

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA

FERNANDA CIGAGNA BOECHAT

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA TREALOSE-6-FOSFATO SOBRE
AS ISOFORMAS DA HEXOQUINASE DE *Saccharomyces cerevisiae***

RIO DE JANEIRO

2017

FERNANDA CIGAGNA BOECHAT

**Investigação do Efeito Inibitório da Trealose-6-fosfato sobre as Isoformas da
Hexoquinase de *Saccharomyces cerevisiae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em Química.

Orientadora: Professora Elis Cristina de Araújo Eleutherio

Co-Orientador: Diego Seixas Gomes de Almeida

Rio de Janeiro

2017

Investigação do Efeito Inibitório da Trealose-6-fosfato sobre as Isoformas da Hexoquinase de *Saccharomyces cerevisiae*

Fernanda Cigagna Boechat

Projeto final de curso submetido ao corpo docente do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de bacharel em Química.

Aprovado por:

Prof.^a Elis Cristina Araújo Eleuthério, D.Sc
Instituto de Química - UFRJ

Diego Seixas Gomes de Almeida, aluno M.Sc.
Instituto de Química - UFRJ

Prof. Bianca Cruz Neves, PhD
Instituto de Química – UFRJ

Prof. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc
Instituto de Química – UFRJ

Aos meus pais, Edson Boechat e Semiramis Cigagna, aos meus tios e à minha avó Nilce.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família, principalmente aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado me incentivando a estudar e me proporcionaram o melhor.

Agradeço aos meus amigos por todo apoio e conselhos, não apenas na caminhada do projeto final mas durante toda a graduação.

Agradeço aos meus companheiros do LIFE (Laboratório Interdisciplinar de Formação de Educadores) por todo apoio e companhia durante essa caminhada e especialmente ao professor Waldmir Neto por todo o aprendizado.

Agradeço aos meus companheiros do LIFE (Laboratório de Investigação de fatores de Estresse) por toda a ajuda desde o princípio, toda a paciência, conselhos e torcida durante o último ano.

Um agradecimento muito especial à Nayanna por toda a ajuda durante esse projeto que construímos juntas. Ao meu coorientador Diego, sou muito grata por toda a paciência, ensinamentos e por ter me ajudado tanto para que cada detalhe desse projeto pudesse ser desenvolvido.

Agradeço também minha orientadora, professora Elis Eleutherio, por todos os ensinamentos, ajuda e orientações durante o projeto para que ele pudesse ser desenvolvido da melhor forma possível.

“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível.” Charles Chaplin

RESUMO

PROJETO DE CURSO – IQWX01

TÍTULO: INVESTIGAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA TREALOSE-6-FOSFATO SOBRE AS ISOFORMAS DA HEXOQUINASE DE *Saccharomyces cerevisiae*

ALUNO: Fernanda Cigagna Boechat

ORIENTADOR: Elis Cristina Araújo Eleuthério, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

COLABORADOR: Diego Seixas Gomes de Almeida, PPGBq – Instituto de Química - UFRJ

A trealose é um dissacarídeo encontrado em microrganismos, plantas e animais invertebrados, mas não em mamíferos, cuja função está relacionada à tolerância a condições de estresse. Além disso, estudos indicam que um dos intermediários metabólicos da síntese de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*, a trealose-6-fosfato (T6P), exerce uma função inibitória sobre a hexoquinase 2 (Hxk2p), regulando o fluxo glicolítico nesta levedura. A isoforma hexoquinase 2 humana é altamente expressa em diversos tipos de tumores, sugerindo que esta proteína é um alvo interessante para desenvolvimento de novas terapias. Células tumorais apresentam fermentação aeróbica (efeito Warburg), um fenômeno similar ao que ocorre na levedura sob repressão catabólica (repressão da glicose sobre a respiração). Existe elevada homologia entre as isoformas das hexoquinasas de *S. cerevisiae* (Hxk1, Hxk2 e Glk1) e as isoformas humanas. O objetivo deste trabalho é investigar o comportamento bioenergético de cepas de *S. cerevisiae* que expressem apenas uma das isoformas da hexoquinase e avaliar a atividade enzimática dessas isoformas em extratos celulares na ausência e na presença do inibidor T6P. Inicialmente construiu-se amplicons contendo marcadores auxotróficos via PCR que foram inseridos na levedura para deleção gênica direcionada via recombinação homóloga para obter-se cepas duplamente deletadas que expressassem apenas uma das isoformas. Obteve-se êxito na obtenção das linhagens *GLK1 Δhvk1 Δhvk2* e *HXK2 Δhvk1 Δglk1*. Em metabolismo fermentativo, a mutante *GLK1* apresentou taxas de consumo de glicose e oxigênio quatro vezes menor e cinco vezes maior, respectivamente, que a cepa selvagem (WT) e a mutante *HXK2*, evidenciando o papel exercido pela Hxk2p no mecanismo de repressão catabólica. Apesar do consumo diferenciado, a atividade enzimática de hexoquinase nos extratos foi similar para todas as cepas, indicando que a célula mantém a taxa de fosforilação da glicose constante, independente da isoforma expressa. A glicose-6-fosfato é substrato não apenas para via glicolítica, mas também para outras vias, como a via das pentoses fosfato. Verificou-se ainda que T6P foi capaz de inibir Hxk2p, através de um mecanismo de inibição competitivo com a glicose, mas não Glk1p. Estes resultados parecem ser bastante promissores diante das notáveis semelhanças bioquímicas existentes entre a levedura e células animais. A clonagem de cada uma das isoformas HXK humanas na levedura *S. cerevisiae Δhvk1 Δhvk2 Δglk1* poderia fornecer informações de grande relevância a respeito do efeito de T6P nas proteínas humanas visando possíveis aplicações terapêuticas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Reação catalisada pela hexoquinase	16
Figura 2: G6P na via glicolítica.....	17
Figura 3: G6P na síntese de glicogênio	18
Figura 4: G6P e a via mais comum de síntese de trealose.....	19
Figura 5: Curva de crescimento clássica da <i>S. cerevisiae</i>	24
Figura 6: Mecanismo de recombinação homóloga.....	25
Figura 7: Plasmídeo pRS315	33
Figura 8: Plasmídeo YEp356R.....	34
Figura 9: PCR para obtenção de amplicons.....	35
Figura 10: Procedimento de eletroporação	43
Figura 11: Reações de medida de atividade	48
Figura 12: Gel de agarose do amplicon HXK1-LEU2	51
Figura 13: Gel de agarose do amplicon HXK2-URA3	51
Figura 14: Meio sólido dropout sem leucina. Lado esquerdo da placa foram plaqueadas as células antes da transformação (Cepa <i>glk1Δ</i>). Lado direito foram plaqueadas as células depois da transformação (Cepa <i>hvk1Δglk1Δ</i>).	49
Figura 15: Meio sólido dropout sem leucina. Lado esquerdo da placa foram plaqueadas as células antes da transformação (Cepa <i>hvk2Δ</i>). Lado direito foram plaqueadas as células depois da transformação (Cepa <i>hvk1Δhvk2Δ</i>).	49
Figura 16: Curvas de crescimento das cepas WT, HXK2 e GLK1	50
Figura 17: Taxa de crescimento específico da primeira fase exponencial	50
Figura 18: Consumo de glicose na primeira fase exponencial (metabolismo fermentativo). * estatisticamente iguais.	52
Figura 19: Consumo de glicose na fase estacionária (metabolismo respiratório) * estatisticamente iguais.	52
Figura 21: Consumo de oxigênio na fase estacionária (metabolismo respiratório)	53
Figura 20: Consumo de oxigênio na primeira fase exponencial (metabolismo fermentativo).	53
Figura 22: Gráfico absorvância X tempo (min) para determinação de atividade. Essa curva especificamente pertence a uma das replicatas da HXK2	55
Figura 23: Atividade de hexoquinase na primeira fase exponencial (metabolismo fermentativo) **Estatisticamente diferentes	55

Figura 24: Atividade de hexoquinase na fase estacionária (metabolismo respiratório).	
*Estatisticamente iguais	55
Figura 26: Atividade de Glk	57
Figura 25: Atividade de Hxk2	57
Figura 27: Modelo de inibição competitiva.....	58
Figura 28: Representação estrutural da HK2 obtida no Chimera através do arquivo 2NZZ do PDB	60
Figura 29: Representação estrutural da Hxk2 obtida pelo Chimera através do arquivo 1IG8 do PDB	61
Figura 30: BLAST sequência de aminoácidos da HK2 (2NZZ) e da Hxk2 (1IG8).....	62
Figura 31: Sobreposição dos monômeros da HK2 (rosa) e Hxk2 (azul). Imagem gerada pelo Chimera (MENG et al., 2006)	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de componentes mistura Dropout	28
Tabela 2: Cepas de trabalho.....	30
Tabela 3: Primers para PCR para obtenção dos amplicons	40
Tabela 4: Composição para obtenção dos amplicons HXK1-LEU2 e HXK2-URA3	41
Tabela 5: Programação do PCR para fragmento HXK2-URA3.....	41
Tabela 6: Programação do PCR para fragmento HXK1-LEU2	42
Tabela 7: Construção das cepas.....	43
Tabela 8: Ensaio de dosagem de atividade de hexoquinase na ausência de T6P	48
Tabela 9: Ensaio de dosagem de atividade de hexoquinase na presença de T6P.....	50
Tabela 10: Medidas da atividade da cepa HXK2	57
Tabela 11: Medidas de atividade da cepa GLK1	57
Tabela 12: Valores de Km e Vmáx para a cepa HXK2 na presença e ausência de T6P.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Triofosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERA	Autorregulação de repressão ao etanol
Euroscarf	European <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Archive for Functional Analyses, Franckfurt – Germany
F1,6P ₂	Frutose-1,6-bisfosfato
F6P	Frutose-6-fosfato
FADH ₂	Dinucleotídeo de Flavina e Adenina Reduzida
G1P	Glicose-6-fosfato
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GAL	Gene que codifica galactose
GCR1	Proteína Reguladora de Glicose 1
GK/HK4	Glicoquinase ou Hexoquinase IV – Isoforma de mamíferos da hexoquinase
Glk	Glicoquinase – Isoforma de <i>S. cerevisiae</i> da hexoquinase. Também conhecida como hexoquinase 3
GLK1	Gene que codifica Glk de <i>S. cerevisiae</i> ou cepa que apenas expressa Glk
<i>glk1Δ</i>	Cepa deletada no gene GLK1
GTP	Guanosina trifosfato

HK1	Isoforma 1 da hexoquinase de mamíferos
HK2	Isoforma 2 da hexoquinase de mamíferos
HK3	Isoforma 3 da hexoquinase de mamíferos
Hxk1	Isoforma 1 da hexoquinase de <i>S. cerevisiae</i>
HXK1	Gene que codifica Hxk1 ou cepa que apenas expressa Hxk1
Hxk2	Isoforma 2 da hexoquinase de <i>S. cerevisiae</i>
HXK2	Gene que codifica Hxk2 ou cepa que apenas expressa Hxk2
<i>hvk1Δ</i>	Cepa deletada no gene HXK1
<i>hvk2Δ</i>	Cepa deletada no gene HXK2
<i>hvk1Δglk1Δ</i>	Cepa deletada nos genes HXK1 e GLK1, ou seja, expressa apenas o gene HXK2
<i>hvk1Δhvk2Δ</i>	Cepa deletada nos genes HXK1 e HXK2, ou seja, expressa apenas o gene GLK1
<i>hvk2Δglk1Δ</i>	Cepa deletada nos genes HXK2 e GLK1, ou seja, expressa apenas o gene HXK1
HXK1-LEU2	Fragmento construído com trechos homólogos à HXK1 e que contém o gene LEU2 – para recombinação homóloga
HXK2-URA3	Fragmento construído com trechos homólogos à HXK2 e que contém o gene URA2 – para recombinação homóloga
HPLC/CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki	Constante de inibição
LB	Meio Luria Bertani
LEU2	Gene que codifica o aminoácido leucina
Mig1	Inibidor multicópia da expressão do gene GAL
NAD ⁺ /NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidada/Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida

