PMF estável, duradoura e com a orientação desejada é normalmente conseguida através da incorporação nas vesículas da enzima citocromo c oxidase. Este método foi inicialmente desenvolvido para estudos com transportadores bacterianos (Driessen *et al.*, 1985) e, posteriormente, adaptado para leveduras (Van Leeuwen *et al.*, 1991).

A caracterização do transporte activo de frutose em *S. pastorianus* e *S. bayanus* tem apresentado algumas dificuldades devido à inevitável interferência do sistema de difusão facilitada que está operacional nas mesmas células. Com base em estudos efectuados em quimiostato, verificou-se que algumas das características do simporte frutose/H⁺, nomeadamente a sua estequiometria, variam de acordo com o metabolismo celular e com a concentração de frutose disponível no ambiente em que as células se encontram (Rodrigues de Sousa, 1998). O estudo deste sistema de transporte em vesículas permitiria eliminar as interferências provocadas pelo metabolismo ou por alterações no estado energético das células. Porém, a baixa capacidade relativa do simporte e a sua coexistência permanente, embora com uma contribuição relativa variável, com um sistema de difusão facilitada tornam este tipo de estudos inviável. A identificação do gene *FSY1*, que codifica o simporte frutose/H⁺ em *S. pastorianus*, veio viabilizar a caracterização deste sistema de transporte em vesículas, uma vez que a inserção num mutante de *S. cerevisiae* *hxt-null* dum plasmídeo de elevado número de cópias contendo o gene *FSY1* permite obter células que transportam frutose apenas através dum sistema de transporte activo de elevada capacidade (Gonçalves *et al.*, 2000).

Embora o principal objectivo deste estudo tenha sido a caracterização do transporte activo de frutose de *S. pastorianus* em vesículas híbridas de membrana plasmática, foi também, para efeitos comparativos, efectuada em condições semelhantes a caracterização cinética em células inteiras do transporte de frutose na estirpe de *S. cerevisiae* usada neste trabalho.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Estirpe

A caracterização do transporte activo de frutose foi realizada na estirpe de *S. cerevisiae* PYCC 5624 (Gonçalves *et al.*, 2000). A expressão do simporte frutose/H⁺ nesta estirpe foi conseguida através da introdução num mutante *hxt-null* (*S. cerevisiae* PYCC 5623) do plasmídeo pT5 II que contém o gene *FSY1* isolado a partir de *S. pastorianus* PYCC 4457.

A estirpe de *S. cerevisiae* IH (EBY.VW4000 *ura3::FSY1::GFP* + pHXT7) é capaz de transportar frutose através do simporte Fsy1 e através dum sistema de difusão facilitada (Hxt7). Esta estirpe foi obtida inserindo os genes *FSY1* e *HXT7* no mutante *hxt-null* EBY.VW4000 (Rodrigues de Sousa *et al.*, 2004).

5.2.2 Meio e condições de cultura

Para o crescimento da levedura foi usado o meio mineral II (Apêndice I), suplementado com frutose 0,5 % p/v, extracto de levedura 0,1 % p/v e aminoácidos (histidina 0,005 % p/v, leucina 0,005 % p/v e triptofano 0,007 % p/v).

Para a obtenção de membranas plasmáticas, a levedura foi cultivada em balões Erlenmeyer de 5 L com 1,5 L de meio, agitados num incubador orbital a 250 rpm à temperatura de 30°C. As células foram recolhidas na fase exponencial do crescimento ($DO_{640\text{ nm}}$ entre 0,7 e 0,8) através de centrifugação a 10.000 rpm, a 4°C. Para a caracterização do transporte em células inteiras, a levedura foi cultivada nas mesmas condições mas utilizando balões Erlenmeyer de 1 L com 200 ml de meio de cultura.

O crescimento na presença de antimicina A foi efectuado em meio sólido YNB (*Yeast Nitrogen Base*) suplementado com frutose 1 % p/v, extracto de levedura 0,1 % p/v, aminoácidos (histidina 0,005 % p/v, leucina 0,005 % p/v e triptofano, 0,007 % p/v), 2 % p/v de agar e 4 µg/ml de antimicina A. As placas foram inoculadas adicionando, em duplicado, 5 µl duma suspensão celular com uma $DO_{640\text{ nm}} = 1,0$ e das respectivas diluições decimais até 10⁻⁴. As placas foram observadas após incubação numa estufa a 30°C durante 7 dias.

O crescimento em condições de semi-anaerobiose foi efectuado em meio mineral II, suplementado com frutose ou glucose 1 % p/v, extracto de levedura 0,1 % p/v e

aminoácidos (histidina 0,005 % p/v, leucina 0,005 % p/v e triptofano 0,007 % p/v), em balão Erlenmeyer de 250 ml com 200 ml de meio de cultura, fechado com uma rolha de borracha atravessada por uma agulha, e incubado num banho termostático a 30°C com agitação magnética.

5.2.3 Isolamento das membranas plasmáticas de levedura

O isolamento das membranas plasmáticas de levedura (com e sem o plasmídeo pT5II) foi iniciado com o rebentamento mecânico da parede celular seguido de separação diferencial de acordo com o protocolo descrito por Van Leeuwen *et al.* (1991) com algumas modificações.

Todos os passos foram efectuados a 4°C. As células recolhidas do meio de cultura por centrifugação, foram lavadas duas vezes com água e uma vez com tampão A (0,1 M glicina, 0,3 M KCl, pH 7,0) e ressuspendidas em 15 mL de tampão A com PMSF (0,1 mM). A suspensão obtida foi colocada num frasco de homogeneização (50 ml), ao qual se adicionou 35 g de esferas de vidro (0,25-0,35 mm de diâmetro). As células foram homogeneizadas duas vezes durante um minuto à velocidade máxima (4.000 rpm) num homogeneizador Braun MSK, refrigerado com neve carbónica. O homogeneizado resultante foi separado das esferas de vidro por filtração através dum filtro de fibra de vidro Jena Glass 25D2 e as esferas lavadas com tampão A.

O homogeneizado foi então centrifugado 10 min a 2.100×g, o sobrenadante filtrado através dum filtro de fibra de vidro (Whatman GF/C) e novamente centrifugado a 6.200×g durante 20 min. O sedimento obtido foi mantido em gelo e o sobrenadante novamente centrifugado 20 min a 6.200×g. Os dois sedimentos foram combinados e ressuspendidos em tampão A e novamente centrifugados durante 20 min a 6.200×g. O sedimento final foi ressuscitado em 15 ml de tampão A com 0,1 mM PMSF.

O pH da suspensão foi ajustado a 4,9, através da adição dum solução de tampão A com 0,1 M HCl, e a suspensão imediatamente centrifugada durante 10 min a 2.100×g. O sobrenadante foi mantido em gelo e o seu pH ajustado a 7,0. O sedimento foi ressuscitado em tampão A, o seu pH ajustado a 4,9 e centrifugado durante 10 min a 2.100×g. As duas fracções de sobrenadante foram reunidas, o seu pH foi ajustado a 5,0 e a suspensão centrifugada durante 3 min a 7.700×g. O pH do sobrenadante foi ajustado a 7,0, tendo sido em seguida congelado em azoto líquido.

Após descongelar, à temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada a 100.000×g durante 20 min. O sedimento obtido foi ressuspendido em tampão B (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) e novamente centrifugado (100.000×g, 20 min). O sedimento final foi ressuspendido em 1 ml de tampão B, homogeneizado e dividido em alíquotas de 100 µl que foram congeladas em azoto líquido.

5.2.4 Preparação de vesículas híbridas

Purificação de fosfolípidos de *E. coli*

Os fosfolípidos usados neste trabalho resultam duma preparação comercial de L- α -fosfatidiletanolamina de *E. coli* (Fluka, Suíça) purificada de acordo com o método de Viitanen *et al.* (1986) com modificações. Todos os passos foram efectuados sob uma atmosfera de azoto.

Dissolveu-se 500 mg de fosfolípidos em 4 ml de clorofórmio/metanol (9:1, v/v). Transferiu-se a solução para um frasco de 250 ml coberto com papel de alumínio, ao qual foram adicionados 150 ml duma solução de 2 mM DTT em acetona. Foi então deixada à temperatura ambiente, com agitação magnética, até ao dia seguinte. A mistura foi centrifugada durante 15 min a 900×g. O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento seco sob um fluxo de azoto. Depois de completamente seco, o sedimento foi ressuspendido em 100 ml duma solução 2 mM DTT em dietiléter e centrifugado (15 min a 900×g). O sobrenadante foi recolhido e evaporado sob vácuo num evaporador rotativo. Os fosfolípidos obtidos foram dissolvidos em 2-3 mL de clorofórmio e transferidos para um tubo previamente pesado. O clorofórmio foi evaporado e o tubo novamente pesado a fim de determinar a massa de fosfolípidos obtida. Os fosfolípidos purificados foram dissolvidos em clorofórmio, numa concentração final de 200 mg/ml, e guardados a -80°C sob atmosfera de azoto.

Preparação de lipossomas com citocromo c oxidase (COV)

A citocromo c oxidase usada neste trabalho, purificada a partir de coração de bovino de acordo com o método descrito por Yu *et al.* (1975), foi gentilmente cedida pela Doutora Fernanda Cássio (Departamento de Biologia, Universidade do Minho). A preparação de lipossomas com citocromo c oxidase foi efectuada de acordo com o método descrito por

van Leeuwen *et al.* (1991). Todos os passos anteriores à diálise foram efectuados em atmosfera de azoto.

Cem miligramas de fosfolípidos dissolvidos em clorofórmio foram colocados num tubo de vidro e o solvente removido num evaporador rotativo à temperatura ambiente. Ao resíduo foram adicionados 2,5 ml duma solução de fosfato de potássio (50 mM, pH 5,5) com 22,5 mg de octilglucosídeo (Sigma). A mistura foi saturada com azoto e os fosfolípidos ressuspendidos por sonicação num banho de ultra-sons, colocando a amostra em gelo a intervalos regulares a fim de evitar o seu sobreaquecimento. Quando se considerou a ressuspensão completada, foram adicionados 22,5 nmol de citocromo c oxidase, a mistura foi agitada e seguidamente mantida em gelo durante 10 min. Foi então transferida para um tubo de diálise (celulose, poro 24 Å, Medicell International Ltd.) e dialisada contra tampão fosfato (50 mM, pH 5,5) a 4°C durante, pelo menos, 12 h (a solução de tampão fosfato foi renovada após 3 h e 6h). A mistura (COV) foi então recolhida, o seu volume ajustado a 3 ml e dividida em alíquotas de 200 µl que foram conservadas em azoto líquido.

Fusão dos proteolipossomas com membranas plasmáticas de levedura

A preparação das vesículas híbridas de membrana plasmática (CL-PMV - *Cytochrome c oxidase Liposomes - Plasma Membranes Vesicles*) foi efectuada de acordo com o método descrito por van Leeuwen *et al.* (1991).

As amostras de membranas plasmáticas e COV foram descongeladas à temperatura ambiente. Misturou-se 100 µl de COV (3,333 mg de fosfolípidos) com 0,168 mg de membranas plasmáticas, aos quais foram adicionados 2 µl de 100 mM MgCl₂, 63 µl de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 5,5) e 5 µl de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 2,51). A mistura foi rapidamente congelada em azoto líquido e descongelada à temperatura ambiente. A fusão das vesículas foi efectuada por sonicação (2× 5 s) num banho de ultra-sons. No intervalo entre sonicações, a mistura foi arrefecida em gelo.

5.2.5 Determinação do volume vesicular

Para obter uma estimativa do volume vesicular, foram preparadas CL-PMV, tal como foi descrito em 5.2.4, às quais se adicionou aproximadamente 1 µCi de L-¹⁴C-glucose (Amersham, UK) antes do passo de congelação. A escolha de L-¹⁴C-glucose para efectuar

a determinação do volume vesicular prende-se com o facto de não existirem na membrana celular da levedura transportadores para este açúcar, o que permite que a quantidade de glucose incorporada nas vesículas se mantenha constante durante o decorrer do ensaio. Uma amostra de 15 μl de CL-PMV foi diluída em 2 ml de LiCl (100 mM, 4°C), filtrada através duma membrana de nitrato de celulose (0,45 μm de diâmetro de poro, Whatman) e lavada novamente com a mesma solução de LiCl. O filtro foi então colocado num frasco contendo líquido de cintilação (OptiPhase “HiSafe 2”, Wallac, Finlândia) e a radioactividade incorporada nas vesículas avaliada com um contador de cintilações (Packard Instrument Co. Inc., USA). A adsorção não-específica de açúcar radioactivo à membrana foi quantificada efectuando um ensaio semelhante no qual o LiCl foi substituído por água desmineralizada. O volume vesicular, expresso em $\mu\text{l}/\text{mg}$ fosfolípidos, foi então calculado com base na quantidade de radioactividade incorporada nas vesículas.

5.2.6 Ensaio de transporte de ^{14}C -frutose em vesículas híbridas

Num tubo de vidro com fundo cónico foram adicionados 200 μl de CL-PMV e o tubo colocado num banho termostaticado a 30°C com agitação magnética. Após 2 min, procedeu-se à adição de 10 μl de D-[U- ^{14}C]-frutose (Amersham, UK) para uma concentração final de 30 μM (aproximadamente 2 μCi). As vesículas foram energizadas 10 min após o início do ensaio através da adição de 5 μl de 0,6 mM citocromo c, 5 μl de ascorbato (0,6 M, pH 5,5) e 5 μl de 6 mM TMPD. A intervalos de tempo pretendidos foram recolhidos 15 μl da amostra, imediatamente diluídos em 2 ml de LiCl (100 mM, 4°C) e filtrados através dum filtro de nitrato de celulose (0,45 μm de diâmetro de poro, Whatman). Cada filtro foi lavado com 2 ml de LiCl e colocado num frasco com 6 ml de líquido de cintilação. A radioactividade incorporada foi medida num contador de cintilações. A adsorção não-específica ao filtro e a difusão simples nas membranas foi avaliada efectuando um ensaio análogo, mas com CL-PMV preparadas usando membranas isoladas de células sem o plasmídeo pT5II.

Para os ensaios em que se pretendia avaliar parâmetros cinéticos, as vesículas foram divididas em alíquotas de 30 μl e incubadas durante 4 min em presença da mistura de energização (2,5 μl), contendo citocromo c, ascorbato e TMPD em partes iguais. Este período de incubação é necessário para permitir que as vesículas possam alcançar o

máximo valor de PMF. A reacção foi iniciada com a adição da frutose radioactiva na concentração desejada, e interrompida após 1 min por diluição com 2 ml de LiCl a 4°C. A amostra foi imediatamente filtrada, lavada com LiCl e a quantidade de radioactividade incorporada determinada tal como anteriormente descrito. A adsorção não-específica ao filtro foi avaliada efectuando um ensaio em que a frutose radioactiva foi adicionada apenas após a diluição das vesículas com LiCl.