NADP ⁺ /NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidada/Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
OD ₆₀₀	Densidade Ótica a 600 nm
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia da polimerase
PDB	Protein DataBase
PFK1	Fosfofrutoquinase 1
PubMed	Motor de busca do banco de dados MEDLINE de publicações médicas
RMSD	Root Mean Square Deviation
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rpm	Rotação por minuto
Snf1	Sucrose NonFermenting
STRE	Elemento Responsivo ao Estresse
T6P	Trealose-6-fosfato
TAB	TA Box
Tpp	Trealose-6-fosfato fosfatase
Tps1	Trealose-6-fosfato sintase
UDP	Uridina difosfato
URA3	Gene que codifica uracila
WT	Wild-Type – cepa selvagem
YPD	Meio de cultura ou estoque que contém extrato de levedo, peptona e glicose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVO	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. CEPAS E CONDIÇÕES DE CULTURA	28
3.2. TRANSFORMAÇÃO PLASMIDIAL EM <i>Escherichia coli</i>	31
3.2.1. Condições de Cultivo e Crescimento de <i>Escherichia coli</i>	31
3.2.2. Preparo de Células Bacterianas Competentes	31
3.2.3. Transformação Bacteriana por Choque Térmico	31
3.2.4. Extração de DNA Plasmidial de <i>Escherichia coli</i>	32
3.3. CONSTRUÇÃO DAS CEPAS DE TRABALHO	32
3.3.1. Obtenção Dos Amplicons	34
3.3.2. Transformação Do Amplicon Em <i>S. cerevisiae</i>	42
3.3.3. Confirmação Das Deleções	44
3.4. CURVA DE CRESCIMENTO	44
3.5. CONSUMO DE OXIGÊNIO	44
3.6. CONSUMO DE GLICOSE	45
3.7. ATIVIDADE DE HEXOQUINASE	46
3.7.1. Obtenção do Extrato celular	46
3.7.2. Determinação de Proteína Total	46
3.7.3. Dosagem da Atividade de Hexoquinase na Ausência de T6P	47
3.7.4. Dosagem da Atividade de Hexoquinase na Presença de T6P	49
3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50
3.9. COMPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. CONSTRUÇÃO DAS CEPAS	51
4.2. CURVA DE CRESCIMENTO	49
4.3. CONSUMO DE GLICOSE	52

4.5. CONSUMO DE OXIGÊNIO	53
4.4. ATIVIDADE DE HEXOQUINASE	54
4.4.1. Atividade de Hexoquinase na Ausência de Trealose-6-fosfato	54
4.4.2. Atividade de Hexoquinase na Presença de Trealose-6-fosfato	56
4.5. ESTRUTURA	Erro! Indicador não definido.
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

A glicose é de grande importância metabólica em todos os organismos, desde microrganismos até os seres humanos (WILSON, 2003). Ela entra nas células por transportadores de glicose localizados na membrana plasmática e é fosforilada pela hexoquinase, produzindo a glicose-6-fosfato (G6P).

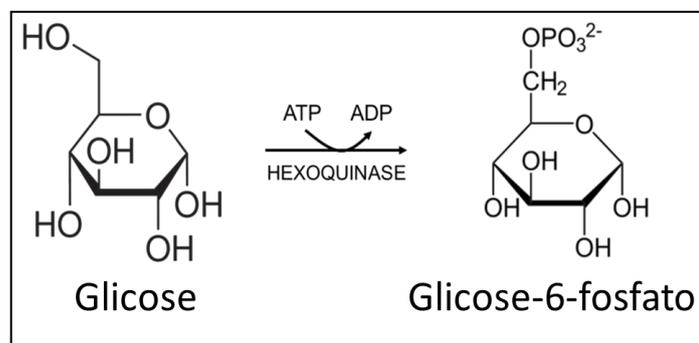


Figura 1: Reação catalisada pela hexoquinase

Essa reação é considerada uma das principais reações de uma via extremamente importante para as células, a glicólise, uma via necessária à obtenção de energia (ATP) a partir da glicose, que também produz precursores de biossíntese de outros processos e vias celulares. (WILSON, 2003)

A G6P produzida a partir da fosforilação da glicose pode ser direcionada para diferentes vias metabólicas além da via glicolítica, como a via das pentoses-fosfato, necessária à obtenção de nucleotídeos e NADPH para biossínteses redutoras, para a síntese de glicogênio, reserva energética celular, e, no caso de alguns organismos como a levedura *S. cerevisiae*, a G6P também é um intermediário para a síntese de trealose, uma importante molécula de manutenção da integridade das estruturas celulares diante de diferentes tipos de estresse (ELEUTHERIO et al., 2014; ROBERTS; MIYAMOTO, 2015; WILSON, 2003).

Na via glicolítica, a glicose é convertida em piruvato através de 10 reações. Três dessas reações são pontos de regulação da via por serem exergônicas ($\Delta G'$ de valor bem negativo), ou seja, reações praticamente irreversíveis. Essas reações são a conversão da

glicose em G6P pela hexoquinase, a conversão da frutose-6-fosfato (F6P) em frutose-1,6-bisfosfato (F1,6P₂) pela fosfofrutoquinase-1 e a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato através da piruvato quinase. A G6P segue na via glicolítica sendo convertida em F6P pela ação da enzima fosfohexose-isomerase, dando continuidade à via glicolítica (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

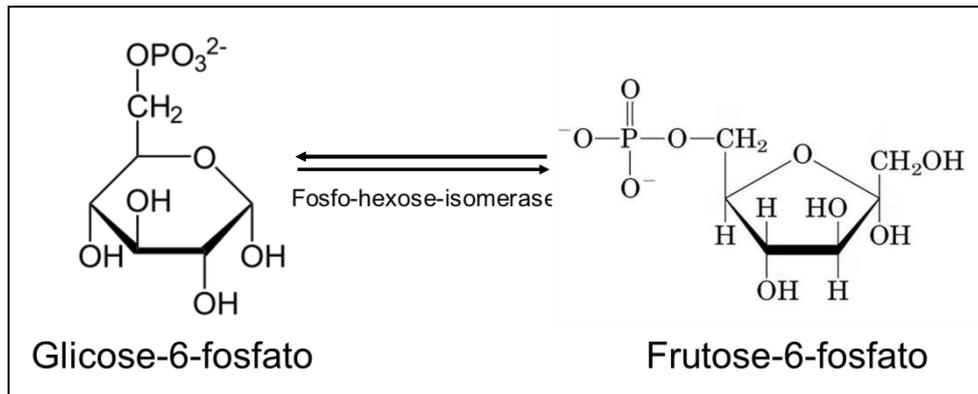


Figura 2: G6P na via glicolítica

A via das pentoses-fosfato gera NADPH e precursores necessários para vias do anabolismo, como a ribose-5-fosfato, que são necessários para a síntese de nucleotídeos, por exemplo. O NADPH é utilizado em diferentes biossínteses redutivas como síntese de ácidos graxos além de ser importante para o combate das espécies reativas de oxigênio (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

A G6P também pode ser redirecionada para a síntese do glicogênio, como está descrito na figura 4. O glicogênio é um polímero de glicose que funciona como um estoque de energia e para momentos em que não há os nutrientes necessários para uso (ROACH et al., 2016).

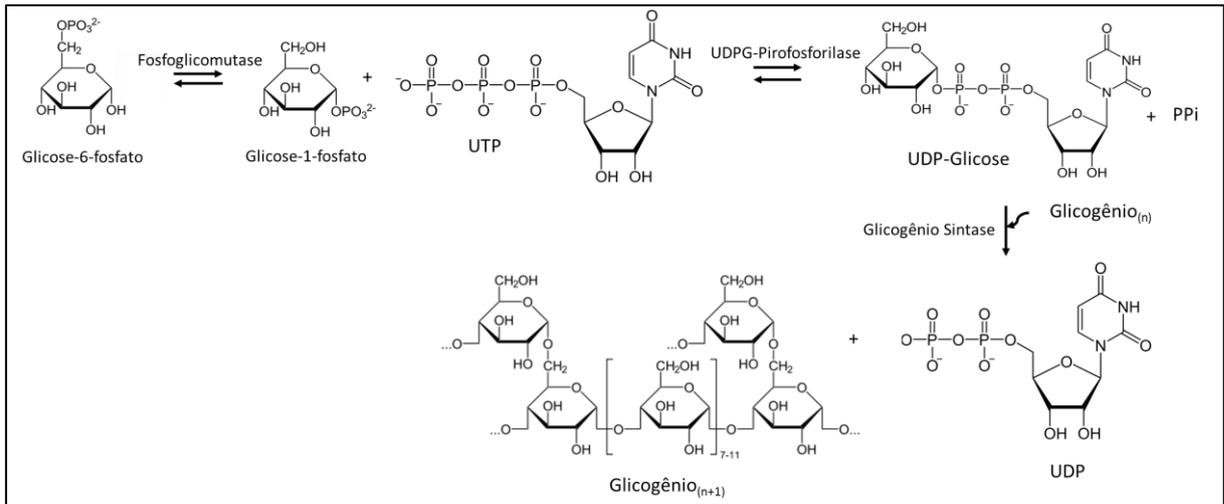


Figura 3: G6P na síntese de glicogênio

Em alguns organismos existe ainda outra via que utiliza G6P como intermediário, a síntese de trealose. A trealose é dissacarídeo, não redutor, formada por dois resíduos de glicose ligados por uma ligação glicosídica α -1,1 (ELEUTHERIO et al., 2014). A via de síntese da trealose nunca foi observada em mamíferos, porém já foi encontrada em outros organismos, como bactérias, fungos, insetos, nematódeos e plantas. Nos diferentes organismos foram observadas diferentes funções para a trealose. Em insetos, foi observado que o nível de trealose cai rapidamente durante atividades que necessitam de muita energia, como o voo, indicando que o dissacarídeo possui um papel de fonte de energia. Em algumas bactérias a trealose pode desempenhar um papel como um componente da parede celular e em outras seu papel ainda não está muito claro. Em plantas, já foi observado um papel de oligossacarídeos de trealose na proteção contra estresse às células (ELBEIN et al., 2003).

A trealose também está envolvida com a aquisição de tolerância a condições adversas em anidrobiontes. Esses organismos são capazes de sobreviver em condições de desidratação muito elevada, podendo chegar a até 99% da água removida, por décadas em condições favoráveis até que haja água disponível novamente (ELBEIN et al., 2003).

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* a trealose age na tolerância a situações de estresse como o oxidativo, osmótico e térmico, estabilizando estruturas das bicamadas lipídicas e das proteínas, além de evitar a agregados proteicos. Em situações de estresse e de escassez de nutrientes a quantidade de trealose pode variar de 1% a até 20% do peso seco da célula. A via de síntese da trealose mais comumente observada e a que é encontrada em *S. cerevisiae* é a descrita na figura 3 onde a trealose-6-fosfato sintase, Tps1, catalisa a reação da

G6P e uridina difosfato glicose (UDP-glicose), gerando trealose-6-fosfato (T6P), enquanto T6P é convertida em trealose pela TPP com liberação de um fosforo inorgânico (ELEUTHERIO et al., 2014).