5.2.7 Determinação do gradiente de pH

A determinação do pH intravesicular foi efectuada de acordo com o método de Clement e Gould (1981). Numa seringa de plástico de 1 ml foi preparada uma coluna de Sephadex G25 (Pharmacia) equilibrada em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 5,5) com 1 mM de MgCl₂. Foram preparadas CL-PMV, tal como descrito em 5.2.4, às quais foram adicionados, antes do passo de congelação, 3 µl duma solução 10 mM de piranina (8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfonato) para uma concentração final de 100 µM. A coluna foi carregada com 300 µl de vesículas e centrifugada (1 min, 150×g). As vesículas foram eluídas durante a centrifugação e recuperadas no final. Na coluna, que foi descartada, permaneceu a piranina não incorporada. Numa célula de espectrofluorímetro, foram misturados 150 µl de vesículas assim obtidas com 1,5 ml de tampão (50 mM fosfato de potássio, 1 mM MgCl₂, pH 5,5). A fluorescência da amostra (comprimento de onda de excitação: 450 nm e comprimento de onda de absorção: 508 nm) foi medida a intervalos de aproximadamente 1 min até obter uma linha de base estável. Seguidamente, as vesículas foram energizadas com a adição de 5 µl de citocromo c (3 mM), 5 µl de ascorbato (3 M, pH 5,5) e 5 µl de TMPD (30 mM). Após ter sido alcançado o máximo de fluorescência, foi adicionado 1,5 µl duma solução do protonóforo FCCP (concentração final 5 µM) à amostra para desfazer o gradiente de pH. A calibração foi efectuada adicionando alíquotas de 2,5 µl de 5 N NaOH e medindo, após cada adição, a fluorescência e o pH da amostra (através da introdução dum microeléctrodo de pH na célula do espectrofluorímetro).

5.2.8 Determinação do potencial de membrana

O potencial de membrana foi determinado a partir da distribuição transvesicular do catião lipofílico tetrafenilfosfónio (TPP⁺). A acumulação de TPP⁺ no interior das vesículas foi avaliada com base na variação da concentração de TPP⁺ externa. Para este efeito foi usado

um eléctrodo específico de TPP⁺ preparado tal como descrito por Kamo *et al.* (1979). Todas as medições foram efectuadas utilizando um eléctrodo de referência de calomelanos.

Numa câmara de reacção termostatzada a 30°C e com agitação magnética foram colocados 2 ml de tampão (50 mM fosfato de potássio, 1 mM MgCl₂, pH 5,5) e efectuadas duas adições consecutivas de TPP⁺ (concentrações finais de 1 e 2 µM, respectivamente) para avaliar a capacidade de resposta do eléctrodo. A esta solução foram adicionados 30 µl de CL-PMV e registada a alteração provocada no potencial medido pelo eléctrodo de TPP⁺. Em seguida, a mistura foi energizada com a adição de 6,7 µl de 3 mM citocromo c, 6,7 µl de ascorbato (3 M, pH 5,5) e 6,7 µl de 30 mM TMPD, e registada a variação de potencial medida pelo eléctrodo de TPP⁺. Após a concentração de TPP⁺ no meio ter atingido o seu valor mínimo, foram adicionados 20 µl de valinomicina (concentração final 100 nM) para dissipar o gradiente de potássio e desenergizar as vesículas.

5.2.9 Ensaios de transporte em células inteiras

Foram utilizados dois métodos distintos para determinar as velocidades iniciais de transporte activo de frutose e calcular os parâmetros cinéticos. A velocidade inicial de entrada de protões foi estimada através da velocidade de alcalinização extracelular provocada pela adição de frutose a uma suspensão aquosa de células. Com a mesma suspensão celular foi também determinada a velocidade inicial de incorporação de ¹⁴C-frutose. A comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos permitiu determinar a estequiometria do simporte frutose/protão.

Para obter as suspensões celulares, as células, recolhidas nas condições descritas em 5.2.2, foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água desmineralizada fria. Em seguida, foram ressuspensas em água desmineralizada de modo a obter uma concentração de biomassa de, aproximadamente, 30 mg de peso seco/mL e mantidas em gelo.

Com o objectivo de quantificar a biomassa seca nas suspensões celulares, foram recolhidas amostras de 200 µl da suspensão celular usada em cada ensaio e colocadas em pequenos recortes de papel de alumínio previamente pesados. Após a incubação numa estufa a 70°C durante pelo menos 24 h (período de tempo necessário para secagem até peso constante), os recortes de papel de alumínio foram novamente pesados e os valores obtidos usados para calcular a biomassa seca.

Transporte de ^{14}C -frutose

O transporte de ^{14}C -frutose (Amersham, UK) foi efectuado tal como descrito em 2.2.5, com adaptações. Todos os ensaios foram efectuados a 30°C e o pH do tampão Tris-citrato foi 5,5, uma vez que foram essas as condições usadas nos ensaios efectuados com vesículas.

Influxo de protões

Para cada ensaio, a medição do pH da suspensão celular aquosa foi efectuada utilizando um eléctrodo combinado de pH (cat n° 52-09, CRISON) e um potenciómetro PHM240 (Radiometer, Copenhagen). Este último foi ligado a um computador com sistema operativo Windows 95 através duma porta RS 232C. A aquisição dos dados e a monitorização dos ensaios foram efectuados directamente no computador, usando um programa desenvolvido por nós especificamente para o efeito.

Os ensaios foram efectuados numa célula termostaticada a 30°C , munida de agitação magnética. Após a adição de $800\ \mu\text{l}$ de água desmineralizada e $200\ \mu\text{l}$ da suspensão celular previamente obtida, o pH foi ajustado a $5,5 \pm 0,1$ com HCl ou NaOH (para este efeito foram usadas soluções concentradas de forma a minimizar as alterações de volume). Uma vez obtida uma linha de base estável, foi adicionado um pequeno volume (até $10\ \mu\text{l}$) duma solução concentrada de frutose de forma a obter a concentração final desejada. O pH da suspensão celular foi registado durante cerca de 1,5 min a intervalos de 0,4 s. A calibração foi efectuada com base na variação de pH da suspensão celular observada após a adição duma quantidade conhecida de protões ($4\ \mu\text{l}$ de uma solução 10 mM HCl).

5.3 Resultados e discussão

No grupo designado por *Saccharomyces sensu stricto*, apenas as espécies *S. bayanus* e *S. pastorianus* possuem um sistema de transporte activo, do tipo simporte frutose/H⁺, específico para frutose (Rodrigues de Sousa *et al.*, 1990; 1995). A sua caracterização em células inteiras de leveduras apresenta algumas dificuldades resultantes das interferências provocadas pelo metabolismo dos açúcares e pela existência dum sistema de transporte de frutose, constitutivo, do tipo difusão facilitada. Estudos preliminares de transporte em vesículas, efectuados com membranas isoladas duma estirpe de *S. bayanus* (resultados não apresentados), não permitiram observar acumulação de frutose, mesmo quando as membranas foram isoladas em condições em que a capacidade do simporte foi maximizada. Estes resultados devem-se à presença nessas membranas dos transportadores de hexoses constitutivos, com maior capacidade relativa, que mascaram a acumulação de frutose no interior das vesículas. A clonagem do gene *FSY1* (Gonçalves *et al.*, 2000) permitiu ultrapassar esta limitação, dado que tornou possível a construção duma estirpe em que o simporte frutose/H⁺ é o único transportador de frutose existente.

A estirpe usada neste trabalho foi um mutante de *S. cerevisiae* incapaz de transportar hexoses e no qual foi inserido o gene *FSY1* através dum plasmídeo do tipo multicópia. Embora *S. cerevisiae* não produza naturalmente um simporte para frutose, este mutante, quando cultivado num meio com frutose, apresenta um sistema de transporte activo para este açúcar com características cinéticas semelhantes às anteriormente descritas em *S. pastorianus* PYCC 4457, estirpe a partir da qual o gene foi obtido.

5.3.1 Actividade das vesículas híbridas

Para este trabalho foram obtidas vesículas híbridas através da fusão das membranas plasmáticas de levedura com fosfolípidos de *E. coli*, uma vez que estudos anteriores já haviam demonstrado que as membranas plasmáticas de levedura não formam, por si só, vesículas bem seladas. Dado que o sistema de transporte estudado é um simporte de frutose com protões, foi necessário incorporar nas vesículas um sistema gerador de força protomotriz. Na Figura 5.1 encontra-se representado o esquema de funcionamento das vesículas usadas. A citocromo c oxidase inserida na membrana na orientação correcta, quando na presença de citocromo c reduzido no meio extravesicular, funciona como uma

bomba de protões gerando um gradiente electroquímico de protões ($\Delta\psi + Z\Delta\text{pH}$) que é usado para produzir uma acumulação intravesicular de frutose.

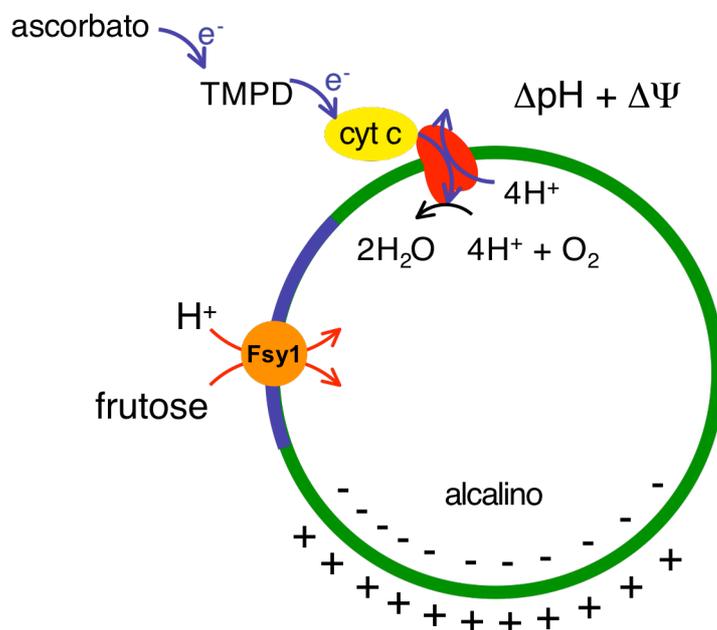


Figura 5.1 Representação esquemática do transporte activo de frutose em vesículas híbridas, obtidas por fusão de membranas plasmáticas duma estirpe de *S. cerevisiae hxt-null* que expressa Fsy1 (PYCC 5624) com proteolipossomas contendo citocromo c oxidase.

A escolha do pH usado nos ensaios foi determinante para que se pudesse obter uma boa razão de acumulação de frutose. Estudos anteriores (Van Leeuwen *et al.*, 1992; Gerós *et al.*, 1996) demonstraram que neste tipo de sistema o valor máximo da PMF é obtido a pH 6,2. Porém, também a actividade do próprio simporte depende do pH e, embora não seja conhecido o valor óptimo de funcionamento deste sistema de transporte em particular, sabe-se que os simportes açúcar/protão em leveduras apresentam uma actividade óptima à volta de pH 5 (Loureiro-Dias e Peinado, 1984). Foi portanto, necessário procurar um pH de trabalho que correspondesse a um compromisso entre as actividades do simporte e da citocromo c oxidase e que permitisse maximizar a capacidade de acumulação de frutose nas vesículas. Estudos preliminares efectuados a valores de pH entre 5,0 e 6,2 demonstraram que a pH 5,5 é possível observar uma acumulação significativa de frutose, enquanto a pH 6,2 essa acumulação é substancialmente menor e a pH 5,0 não foi

observada qualquer acumulação. Com base nestes resultados, foi escolhido o valor de pH 5,5 para efectuar todos os ensaios.

A razão proteína:fosfolípidos escolhida para a preparação das vesículas foi de 1:20. De acordo com os estudos efectuados por van Leeuwen *et al.* (1991) e por Gerós *et al.* (1996), este valor permite maximizar a acumulação do substrato. Embora a utilização duma quantidade de proteína mais elevada permitisse aumentar a fracção de vesículas contendo pelo menos um transportador, a diminuição da quantidade relativa de fosfolípidos torna as vesículas mais permeáveis e gera um valor da PMF mais baixo.

A citocromo c oxidase incorporada nas vesículas foi testada a fim de avaliar a sua capacidade para gerar uma força protomotriz com as características pretendidas (interior negativo e alcalino). Uma vez que não existe um método que permita determinar directamente a força protomotriz total, foi necessário quantificar, separadamente, o gradiente transmembranar de protões (ΔpH) e o potencial de membrana ($\Delta\psi$). O valor da força protomotriz total (PMF) foi então calculado de acordo com a equação:

$$\text{PMF} = \Delta\psi - Z\Delta\text{pH} \quad (5.1)$$

em que Z é igual a $2,303RT/F$ (igual a 60 mV a 30°C). O potencial de membrana foi determinado com o auxílio dum eléctrodo específico de TPP^+ . Tal como podemos ver na Figura 5.2, após a adição dum sistema de energização adequado (citocromo c, TMPD, ascorbato) o íão TPP^+ é acumulado no interior das vesículas, indicando a formação dum potencial de membrana (interior negativo). A adição de valinomicina (ionóforo de potássio) provoca a dissipação do potencial de membrana gerado e leva à saída do TPP^+ acumulado nas vesículas. O cálculo do potencial de membrana foi efectuado com base no modelo proposto por Lolkema *et al.* (1982). Como se pode observar na Tabela 5.1, nas condições usadas nos ensaios o potencial de membrana gerado foi de, aproximadamente, -37 mV.

A formação dum gradiente de pH foi avaliada medindo a variação da intensidade de fluorescência de piranina no interior das vesículas, uma vez que a fluorescência deste composto varia com o pH. Na Figura 5.3 podemos observar que após a adição da mistura de energização o espaço intravesicular se torna mais alcalino. A adição de FCCP (que actua como um protonóforo e desacoplador) provoca a dissipação do gradiente de pH

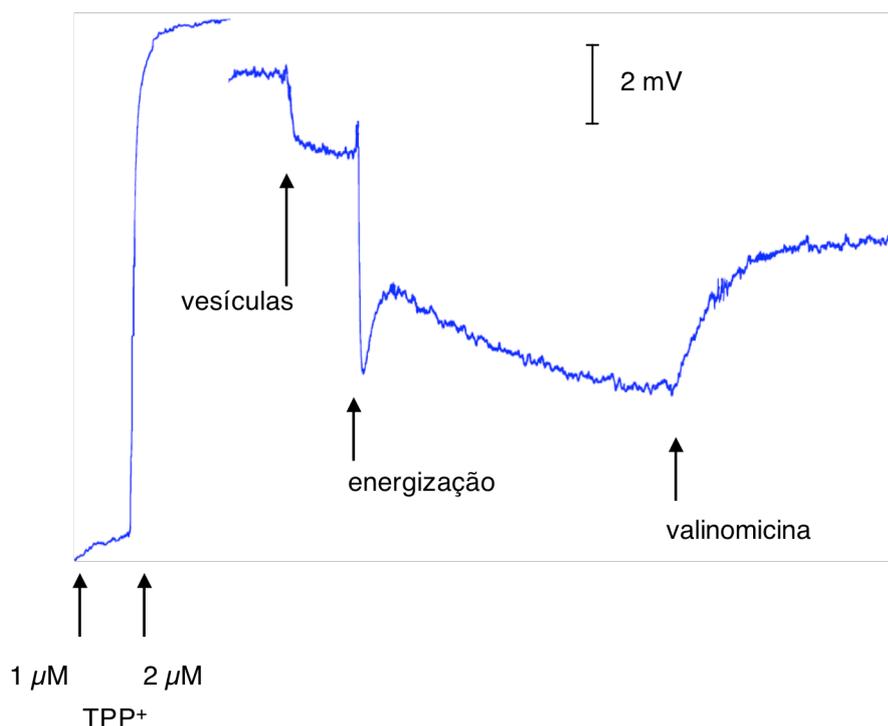


Figura 5.2 Acumulação do ião TPP^+ em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* PYCC 5624 utilizando um eléctrodo específico de TPP^+ para estimativa do potencial de membrana. As setas indicam a adição das vesículas, mistura de energização (citocromo c, TMPD e ascorbato) e valinomicina. A calibração foi efectuada aumentando a concentração final de TPP^+ na solução de $1\mu\text{M}$ para $2\mu\text{M}$.

gerado. Nas condições usadas nestes ensaios foi possível gerar um ΔpH igual a 1 unidade (interior alcalino).