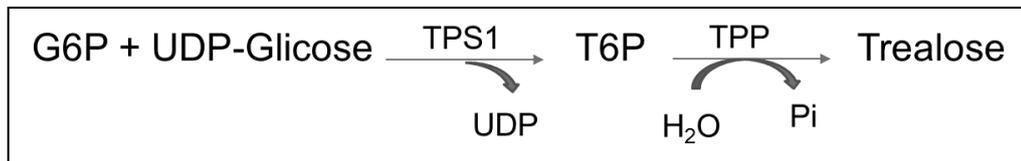


Figura 4: G6P e a via mais comum de síntese de trealose

Estudos mostraram que células de levedura deficientes na proteína Tps1 não são capazes de crescer em presença de glicose, mesmo que as enzimas da glicólise estejam ativas. Isso é um indicativo de que a T6P regula a via glicolítica (BLÁZQUEZ et al., 1993; FRANCOIS; PARROU, 2001).

Na *S. cerevisiae*, o fluxo glicolítico é principalmente regulado pelo nível das atividades de fosfofrutoquinase 1 e piruvato quinase, assim como ocorre nos mamíferos. As atividades destas enzimas são reguladas principalmente em função da demanda energética da célula. Porém, diferentemente dos mamíferos, as isoformas da hexoquinase de *S. cerevisiae* não são inibidas pela G6P (BLÁZQUEZ et al., 1993).

S. cerevisiae possui três isoformas de hexoquinase: a hexoquinase I, a hexoquinase II e a glicoquinase. Essas enzimas não apresentam afinidade apenas por glicose, elas também apresentam afinidade por manose e frutose, no caso da hexoquinase I e hexoquinase II, ou apenas por manose, como no caso da glicoquinase. (HERRERO et al., 1995).

Experimentos realizados *in vitro* com as três isoformas purificadas mostraram que a T6P é um inibidor das atividades das isoformas. Essa inibição, porém, ocorre de forma diferenciada nas isoformas. Foi observado em relação ao inibidor T6P que a hexoquinase I (Hxk1) apresentou K_i de 200 μM , sendo bem menos inibida que a hexoquinase II (Hxk2), que apresentou K_i de 40 μM . A glicoquinase (Glk) manteve atividade inalterada até concentrações de T6P de 5 mM. Esse estudo sugere que a T6P poderia ter o mesmo papel na *S. cerevisiae* que a G6P tem em organismos superiores, regulando a atividade da hexoquinase (BLÁZQUEZ et al., 1993).

Essa possível inibição seletiva da Hxk2 de *S. cerevisiae* pode ser de extremo interesse para o desenvolvimento de fármacos, como será discutido a seguir.

A sobrevivência de organismos multicelulares requer sistemas de controle que evitam a proliferação celular exagerada (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). O câncer é descrito como uma doença que envolve um crescimento celular anormal, podendo chegar a metástase, que é uma situação onde o câncer se espalha para outras partes do corpo. Entender a origem do câncer e as características dessa proliferação exacerbada é um tópico de pesquisa importante para o desenvolvimento de fármacos para o combate à doença (COURTNAY et al., 2015). As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam que cerca de 600.000 novos casos de câncer eram esperados para o Brasil para o biênio 2016-2017. É um dado alarmante que ressalta a importância dos estudos acerca do tema.

Todas as células, diferenciadas ou não, contam com a glicólise para obtenção de energia. A via glicolítica é um conjunto de reações anaeróbicas que converge para a conversão de uma molécula de glicose a duas de piruvato com formação de duas moléculas de ATP por glicose, além de duas moléculas de NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida). Na ausência de oxigênio o piruvato é convertido em ácido láctico, no caso dos mamíferos, ou em etanol, em microrganismos como a *S. cerevisiae*, para regeneração do NAD^+ citosólico para manutenção do equilíbrio de NAD^+/NADH celular na ausência de atividade respiratória, num processo metabólico anaeróbico denominado fermentação. As duas moléculas de piruvato também podem ser transportadas para o interior da mitocôndria, onde são convertidas em acetil-CoA, que adentra o ciclo do ácido cítrico ao reagir com o oxaloacetato, gerando uma molécula de GTP e três moléculas de NADH, além de uma molécula de dinucleotídeo de flavina e adenina reduzida (FADH_2). As moléculas de NADH e FADH_2 são oxidadas nos complexos da cadeia transportadora de elétrons, presentes na membrana interna da mitocôndria, transferindo seus elétrons em uma sequência de reações de oxirredução, terminando no receptor final de elétrons, o oxigênio. Essas reações causam um bombeamento de prótons para o espaço intermembranar da mitocôndria, criando uma diferença de potencial. Essa energia eletroquímica gerada possibilita a ativação da ATP sintase, que atua fosforilando ADP a ATP. Esse processo é chamado de fosforilação oxidativa, e se trata de um processo aeróbico, já que conta com o oxigênio como receptor final de elétrons e tem rendimento de 30 a 32 moléculas de ATP por molécula de glicose (NGO et al., 2015; ZHOU; LIOTTA; PETRICOIN, 2017).

Em 1924, Otto Warburg notou que, mesmo em presença de oxigênio, a principal via que as células de câncer usam para obtenção de energia é a glicólise seguida por conversão do piruvato a ácido láctico (fermentação) e não a fosforilação oxidativa, mesmo esta sendo mais rentável energeticamente. Ele observou isso devido ao grande consumo de glicose e a alta produção de lactato pelas células cancerosas. Também foi observado que a proporção de piruvato convertido a acetil-CoA diminuiu significativamente e, portanto, a entrada do acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico diminuiu. Esse efeito foi chamado de Efeito Warburg, sendo verificado em uma ampla variedade de células tumorais (COURTNAY et al., 2015; NGO et al., 2015).

Originalmente, esse estado metabólico alterado foi considerado resultado da adaptação de algumas células cancerosas para um novo estado bioenergético, implicando disfunções no metabolismo mitocondrial. Na verdade, evidências apontam que tal efeito resulta de um rearranjo metabólico muito mais complexo, porém ainda não totalmente evidenciado. Não apenas a glicólise, mas também o ciclo do ácido cítrico e metabolismo anabólico em geral sofrem adaptações para responder à nova função primária dessa célula, isto é, proliferação descontrolada, fornecendo não apenas energia, mas também blocos de construção para síntese de nucleotídeos, aminoácidos e ácidos graxos (SCATENA et al., 2008).

Algumas enzimas glicolíticas são altamente expressas em células cancerosas, como a lactato desidrogenase, glicose-6-fosfato isomerase e a hexoquinase II (HK2). Uma nova evidência que relaciona a glicólise à via das pentoses-fosfato e ao metabolismo mitocondrial parece indicar a existência de um *status* metabólico peculiar típico de células proliferantes, no qual a glicólise representa o sinal metabólico central que regula a proliferação celular, adaptando o metabolismo das células cancerosas às pressões seletivas do meio (SCATENA et al., 2008).

Essa peculiaridade do metabolismo tumoral (efeito Warburg) vem sendo um alvo promissor para estudo de terapias anti-tumorais que tem como alvo o metabolismo. A inibição da glicólise pode ser usada como um alvo para desenvolvimento de terapias anti-tumorais, já que poderia restringir a obtenção de energia e de substratos necessários para a proliferação celular tumoral, facilitando ou até induzindo a apoptose (SCATENA et al., 2008).

A hexoquinase é um dos principais alvos para esse tipo de tratamento. Resultados de um estudo realizado por Wolf et al., 2011, mostraram que a HK2 é um regulador majoritário do efeito Warburg em glioblastomas multiformes, agindo como um inibidor da fosforilação

oxidativa. Também foi mostrado, através de experimentos *in vitro*, que a inibição da HK2 nas células do glioblastoma, diminuiu a proliferação celular, tornando-as células mais sensíveis a terapias anti-tumorais, como radioterapia e alguns tipos de quimioterapia. A deleção da HK2 diminuiu o efeito Warburg e promoveu um metabolismo oxidativo normal da glicose, o que foi observável através da diminuição do lactato extracelular, aumento da expressão das proteínas da fosforilação oxidativa e aumento de consumo de oxigênio. Já a superexpressão de HK2 promoveu o aumento da proliferação, a resistência à apoptose e formação de lactato. Os mecanismos de como a hexoquinase inibe a oxidação fosforilativa, promove a proliferação celular e o aumento de lactato ainda são desconhecidos (WOLF et al., 2011). Alguns compostos, como a 2-deoxiglicose e o 3-bromopiruvato, já estão sendo submetidas a testes em fase de teste pré-clínico e clínico e funcionam como inibidores da HK (LIS et al., 2016; SCATENA et al., 2008).

O modelo utilizado neste trabalho é a levedura *S. cerevisiae* e existem várias vantagens de se trabalhar com ela. Uma das características que muito interessa para esse trabalho é o fato de a levedura possuir o efeito Crabtree ou repressão catabólica. A levedura *S. cerevisiae* vem se apresentando como um modelo para estudos bioquímicos de células cancerosas; dentre outras vantagens, esta levedura apresenta um efeito metabólico semelhante ao efeito Warburg observado no câncer, denominado efeito Crabtree. O Efeito Crabtree é definido como a repressão do fluxo respiratório induzido pela glicose, mesmo em presença de oxigênio (HAMMAD et al., 2016). Em altas concentrações de glicose a levedura possui metabolismo fermentativo mesmo em presença de oxigênio; nestas condições, apenas Hxk2 é expressa. Se a disponibilidade de glicose diminui no meio, há uma adaptação do metabolismo e a levedura passa a respirar; nestas condições, Hxk1 e Glk são expressas. A regulação das hexoquinases ocorre principalmente por mecanismos que podem aumentar ou diminuir a quantidade dessas enzimas (controle transcricional). A glicose parece induzir a transcrição do gene *HXK2*, mas o mecanismo sobre a forma como isso ocorre, não é completamente conhecido. O efeito combinatório de três seqüências reguladoras do promotor *GLK1*, *STRE* (*STress Responsive Element* - elemento responsivo ao estresse), *ERA/TAB* (*Ethanol Repression Autoregulation* - autoregulação de repressão ao etanol - *TA Box*) e *GCR1* (*GlyColysis Regulation* - proteína reguladora da glicólise), leva à regulação da transcrição do gene *GLK1*, ou seja, reprime a transcrição de *GLK1* em alta concentração de glicose ou na presença de outras fontes de carbono, como frutose ou manose, e ativa a expressão de *GLK1*

em baixos níveis de glicose. A transcrição do gene *HXK1* é reprimida na presença de glicose por fatores de transcrição que operam através de um elemento ERA e, após a depleção de glicose, é observada uma rápida ativação da transcrição, através da regulação modulada por vários elementos STRE (RODRÍGUEZ et al., 2001).

Algumas evidências mostram que a Hxk2 teria um papel na sinalização da glicólise e que isso é alcançado através da interação da Hxk2 com o repressor transcricional Mig1 (*Multicopy Inhibitor of GAL gene expression* - inibidor multicópia da expressão do gene GAL) e com a quinase Snf1 (*Sucrose NonFermenting*) (RIERA et al., 2008).

A ligação da Hxk2 com a Mig1 seria importante para a retenção da Hxk2 no núcleo. Quando não há glicose ou há pouca glicose Mig1 é fosforilada pela forma ativa da proteína quinase Snf1 (forma fosforilada da Snf1) e essa fosforilação acaba com a capacidade de repressão da Mig1, pois impossibilita que Mig1 se localize no núcleo. São alvos da repressão de Mig1: o ativador de genes que codificam proteínas da gliconeogênese, *CAT8*; genes que codificam proteínas necessárias ao catabolismo de fontes alternativas de energia, como galactose e maltose, *GAL4* e *MAL*; e genes que codificam proteínas do ciclo do ácido cítrico e cadeia transportadora de elétrons. Quando fosforilada Mig1 é transportada para o citoplasma, a Hxk2 não entra no núcleo e a repressão não ocorre, permitindo um metabolismo respiratório. Quando há muita glicose, Mig1 e a Hxk2 interagem no núcleo e a repressão ocorre. A Hxk2 também parece ter um papel regulatório na desfosforilação da Snf1 (Snf1 está não ativa quando desfosforilada); o mecanismo dessa regulação não é completamente elucidado (GANCEDO; FLORES, 2008).

Portanto, em condições de alta disponibilidade de glicose *S. cerevisiae* apresenta um efeito similar ao efeito Warburg, podendo-se dizer que a levedura imita o metabolismo de células tumorais sob essas condições, fazendo dela um excelente modelo de estudo para esses objetivos, já que em ambos os casos há predomínio do metabolismo fermentativo e, em ambos os casos, a hexoquinase II é a isoforma mais expressa (DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011).

Desta forma, crescendo a levedura em quantidades adequadas de glicose, de modo que a mesma esteja em repressão catabólica é possível avaliar o metabolismo fermentativo, com características semelhantes às células tumorais, já que em ambos os casos a isoforma predominante é a dois e estão em metabolismo fermentativo. Com o passar do tempo, é

possível observar a adaptação do metabolismo e, então, o metabolismo respiratório como descrito na curva de crescimento apresentada na figura 5.

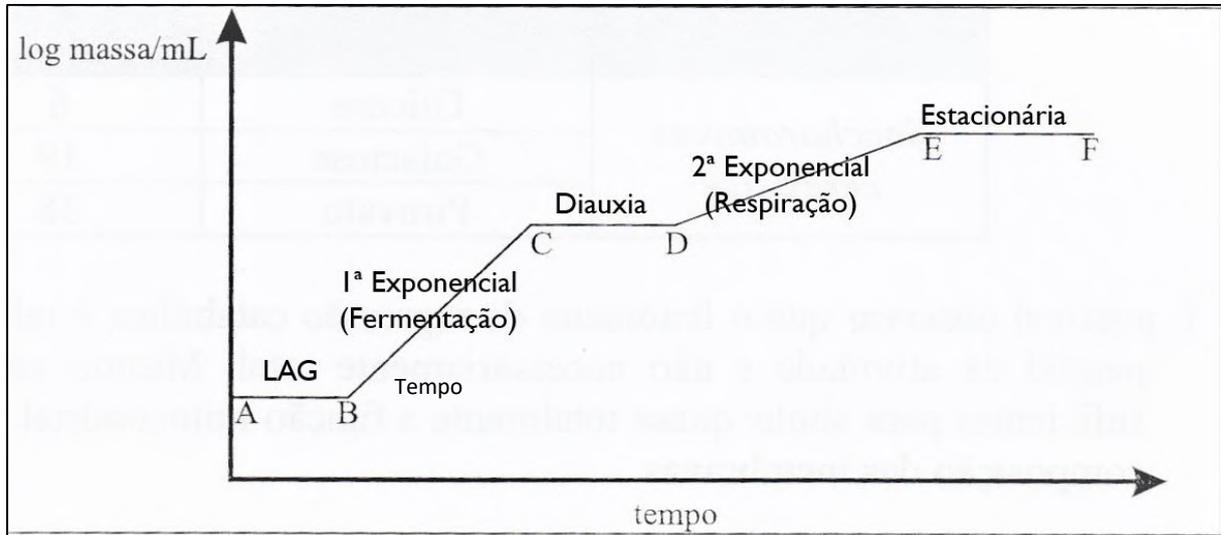


Figura 5: Curva de crescimento clássica da *S. cerevisiae*

Na curva de crescimento da figura 5, a fase AB é chamada de fase LAG e é uma fase de adaptação metabólica. A fase BC é a fase onde há a fermentação da glicose do meio, chamada de primeira exponencial, gerando etanol, no caso da levedura. As enzimas ativas nesse metabolismo que tem glicose como fonte de carbono em excesso são constitutivas e essa é a fase onde o metabolismo da *S. cerevisiae* se assemelha ao metabolismo tumoral. A fase CD é a diauxia, quando a glicose acaba e a levedura necessita de outro combustível para obter energia. Então a diauxia também é uma fase de adaptação metabólica, onde as enzimas da respiração estão sendo desreprimidas. Nesse caso, ela vai utilizar o etanol gerado na fermentação para, através da fosforilação oxidativa (metabolismo respiratório), obter energia. A fase DE é a segunda exponencial, onde o etanol está sendo respirado. Por fim, a fase EF é a estacionária, onde não há mais crescimento celular pela exaustão de um nutriente, como a fonte de energia.

Além disso, a *S. cerevisiae* também possibilita uma fácil manipulação genética, possuindo o mecanismo de recombinação homóloga intrínseco à ela e muito eficiente, o que se torna muito útil. Isso se dá por que a *S. cerevisiae* tem um sistema de reparo de alta eficiência e do fato de não haver necessidade da introdução de recombinases. A recombinação homóloga consiste na troca de um fragmento de DNA do genoma da levedura por um

fragmento exógeno, desde que haja sequências homólogas à região que se quer fazer a troca, como mostrado na figura 6.

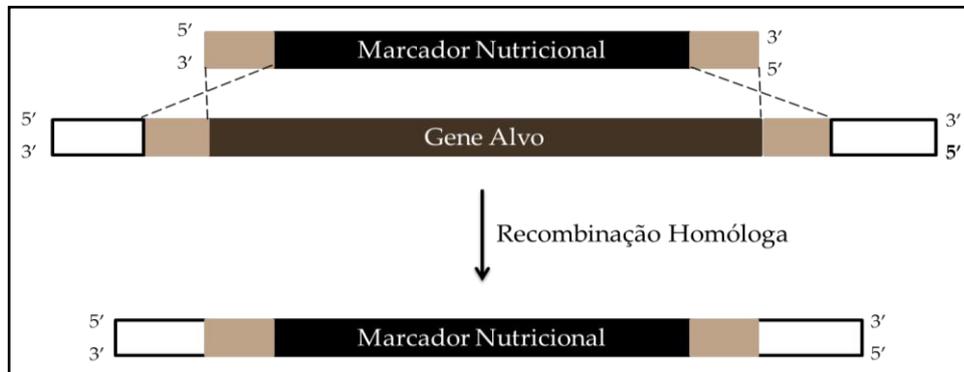


Figura 6: Mecanismo de recombinação homóloga. A recombinação homóloga consiste na substituição de uma determinada parte do genoma por uma outra quando há homologia entre as sequências.

A *S. cerevisiae* também possui outra característica muito interessante, que é a possibilidade de substituição ortóloga. Uma porcentagem substancial dos genes conservados da levedura e de humanos tem os mesmos papéis nos dois organismos, com isso uma grande parte das enzimas da levedura pode ser substituída por suas correspondentes humanas sem perda de função ou viabilidade (KACHROO et al., 2015).

As hexoquinases de mamíferos são semelhantes às hexoquinases de levedura, o que é um fator que pode ser interessante ao se pensar no desenvolvimento de fármacos utilizando a T6P como inibidor seletivo para as diferentes hexoquinases. Isso porque a hexoquinase II de levedura parece ser inibida seletivamente por T6P, então, devido à semelhanças regiões de ambas as enzimas, pode-se levantar o questionamento se a isoforma dois de humanos também seria inibida seletivamente pela T6P.

Os mamíferos possuem quatro isoformas de hexoquinase: a hexoquinase I (HK1), que é predominantemente expressa no cérebro e nos glóbulos vermelhos, mas é expressa em todo o organismo; a hexoquinase II que é a isoforma predominante no músculo cardíaco e esquelético e tecido adiposo; a hexoquinase III (HK3) que é expressa em todo o organismo, mas sem predominância; e a hexoquinase IV (HK4) que também é chamada de glicoquinase (GK) e é a isoforma predominantemente expressa no fígado e no pâncreas (ROBERTS; MIYAMOTO, 2015).

As isoformas 1, 2 e 3 humanas tem maior afinidade por glicose, se comparadas com a GK que possui baixa afinidade e não é regulada pela G6P como as outras isoformas. GK tem

massa molecular de aproximadamente 50 kDa, assim como as três isoformas da hexoquinase da *S. cerevisiae* (Hxk1, Hxk2 e Glk1), enquanto HK1, HK2 e a HK3 possuem massa molecular de aproximadamente 100 kDa, o que suspeita-se ser o resultado de uma duplicação e fusão de um único domínio de hexoquinase que ocorreu durante a evolução. Essa suspeita se dá devido ao fato de que as isoformas com 100 kDa possuem uma repetição na sequência interna, como evidenciado por uma extensa similaridade entre o N-terminal e o C-terminal das metades da enzima, que são semelhantes às sequências presentes nas hexoquinase de 50 kDa. Estudos confirmaram funções diferentes entre as metades N- e C-terminais apesar de apresentarem sequências de aminoácidos semelhantes na HK1. A metade C-terminal da HK1 é ativa enquanto a N-terminal é inativa. Apesar de G6P se ligar as duas metades da HK1, o sítio regulatório da G6P na HK1 é localizado na metade N-terminal. Estudos mostraram que as duas metades de HK2 são ativas cataliticamente e são inibidas por G6P, mas as características cinéticas das metades N-terminal e C-terminal são bem diferentes, onde a metade N-terminal tem afinidade um pouco maior por ATP e o K_i pela G6P é bem menor que o do C-terminal. (AHN et al., 2009; ROBERTS; MIYAMOTO, 2015).

2. OBJETIVO

O trabalho teve como objetivo principal investigar o efeito inibitório de T6P sobre Hxk2 de *S. cerevisiae*.

Objetivos específicos:

- 1) Construir leveduras mutantes que expressem apenas uma das isoformas de hexoquinase;
- 2) Investigar o papel desempenhado pelas isoformas individuais das hexoquinases sobre o perfil bioenergético e o crescimento celular;
- 3) Avaliar o potencial inibitório de T6P sobre as mesmas isoformas individuais das hexoquinases em extrato celular;
- 4) Avaliar as semelhanças estruturais entre a isoforma hexoquinase 2 de *S. cerevisiae* e a isoforma hexoquinase 2 humana a partir de estruturas cristalográficas já existentes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CEPAS E CONDIÇÕES DE CULTURA

Meios:

- 1) YPD 2% : Extrato de Levedura 1 % p/v, Peptona 2 % p/v, Glicose 2 % p/v ; para solidificar o meio, adicionou-se Agarose 2% p/v
- 2) *Dropout mix* – É a combinação dos componentes da tabela 1 menos o suprimento apropriado. Os componentes e suas respectivas quantidades estão descritos na tabela 1:

Tabela 1: Lista de componentes mistura *Dropout*

Adenina	0,5g	Leucina	10,0g
Alanina	2,0g	Lisina	2,0g
Arginina	2,0g	Metionina	2,0g
Asparagina	2,0g	Ácido para-aminobenzóico	2,0g
Ácido Aspártico	2,0g	Fenilalanina	2,0g
Cisteína	2,0g	Prolina	2,0g
Glutamina	2,0g	Serina	2,0g
Ácido Glutâmico	2,0g	Treonina	2,0g
Glicina	2,0g	Triptofano	2,0g
Histidina	2,0g	Tirosina	2,0g
Inositol	2,0g	Uracila	2,0g
Isoleucina	2,0g	Valina	2,0g

- 3) Meio *Dropout* sem uracila : Base nitrogenada sem aminoácidos 0,67 % p/v, Glicose 2 % p/v, *Dropout mix* sem uracila 0,2 % p/v, Agarose 2% (p/v)

- 4) Meio *Dropout* sem leucina: Base nitrogenada sem aminoácidos 0,67 % p/v, Glicose 2 % p/v, *Dropout mix* sem leucina 0,2 % p/v
- 5) Meios para verificação de resistência à geneticina: adicionou-se ao meio geneticina 200 mg/L.