Com base nos resultados obtidos para o ΔpH e $\Delta\psi$, a PMF total calculada de acordo com a equação 5.1 foi de, aproximadamente, -100 mV . Este valor, embora inferior aos obtidos por outros autores em condições semelhantes (Van Leeuwen *et al.*, 1991; 1992; Gerós *et al.*, 1996), proporciona as características pretendidas (interior negativo e alcalino) e é suficientemente elevado para permitir uma acumulação significativa de frutose nas vesículas.

5.3.2 Fração de vesículas activas

Estudos anteriores efectuados em vesículas híbridas (Ongjoco *et al.*, 1987; Van Leeuwen *et al.*, 1991; 1992; Gerós *et al.*, 1996; 1999) demonstraram que, usando a metodologia descrita em 5.2.4, a percentagem de vesículas que incorporam um transportador funcional

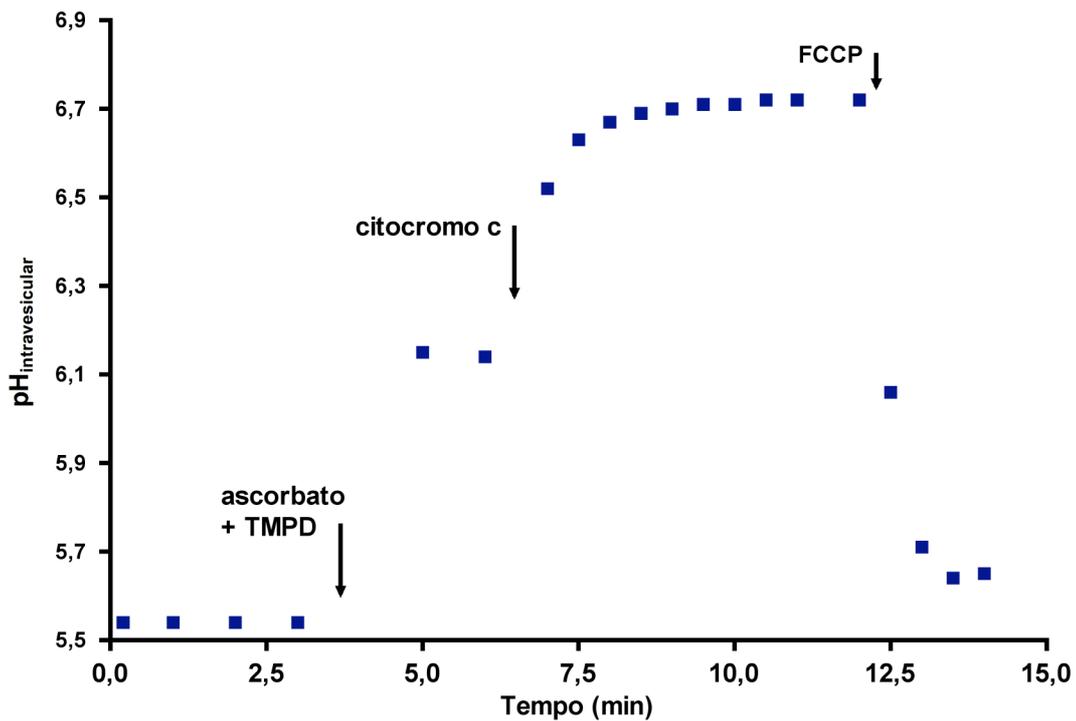


Figura 5.3 Determinação do gradiente de pH gerado em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* PYCC 5624. As vesículas foram preparadas na presença do composto fluorescente piranina e energizadas com citocromo c, TMPD e ascorbato. Após estabelecido o valor máximo de gradiente de pH, foi adicionado o protonóforo FCCP. Os valores de pH foram avaliados em função da fluorescência medida em cada uma das condições indicadas (ver 5.2.7).

é inferior a 50%. Para conhecer a razão de acumulação de frutose real é necessário saber qual a percentagem de vesículas que possui um simporte funcional. Para tal, foram efectuados ensaios de transporte de ^{14}C -frutose, sem energização, em CL-PMV preparadas a partir de membranas com e sem Fsy1. De acordo com o método proposto por Ongjoco *et al.* (1987), o transporte de frutose observado em vesículas sem simporte de frutose é devido a factores não-específicos (difusão simples, vesículas não seladas ou adsorção). Em vesículas com transportador temos, fundamentalmente, um transporte mediado devido à presença de Fsy1. A distinção entre a população de CL-PMV com e sem transportadores funcionais pode ser visualizada através duma entrada inicial de frutose nas vesículas com transportador substancialmente mais rápida do que nas vesículas sem transportador. Na Figura 5.4 encontra-se representado o transporte de frutose (% do valor de equilíbrio) em função do tempo para vesículas preparadas a partir de membranas com e sem Fsy1. A

percentagem de vesículas com transportador é determinada com base na diferença entre as duas curvas. O valor de equilíbrio foi determinado com base num volume intravesicular, determinado tal como descrito em 5.2.5, de $0,40 \mu\text{l/mg}$ fosfolípidos. Os resultados apresentados na Figura 5.4 mostram que aproximadamente 22,5% das vesículas possuem um simporte para frutose. Este valor é superior ao conseguido para o simporte de galactose em *K. marxianus* (11%) (Van Leeuwen *et al.*, 1991), mas inferior ao valor obtido para o simporte da maltose em *S. cerevisiae* (30%) (Van Leeuwen *et al.*, 1992).

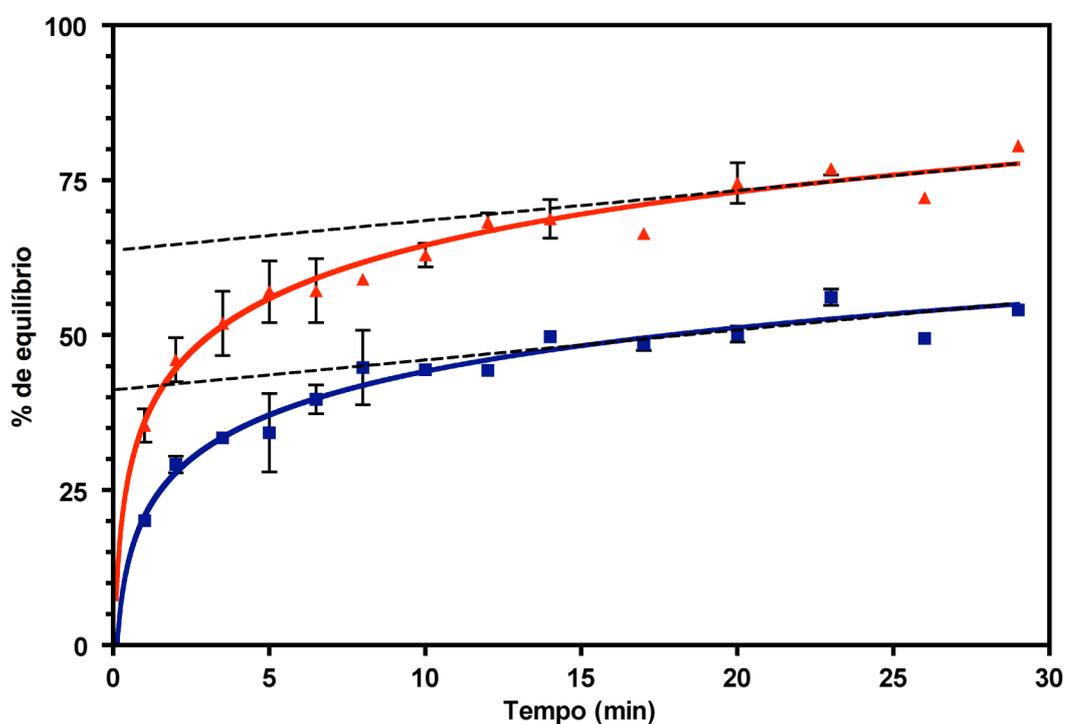


Figura 5.4 Transporte de ^{14}C -frutose em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* com (▲) o transportador Fsy1 (PYCC 5624) e sem (■) o transportador Fsy1 (PYCC 5623). O valor da fracção do equilíbrio em cada ponto foi calculado a partir da razão entre a concentração intravesicular de frutose na amostra e a respectiva concentração no equilíbrio.

5.3.3 Transporte activo de frutose em CL-PMV

A energização de CL-PMV incubadas em presença de $30 \mu\text{M}$ de ^{14}C -frutose permitiu observar uma acumulação de frutose no interior das vesículas cerca de seis vezes superior à concentração externa (Figura 5.5). Estes resultados demonstram que foi possível

reconstituir com sucesso o simporte de frutose em vesículas híbridas e confirmam que Fsy1 é efectivamente um transportador activo de frutose.

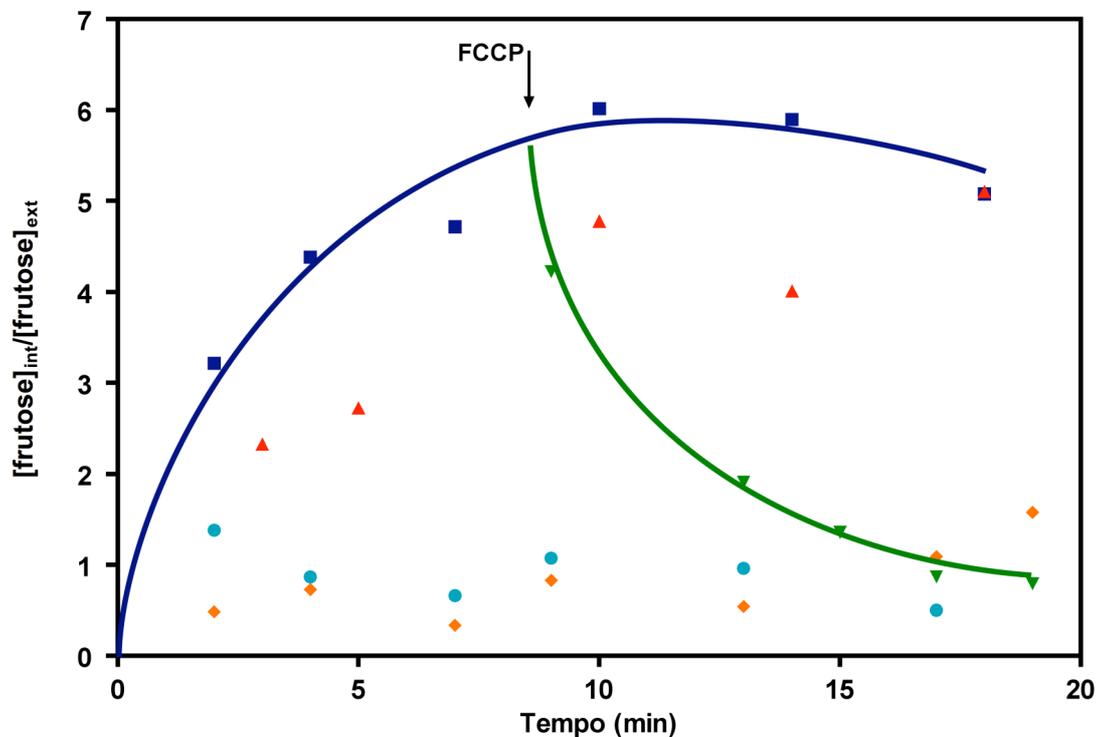


Figura 5.5 Efeito da adição de ionóforos na acumulação intravesicular de ^{14}C -frutose (■) em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* PYCC 5624 a pH 5,5. A adição da mistura de energização foi efectuada no instante $t = 0$ min. Nigericina (▲) e valinomicina (●) foram adicionadas 1 min antes da mistura de energização. FCCP foi adicionado 1 min antes (◆) ou 8 min após (▼) a adição da mistura de energização.

O efeito dos diferentes componentes da força protomotriz no transporte de frutose foi avaliado usando um desacoplador da cadeia de transporte de electrões (FCCP) e os ionóforos valinomicina (ionóforo de K^+) e nigericina (antiporte K^+/H^+ que dissipa o gradiente de prótons sem alteração do potencial de membrana). A adição de FCCP ($10 \mu\text{M}$) antes da mistura de energização impede por completo a acumulação de frutose. Quando o FCCP foi adicionado após a acumulação intracelular de frutose observou-se um rápido efluxo da frutose acumulada nas vesículas. A dissipação do gradiente de pH através da adição de nigericina (10 nM) causou uma ligeira redução no nível de acumulação de frutose nas vesículas. Por outro lado, a dissipação do potencial de

membrana através da adição de valinomicina (100 nM) impede praticamente qualquer acumulação de frutose. Embora estudos semelhantes efectuados com o simporte de maltose de *S. cerevisiae* (Van Leeuwen *et al.*, 1992) e *Candida utilis* (Van den Broek *et al.*, 1997) e com o simporte de galactose em *K. marxianus* (Van Leeuwen *et al.*, 1991) tenham demonstrado que a valinomicina provoca uma redução muito mais acentuada na acumulação de frutose do que a nigericina, não deixa de ser surpreendente a ausência de acumulação de frutose observada na presença de valinomicina, dado que o ΔpH existente nestas condições deveria ser suficiente para permitir o transporte activo de frutose. De qualquer forma, van den Broek *et al.* (1997) referem que a baixa acumulação de açúcar na presença de valinomicina poderá reflectir não apenas um efeito na dissipação do $\Delta\psi$, mas resultar também duma inibição não-específica do próprio transportador pela valinomicina ou duma inibição do transporte do açúcar causada por uma elevada concentração intravesicular de iões K^+ .

A especificidade do simporte de frutose foi avaliada através da adição de açúcares não radioactivos (30 mM) a vesículas após a energização e próximo do máximo de acumulação. Tal como podemos ver na Figura 5.6, a adição de D-frutose fria provoca um rápido efluxo da ^{14}C -frutose acumulada. Este resultado está perfeitamente de acordo com o esperado, uma vez que a adição duma elevada concentração de frutose não radioactiva relativamente à concentração de ^{14}C -frutose faz com que haja uma permuta entre a frutose marcada existente no interior das vesículas e a frutose não marcada adicionada, o que provoca a redução aparente na acumulação de ^{14}C -frutose observada. A adição de L-sorbose nas mesmas condições provoca um efeito semelhante, embora a permuta não seja tão rápida devido a uma menor afinidade do transportador para a sorbose (Rodrigues de Sousa, 1998). Ao efectuarmos a adição de D-glucose não foi observado qualquer efeito na acumulação de frutose, o que significa que este açúcar não é um substrato para o simporte de frutose. Os resultados obtidos estão de acordo com estudos de especificidade efectuados em células inteiras (Cason *et al.*, 1986; Rodrigues de Sousa, 1998) que indicam que para além da D-frutose este transportador é também capaz de transportar L-sorbose, mas não D-glucose.

Para determinar os parâmetros cinéticos do transportador em CL-PMV foram efectuados ensaios de transporte numa gama de concentrações de frutose entre 30 e 750 μM . O período de incorporação foi dum minuto, tendo sido efectuados ensaios preliminares para

confirmar que este tempo correspondia a condições para determinar velocidades iniciais. Os parâmetros cinéticos foram calculados por regressão não-linear usando o programa GraphPad Prism. Nestas condições, o transporte de frutose ocorre segundo uma cinética de saturação monofásica do tipo Michaelis-Menten (Figura 5.7) com um K_m de 0,53 mM e V_{max} de 0,69 nmol frutose·(min·mg fosfolípidos)⁻¹.

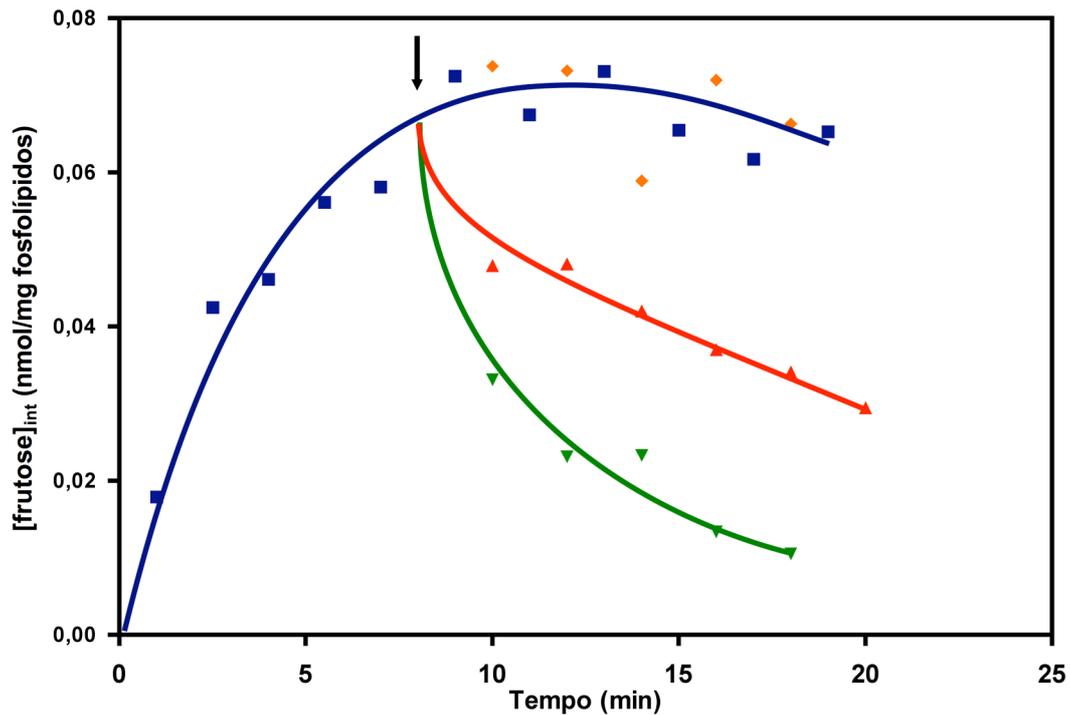


Figura 5.6 Acumulação de ¹⁴C-frutose (■), numa concentração inicial de 30 μM, em vesículas híbridas de *S. cerevisae* PYCC 5624. O ensaio foi iniciado com a adição da mistura de energização. A seta indica a adição de frutose 30 mM (▼), sorbose 30 mM (▲) ou glucose 30 mM (◆) não radioactivas.

A estequiometria do simporte frutose/H⁺ (η_{ap}) foi calculada através da equação 5.2 (Driessen *et al.*, 1987), em que $\Delta\mu_{frutose}$ representa o gradiente químico de frutose e F a constante de Faraday:

$$\eta_{ap} = \frac{\Delta\mu_{frutose}}{F \cdot PMF} \quad (5.2)$$

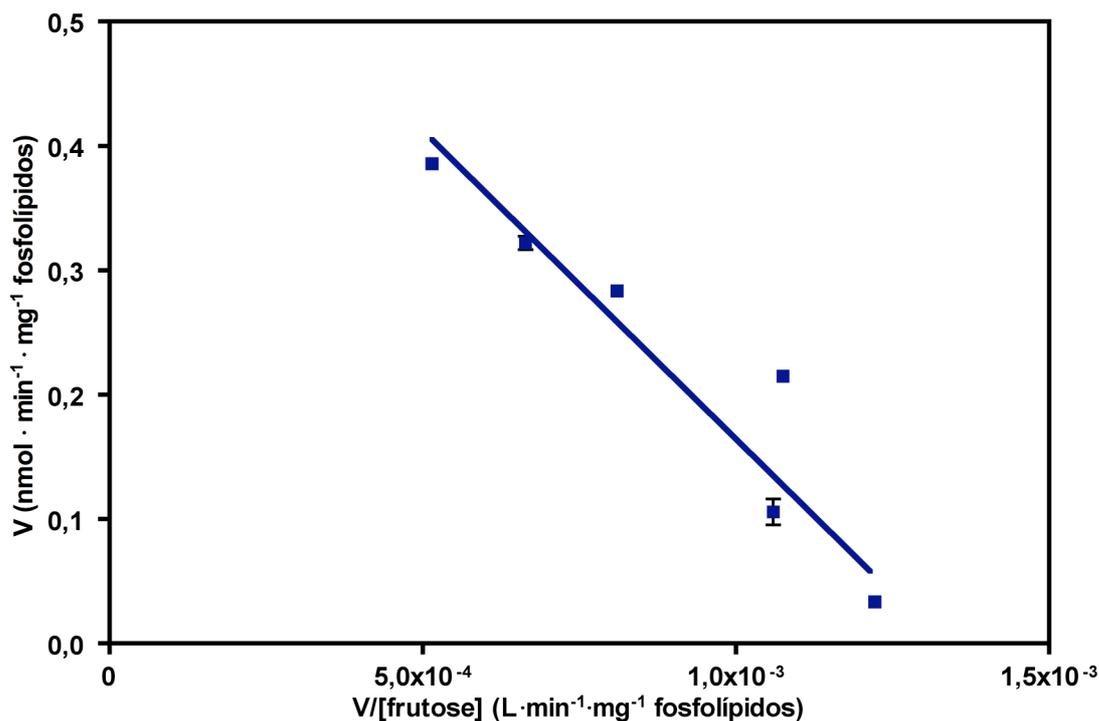


Figura 5.7 Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ^{14}C -frutose em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* PYCC 5624 (pH 5,5; 30°C). As vesículas foram energizadas 4 min antes da adição do açúcar radioactivo.

Os resultados obtidos (Tabela 5.1) indicam que o simporte tem uma estequiometria 1:2, o que significa que por cada molécula de frutose são co-transportados dois protões. Este resultado é claramente diferente do que foi encontrado para outros simportes de açúcares em leveduras (Postma e Van den Broek, 1990; Van Leeuwen *et al.*, 1992; Van den Broek *et al.*, 1997), para os quais a estequiometria calculada foi sempre aproximadamente 1:1. Isto indica que o simporte de frutose apresenta uma eficiência energética 50% inferior à encontrada para todos os simportes de açúcares até agora descritos em leveduras ou em outros organismos.

Tabela 5.1 Parâmetros para a determinação da estequiometria do simporte frutose/ H^+ em vesículas híbridas de *S. cerevisiae* PYCC 5624

$\Delta\psi$ (mV)	$Z\Delta\text{pH}$ (mV)	PMF (mV)	$\Delta\mu_{\text{frutose}}/F$ (mV)	η_{ap}
-37,3	61,4	98,7	48,5	0,49

Z é o factor na conversão de unidades de pH em mV. O valor usado foi 60 mV.

5.3.4 Transporte activo de frutose em células inteiras

A título comparativo, foi também caracterizado o transporte de frutose em células inteiras, nas mesmas condições experimentais usadas para os ensaios em vesículas (30°C, pH 5,5). As velocidades iniciais de transporte foram estimadas com ^{14}C -frutose e através do influxo de prótons associado à entrada do açúcar. Em qualquer dos casos, foi observada uma cinética de saturação do tipo Michaelis-Menten (Figura 5.8) os parâmetros cinéticos foram calculados tal como anteriormente descrito para as vesículas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.2. As afinidades do simporte avaliadas com base no transporte de ^{14}C -frutose ($K_m = 0,44 \text{ mM}$) e através do influxo de prótons ($K_m = 0,35 \text{ mM}$) são muito semelhantes. Relativamente à capacidade do transportador, o valor calculado a partir do transporte de ^{14}C -frutose - $3,2 \text{ mmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mg peso seco})^{-1}$ foi cerca de metade do calculado para o influxo de prótons - $7,0 \text{ mmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mg peso seco})^{-1}$. A estequiometria do simporte frutose/ H^+ determinada com base nestes valores de V_{max} é também de 1:2.

Tabela 5.2 Constantes cinéticas correspondentes ao transporte de ^{14}C -frutose e ao influxo de prótons associado à entrada de frutose em células de *S. cerevisiae* PYCC 5624 (pH 5,5; 30°C)

	V_{max} $\text{mmol}\cdot(\text{h}\cdot\text{mg peso seco})^{-1}$	K_m (mM)
Incorporação de ^{14}C -frutose	$3,2 \pm 0,2$	$0,44 \pm 0,06$
Influxo de prótons	$7,0 \pm 0,4$	$0,35 \pm 0,04$

Os resultados obtidos com células inteiras, nomeadamente no que respeita à afinidade e estequiometria do transportador, são totalmente concordantes com os que foram alcançados com as vesículas híbridas. Vários autores (Ramos *et al.*, 1989; Van Leeuwen *et al.*, 1992; Van den Broek *et al.*, 1997; Gerós *et al.*, 1999), ao estudarem outros transportadores de açúcares de leveduras em vesículas, verificaram que a afinidade dos transportadores em células inteiras é em geral maior do que a encontrada em vesículas, sendo esta diferença explicada pela alteração do ambiente lipídico em que os transportadores estão inseridos. Embora neste trabalho também tenha sido observada uma diminuição da afinidade do transportador em vesículas relativamente a células inteiras, a

diferença é muito reduzida, o que significa que os fosfolípidos usados na preparação das CL-PMV não perturbam significativamente o funcionamento do simporte de frutose.

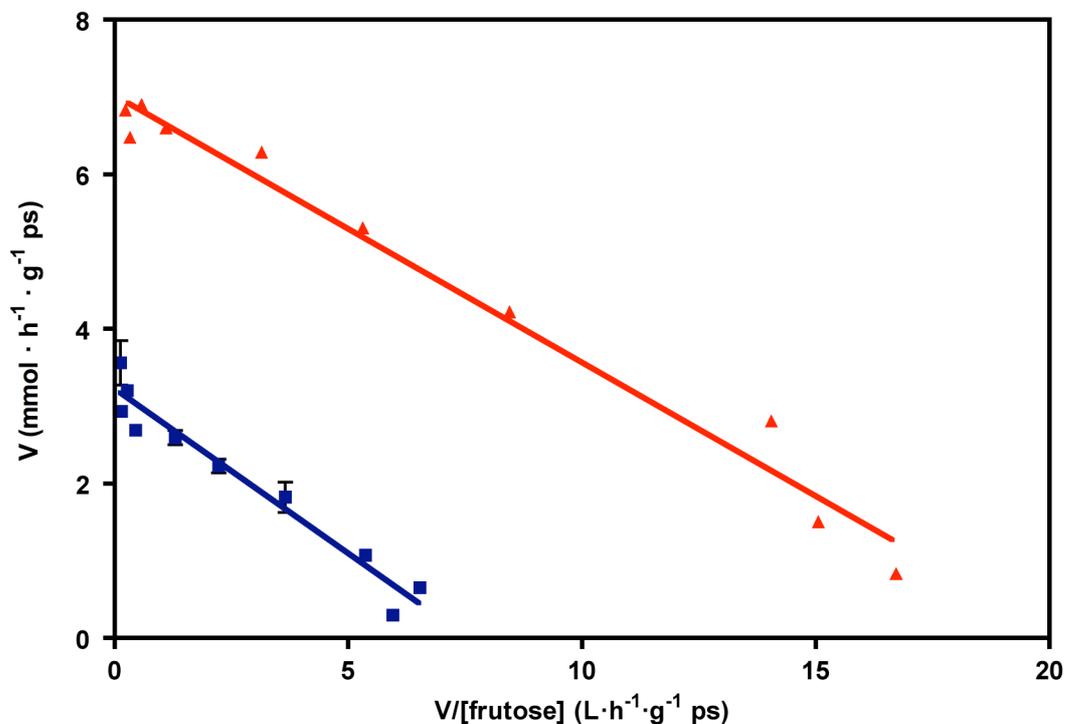


Figura 5.8 Representação Eadie-Hofstee das velocidades iniciais de transporte de ¹⁴C-frutose (■) e do influxo de prótons (▲) associado ao transporte de frutose em *S. cerevisiae* PYCC 5624 (pH 5,5; 30°C).

Ao compararmos os nossos resultados com os do estudo do simporte frutose/H⁺ efectuado por Rodrigues de Sousa (1998) na estirpe de *S. pastorianus* PYCC 4457, a mesma estirpe usada por Gonçalves *et al.* (2000) para isolar o gene *FSY1*, verificamos que a estequiometria por nós determinada para simporte frutose/H⁺ (1:2) é semelhante à encontrada por esta autora em quimiostato.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o simporte frutose/H⁺ codificado pelo gene *FSY1* de *S. pastorianus* foi reconstituído com sucesso num sistema de vesículas híbridas obtido através da fusão de membranas plasmáticas de levedura com fosfolípidos de *E. coli* contendo citocromo c oxidase.

Se considerarmos que num metabolismo fermentativo o rendimento energético é de duas moles de ATP por mole de frutose consumida e, se o único sistema de transporte de frutose for um simporte com protão com uma estequiometria de 1:2, tal como acontece no caso da estirpe por nós usada neste estudo, é de esperar que todo o ATP produzido seja usado no transporte não existindo energia disponível para produção de biomassa e outras funções celulares.

Para testar esta hipótese, foram efectuados ensaios de crescimento em meio sólido YNB com 1% p/v de frutose suplementado com antimicina A, que é um inibidor da cadeia respiratória, de forma a obter um metabolismo exclusivamente fermentativo. Para efeitos comparativos foi também testada a estirpe IH que, para além do sistema de transporte activo para frutose codificado pelo gene *FSY1*, possui um sistema de transporte do tipo difusão facilitada, codificado pelo gene *HXT7*.

Os resultados obtidos (Figura 5.9) mostram que a estirpe que apenas possui o sistema de transporte activo para frutose não é capaz de crescer em meio YNB com antimicina, enquanto que a estirpe que possui os dois sistemas de transporte é capaz de se desenvolver normalmente nestas condições. Os resultados obtidos apoiam a hipótese apresentada, uma vez que em condições em que não existe metabolismo respiratório e em que a frutose apenas pode entrar na célula através do simporte frutose/H⁺ o rendimento energético não parece ser suficiente para suportar o crescimento desta levedura.

Fomos também avaliar o efeito do transporte activo de frutose no coeficiente de rendimento em biomassa quando a levedura é cultivada em meio líquido em condições de semi-anaerobiose. Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 5.3.

Nas condições de semi-anaerobiose usadas o metabolismo energético das células deverá ser quase exclusivamente fermentativo. A estirpe IH, que possui dois transportadores de hexoses (*Hxt7* e *Fsy1*), quando é cultivada num meio com glucose apenas utiliza o mecanismo de difusão facilitada (*Hxt7*), uma vez que o simporte *Fsy1* é específico para frutose, pelo que nestas condições o custo energético do transporte deverá ser nulo. Quando esta mesma estirpe é cultivada num meio com frutose tanto o sistema de difusão facilitada como o simporte contribuem para o transporte de frutose para o interior da célula. Nestas condições, o rendimento em biomassa é ligeiramente mais baixo do que em meio com glucose (93 %) dado que parte do ATP produzido pela fermentação é gasto com o transporte de frutose e, por isso, não pode ser usado para a produção de biomassa.

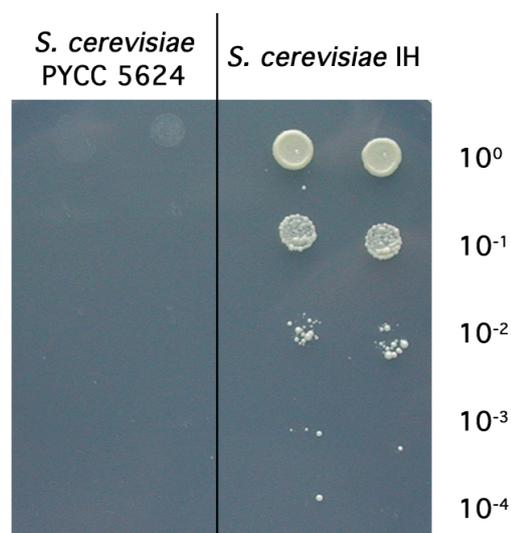


Figura 5.9 Crescimento de *S. cerevisiae* PYCC 5624 (apenas com Fsy1) e da estirpe IH (expressando Fsy1 e Hxt7) em meio de cultura sólido com 1% p/v frutose e 4 µg/ml antimicina A. As placas foram incubadas a 30°C durante uma semana. O inóculo consistiu numa suspensão celular com $DO_{640\text{ nm}} = 1$ e respectivas diluições até 10^{-4} .