As células foram cultivadas em frascos Erlenmeyer preenchidos com 1/5 de seu volume com o meio de cultivo e incubadas a 28°C e 160 rpm e coletadas em metabolismo fermentativo (primeira fase exponencial) ou em metabolismo respiratório (fase estacionária). As cepas utilizadas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Cepas de trabalho

Cepa	Genótipo de Interesse	Fenótipo	Fonte
BY4741 (WT)	<i>MATa leu2 his3 ura3 met</i> 15	Selvagem	Euroscarf, Alemanha
<i>hvk2Δ</i>	Isogênica a WT exceto <i>hvk2::kaMX4</i>	Não expressa Hvk2 Resistente à geneticina	Euroscarf, Alemanha
<i>glk1Δ</i>	Isogênica a WT exceto <i>glk1::kaMX4</i>	Não expressa Glk1 Resistente à geneticina	Euroscarf, Alemanha
HXK1+	Isogênica a <i>glk1Δ</i> exceto <i>hvk2::URA3</i>	Expressa apenas Hvk1 Resistente à geneticina	Este estudo
HXK2+	Isogênica a <i>glk1Δ</i> exceto <i>hvk1::LEU2</i>	Expressa apenas Hvk2 Resistente à geneticina	Este estudo
GLK1+	Isogênica a <i>hvk2Δ</i> exceto <i>hvk1::LEU2</i>	Expressa apenas Glk1 Resistente à geneticina	Este estudo

3.2. TRANSFORMAÇÃO PLASMIDIAL EM *Escherichia coli*

3.2.1. Condições de Cultivo e Crescimento de *Escherichia coli*

As células de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido LB (1% (p/v) triptona, 0,5 % (p/v) extrato de lêvedo, 1% (p/v) NaCl, pH 7,5) a 37°C e 300 rpm. Para seleção de células transformantes, que incorporaram o plasmídeo pRS315 ou YEp356R que contém o marcador de resistência ao antibiótico ampicilina, as células submetidas ao protocolo de transformação foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina na concentração de 100 µg.mL⁻¹, mantidas em estufa a 37°C para crescimento.

3.2.2. Preparo de Células Bacterianas Competentes

Uma colônia da cepa DH5α da bactéria *Escherichia coli* foi incubada por 16 h em 5 mL de meio de cultivo LB, sob agitação de 300 rpm a 37°C. Uma alíquota de 250 µL da suspensão bacteriana foi retirada e transferida para 25 mL de meio LB, em franco de Erlenmeyer de 250 mL. O cultivo foi mantido a 37°C e 300 rpm e o crescimento acompanhado até o início da fase logarítmica, OD₆₀₀ entre 0,2 e 0,4. As células foram coletadas por centrifugação a frio, 4000 rpm por 5 min a 4°C, e mantidas no gelo. O sedimentado de células foi ressuspensão em 12,5 mL de CaCl₂ 0,1 mol.L⁻¹ estéril, previamente gelado, e a suspensão celular foi mantida no gelo por 1 hora. As células foram coletadas por centrifugação a frio e ressuspensas em 2,5 mL de CaCl₂ 0,1 mol.L⁻¹ estéril. As células competentes foram aliqüotadas em microtubos, mantidas em gelo por 30 minutos e estocadas a -80°C para uso posterior.

3.2.3. Transformação Bacteriana por Choque Térmico

As células competentes de bactéria foram descongeladas lentamente em banho de gelo. Em um microtubo foram aliqüotados 200 µL da suspensão de células competentes e 1 µL da suspensão plasmidial. Os plasmídeos utilizados foram o pRS315 que possui o gene LEU2 e o plasmídeo YEp356R que possui o gene URA3. Ambos os plasmídeos possuem o marcador ampicilina para seleção. Foi usado (aproximadamente 500 ng) ou 1 µL de água estéril (controle negativo). A mistura foi suavemente agitada e mantida no gelo por 30

minutos. Após este tempo, as células foram submetidas a um choque térmico por incubação em banho de água a 42°C, por 2 minutos. Após este tempo, foi adicionado 1 mL de meio LB à suspensão, que foi incubada a 37°C por 1 hora. O conteúdo celular foi plaqueado em meio LB sólido contendo 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e mantido em estufa a 37°C por aproximadamente 18 h, para crescimento das colônias transformantes.

3.2.4. Extração de DNA Plasmidial de *Escherichia coli*

Para isolamento rápido e em pequena escala do DNA plasmidial de *E. coli*, foi utilizado o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). A extração de DNA plasmidial foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. A solução de DNA plasmidial foi armazenada em água ultrapura estéril a -20°C. O DNA plasmidial isolado foi utilizado para transformação na levedura.

3.3. CONSTRUÇÃO DAS CEPAS DE TRABALHO

A construção das cepas foi iniciada a partir de cepas deletadas no gene *HXK2* ou *GLK1*, individualmente, descritas na tabela 2.

As cepas duplamente deletadas obtidas neste estudo (que expressam apenas *HXK1*, *HXK2* ou *GLK1*), foram geradas através da incorporação de um fragmento de DNA específico (amplicon obtido por PCR) por transformação nas cepas de *S. cerevisiae* unideletadas. Tal fragmento de DNA contém a sequência de um marcador nutricional específico (LEU ou URA) flanqueado em suas extremidades por uma região homóloga à região a ser deletada no genoma (correspondente aos genes *HXK1* ou *HXK2*). Após a transformação deste fragmento em *S. cerevisiae*, esta levedura realiza um mecanismo próprio denominado recombinação homóloga, substituindo a região do genoma correspondente à região de flanqueio definida no amplicon inserido pelo gene do marcador nutricional do próprio amplicon. Foram construídos dois amplicons por PCR: *HXK1-LEU2* ou *HXK2-URA3*, para deleção genômica de *HXK1* ou *HXK2*, respectivamente, ocorrendo a inserção genômica dos marcadores *LEU2* ou *URA3*, respectivamente, recuperando a capacidade de sintetizar o marcador auxotrófico específico.

Dessa forma, foram sintetizados *amplicons* de DNA que obtivessem sequências homólogas ao gene da levedura. Essas sequências homólogas se localizavam a montante e a jusante dos genes de interesse (genes das isoformas da hexoquinase), de forma que, na

ocorrência do mecanismo de recombinação homóloga, todo o gene da hexoquinase definido pelo amplicon inserido seria deletado, como descrito na figura 6.

A obtenção desses *amplicons* foi realizada por PCR (*polymerase chain reaction*) e foram usados dois plasmídeos diferentes, pRS315 e YEp356R, amplificados, isolados e purificados segundo protocolo descrito em 3.2. Nesses plasmídeos foram amplificados os genes *LEU2* e *URA3*, respectivamente.