Tabela 5.3 Efeito do transporte activo de frutose no coeficiente de rendimento em biomassa de *S. cerevisiae*, em meio mineral com 1% de glucose ou de frutose em condições de semi-anaerobiose em cultura descontínua a 25°C

Estirpe	Fonte de carbono e energia	Y_{biomassa}^*
PYCC 5264	frutose	0,034
IH	frutose	0,048
IH	glucose	0,051

* g biomassa/ g açúcar

Tal como seria de esperar, a estirpe PYCC 5624 que tem como único transportador de frutose o simporte codificado pelo gene *FSY1* apresenta um rendimento em biomassa ainda mais baixo do que a estirpe IH (67% do rendimento em biomassa em meio com glucose), pois neste caso toda a frutose entra na célula através do sistema de transporte activo.

Capítulo 6:
Considerações finais e
perspectivas

6.1 Influência da maltose no transporte de glucose

É bem conhecido o efeito de repressão exercido pela glucose na utilização de fontes de carbono alternativas. Vários autores referem ainda que, para além da glucose, outros açúcares, tais como a maltose ou a galactose, são capazes de reprimir os genes envolvidos no metabolismo de fontes de carbono mais dificilmente assimiláveis (Gancedo, 1992; Rodriguez e Gancedo, 1999; Belinchon e Gancedo, 2003; Rodrigues de Sousa *et al.*, 2004). Porém, no decorrer deste trabalho, verificámos pela primeira vez que a maltose, em determinadas condições, também consegue influenciar o transporte de glucose.

Um dos efeitos observados foi o da capacidade da maltose para inibir competitivamente o transporte de glucose, embora a maltose não seja substrato dos transportadores de glucose. Esta inibição existe, aparentemente, em todas as leveduras do grupo *Saccharomyces sensu stricto*, pode ser observada tanto para o sistema de alta como para o de baixa afinidade e é específica de maltose, i.e., não foi observada para outros dissacáridos de glucose.

Embora a afinidade dos transportadores de glucose para a maltose seja baixa (cerca duma ordem de grandeza inferior à afinidade para glucose), em misturas dos dois açúcares em que a concentração relativa de maltose seja consideravelmente mais elevada poderá ocorrer uma redução significativa da velocidade de transporte de glucose pela levedura. Isso poderá conduzir, por sua vez, a um aumento do tempo de fermentação de misturas de glucose e maltose e a uma redução do peso relativo da fermentação no metabolismo energético da glucose. É concebível que este tipo de situações possa ocorrer no mosto de cerveja ou mesmo na panificação.

O outro fenómeno observado relaciona-se com a perda de capacidade de transporte de glucose em leveduras filogeneticamente próximas de *Saccharomyces cerevisiae*, tal como investigado por nós em *S. bayanus* PYCC 4565. Quando cultivada em meio com maltose, esta levedura deixou de transportar glucose em consequência da repressão da transcrição dos genes *HXT6/7* pela maltose. Estes resultados são, aparentemente, semelhantes aos observados por Diderich *et al.* (2001) relativamente à regulação do transportador de glucose Hxt5, que também não é expresso durante o crescimento em maltose.

Devido ao elevado grau de semelhança entre os genes *HXT6* e *HXT7*, não nos foi possível desenhar sondas que permitissem avaliar o efeito da maltose na expressão diferencial destes dois genes. Contudo, os níveis de expressão do gene *HXT6* são, numa forma geral, baixos (Liang e Gaber, 1996; Diderich *et al.*, 1999a), pelo que o fenómeno de repressão pela maltose deverá estar relacionado com a regulação da transcrição do gene *HXT7*.

A forma como é regulada a transcrição deste gene ainda não é completamente conhecida. Embora se saiba que a expressão do gene *HXT7* é activada na presença de baixas concentrações de glucose (Diderich *et al.*, 1999a; Luyten *et al.*, 2002), através duma via de transdução de sinal dependente do sensor de glucose Snf3, Ye *et al.* (2001) observaram que este gene apresenta um nível elevado de expressão basal que também depende de Snf3, mesmo na ausência de glucose no meio de cultura. Na presença de elevadas concentrações de glucose não é possível detectar a transcrição deste gene (Diderich *et al.*, 1999a). Embora não tenha, até agora, sido descrito qualquer mecanismo que explique a repressão observada, é possível que esta ocorra através duma via de transdução de sinal independente de Snf3.

Consideramos que uma melhor compreensão das bases moleculares do fenómeno observado em *S. bayanus* PYCC 4565 deverá passar, em primeiro lugar, por uma melhor elucidação dos mecanismos que regulam a transcrição do gene *HXT7* em *S. cerevisiae* e espécies relacionadas. O trabalho de Jansen *et al.* (2002) poderá fornecer pistas para um estudo mais aprofundado sobre mecanismos de regulação adicionais. Segundo estes autores, quando a levedura *S. cerevisiae* é colocada na presença de elevadas concentrações de maltose verifica-se um efluxo de glucose através dos transportadores de hexoses (Hxt).

Outro aspecto interessante que surgiu no decorrer deste trabalho foi a identificação, em *S. bayanus* PYCC 4565, dum possível novo transportador de hexoses com elevado grau de homologia com o gene *HXT5*. A existência deste gene foi detectada a partir da análise do produto da amplificação por PCR, a partir do DNA total de *S. bayanus* PYCC 4565, usando *primers* específicos para o gene *HXT5*.

O fragmento encontrado, quando comparado com *HXT5*, apresenta uma deleção correspondente a 36 nucleótidos e uma homologia de 89 % relativamente às sequências conhecidas para *S. bayanus* (Cliften *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2003). A nossa descoberta deverá ser confirmada através da sequenciação completa do gene e sua localização no genoma da levedura. Vale a pena referir, a este propósito, que alguns autores consideram

que *S. bayanus* deve ser subdividido em duas variedades: var. *bayanus* e var. *uvarum* (Naumova *et al.*, 2005). É possível que esta última variedade, filogeneticamente mais próxima de *S. cerevisiae*, se distinga da primeira no que respeita ao gene *HXT5*.

6.2 Efeito da desrepressão para a utilização de maltose no transporte de glucose

As estirpes estudadas neste trabalho foram construídas por Klein *et al.* (1996; 1997) com o intuito de obter mutantes de *S. cerevisiae* desreprimidos para a utilização de maltose. Estes autores observaram que os mutantes *MAL^c* e *Δmig1 MAL^c* apresentavam taxas específicas de crescimento em glucose superiores à da estirpe selvagem. Estes resultados, em conjunto com as evidências experimentais que obtivemos de que existem interações entre a maltose e o transporte de glucose, levaram-nos a caracterizar melhor este conjunto de mutantes no que respeita às taxas de fermentação e respiração bem como ao transporte de glucose e de maltose.

No que respeita às taxas específicas de fermentação e respiração de glucose, embora os valores obtidos para os diferentes mutantes sejam ligeiramente superiores aos observados para a estirpe selvagem, as diferenças observadas não foram muito significativas.

Relativamente à cinética de transporte de glucose, verificou-se, no entanto, que a velocidade máxima de transporte para os mutantes *Δmig1* era mais do dobro da observada para a estirpe selvagem. Tal como pudemos demonstrar, este aumento da capacidade de transporte de glucose resulta dum aumento dos níveis de expressão dos genes *HXT3* e *HXT4*. Estes resultados indicam que qualquer destes transportadores se encontra sujeito a repressão por parte da proteína Mig1, o que não está inteiramente de acordo com o modelo de regulação proposto por Özcan e Johnston (1995; 1999), que propõem que a expressão do gene *HXT3* não é regulada por Mig1.

Quanto ao metabolismo da maltose, observou-se um ligeiro aumento das taxas específicas de fermentação e de respiração bem como da velocidade máxima de transporte de maltose relativamente à estirpe selvagem. A serem confirmadas as observações de Klein *et al.* (1997), estes aumentos não se traduziram directamente numa maior taxa específica de crescimento em maltose.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com as conclusões de outros autores (Teusink *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 1999; Reijenga *et al.*, 2001; Elbing *et al.*, 2004) quanto ao controlo que o transporte apresenta no fluxo metabólico global. Embora o transporte possa apresentar um elevado nível de controlo sobre o fluxo glicolítico em determinadas condições, pode já não ser o passo limitante quando se alteram essas condições. Assim, o aumento da capacidade de transporte não provoca necessariamente um aumento proporcional do fluxo glicolítico.

6.3 Transporte activo de frutose em *Saccharomyces*: novos aspectos

Embora tenhamos procedido a uma avaliação dos custos energéticos do simporte frutose/H⁺ em *S. bayanus* PYCC 4565, utilizando um quimiostato em condições de anaerobiose, não foi possível quantificar o ATP consumido pelo sistema de transporte activo durante a fermentação por duas razões fundamentais: (1) devido à coexistência nas células do sistema de transporte activo de frutose com o sistema de difusão facilitada; (2) por não terem sido determinadas as constantes cinéticas do transporte em células obtidas nas condições ensaiadas. Porém, verificou-se que à taxa de diluição mais baixa (0,025 h⁻¹) a produtividade específica em etanol foi 54% mais elevada e o coeficiente de rendimento em biomassa foi 30% mais baixo em células cultivadas em meio mineral com frutose do que no mesmo meio com glucose. Estes resultados mostram que, em células que apresentam um metabolismo fermentativo, uma parte significativa da energia produzida é gasta no transporte activo de frutose.

A identificação do gene responsável pelo transporte activo de frutose em *S. pastorianus* PYCC 4457 e a sua expressão num mutante *hxt-null* de *S. cerevisiae* (Gonçalves *et al.*, 2000) permitiram produzir uma estirpe que apenas é capaz de transportar frutose através do simporte frutose/H⁺. Esta estirpe veio possibilitar uma melhor caracterização do mecanismo de transporte bem como uma avaliação da estequiometria do simporte sem a interferência de outro sistema de transporte.

O simporte frutose/H⁺ apresenta um conjunto de características bastante interessantes e significativamente diferentes de outros sistemas de transporte activo de açúcares, nomeadamente o ser muito específico e não transportar glucose e, conforme observado em células cultivadas em quimiostato aeróbio, o facto da estequiometria variar de acordo

com a taxa de diluição (Rodrigues de Sousa, 1998). Recentemente, foram obtidos resultados pelo mesmo grupo que sugerem que as alterações de estequiometria observadas dependem do fluxo glicolítico e não da concentração de frutose no fermentador (C. Roca, comunicação pessoal).

O estudo do sistema de transporte activo foi efectuado em vesículas híbridas contendo apenas este sistema de transporte de frutose, o que também permite a sua caracterização independente do metabolismo celular.

A estequiometria do simporte frutose/H⁺, determinada em células recolhidas na fase exponencial de crescimento em frutose 0,5 % p/v, é de 1:2, o que inviabiliza o crescimento se o metabolismo for exclusivamente fermentativo, tal como ficou demonstrado pela incapacidade de crescimento em meio com antimicina A.

No que respeita à regulação da expressão deste transportador, os nossos resultados estão de acordo com a repressão do gene *FSY1* por elevadas concentrações de glucose ou frutose, funcionando as baixas concentrações destes açúcares como activadores da transcrição (Rodrigues de Sousa *et al.*, 2004).

6.4 Perspectivas

A glucose é o monossacárido mais abundante em ambientes naturais e também a principal fonte de carbono e energia para a grande maioria dos organismos organoquímio-heterotróficos. As leveduras do género *Saccharomyces*, em particular, estão extremamente bem adaptadas à utilização eficiente deste açúcar numa gama bastante alargada de concentrações. Esta adaptação traduz-se numa enorme diversidade de transportadores de hexoses que *S. cerevisiae* e espécies muito próximas possuem e da forma como são regulados.

O modelo de regulação do transporte de hexoses proposto por Özcan e Johnston (1995; 1999) apresenta lacunas e é incapaz de explicar alguns dos fenómenos observados neste trabalho, nomeadamente a influência da maltose na regulação do transporte de glucose ao nível da transcrição. Considerando a importância da maltose como substrato em muitas das fermentações industriais protagonizadas por *S. cerevisiae*, é fundamental compreender melhor o(s) mecanismo(s) de regulação que este dissacárido pode accionar. Para isso, será necessário identificar os componentes da via de transdução de sinal responsável pelo

fenómeno observado e quais as principais diferenças, a nível molecular, entre as estirpes que exibem esse fenómeno e as restantes estirpes.

A pesquisa dos genes transportadores de glucose efectuada neste trabalho resultou em fortes indícios de que *S. bayanus* PYCC 4565 possui um conjunto de genes *HXT* diferente dos existentes nas estirpes de *S. cerevisiae* e *S. bayanus* cujas sequências genómicas são conhecidas. É provável a existência de pelo menos um novo gene *HXT* com elevado grau de homologia com *HXT5*. A sequenciação e identificação de todos os transportadores de hexoses existentes em *S. bayanus* PYCC 4565 poderá não só levar à identificação de novos transportadores de glucose, mas também contribuir para explicar algumas das características particulares que esta levedura apresenta a nível da regulação do transporte de glucose.

O estudo do transporte de glucose efectuada em mutantes *Δmig1* mostrou que o aumento da capacidade de transporte de glucose observada nestes mutantes resulta duma desrepressão dos genes *HXT3* e *HXT4*. Estes resultados indicam que qualquer dos correspondentes transportadores de glucose é regulado pela proteína Mig1 e sugerem que, contrariamente ao proposto por Özcan e Johnston (1995), o gene *HXT3* apresenta um mecanismo de regulação semelhante a *HXT4* e não a *HXT1*. São necessários mais estudos a fim de elucidar convenientemente o mecanismo de regulação de *HXT3*.

Como já referimos, a quantificação dos custos energéticos do transporte activo de frutose em *S. bayanus* não foi completamente conseguida, mas a investigação realizada suscitou novas questões e deixou outras em aberto. Tendo em conta que foi determinada uma estequiometria frutose/protão de 1:2, é de esperar que quando o metabolismo é fermentativo e a capacidade relativa do simporte elevada, face à difusão facilitada via transportadores Hxt, a célula não consiga produzir energia suficiente para assegurar o crescimento. Para testar esta hipótese, seria importante efectuar ensaios em quimiostato anaeróbio com determinação simultânea das constantes cinéticas do transporte e quantificação dos custos energéticos do simporte frutose/H⁺. A escolha da estirpe de *S. bayanus* ou *S. pastorianus* a estudar teria de ter em atenção as capacidades naturais relativas dos dois sistemas de transporte de frutose. Ainda em relação à estequiometria do simporte frutose/protão, surgem duas questões muito interessantes: (1) qual o sinal que desencadeia a alteração da estequiometria de um para dois protões por molécula de frutose? (2) qual a modificação conformacional na proteína associada à alteração na

estequiometria? Uma outra questão básica permanece: a presença do transporte activo de frutose representa uma vantagem competitiva de certas leveduras em ambientes com baixas concentrações de frutose, quando o metabolismo é essencialmente respiratório e os custos energéticos do simporte insignificantes?