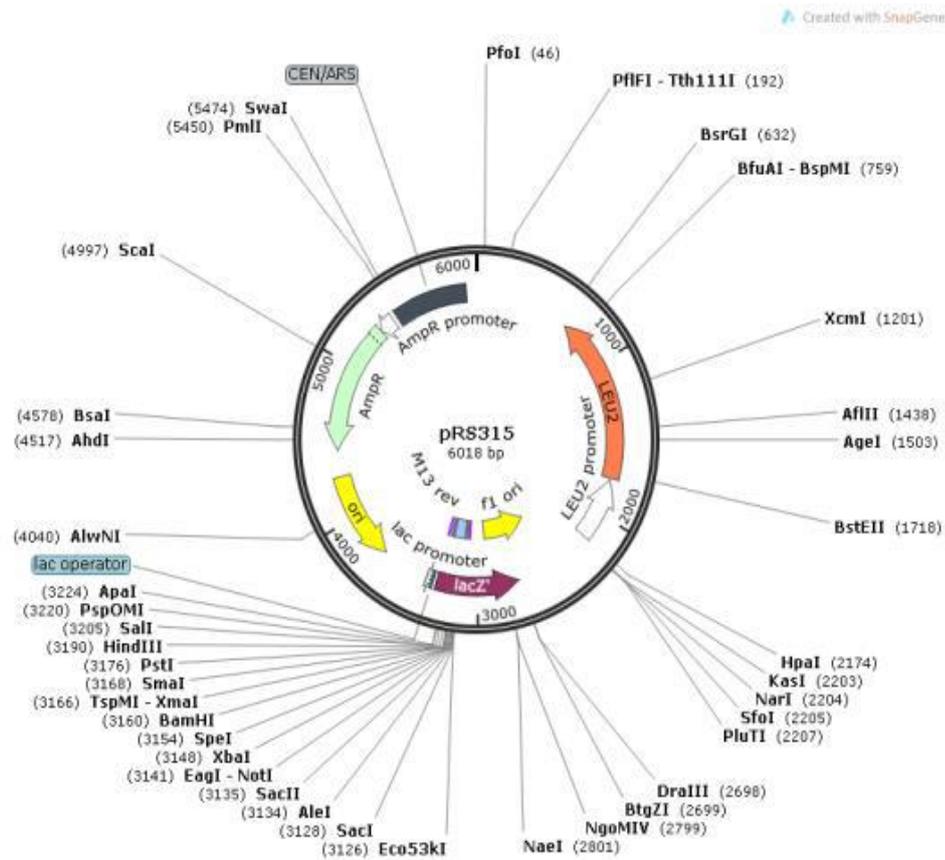


Figura 7: Plasmídeo pRS315

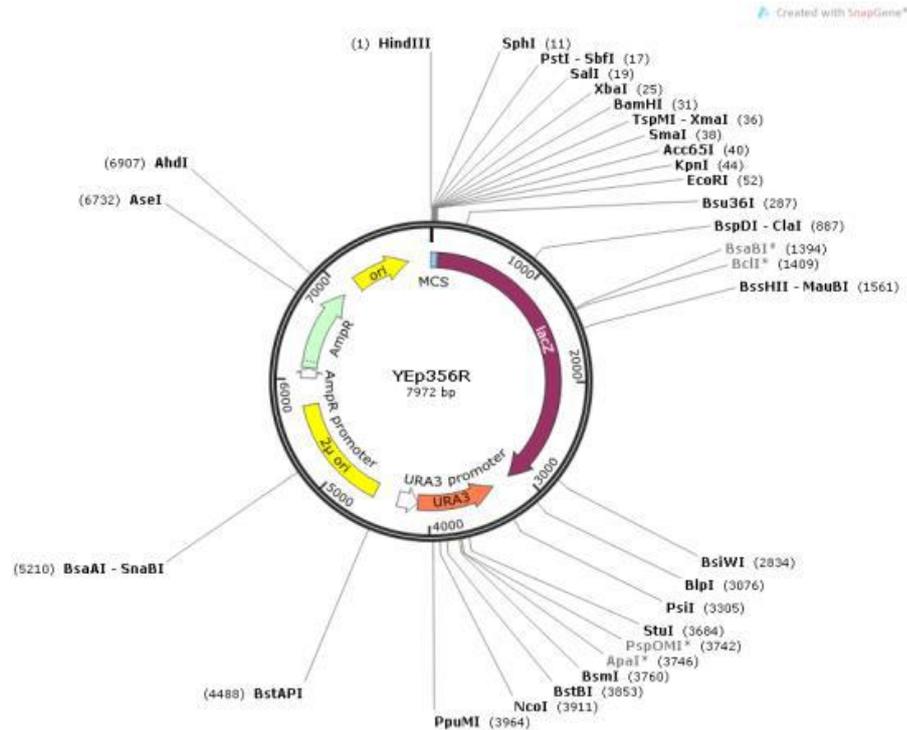


Figura 8: Plasmídeo YEp356R

3.3.1. Obtenção Dos Amplicons

Para a realização do PCR para obtenção dos amplicons, os *primers* utilizados continham um trecho ligante ao sítio correspondente a 25 pares de bases a montante do códon de iniciação de 29 pares de bases à jusante do códon de terminação para amplificação do gene do marcador auxotrófico, porém também continha uma região homóloga às sequências a montante e a jusante dos genes da hexoquinase. Desta forma, o amplicon obtido após a finalização do PCR apresenta o gene correspondente ao marcador nutricional *LEU2* (amplificado a partir do plasmídeo pRS315) flanqueado pelas regiões homólogas ao gene da *HXK1*, denominado fragmento *HXK1-LEU2*; ou o gene correspondente ao marcador nutricional *URA3* (amplificado a partir do plasmídeo YEp356R) flanqueado pelas regiões homólogas ao gene da *HXK2*, denominado fragmento *HXK2-URA3*. A homologia gênica é necessária à recombinação homóloga *S. cerevisiae*. O procedimento descrito encontra-se resumido na Figura 9. A obtenção dos amplicons foi obtida de acordo com o procedimento descrito em “Yeast Genetics: Methods and Protocol (SMITH; BURKE, 2014)

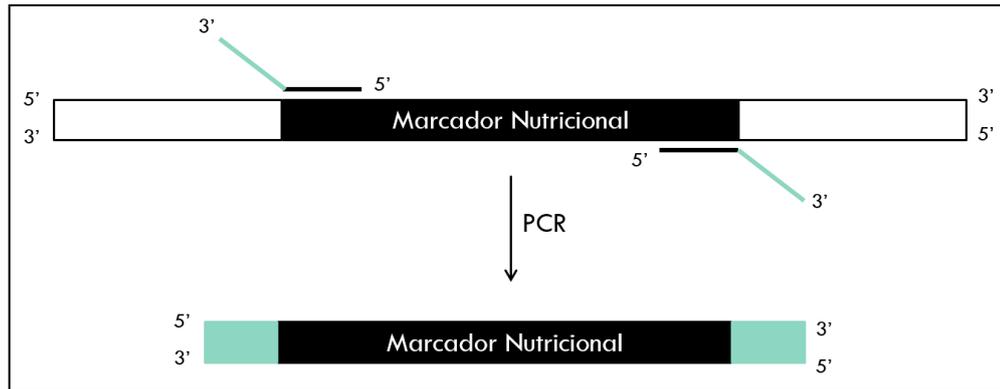


Figura 9: PCR para obtenção de *amplicons*

Para obter o fragmento HXK1-LEU2 foi amplicado o gene LEU2 do plasmídeo pRS315, a sequência desse amplicon está descrita abaixo.

CACATAAATATATATATATGTGTGTGTCTATATTTACATATTAAGCAAGGATTTTCTT
AACTTCTTCGGCGACAGCATCACCGACTTCGGTGGTACTGTTGGAACCACCTAAATCACC
AGTTCTGATACCTGCATCCAAAACCTTTTTAACTGCATCTCAATGGCCTTACCTTCTTCA
GGCAAGTTCAATGACAATTTCAACATCATTGCAGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTC
AACCTTATTCTTTGGCAAATCTGGAGCAGAACCGTGGCATGGTTCGTACAAACCAAATGC
GGTGTCTTGTCTGGCAAAGAGGCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCCAAGGAACCTG
GGATAACGGAGGCTTCATCGGAGATGATATCACCAAACATGTTGCTGGTGATTATAATAC
CATTTAGGTGGGTTGGGTTCTTAACTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGATGTT
GAACCTTCAATGTAGGGAATTCGTTCTTGATGGTTTCCTCCACAGTTTTTCTCCATAATCTT
GAAGAGGCCAAAACATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGGTGGCTCATGTTGT
AGGGCCATGAAAGCGGCCATTCTTGTGATTCTTTGCACTTCTGGAACGGTGTATTGTTAC
TATCCCAAGCGACACCATCACCATCGTCTTCCTTTCTCTTACCAAAGTAAATACCTCCCAC
TAATTCTCTGACAACAACGAAGTCAGTACCTTTAGCAAATTGTGGCTTGATTGGAGATAA
GTCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTACATGGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTC
TTACGGATTTTTAGTAAACCTTGTTCAAGTCTAACACTACCGGTACCCATTTAGGACCA
CCCACAGCACCTAACAAAACGGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATCTGGA
AGTGGGACACCTGTAGCATCGATAGCAGCACCAATTAATGATTTTCGAAATCGAAC
TTGACATTGGAACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATT
TCTTGACCAACGTGGTCACCTGGCAAACGACGATCTTCTTAGGGGCAGACATAGGGGCA
GACATTAGAATGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCTGAAATGTAAAAGGTAAG
AAAAGTTAGAAAGTAAGACGATTGCTAACACCTATTGGAAAAACAATAGGTCCTTAA
ATAATATTGTCAACTTCAAGTATTGTGATGCAAGCATTTAGTCATGAACGCTTCTCTATTC
TATATGAAAAGCCGGTTCGGCCTCTCACCTTTCTTTTTCTCCAATTTTTAGTTGAAA

AAGGTATATGCGTCAGGCGACCTCTGAAATTAACAAAAAATTTCCAGTCATCGAATTTGA
TTCTGTGCGATAGCGCCCCTGTGTGTTCTCGTTATGTTGAGGAAAAAATAATGGTTGCTA
AGAGATTTCGAACTCTTGCATCTTACGATACCTGAGTATTCCCACAGTTAGTCATAAGAT
TA**ACTCAACAAACCCACTCAA****ACTAATT**

Com o sublinhado tracejado está a sequência do gene LEU2, incluindo seu promotor, a com tracejado contínuo é a sequência da região homóloga ao gene da HXK1 e as regiões em negrito são as regiões onde os *primers* se anelam, ou seja, parte pertencente ao gene LEU2 e parte à regiões à montante e à jusante do gene da HXK1.

O *amplicon* HXK2-URA3 tem sequência descrita abaixo.

GTTGTAGGAATATAATTCTCCCACCATAATAAGTACGTCAATTCTGATATAATTAAT
TGAAGCTCTAATTTGTGAGTTTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTTTAGTTTT
GCTGGCCGCATCTTCTCAAATATGCTTCCCAGCCTGCTTTTCTGTAACGTTCCACCCTCTAC
CTTAGCATCCCTTCCCTTTGCAAATAGTCCTCTTCCAACAATAATAATGTCAGATCCTGTA
GAGACCACATCATCCACGGTTCTATACTGTTGACCCAATGCGTCTCCCTTGTCATCTAAAC
CCACACCGGGTGTCAATAATCAACCAATCGTAACCTTCATCTCTTCCACCCATGTCTCTTTG
AGCAATAAAGCCGATAACAAAATCTTTGTGCTCTTCGCAATGTCAACAGTACCCTTAGT
ATATTCTCCAGTAGATAGGGAGCCCTTGCATGACAATTCTGCTAACATCAAAGGCCCTCT
AGGTTCCCTTTGTTACTTCTTCTGCCGCTGCTTCAAACCGCTAACAATACCTGGGCCACC
ACACCGTGTGCATTCGTAATGTCTGCCATTCTGCTATTCTGTATACACCCGCAGAGTACT
GCAATTTGACTGTATTACCAATGTCAGCAAATTTTCTGTCTTCGAAGAGTAAAAAATTGTA
CTTGGCGGATAATGCCTTTAGCGGCTTAACTGTGCCCTCCATGGAAAAATCAGTCAAGAT
ATCCACATGTGTTTTTAGTAAACAAATTTGGGACCTAATGCTTCAACTAACTCCAGTAAT
TCCTTGGTGGTACGAACATCCAATGAAGCACACAAGTTTGTTTGCTTTTCGTGCATGATAT
TAAATAGCTTGGCAGCAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCACGTTCCCTTATATGTAGCTT
TCGACATGATTTATCTTCGTTTTTTGTTCTGTGCAGTTGGGTTAAGAATACTGGGCAATTT
CATGTTTCTTCAACACTACATATGCGTATATATACCAATCTAAGTCTGTGCTCCTTCCTTC
GTTCTTCCTTCTGTTCCGGAGATTACCGAATCAAAAAAATTTCAAAGAAACCGAAATCAAA
AAAAAGAATAAAAAAATAATGATGAATTGAATTGAAAAGCTACTTGTTACCCATCATTG
AATTTTGAACATCCGAACCTGGGAGTTTTCCCTGAAACAGA**ACTTAATTTGTAAATTAA**
GTTTGAACAACAAGAACCTGCCCTTTT

A região sublinhada tracejada é correspondente ao gene URA3 incluindo promotor, a região tracejada contínua corresponde a região de anelamento dos *primers*, enquanto a região

em negrito é complementar as regiões à montante e à jusante do gene da HXK2 para que ocorra a recombinação homóloga.

A partir do momento que esses fragmentos são inseridos na célula a recombinação homóloga se torna possível onde os genes HXK1 e HXK2 são deletados e os genes LEU2 e URA3 são inseridos, respectivamente. As sequências de aminoácidos que serão então sintetizadas passam a ser as descritas abaixo.

No caso da LEU2:

MSAPKKIVLPGDHVGQEITAEAIKVLKAISDVRSNVKFDNFENHLIGGAAIDATGVPLPDEALE
ASKKVDAVLLGAVGGPKWGTGSRPEQGLLKIRKELQLYANLRPCNFASDSLSDLSPKIPQF
AKGTDFVVVRELVGGIYFGKRKEDDGDGVAWDSEQYTVPEVQRITRMAAFMALQHEPPLPI
WLDKANVLASSRLWRKTVEETIKNEFPTLVQHQQLIDSAAMILVKNPHTLNGLIITSNMFQDI
ISDEASVIPGSLGLLPSASLASLPDKNTAFGLYEPCHGSAPDLPKNKVDPIATILSAAMMLKLSL
NLPEEGKAIEDAVKKVLDAGIRTGDLGGSNSTTEVGDAVAEEVKKILA

No caso da URA3:

MSKATYKERAATHPSVAAKLFNIMHEKQTNLCASLDVVRTTKELLELVEALGPKICLLKTHV
DILTDFSMEGTVKPLKALSAYNFFLFEDRKFADIGNTVKLQYSAGVYRIA EWADITNAHGV
VGP GIVSGLKQAAEEVTKEPRGLMLAELSCKGSLSTGEYTKGTVDIAKSDKDFVIGFIAQRD
MGRDEGYDWLIMTPGVGLDDKGDALGQQYRTVDDVVSTGSDIIIVGRGLFAKGRDAKVEG
ERYRKAGWEAYLRRCGQQN

Com isso os genes da HXK1 e HXK2 são deletados e substituídos. As sequências de nucleotídeos dos genes deletados estão apresentados abaixo. A região em negrito são os genes com os respectivos promotores e as regiões sublinhadas são as regiões complementares às regiões dos primers que proporcionam a recombinação homóloga.