A utilização duma levedura capaz de transportar frutose exclusivamente através dum sistema de transporte activo do tipo frutose/H⁺ deverá permitir um aumento da produtividade específica em etanol, derivada da redução do rendimento em biomassa durante a fermentação. Contudo, a utilização industrial destas estirpes para produção de etanol é problemática, pois o rendimento energético da fermentação é demasiado baixo para suportar o crescimento. Por outro lado, esta levedura não poderia usar a glucose que estivesse presente no meio de cultura, uma vez que não dispõe dum sistema de transporte para este açúcar.

Uma forma de resolver estas limitações poderia passar por desenvolver uma estirpe capaz de transportar frutose através do transportador Fsy1 e glucose através dum transportador específico para glucose, a fim de garantir que toda a frutose entrava na célula através do simporte. Como se sabe, em *S. cerevisiae*, os transportadores de glucose codificados pelos genes *HXT* são também capazes de transportar frutose. Poder-se-ia considerar como alternativa o transportador codificado pelo gene *GAL2*. Este transportador de galactose é também capaz de transportar glucose com elevada afinidade (Bisson *et al.*, 1993; Reifenberger *et al.*, 1997), mas não existe qualquer informação relativa à sua capacidade para transportar frutose. Sabe-se, no entanto, que este transportador não será muito específico pois também aceita L-arabinose como substrato (Becker e Boles, 2003)

A ideia de utilizar em processos industriais misturas de estirpes de *S. cerevisiae* transformadas geneticamente de modo a “especializarem-se” em diferentes açúcares fermentáveis é interessante e está a merecer cada vez maior atenção. Não se deve, no entanto, ignorar que a levedura tem recursos próprios no que respeita aos mecanismos de regulação e suas interacções que permanecem, em grande parte, desconhecidos.

Bibliografia

- Anjos, J., I. Spencer-Martins. 1994. Repression of glucose-uptake in maltose-grown cells of *Saccharomyces bayanus* IGC 4565. *Folia Microbiologica* **39**: 506-7.
- Anjos, J. 1996. Estudos fisiológicos comparativos em estirpes do género *Saccharomyces* com interesse industrial. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Becker, J., E. Boles. 2003. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4144-50.
- Belinchon, M. M., J. M. Gancedo. 2003. Xylose and some non-sugar carbon sources cause catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **180**: 293-7.
- Benito, B., R. Lagunas. 1992. The low-affinity component of *Saccharomyces cerevisiae* maltose transport is an artifact. *J Bacteriol* **174**: 3065-9.
- Bisson, L. F., D. G. Fraenkel. 1983a. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 1730-4.
- Bisson, L. F., D. G. Fraenkel. 1983b. Transport of 6-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **155**: 995-1000.
- Bisson, L. F., D. G. Fraenkel. 1984. Expression of kinase-dependent glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **159**: 1013-7.
- Bisson, L. F., L. Neigeborn, M. Carlson, D. G. Fraenkel. 1987. The *SNF3* gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **169**: 1656-62.
- Bisson, L. F. 1988. High-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is under general glucose repression control. *J Bacteriol* **170**: 4838-45.
- Bisson, L. F., D. M. Coons, A. L. Kruckeberg, D. A. Lewis. 1993. Yeast sugar transporters. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**: 259-308.
- Boles, E., C. P. Hollenberg. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 85-111.
- Bowyer, F. 1957. The kinetics of the penetration of nonelectrolytes into the mammalian erythrocyte. *Int Rev Cytol* **6**: 469-511.
- Brondijk, T. H., M. E. van der Rest, D. Pluim, Y. de Vries, K. Stingl, B. Poolman, W. N. Konings. 1998. Catabolite inactivation of wild-type and mutant maltose transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 15352-7.

- Brondijk, T. H., W. N. Konings, B. Poolman. 2001. Regulation of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **176**: 96-105.
- Busturia, A., R. Lagunas. 1985. Identification of two forms of the maltose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation. *Biochim Biophys Acta* **820**: 324-6.
- Buziol, S., J. Becker, A. Baumeister, S. Jung, K. Mauch, M. Reuss, E. Boles. 2002. Determination of *in vivo* kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2**: 283-91.
- Carlson, M. 1999. Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**: 202-7.
- Carruthers, A., A. L. Helgerson. 1991. Inhibitions of sugar transport produced by ligands binding at opposite sides of the membrane. Evidence for simultaneous occupation of the carrier by maltose and cytochalasin B. *Biochemistry* **30**: 3907-15.
- Cason, D. T., I. Spencer-Martins, N. van Uden. 1986. Transport of fructose by a proton symport in a brewing yeast. *FEMS Microbiol Lett* **36**: 307-9.
- Celenza, J. L., L. Marshall-Carlson, M. Carlson. 1988. The yeast *SNF3* gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 2130-4.
- Chang, Y. S., R. A. Dubin, E. Perkins, D. Forrest, C. A. Michels, R. B. Needleman. 1988. *MAL63* codes for a positive regulator of maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **14**: 201-9.
- Chang, Y. S., R. A. Dubin, E. Perkins, C. A. Michels, R. B. Needleman. 1989. Identification and characterization of the maltose permease in genetically defined *Saccharomyces* strain. *J Bacteriol* **171**: 6148-54.
- Charron, M. J., R. A. Dubin, C. A. Michels. 1986. Structural and functional analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **6**: 3891-9.
- Charron, M. J., E. Read, S. R. Haut, C. A. Michels. 1989. Molecular Evolution of the telomere-associated *Mal* loci of *Saccharomyces*. *Genetics* **122**: 307-316.
- Cheng, Q., C. A. Michels. 1989. The maltose permease encoded by the *MAL61* gene of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits both sequence and structural homology to other sugar transporters. *Genetics* **123**: 477-84.
- Cheng, Q., C. A. Michels. 1991. *MAL11* and *MAL61* encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**: 1817-20.

-
- Cherry, J. M., C. Ball, S. Weng, G. Juvik, R. Schmidt, C. Adler, B. Dunn, S. Dwight, L. Riles, R. K. Mortimer, D. Botstein. 1997. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **387**: 67-73.
- Chow, T., M. J. Goldenthal, J. D. Cohen, M. Hegde, J. Marmur. 1983. Identification and physical characterization of yeast maltase structural genes. *Mol Gen Genet* **191**: 366-71.
- Ciriacy, M., E. Reifenberger. 1997. Hexose transport, p. 45-65. In F. K. Zimmermann e K. D. Entian (ed.), *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications*. Technomic, Lancaster.
- Cirillo, V. P. 1961. Sugar transport in microorganisms. *Annu Rev Microbiol* **15**: 197-218.
- Cirillo, V. P. 1962. Mechanism of Glucose Transport across Yeast Cell Membrane. *J Bacteriol* **84**: 485-&.
- Cirillo, V. P. 1968a. Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Nonmetabolized sugars as substrates and inducers of the galactose transport system. *J Bacteriol* **95**: 1727-31.
- Cirillo, V. P. 1968b. Relationship between sugar structure and competition for the sugar transport system in Bakers' yeast. *J Bacteriol* **95**: 603-11.
- Clement, N. R., J. M. Gould. 1981. Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **20**: 1534-8.
- Cliften, P., P. Sudarsanam, A. Desikan, L. Fulton, B. Fulton, J. Majors, R. Waterston, B. A. Cohen, M. Johnston. 2003. Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science* **301**: 71-6.
- Cohen, J. D., M. J. Goldenthal, T. Chow, B. Buchferer, J. Marmur. 1985a. Organization of the MAL loci of *Saccharomyces*. Physical identification and functional characterization of three genes at the MAL6 locus. *Mol Gen Genet* **200**: 1-8.
- Cohen, J. D., M. J. Goldenthal, T. Chow, B. Buchferer, J. Marmur. 1985b. Organization of the MAL loci of *Saccharomyces*. Physical identification and functional characterization of three genes at the MAL6 locus. *Mol Gen Genet* **200**: 1-8.
- Coons, D. M., R. B. Boulton, L. F. Bisson. 1995. Computer-assisted nonlinear regression analysis of the multicomponent glucose uptake kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**: 3251-8.
- Coons, D. M., P. Vagnoli, L. F. Bisson. 1997. The C-terminal domain of Snf3p is sufficient to complement the growth defect of snf3 null mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: SNF3 functions in glucose recognition. *Yeast* **13**: 9-20.
- De Vit, M. J., J. A. Waddle, M. Johnston. 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell* **8**: 1603-18.
-

- De Vit, M. J., M. Johnston. 1999. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* **9**: 1231-41.
- Delafuente, G., A. Sols. 1962. Transport of sugars in yeasts .2. Mechanisms of utilization of disaccharides and related glycosides. *Biochim Biophys Acta* **56**: 49-62.
- Diderich, J. A., M. Schepper, P. van Hoek, M. A. Luttkik, J. P. van Dijken, J. T. Pronk, P. Klaassen, H. F. Boelens, M. J. de Mattos, K. van Dam, A. L. Kruckeberg. 1999a. Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 15350-9.
- Diderich, J. A., B. Teusink, J. Valkier, J. Anjos, I. Spencer-Martins, K. van Dam, M. C. Walsh. 1999b. Strategies to determine the extent of control exerted by glucose transport on glycolytic flux in the yeast *Saccharomyces bayanus*. *Microbiology* **145**: 3447-54.
- Diderich, J. A., J. M. Schuurmans, M. C. van Gaalen, A. L. Kruckeberg, K. van Dam. 2001. Functional analysis of the hexose transporter homologue *HXT5* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **18**: 1515-24.
- Dijkhuizen, L., L. Groen, W. Harder, W. N. Konings. 1977a. Active transport of oxalate by *Pseudomonas oxalaticus* *OX1*. *Arch Microbiol* **115**: 223-7.
- Dijkhuizen, L., M. Wiersma, W. Harder. 1977b. Energy production and growth of *Pseudomonas oxalaticus* *OX1* on oxalate and formate. *Arch Microbiol* **115**: 229-36.
- Dlugai, S., S. Hippler, R. Wiczorke, E. Boles. 2001. Glucose-dependent and -independent signalling functions of the yeast glucose sensor Snf3. *FEBS Lett* **505**: 389-92.
- Driessen, A. J., W. de Vrij, W. N. Konings. 1985. Incorporation of beef heart cytochrome c oxidase as a proton-motive force-generating mechanism in bacterial membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 7555-9.
- Driessen, A. J., K. J. Hellingwerf, W. N. Konings. 1987. Mechanism of energy coupling to entry and exit of neutral and branched chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *J Biol Chem* **262**: 12438-43.
- Elbing, K., C. Larsson, R. M. Bill, E. Albers, J. L. Snoep, E. Boles, S. Hohmann, L. Gustafsson. 2004. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5323-30.
- Entian, K. D., M. C. Loureiro-Dias. 1990. Misregulation of maltose uptake in a glucose repression defective mutant of *Saccharomyces cerevisiae* leads to glucose poisoning. *J Gen Microbiol* **136**: 855-60.
- Federoff, H. J., T. R. Eccleshall, J. Marmur. 1983. Carbon catabolite repression of maltase synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J Bacteriol* **156**: 301-7.

-
- Flick, K. M., N. Spielewoy, T. I. Kalashnikova, M. Guaderrama, Q. Zhu, H. C. Chang, C. Wittenberg. 2003. Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from *HXT* gene promoters. *Mol Biol Cell* **14**: 3230-41.
- Franzusoff, A. J., V. P. Cirillo. 1983. Glucose transport activity in isolated plasma membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **258**: 3608-14.
- Fuhrmann, G. F., B. Volker. 1992. Regulation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* **27**: 1-15.
- Gamo, F. J., E. Moreno, R. Lagunas. 1995. The low-affinity component of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* is not due to passive diffusion. *Yeast* **11**: 1393-8.
- Gancedo, J. M. 1992. Carbon catabolite repression in yeast. *Eur J Biochem* **206**: 297-313.
- Gancedo, J. M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 334-61.
- Gerós, H., F. Cássio, C. Leão. 1996. Reconstitution of lactate proton symport activity in plasma membrane vesicles from the yeast *Candida utilis*. *Yeast* **12**: 1263-72.
- Gerós, H., F. Cássio, C. Leão. 1999. Transport of Glucose in the wine spoilage yeast *Dekkera anomala*. *Food Technol Biotechnol* **37**: 247-55.
- Gibson, A. W., L. A. Wojciechowicz, S. E. Danzi, B. Zhang, J. H. Kim, Z. Hu, C. A. Michels. 1997. Constitutive mutations of the *Saccharomyces cerevisiae* *MAL*-activator genes *MAL23*, *MAL43*, *MAL63*, and *MAL64*. *Genetics* **146**: 1287-98.
- Gonçalves, P., H. Rodrigues de Sousa, I. Spencer-Martins. 2000. *FSY1*, a novel gene encoding a specific fructose/H⁺ symporter in the type strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. *J Bacteriol* **182**: 5628-30.
- Gorts, C. P. 1969. Effect of glucose on the activity and the kinetics of the maltose-uptake system and of alpha-glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **184**: 299-305.
- Harris, G., C. C. Thompson. 1961. Uptake of nutrients by yeasts .3. Maltose permease of a brewing yeast. *Biochim Biophys Acta* **52**: 176-83.
- Heredia, C. F., A. Sols, G. DelaFuente. 1968. Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. *Eur J Biochem* **5**: 321-9.
- Horak, J. 1997. Yeast nutrient transporters. *Biochim Biophys Acta* **1331**: 41-79.
- Hu, Z., J. O. Nehlin, H. Ronne, C. A. Michels. 1995. *MIG1*-dependent and *MIG1*-independent glucose regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **28**: 258-66.
-

- Hu, Z., Y. Yue, H. Jiang, B. Zhang, P. W. Sherwood, C. A. Michels. 2000. Analysis of the mechanism by which glucose inhibits maltose induction of *MAL* gene expression in *Saccharomyces*. *Genetics* **154**: 121-32.
- Ibu, J. O., A. H. Short. 1986. Interactions between monosaccharides and disaccharides during uptake by the perfused liver of rat. *Q J Exp Physiol* **71**: 599-607.
- Jansen, M. L., J. H. De Winde, J. T. Pronk. 2002. Hxt-Carrier-mediated glucose efflux upon exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to excess maltose. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4259-65.
- Jaspers, H. T., J. van Steveninck. 1975. Transport-associated phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose in *Saccharomyces fragilis*. *Biochim Biophys Acta* **406**: 370-85.
- Jiang, H., I. Medintz, C. A. Michels. 1997. Two glucose sensing/signaling pathways stimulate glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. *Mol Biol Cell* **8**: 1293-304.
- Jiang, H., I. Medintz, B. Zhang, C. A. Michels. 2000a. Metabolic signals trigger glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. *J Bacteriol* **182**: 647-54.
- Jiang, H., K. Tatchell, S. Liu, C. A. Michels. 2000b. Protein phosphatase type-1 regulatory subunits Reg1p and Reg2p act as signal transducers in the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **263**: 411-22.
- Johnston, M. 1999. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* **15**: 29-33.
- Kamo, N., M. Muratsugu, R. Hongoh, Y. Kobatake. 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J Membr Biol* **49**: 105-21.
- Kellis, M., N. Patterson, M. Endrizzi, B. Birren, E. S. Lander. 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* **423**: 241-54.
- Kim, J., C. A. Michels. 1988. The *MAL63* gene of *Saccharomyces* encodes a cysteine-zinc finger protein. *Curr Genet* **14**: 319-23.
- Kishi, T., T. Seno, F. Yamao. 1998. Grr1 functions in the ubiquitin pathway in *Saccharomyces cerevisiae* through association with Skp1. *Mol Gen Genet* **257**: 143-8.
- Klein, C. J., L. Olsson, B. Ronnow, J. D. Mikkelsen, J. Nielsen. 1996. Alleviation of glucose repression of maltose metabolism by *MIG1* disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4441-9.
- Klein, C. J., L. Olsson, J. Nielsen. 1998. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology* **144** (Pt 1): 13-24.