HXK1

TTTAATCAA**ACTCACCCAAACA**ACTCAATTAGA**ACTGAAAAATAAGATGGTTCATT**
TAGGTCCAAAGAAACCACAGGCTAGAAAGGGTTCATGGCTGATGTGCCCAAGGAA
TTGATGGATGAAATTCATCAGTTGGAAGATATGTTTACAGTTGACAGCGAGACCTTG
AGAAAGGTTGTTAAGCACTTTATCGACGAATTGAATAAAGGTTTGACAAAGAAGGGA
GGTAACATTCCAATGATTCCCGGTTGGGTTCATGGAATTCCCAACAGGTAAAGAATCT
GGTAACTATTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACTAACTTAAGAGTCGTGTTGGTCAAG
TTGAGCGGTAACCATACCTTTGACACCACTCAATCCAAGTATAAACTACCACATGAC
ATGAGAACCACTAAGCACCAAGAGGAGTTATGGTCCTTTATTGCCGACTCTTTGAAG
GACTTTATGGTTCGAGCAAGAATTGCTAAACACCAAGGACACCTTACCATTAGGTTTC

ACCTTCTCGTACCCAGCTTCCCAAAAACAAGATTAACGAAGGTATTTTGCAAAGATGG
 ACCAAGGGTTTCGATATTCCAAATGTCGAAGGCCACGATGTCGTCCCATTGCTACAA
 AACGAAATTTCCAAGAGAGAGTTGCCTATTGAAATTGTAGCATTGATTAATGATACT
 GTTGGTACTTTAATTGCCTCATACTACACTGACCCAGAGACTAAGATGGGTGTGATT
 TTCGGTACTGGTGTCAACGGTGCTTTCTATGATGTTGTTTCCGATATCGAAAAGTTG
 GAGGGCAAATTAGCAGACGATATTCCAAGTAACTCTCCAATGGCTATCAATTGTGAA
 TATGGTTCCTTCGATAATGAACATTTGGTCTTGCCAAGAACCAAGTACGATGTTGCT
 GTCGACGAACAATCTCCAAGACCTGGTCAACAAGCTTTTGAAAAGATGACCTCCGGT
 TACTACTTGGGTGAATTGTTGCGTCTAGTGTTACTTGAATTAACGAGAAGGGCTTG
 ATGTTGAAGGATCAAGATCTAAGCAAGTTGAAACAACCATACATCATGGATACCTCC
 TACCCAGCAAGAATCGAGGATGATCCATTTGAAAACCTGGAAGATACTGATGACATC
 TTCCAAAAGGACTTTGGTGTCAAGACCACTCTGCCAGAACGTAAGTTGATTAGAAGA
 CTTTGTGAATTGATCGGTACCAGAGCTGCTAGATTAGCTGTTTGTGGTATTGCCGCT
 ATTTGCCAAAAGAGAGGTTACAAGACTGGTCACATTGCCGCTGACGGTTCTGTCTAT
 AACAAATACCCAGGTTTCAAGGAAGCCGCCGCTAAGGGTTTGAGAGATATCTATGG
 ATGGACTGGTGACGCAAGCAAAGATCCAATTACGATTGTTCCAGCTGAGGATGGTT
 CAGGTGCAGGTGCTGCTGTTATTGCTGCATTGTCCGAAAAAAGAATTGCCGAAGGT
 AAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTTAATGAAAAAATGTAATGAAATATAAATGTGTTT
 TTCCCTCCCTTAATATTATTCTTATGAGTGATGCCCTTATGTTTTTTTTGCGGTCTAGT
ATATGTAAATATAGACACACATATATATATATTTATGTG

HXK2

GTTGTAGGAATATAATTCTCCACACATAATAAGTACGCTAATTAATAAAAATGGTTCATT
 TAGGTCCAAAAAACCACAAGCCAGAAAGGGTTCATGGCCGATGTGCCAAAGGAA
 TTGATGCAACAAATTGAGAATTTTGAAAAAATTTTCACTGTTCCAAGTAACTTTAC
 AAGCCGTTACCAAGCACTTCATTTCCGAATTGGAAAAGGGTTTGTCCAAGAAGGGTG
 GTAACATTCCAATGATTCCAGGTTGGGTTATGGATTTCCCAACTGGTAAGGAATCCG
 GTGATTTCTTGGCCATTGATTTGGGTGGTACCAACTTGAGAGTTGTCTTAGTCAAGT
 TGGGCGGTGACCGTACCTTTGACACCACTCAATCTAAGTACAGATTACCAGATGCTA
 TGAGAACTACTCAAAATCCAGACGAATTGTGGGAATTTATTGCCGACTCTTTGAAAG
 CTTTTATTGATGAGCAATTCCCACAAGGTATCTCTGAGCCAATTCCATTGGGTTTCA
 CCTTTTCTTTCCCAGCTTCTCAAAACAAAATCAATGAAGGTATCTTGCAAAGATGGA
 CTAAGGTTTGTATATTCCAACATTGAAAACCACGATGTTGTTCCAATGTTGCAAA
 AGCAAATCACTAAGAGGAATATCCAATTGAAGTTGTTGCTTTGATAAACGACACTA
 CCGGTACTTTGGTTGCTTCTTACTACACTGACCCAGAAACTAAGATGGGTGTTATCT

TCGGTACTGGTGTCAATGGTGCTTACTACGATGTTTGTTCGGATATCGAAAAGCTAC
AAGGAAAACTATCTGATGACATTCCACCATCTGCTCCAATGGCCATCAACTGTGAAT
ACGGTTCCTTCGATAATGAACATGTCGTTTTGCCAAGAACTAAATACGATATCACCA
TTGATGAAGAATCTCCAAGACCAGGCCAACAAACCTTTGAAAAAATGTCTTCTGGTT
ACTACTTAGGTGAAATTTTGCCTTTGGCCTTGATGGACATGTACAAACAAGGTTTCA
TCTTCAAGAACCAAGACTTGTCTAAGTTCGACAAGCCTTTCGTCATGGACACTTCTT
ACCCAGCCAGAATCGAGGAAGATCCATTCGAGAACCTAGAAGATACCGATGACTTG
TTCCAAAATGAGTTCGGTATCAACACTACTGTTCAAGAACGTAAATTGATCAGACGT
TTATCTGAATTGATTGGTGCTAGAGCTGCTAGATTGTCCGTTTGTGGTATTGCTGCT
ATCTGTCAAAGAGAGGTTACAAGACCGGTCACATCGCTGCAGACGGTTCGGTTTAC
AACAGATACCCAGGTTTCAAAGAAAAGGCTGCCAATGCTTTGAAGGACATTTACGGC
TGGACTCAAACCTCACTAGACGACTACCCAATCAAGATTGTTCCCTGCTGAAGATGGT
TCCGGTGCTGGTGCCGCTGTTATTGCTGCTTTGGCCAAAAAAGAATTGCTGAAGGT
AAGTCCGTTGGTATCATCGGTGCTTAATCCTTAATTTGTAAATTAAGTTTGAACAACAAG
AAGGTGCCCTTTT

Os *primers* utilizados estão especificados na tabela 3. Os trechos destacados em negrito são complementares aos genes das hexoquinase, os trechos sublinhados e sem negrito são complementares aos genes dos marcadores nutricionais.

Tabela 3: *Primers* para PCR para obtenção dos *amplicons*

	<i>Primers</i>	Tamanho dos fragmentos gerados
HXK1 – LEU2	<i>Primer Forward</i> 5'AAATTAGTTTGA GTGGGTTTGTGA GTTAATCTTATGA <u>CTAACTGTGGGAAT</u> <u>ACTCAGGTATCGT</u> 3'	1592 pares de base
	<i>Primer Reverse</i> 5'CACATAAATATA TATATATGTGTGT GTCTATATTTACA <u>TATTAAGCAAGGAT</u> <u>TTTCTTAACTTCTTC</u> <u>GG 3'</u>	
HXK2 – URA3	<i>Primer Forward</i> 5'GTTGTAGGAATA TAATTCTCCCACC ATAATAAGTACGT <u>CAATTCTGATAATA</u> <u>TTAAATTGA 3'</u>	1236 pares de base
	<i>Primer Reverse</i> 5'AAAAGGGCACCT TCTTGTTGTTCAA ACTTAATTTACAA <u>ATTAAGTTCTGTTT</u> <u>CAGGGAAAAC 3'</u>	

O PCR foi realizado de acordo com as condições descritas nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4: Composição para obtenção dos *amplicons* HXK1-LEU2 e HXK2-URA3

Componente da mistura (Concentração no estoque)	Volume de reação (Concentração na reação)
Tampão PFU 10X	5 μ L
dNTP Mix (2mM cada)	5 μ L (0,2mM cada)
<i>Primer Forward</i>	1 μ L (2 μ M)
<i>Primer Reverse</i>	1 μ L (2 μ M)
MgSO ₄	2,5 μ L (2mM)
Amostra de DNA	1 μ L (~1pg)
DNA Polimerase PFU	1 μ L (1,25U)
Água (Nuclease-Free)	33,5 μ L
Volume total	50μL

Tabela 5: Programação do PCR para fragmento HXK2-URA3

95°C	1 minuto
30 Ciclos	
95°C	1 minuto
56°C	1 minuto
72°C	4 minutos
72°C	<i>Final Extension</i>
10°C	<i>Final Hold</i>

Tabela 6: Programação do PCR para fragmento HXK1-LEU2

95°C	1 minuto
<hr/>	
30 Ciclos	
95°C	1 minuto
56°C	1 minuto 30 segundos
72°C	4 minutos
72°C	<i>Final Extension</i>
10°C	<i>Final Hold</i>

Após o PCR, o *amplicon* foi purificado com o QIA quick – PCR Purification Kit, de acordo com o protocolo do fabricante. Para confirmação do êxito da síntese do amplicon, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), comparando-se o peso molecular do fragmento obtido com um padrão de peso molecular (Gene Ruler 1kb).

3.3.2. Transformação dos Fragmentos Mutagenizados Em *S. cerevisiae*

Os *amplicons* obtidos (*HXK1-LEU2* ou *HXK2-URA3*) foram inseridos na levedura por eletroporação de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 7: Construção das cepas

Fragmento	Cepa unideletada usada na transformação	Cepa que se espera obter
HXK2-URA3	<i>glk1Δ</i>	HXK1 (<i>hpk2Δglk1Δ</i>)
HXK1-LEU2	<i>glk1Δ</i>	HXK2 (<i>hpk1Δglk1Δ</i>)
HXK1-LEU2	<i>hpk2Δ</i>	GLK1 (<i>hpk1Δhpk2Δ</i>)

As células foram cultivadas em meio YPD 2% e foram recolhidas em OD entre 0,7 e 1,5 e ressuspensas em tampão com acetato de lítio e DTT e incubadas em temperatura ambiente por uma hora. As células foram então centrifugadas a 3000 rpm por cinco minutos a 4°C. O pellet foi então lavado com água milli-Q gelada e sorbitol gelado. As células foram então ressuspensas em 100 μL de sorbitol 1M.

Cerca de 1μg de DNA é adicionado à cubeta de eletroporação, juntamente com as células e então é aplicada a voltagem.