-
- Klein, C. J. L., L. Olsson, B. Rønnow, J. D. Mikkelsen, J. Nielsen. 1997. Glucose and maltose metabolism in *MIG1*-disrupted and *MAL*-constitutive strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol Biotechnol* **35**: 287-292.
- Ko, C. H., H. Liang, R. F. Gaber. 1993. Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**: 638-48.
- Kotyk, A., D. Michaljaniková. 1974. Nature of uptake of D-galactose, D-glucose and alpha-methyl-D-glucoside by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **332**: 104-113.
- Krampe, S., O. Stamm, C. P. Hollenberg, E. Boles. 1998. Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett* **441**: 343-7.
- Krampe, S., E. Boles. 2002. Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. *FEBS Lett* **513**: 193-6.
- Kruckeberg, A. L., L. F. Bisson. 1990. The *HXT2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Mol Cell Biol* **10**: 5903-13.
- Kruckeberg, A. L. 1996. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **166**: 283-92.
- Kundig, W., F. D. Kundig, B. Anderson, S. Roseman. 1966. Restoration of active transport of glycosides in *Escherichia coli* by a component of a phosphotransferase system. *J Biol Chem* **241**: 3243-&.
- Lacko, L., M. Burger. 1962. Interaction of some disaccharides with the carrier system for aldoses in erythrocytes. *Biochem J* **83**: 622-5.
- Lafuente, M. J., C. Gancedo, J. C. Jauniaux, J. M. Gancedo. 2000. Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **35**: 161-72.
- Lagunas, R., C. Dominguez, A. Busturia, M. J. Saez. 1982. Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *J Bacteriol* **152**: 19-25.
- Lagunas, R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **10**: 229-42.
- Levine, J., L. Tanouye, C. A. Michels. 1992. The UAS(*MAL*) is a bidirectional promotor element required for the expression of both the *MAL61* and *MAL62* genes of the *Saccharomyces MAL6* locus. *Curr Genet* **22**: 181-9.
- Lewis, D. A., L. F. Bisson. 1991. The *HXT1* gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters. *Mol Cell Biol* **11**: 3804-13.
-

- Li, F. N., M. Johnston. 1997. Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *Embo J* **16**: 5629-38.
- Liang, H., R. F. Gaber. 1996. A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of *HXT6*. *Mol Biol Cell* **7**: 1953-66.
- Lobo, Z., P. K. Maitra. 1977. Resistance to 2-deoxyglucose in yeast: a direct selection of mutants lacking glucose-phosphorylating enzymes. *Mol Gen Genet* **157**: 297-300.
- Lokema, J. S., K. J. Hellingwerf, W. N. Konings. 1982. The effect of "probe binding" on the quantitative determination of the proton-motive force in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **681**: 85-94.
- Loureiro-Dias, M. C., J. M. Peinado. 1984. Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of pH and potassium ions. *Biochem J* **222**: 293-8.
- Lucero, P., M. Herweijer, R. Lagunas. 1993. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS Lett* **333**: 165-8.
- Lucero, P., R. Lagunas. 1997. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase *npi1/rsp5* and ubiquitin-hydrolase *npi2/doa4*. *FEMS Microbiol Lett* **147**: 273-7.
- Lucero, P., E. Penalver, E. Moreno, R. Lagunas. 1997. Moderate concentrations of ethanol inhibit endocytosis of the yeast maltose transporter. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3831-6.
- Lucero, P., E. Penalver, L. Vela, R. Lagunas. 2000. Monoubiquitination is sufficient to signal internalization of the maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **182**: 241-3.
- Lundin, M., J. O. Nehlin, H. Ronne. 1994. Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol Cell Biol* **14**: 1979-85.
- Luyten, K., C. Riou, B. Blondin. 2002. The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. *Yeast* **19**: 713-26.
- Maier, A., B. Volker, E. Boles, G. F. Fuhrmann. 2002. Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Res* **2**: 539-50.
- Marger, M. D., M. H. Saier, Jr. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* **18**: 13-20.
- Marshall-Carlson, L., J. L. Celenza, B. C. Laurent, M. Carlson. 1990. Mutational analysis of the *SNF3* glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**: 1105-15.

-
- Marshall-Carlson, L., L. Neigeborn, D. Coons, L. Bisson, M. Carlson. 1991. Dominant and recessive suppressors that restore glucose transport in a yeast *snf3* mutant. *Genetics* **128**: 505-12.
- Medintz, I., H. Jiang, E. K. Han, W. Cui, C. A. Michels. 1996. Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **178**: 2245-54.
- Medintz, I., H. Jiang, C. A. Michels. 1998. The role of ubiquitin conjugation in glucose-induced proteolysis of *Saccharomyces* maltose permease. *J Biol Chem* **273**: 34454-62.
- Medintz, I., X. Wang, T. Hradek, C. A. Michels. 2000. A PEST-like sequence in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces* maltose permease is required for glucose-induced proteolysis and rapid inactivation of transport activity. *Biochemistry* **39**: 4518-26.
- Meredith, S. A., A. H. Romano. 1977. Uptake and phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose by wild type and respiration-deficient bakers' yeast. *Biochim Biophys Acta* **497**: 745-59.
- Michels, C. A., R. B. Needleman. 1984. The dispersed, repeated family of *MAL* loci in *Saccharomyces spp.* *J Bacteriol* **157**: 949-52.
- Mosley, A. L., J. Lakshmanan, B. K. Aryal, S. Özcan. 2003. Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator. *J Biol Chem* **278**: 10322-7.
- Mueckler, M. 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* **219**: 713-25.
- Mueckler, M., R. C. Hresko, M. Sato. 1997. Structure, function and biosynthesis of GLUT1. *Biochem Soc Trans* **25**: 951-4.
- Naumov, G. I., E. S. Naumova, C. A. Michels. 1994. Genetic-variation of the repeated *MAL* loci in natural-populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics* **136**: 803-812.
- Naumova, E. S., G. I. Naumov, I. Masneuf-Pomarede, M. Aigle, D. Dubourdieu. 2005. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast* **22**: 1099-115.
- Needleman, R. 1991. Control of maltase synthesis in yeast. *Mol Microbiol* **5**: 2079-84.
- Needleman, R. B., D. B. Kaback, R. A. Dubin, E. L. Perkins, N. G. Rosenberg, K. A. Sutherland, D. B. Forrest, C. A. Michels. 1984. *MAL6* of *Saccharomyces*: a complex genetic locus containing three genes required for maltose fermentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 2811-5.
- Nehlin, J. O., H. Ronne. 1990. Yeast *MIG1* repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *Embo J* **9**: 2891-8.
- Nehlin, J. O., M. Carlberg, H. Ronne. 1991. Control of yeast *GAL* genes by *MIG1* repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *Embo J* **10**: 3373-7.
-

- Neigeborn, L., M. Carlson. 1984. Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **108**: 845-58.
- Neigeborn, L., P. Schwartzberg, R. Reid, M. Carlson. 1986. Null mutations in the *SNF3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* cause a different phenotype than do previously isolated missense mutations. *Mol Cell Biol* **6**: 3569-74.
- Nevado, J., M. A. Navarro, C. F. Heredia. 1994. Transport of hexoses in yeast. Re-examination of the sugar phosphorylation hypothesis with a new experimental approach. *Yeast* **10**: 59-65.
- Nourani, A., M. Wesolowski-Louvel, T. Delaveau, C. Jacq, A. Delahodde. 1997. Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol Cell Biol* **17**: 5453-60.
- Novak, S., T. D'Amore, G. G. Stewart. 1990. 2-Deoxy-D-glucose resistant yeast with altered sugar transport activity. *FEBS Lett* **269**: 202-4.
- Ongjoco, R., K. Szkutnicka, V. P. Cirillo. 1987. Glucose transport in vesicles reconstituted from *Saccharomyces cerevisiae* membranes and liposomes. *J Bacteriol* **169**: 2926-31.
- Ostling, J., H. Ronne. 1998. Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. *Eur J Biochem* **252**: 162-8.
- Özcan, S., K. Freidel, A. Leuker, M. Ciriacy. 1993. Glucose uptake and catabolite repression in dominant *HTR1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **175**: 5520-8.
- Özcan, S., M. Johnston. 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol Cell Biol* **15**: 1564-72.
- Özcan, S., J. Dover, A. G. Rosenwald, S. Wolfl, M. Johnston. 1996a. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12428-32.
- Özcan, S., M. Johnston. 1996. Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose. *Mol Cell Biol* **16**: 5536-45.
- Özcan, S., T. Leong, M. Johnston. 1996b. Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol Cell Biol* **16**: 6419-26.
- Özcan, S., J. Dover, M. Johnston. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **17**: 2566-73.
- Özcan, S., M. Johnston. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 554-69.

-
- Pao, S. S., I. T. Paulsen, M. H. Saier, Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1-34.
- Peinado, J. M., M. C. Loureiro-Dias. 1986. Reversible loss of affinity induced by glucose in the maltose-H⁺ symport of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **856**: 189-92.
- Penalver, E., L. Ojeda, E. Moreno, R. Lagunas. 1997. Role of the cytoskeleton in endocytosis of the yeast maltose transporter. *Yeast* **13**: 541-9.
- Penalver, E., P. Lucero, E. Moreno, R. Lagunas. 1998. Catabolite inactivation of the maltose transporter in nitrogen-starved yeast could be due to the stimulation of general protein turnover. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 317-24.
- Petit, T., J. A. Diderich, A. L. Kruckeberg, C. Gancedo, K. van Dam. 2000. Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **182**: 6815-8.
- Pinson, B., C. Napias, J. Chevallier, P. J. Van den Broek, D. Brethes. 1997. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* cytosine transporter using energizable plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* **272**: 28918-24.
- Polish, J. A., J. H. Kim, M. Johnston. 2005. How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose. *Genetics* **169**: 583-94.
- Postma, E., P. J. Van den Broek. 1990. Continuous-culture study of the regulation of glucose and fructose transport in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *J Bacteriol* **172**: 2871-6.
- Postma, E., C. Verduyn, A. Kuiper, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken. 1990. Substrate-accelerated death of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 under maltose stress. *Yeast* **6**: 149-58.
- Prior, C., H. Fukuhara, J. Blaisonneau, M. Wesolowski-Louvel. 1993. Low-affinity glucose carrier gene *LGTI* of *Saccharomyces cerevisiae*, a homologue of the *Kluyveromyces lactis* *RAG1* gene. *Yeast* **9**: 1373-7.
- Ramos, J., K. Szkutnicka, V. P. Cirillo. 1988. Relationship between low- and high-affinity glucose transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **170**: 5375-7.
- Ramos, J., K. Szkutnicka, V. P. Cirillo. 1989. Characteristics of galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells and reconstituted lipid vesicles. *J Bacteriol* **171**: 3539-44.
- Reifenberger, E., K. Freidel, M. Ciriacy. 1995. Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol Microbiol* **16**: 157-67.
-

- Reifenberger, E., E. Boles, M. Ciriacy. 1997. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem* **245**: 324-33.
- Reijenga, K. A., J. L. Snoep, J. A. Diderich, H. W. van Verseveld, H. V. Westerhoff, B. Teusink. 2001. Control of glycolytic dynamics by hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biophys J* **80**: 626-34.
- Reinhardt, C., B. Volker, H. J. Martin, J. Kneiseler, G. F. Fuhrmann. 1997. Different activation energies in glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* *DFY1* suggest two transport systems. *Biochim Biophys Acta* **1325**: 126-34.
- Riballo, E., M. Herweijer, D. H. Wolf, R. Lagunas. 1995. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J Bacteriol* **177**: 5622-7.
- Rodrigues de Sousa, H., I. Spencer-Martins, N. van Uden. 1990. Active fructose transport in *Saccharomyces sensu stricto*. Taxonomic implications. *Acta Varia* **5**: 127-134.
- Rodrigues de Sousa, H., A. Madeira-Lopes, I. Spencer-Martins. 1995. The significance of active fructose transport and maximum temperature for growth in the taxonomy of *Saccharomyces sensu stricto*. *System Appl Microbiol* **18**: 44-51.
- Rodrigues de Sousa, H. 1998. Transporte Activo de Frutose em *Saccharomyces sensu stricto*: Implicações Taxonómicas e Industriais. Tese de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Rodrigues de Sousa, H., I. Spencer-Martins, P. Gonçalves. 2004. Differential regulation by glucose and fructose of a gene encoding a specific fructose/H⁺ symporter in *Saccharomyces sensu stricto* yeasts. *Yeast* **21**: 519-30.
- Rodriguez, C., J. M. Gancedo. 1999. Glucose signaling in yeast is partially mimicked by galactose and does not require the Tps1 protein. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**: 52-8.
- Rolland, F., J. Winderickx, J. M. Thevelein. 2002. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* **2**: 183-201.
- Romano, A. H. 1982. Facilitated diffusion of 6-deoxy-D-glucose in bakers' yeast: evidence against phosphorylation-associated transport of glucose. *J Bacteriol* **152**: 1295-7.
- Rossell, S., C. C. van der Weijden, A. Kruckeberg, B. M. Bakker, H. V. Westerhoff. 2002. Loss of fermentative capacity in baker's yeast can partly be explained by reduced glucose uptake capacity. *Mol Biol Rep* **29**: 255-7.

-
- Schmidt, M. C., R. R. McCartney, X. Zhang, T. S. Tillman, H. Solimeo, S. Wolfl, C. Almonte, S. C. Watkins. 1999. Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 4561-71.
- Schuddemat, J., P. J. van den Broek, J. van Steveninck. 1988. The influence of ATP on sugar uptake mediated by the constitutive glucose carrier of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **937**: 81-7.
- Schuddemat, J., C. C. van Leeuwen, J. J. Plijter, P. J. van den Broek, J. van Steveninck. 1990. Determination of the role of polyphosphate in transport-coupled phosphorylation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **57**: 159-64.
- Schulte, F., R. Wiczorke, C. P. Hollenberg, E. Boles. 2000. The *HTR1* gene is a dominant negative mutant allele of MTH1 and blocks Snf3- and Rgt2-dependent glucose signaling in yeast. *J Bacteriol* **182**: 540-2.
- Seaston, A., C. Inkson, A. A. Eddy. 1973. The absorption of protons with specific amino acids and carbohydrates by yeast. *Biochem J* **134**: 1031-43.
- Serrano, R., G. Delafuente. 1974. Regulatory properties of the constitutive hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* **5**: 161-71.
- Serrano, R. 1977. Energy requirements for maltose transport in yeast. *Eur J Biochem* **80**: 97-102.
- Simoni, R. D., Levintha.M, F. D. Kundig, W. Kundig, B. Anderson, P. E. Hartman, S. Roseman. 1967. Genetic evidence for role of a bacterial phosphotransferase system in sugar transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**: 1963-70.
- Sirenko, O. I., B. Ni, R. B. Needleman. 1995. Purification and binding properties of the Mal63p activator of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **27**: 509-16.
- Skowyra, D., K. L. Craig, M. Tyers, S. J. Elledge, J. W. Harper. 1997. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**: 209-19.
- Smits, H. P., G. J. Smits, P. W. Postma, M. C. Walsh, K. van Dam. 1996. High-affinity glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* is not dependent on the presence of glucose-phosphorylating enzymes. *Yeast* **12**: 439-47.
- Teusink, B., J. A. Diderich, H. V. Westerhoff, K. van Dam, M. C. Walsh. 1998. Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *J Bacteriol* **180**: 556-62.
- Theodoris, G., N. M. Fong, D. M. Coons, L. F. Bisson. 1994. High-copy suppression of glucose transport defects by *HXT4* and regulatory elements in the promoters of the *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **137**: 957-66.
-

- Treitel, M. A., M. Carlson. 1995. Repression by *SSN6-TUP1* is directed by *MIG1*, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3132-6.
- Treitel, M. A., S. Kuchin, M. Carlson. 1998. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**: 6273-80.
- Umbreit, W. W., R. H. Burris, J. F. Stauffer. 1964. *Manometric Techniques*, 4th ed. Burgess Publishing, Minneapolis, Minnesota.
- Vagnoli, P., D. M. Coons, L. F. Bisson. 1998. The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **160**: 31-6.
- Vallier, L. G., M. Carlson. 1994. Synergistic release from glucose repression by *mig1* and *ssn* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **137**: 49-54.
- Van den Broek, P. J., C. C. van Leeuwen, R. A. Weusthuis, E. Postma, J. P. van Dijken, R. H. Karssies, R. Amons. 1994. Identification of the maltose transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **200**: 45-51.
- Van den Broek, P. J., A. E. van Gompel, M. A. Luttkik, J. T. Pronk, C. C. van Leeuwen. 1997. Mechanism of glucose and maltose transport in plasma-membrane vesicles from the yeast *Candida utilis*. *Biochem J* **321**: 487-95.
- Van der Rest, M. E., Y. de Vries, B. Poolman, W. N. Konings. 1995a. Overexpression of Mal61p in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of maltose transport in artificial membranes. *J Bacteriol* **177**: 5440-6.
- Van der Rest, M. E., A. H. Kamminga, A. Nakano, Y. Anraku, B. Poolman, W. N. Konings. 1995b. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* **59**: 304-22.
- Van Leeuwen, C. C., E. Postma, P. J. van den Broek, J. van Steveninck. 1991. Proton-motive force-driven D-galactose transport in plasma membrane vesicles from the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *J Biol Chem* **266**: 12146-51.
- Van Leeuwen, C. C., R. A. Weusthuis, E. Postma, P. J. van den Broek, J. P. van Dijken. 1992. Maltose/proton co-transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparative study with cells and plasma membrane vesicles. *Biochem J* **284**: 441-5.
- Van Steveninck, J. 1968. Transport-associated phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose in yeast. *Biochim Biophys Acta* **163**: 386-94.

-
- Van Steveninck, J. 1969. The mechanism of transmembrane glucose transport in yeast: evidence for phosphorylation, associated with transport. *Arch Biochem Biophys* **130**: 244-52.
- Van Uden, N. 1971. Kinetics and Energetics of Yeast Growth, p. 75-118. In A. H. Rose e J. S. Harrison (ed.), *The Yeasts*, vol. 2. Academic Press Inc., London.
- Van Urk, H., P. R. Mak, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken. 1988. Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 upon transition from glucose limitation to glucose excess. *Yeast* **4**: 283-91.
- Verduyn, C., E. Postma, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken. 1990. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J Gen Microbiol* **136 (Pt 3)**: 395-403.
- Viitanen, P., M. J. Newman, D. L. Foster, T. H. Wilson, H. R. Kaback. 1986. Purification, reconstitution, and characterization of the lac permease of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **125**: 429-52.
- Walsh, M. C., H. P. Smits, M. Scholte, K. van Dam. 1994a. Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *J Bacteriol* **176**: 953-8.
- Walsh, M. C., H. P. Smits, K. van Dam. 1994b. Respiratory inhibitors affect incorporation of glucose into *Saccharomyces cerevisiae* cells, but not the activity of glucose transport. *Yeast* **10**: 1553-8.
- Wang, J., R. Needleman. 1996. Removal of Mig1p binding site converts a *MAL63* constitutive mutant derived by interchromosomal gene conversion to glucose insensitivity. *Genetics* **142**: 51-63.
- Wang, J., O. Sirenko, R. Needleman. 1997. Genomic footprinting of Mig1p in the *MAL62* promoter. Binding is dependent upon carbon source and competitive with the *Mal63p* activator. *J Biol Chem* **272**: 4613-22.
- Wang, X., M. Bali, I. Medintz, C. A. Michels. 2002. Intracellular maltose is sufficient to induce *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **1**: 696-703.
- Wendell, D. L., L. F. Bisson. 1993. Physiological characterization of putative high-affinity glucose transport protein Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae* by use of anti-synthetic peptide antibodies. *J Bacteriol* **175**: 7689-96.
- Wendell, D. L., L. F. Bisson. 1994. Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *J Bacteriol* **176**: 3730-7.
- Weusthuis, R. A., H. Adams, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken. 1993. Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3102-9.

Weusthuis, R. A., W. Visser, J. T. Pronk, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken. 1994. Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluver effect. *Microbiology* **140**: 703-15.

Wieczorke, R., S. Krampe, T. Weierstall, K. Freidel, C. P. Hollenberg, E. Boles. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **464**: 123-8.

Yang, Z., L. F. Bisson. 1996. The SKS1 protein kinase is a multicopy suppressor of the snf3 mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 1407-19.

Yao, B., P. Sollitti, J. Marmur. 1989. Primary structure of the maltose-permease-encoding gene of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene* **79**: 189-97.

Ye, L., A. L. Kruckeberg, J. A. Berden, K. van Dam. 1999. Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. *J Bacteriol* **181**: 4673-5.

Ye, L., J. A. Berden, K. van Dam, A. L. Kruckeberg. 2001. Expression and activity of the Hxt7 high-affinity hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **18**: 1257-67.

Yin, Z., S. Wilson, N. C. Hauser, H. Tournu, J. D. Hoheisel, A. J. Brown. 2003. Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. *Mol Microbiol* **48**: 713-24.

Yu, C., L. Yu, T. E. King. 1975. Studies on cytochrome oxidase. Interactions of the cytochrome oxidase protein with phospholipids and cytochrome c. *J Biol Chem* **250**: 1383-92.

Apêndice I:
Meios de cultura

Meio mineral I

Meio base

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 % (p/v)
KH ₂ PO ₄	0,5 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 %
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,013 %
Solução de oligoelementos A	0,05 % (v/v)
Solução de oligoelementos B	0,05 %
Solução de vitaminas	0,05 %
Água desmineralizada	q.b.

A composição das três soluções é a seguinte:

Solução de oligoelementos A

H ₃ BO ₃	0,18 % (p/v)
KI	0,02 %
NaMoO ₄ ·2H ₂ O.....	0,04 %
Água desmineralizada	q.b.

Solução de oligoelementos B

CuSO ₄ ·5H ₂ O.....	0,08 % (p/v)
FeCl ₃ ·6H ₂ O.....	0,04 %
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,04 %
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,08 %
HCl (pH 3,0).....	q.b.
Água desmineralizada	q.b.

Solução de vitaminas

Biotina	0,001 % (p/v)
Pantotenato de cálcio	0,08 %
Mio-inositol	4 %
Niacina	0,16 %
Piridoxina (HCl)	0,16 %
Tiamina (HCl).....	0,16 %
Água desmineralizada	q.b.

A esterilização do meio base foi feita em autoclave a 1 atmosfera (121°C), durante 25 min. As outras soluções foram esterilizadas por filtração, através de filtro Millipore (0,22 µm).

As soluções das fontes de carbono e energia, glucose, maltose ou frutose (40 %, p/v) foram esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio base de modo a obter um meio de cultura com a concentração final desejada na fonte de carbono e energia.

Meio mineral II

Meio base

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 % (p/v)
KH ₂ PO ₄	0,3 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 %
Solução de oligoelementos	0,1 % (v/v)
Solução de vitaminas.....	0,1 %
Água desmineralizada	q.b.

A composição das duas soluções é a seguinte:

Solução de oligoelementos A

EDTA	1,5 % (p/v)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,45 %
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,03 %
MnCl ₂	0,1 %
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,03 %
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0,45 %
FeSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,3 %
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O.....	0,04 %
H ₃ BO ₃	0,1 %
KI	0,01 %
Água desmineralizada	q.b.

Solução de vitaminas

Biotina	0,005 % (p/v)
Pantotenato de cálcio.....	0,1 %
Ácido nicotínico.....	0,1 %
Inositol.....	2,5 %
Tiamina (HCl).....	0,1 %
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	0,02 %
Água desmineralizada	q.b.

A esterilização do meio base foi feita em autoclave a 1 atmosfera (121°C), durante 25 min. As outras soluções foram esterilizadas por filtração, através de filtro Millipore (0,22 µm).

As soluções das fontes de carbono e energia, glucose, maltose ou frutose (40 %, p/v) foram esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio base de modo a obter um meio de cultura com a concentração final desejada na fonte de carbono e energia.

Apêndice II:
Análise comparativa das
sequências de aminoácidos dos
transportadores de hexoses de
S. bayanus

Foi realizada uma análise comparativa das sequências de aminoácidos inferidas das sequências dos fragmentos de DNA isolados de *Saccharomyces bayanus* PYCC 4565 com as sequências de aminoácidos dos transportadores de hexoses identificados nas estirpes seguintes:

S. bayanus CBS 7001: 623-6c (Cliften *et al.*, 2003)

S. bayanus CBS 7001: MCY623 (Kellis *et al.*, 2003)

S. cerevisiae S288C (Cherry *et al.* 1997).

O grau de semelhança entre os diferentes alinhamentos encontra-se representado por um código de cores (█ - idêntico, █ - elevado, █ - baixo)

HXT1

PYCC 4565	1		P	QKSNSSNSYD	LES---	KAMN	APEGKNESFH	DNLSESQAQP
623-6c	1	MNSTPDLISP		QKSNSSNSYD	LES---	KAMN	APEGKNESFH	DNLSESQAQP
MCY623	1	-----		-----	-----	-----	-----	-----
S288C	1	MNSTPDLISP		QKSNSSNSYE	LESGRS	KAMN	TPEGKNESFH	DNLSESQVQP
PYCC 4565	51	AVPSPNTGKG		AYVTVSICCI	MVAFGGFV	VFG	WDTGTIS	
623-6c	51	AVPSPNTGKG		AYVTVSICCI	MVAFGGFV	VFG	WDTGTISGFV	
MCY623	51	-----		-----	MVAFGGFV	VFG	WDTGTISGFV	
S288C	51	AVAPNTGKG		VYVTVSICCV	MVAFGGFI	IFG	WDTGTISGFV	

HXT3

PYCC 4565	1		P	QKSSSENSNAE	LPSSSSQVMN	MPDEKGVQDD	FQAEADQILS
623-6c	1	MNSTPDLISP		QKSSSENSNAE	LPSNSSQVMN	MPEEKGTVQDD	FQAEADQILS
MCY623	1	-----		-----	-----	-----	-----
S288C	1	MNSTPDLISP		QKSSSENSNAD	LPSNSSQVMN	MPEEKGTVQDD	FQAEADQVLT
PYCC 4565	51	NPNTGKGAYV		TVSICCVMA	FGGFVFGWDT	G	
623-6c	51	NPNTGKGAYV		TVSICCVMA	FGGFVFGWDT		GTISGFVAQT
MCY623	51	-----		-----MVA	FGGFVFGWDT		GTISGFVAQT
S288C	51	NPNTGKGAYV		TVSICCVMA	FGGFVFGWDT		GTISGFVAQT

HXT4

PYCC 4565	1	SEEAAYQED		TAVQNTPAEG	LSPVESDSNS	ALSTPSNKAE	RDDLKDFDEN
623-6c	1	MSEEAAYQED		TAVQNTPAEG	LSPVESDSNS	ALSTPSNKAE	RDDLKDFDEN
MCY623	1	-----		-----	-----	-----	-----
S288C	1	MSEEAAYQED		TAVQNTPAD	LSPVESDSNS	ALSTPSNKAE	RDDMKDFDEN
PYCC 4565	51	HEESNNYVEI		PKKPASAYVT	VSIMCIMIAF	GGFVFGWDTG	TIS
623-6c	51	HEESNNYVEI		PKKPASAYVT	VSIMCIMIAF	GGFVFGWDTG	TISGFVAQTD
MCY623	51	-----		-----	---MCIMIAF	GGFVFGWDTG	TISGFVAQTD
S288C	51	HEESNNYVEI		PKKPASAYVT	VSI CCLMVA	GGFVFGWDTG	TISGFVAQTD

HXT5 (fragmento longo)

PYCC 4565	1		EGSATVST	NSNSYNEKSG	NSTAPGAARY	NDDSPQVKPV
623-6c	1	MSEPEQARQI	PLEGSATAST	NSNSYNEKSG	NSTAPGAARY	NDDSPQVKPV
MCY623	1	MSEPEQARQI	PLEGSATAST	NSNSYNEKSG	NSTAPGAARY	NDDSPQVKPV
S288C	1	MSELENAHQG	PLEGSATVST	NSNSYNEKSG	NSTAPGTAGY	NDNLAQAKPV
PYCC 4565	51	SSYSSHGPP	KDELEELQRE	ADNQLETKSK	SDLLFVSICC	LMVAFGGFVF
623-6c	51	SSYSSHGPP	KDELEELQRE	ADNQLETKSK	SDLLFVSICC	LMVAFGGFVF
MCY623	51	SSYSSHGPP	KDELEELQRE	ADNQLETKSK	SDLLFVSICC	LMVAFGGFVF
S288C	51	SSYISHEGPP	KDELEELQKE	VDKQLEKSK	SDLLFVSVCC	LMVAFGGFVF
PYCC 4565	101	GWDTGTIS				
623-6c	101	GWDTGTISGF				
MCY623	101	GWDTGTISGF				
S288C	101	GWDTGTISGF				

HXT5 (fragmento curto)

PYCC 4565	1		EGSATVST	NSNSYNEKSG	NSTAPGAAGY	N-----
623-6c	1	MSEPEQARQI	PLEGSATAST	NSNSYNEKSG	NSTAPGAARY	NDDSPQVKPV
MCY623	1	MSEPEQARQI	PLEGSATAST	NSNSYNEKSG	NSTAPGAARY	NDDSPQVKPV
S288C	1	MSELENAHQG	PLEGSATVST	NSNSYNEKSG	NSTAPGTAGY	NDNLAQAKPV
PYCC 4565	51	---APHGGPP	KDELEELQRE	ANNQLETKSK	SDLLFVSICC	LMVAFGGFVF
623-6c	51	SSYSSHGPP	KDELEELQRE	ADNQLETKSK	SDLLFVSICC	LMVAFGGFVF
MCY623	51	SSYSSHGPP	KDELEELQRE	ADNQLETKSK	SDLLFVSICC	LMVAFGGFVF
S288C	51	SSYISHEGPP	KDELEELQKE	VDKQLEKSK	SDLLFVSVCC	LMVAFGGFVF
PYCC 4565	101	GWDTGTMS				
623-6c	101	GWDTGTISGF				
MCY623	101	GWDTGTISGF				
S288C	101	GWDTGTISGF				

HXT7

PYCC 4565	1	MSQDAAIAEN	TPVEHLSPVD	SASNSMLSTP	TNKAERDELK	AYGEDEDQEP
623-6c	1	MSQDAAIAEH	TPVEHLSPAG	SASNSVLSTP	TNKAERDELK	AYGEGEDQEP
MCY623	1	MSQDAAIAER	TPVEHLSPVD	SASNSMLSTP	TNKAERDELK	AYGEDEGQEP
S288C	1	MSQDAAIAEQ	TPVEHLSAVD	SASHSVLSTP	SNKAERDEIK	AYGEGEEHEP
PYCC 4565	51	TVEIPKRPAS	AYVTVSIMCI	MIAFGGFVFG	WDTG	
623-6c	51	TVEIPKRPNS	AYVTVSIMCI	MIAFGGFVFG	WDTGTISGFV	
MCY623	51	AIEIPKRPAS	AYVTVSIMCI	MIAFGGFVFG	WDTGTISGFV	
S288C	51	VVEIPKRPAS	AYVTVSIMCI	MIAFGGFVFG	WDTGTISGFI	