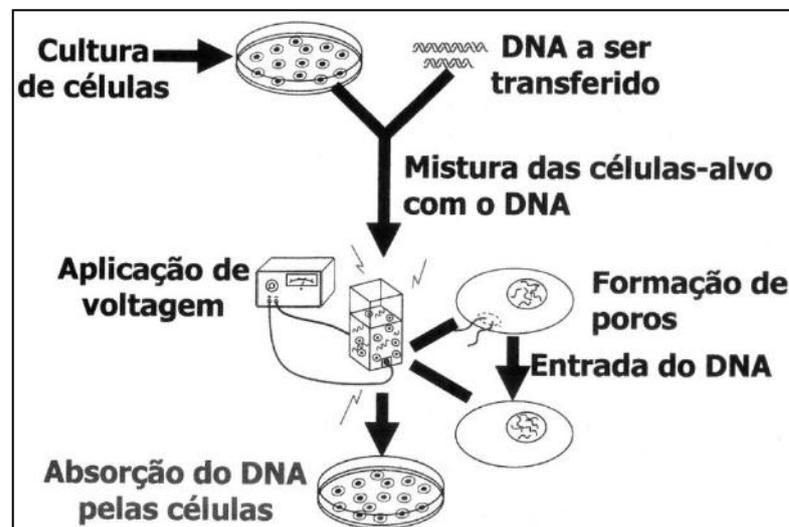


Figura 10: Procedimento de eletroporação. A eletroporação consiste na fragilização da membrana plasmática por meio da aplicação de uma voltagem, o que torna possível a entrada do DNA na célula.

3.3.3. Confirmação Das Deleções e Inserções

As células transformadas foram selecionadas nos meios sólidos e replaqueadas em meio seletivo *Dropout* sem uracila, no caso na cepa HXK1 ou sem leucina no caso das cepas HXK2 e GLK1. Também foram plaqueadas as cepas unideletadas como controle negativo.

3.4. CURVA DE CRESCIMENTO

Foram feitos inóculos de concentrações conhecidas ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em meio YPD 2% e foram deixados a 28°C e 160 rpm *overnight*. Após este período, foram coletadas alíquotas a cada 40 minutos. As concentrações celulares (peso seco) das alíquotas coletadas foram determinadas por leitura espectrofotométrica a 570 nm, construindo-se uma curva [Concentração celular (mg.mL^{-1} - peso seco) X tempo (h)], a partir da qual foram determinados os intervalos e as concentrações celulares características das fases metabólicas de crescimento da levedura em meio YPD, necessários à coleta celular para a realização dos ensaios posteriores.

Para a determinação foi usada a lei de Lambert-Beer ($C = f \times L \times \text{Abs}_{570}$, onde C é a concentração, f é o fator de peso seco, L é a espessura da cubeta e Abs_{570} é a absorbância a 570 nm).

3.5. CONSUMO DE OXIGÊNIO

A taxa de consumo de oxigênio foi avaliada medindo-se a variação da concentração de oxigênio dissolvido em suspensão celular ao longo do tempo, utilizando eletrodo de Clark. As células foram coletadas e centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. O *pellet* foi lavado duas vezes e ressuspenso em água destilada a uma concentração celular de $1 \text{ mg. } \mu\text{L}^{-1}$ (peso úmido). 50 μL da suspensão celular (peso úmido de 50 mg célula) foram adicionados a 2 mL de solução de glicose 100 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7 em uma câmara de consumo de oxigênio com agitação contínua, perfazendo uma suspensão celular final na câmara de concentração 25 mg.mL^{-1} (peso úmido). O consumo de oxigênio foi medido ao longo do tempo em oxígrafo por um eletrodo do tipo Clark, utilizando calibração em fase líquida (ponto de saturação da água com oxigênio como 100% da calibração e depleção do oxigênio disponível na câmara

pela adição de ditionito de sódio como 0%). A concentração de oxigênio foi avaliada durante um período aproximado de 5 min e a taxa de consumo de oxigênio (%.s⁻¹) foi obtida a partir do coeficiente angular da reta do gráfico [% oxigênio em solução X tempo (s)] (RONA et al., 2016).

3.6. CONSUMO DE GLICOSE

A taxa de consumo de glicose foi avaliada por dosagem da glicose residual no meio por Cromatografia Líquida. As células foram coletadas e centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. O *pellet* foi lavado duas vezes com água destilada e resuspenso em tampão fosfato 50 mM pH 6 a uma concentração celular final de 6 mg.mL⁻¹ (peso seco). À 5 mL da suspensão celular, foram adicionados 5 mL de solução de glicose 40 mM no mesmo tampão, perfazendo 10 mL de uma suspensão celular 3 mg.mL⁻¹ (peso seco) contendo 20 mM de glicose, em erlenmeyer de 50 mL. Foi retirada uma alíquota de 1 mL imediatamente após a adição do tampão contendo glicose (ponto zero, 0 min), que foi centrifugada imediatamente a 13000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi devidamente filtrado para condições cromatográficas e armazenado para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O meio foi incubado a 28° C e 160 rpm e alíquotas de 1 mL foram retiradas ao longo do tempo nos pontos referentes a 20 min, 40 min, 60 min e 80 min, procedendo-se da mesma maneira que no ponto zero para o tratamento da amostra, centrifugando-se o meio e armazenando o sobrenadante após a filtração para posterior análise por CLAE. A glicose residual no sobrenadante foi analisada utilizando-se um sistema de CLAE equipado com um detector de índice de refração RI- 2031 Plus, JASCO, Japão. A glicose foi quantificada em uma coluna Aminex HPX- 87H (7.8 mm I.D. × 30 cm, BioRad, EUA), com a temperatura de 60°C utilizando 0,004 mM de ácido sulfúrico (H₂SO₄) como eluente a um fluxo igual a 0,6 mL por minuto. Uma vez determinada a concentração de glicose residual no sobrenadante em cada uma das alíquotas coletadas, foi feita uma curva de [concentração de glicose no sobrenadante (g.L⁻¹) x tempo (min)] e, a partir do coeficiente angular, determinou-se a taxa de consumo de glicose (g.L⁻¹.min⁻¹) da cepa em estudo (RONA et al., 2016).

3.7. ATIVIDADE DE HEXOQUINASE

3.7.1. Obtenção do Extrato celular

A atividade de hexoquinase foi dosada em extrato celular. Para a obtenção do extrato celular as células foram inoculadas em meio YPD 2% até as a primeira fase exponencial e a fase estacionária. Foi coletado um volume contendo 50mg e centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e então as células são lavadas com água destilada gelada. O sobrenadante foi novamente descartado e repetiu-se a lavagem. As células foram ressuspensas em 0,5 mL de tampão Tris-HCl (50mM/ pH 7,6) e o volume foi transferido para um tudo de parede grossa contendo 1,5g de pérolas de vidro.

Para romper as células, foram executados seis ciclos de agitação em vortex (ajustado para velocidade máxima) por 30 segundos, intercalando cada etapa de agitação com repouso da suspensão em banho de gelo também por 30 segundos.

O extrato celular foi coletado para um eppendorf. As perolas de vidro foram lavadas com 400µL de tampão Tris-HCl e a solução de lavagem foi transferido para o mesmo eppendorf que o extrato, que foi centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm em microcentrífuga, coletando-se o sobrenadante em outro eppendorf.

3.7.2. Determinação de Proteína Total

A quantidade de proteína total foi dosada de duas formas, pelo método de Biureto adaptado por Stickland e pelo método patenteado QubitTM, da Thermo Fisher Scientific. Isso porque no experimento de dosagem de atividade da hexoquinase na presença de T6P se fosse feita a dosagem de proteína por Stickland, a quantidade de extrato que é obtida ficaria muito limitada. Então optou-se por um método que utiliza quantidades muito baixas de extrato (QubitTM) para que houvesse maior flexibilidade no experimento.

No método do Biureto adaptado por Stickland (STICKLAND L., 1951) adicionou-se em um tubo falcon de 15 mL água destilada, solução padrão de caseína 10 mg/mL, NaOH 20%, CuSO₄.5H₂O 25%, na ordem descrita. A caseína foi adicionada em diferentes concentrações de forma a ser possível obter uma curva de calibração. As misturas foram homogeneizadas e centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. Com a leitura do sobrenadante a 550nm fez-se uma curva de onde é possível obter um fator pelo ajuste linear.

Em um tubo falcon de 15 mL adicionou-se 4,9 mL de água, 0,1mL de extrato celular, 0,9mL de NaOH 20% e 0,15mL de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 25%. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos. Com o valor de absorbância lido no espectrofotômetro a 550nm a quantidade de proteína total foi calculada com o fator obtido da curva padrão.

$$\text{Massa de proteína} = \text{Abs} \times f$$

$$[\text{massa de proteína}] = \text{mg}$$

Devido ao grande volume necessário de extrato para dosagem de atividade de hexiquinase na presença de T6P, o método utilizado para dosagem de proteína foi o método patenteado QubitTM, no qual se utiliza apenas 1 μ L da amostra para dosagem de proteínas, seguindo-se as recomendações e protocolos do equipamento. De modo geral, método se baseia em leitura de fluorescência gerada pela reação do reagente Qubit com as proteínas presentes no extrato. A fluorescência gerada é diretamente proporcional à quantidade de proteína no extrato.

3.7.3. Dosagem da Atividade de Hexoquinase na Ausência de T6P

A dosagem de atividade de hexoquinase foi realizada em espectrofotômetro a 340nm através de um experimento de cinética onde, durante três minutos, a cada dez segundos é realizada uma leitura.

Usando uma cubeta de quartzo é realizado um branco, que contém todos os componentes da reação, menos o NADP^+ , que dispara a reação. No branco, o NADP^+ é substituído por água. Após o branco, é realizada a reação na cubeta de quartzo adicionando os reagentes de acordo com a ordem da tabela abaixo.

As quantidades no ensaio estão descritas na tabela 8.

Tabela 8: Ensaio de dosagem de atividade de hexoquinase na ausência de T6P

Reagente	Concentração no estoque	Concentração no ensaio	Volume (mL)
Tampão Tris	50mM	38,3mM	1,00
Glicose	100mg/mL em tampão Tris	212.7mM	1,00
MgCl ₂	0,1M	7,7mM	0,20
ATP, sal dissódico	10mg/mL	0,72mM	0,10
Enzima G6PDH	10mg/mL	0,50U/mL	0,01
Extrato	-	-	0,10
NADP ⁺	10mg/mL	1,0mM	0,20

A medida de atividade de hexoquinase não é medida de forma direta, isso porque o que é medido no equipamento é a absorbância do NADPH que é um dos produtos de uma reação consecutiva. Uma unidade de atividade hexoquinase é definida como a formação de 1 μmol de NADPH por minuto.

**Figura 11: Reações de medida de atividade**

Foram pegos os primeiros pontos da curva Abs 340 nm X tempo (min) que são os pontos de condição de velocidade inicial. Ao fazer o ajuste linear é possível obter o coeficiente angular e então a atividade. Para obter a atividade específica então, o coeficiente angular da reta é dividido pelo fator do NADPH ($6,22 \text{ mM}^{-1}$), com isso chega-se à taxa de NADPH gerado. Então calcula-se a atividade em $\mu\text{mol}/\text{min}$ (U), multiplicando a taxa de

formação de NADPH pelo volume do ensaio que é 2,61 mL. Para calcular a atividade específica é necessário dividir a atividade pela massa de proteína presente em 0,1 mL de extrato.

Para chegar ao valor da quantidade total de proteína foi realizado o experimento pelo método de Biureto modificado por Stickland, onde também foi feita uma curva de calibração para se obter o fator da curva e poder converter a absorbância obtida em concentração. Nesse caso o fator obtido foi 24mg.

3.7.4. Dosagem da Atividade de Hexoquinase na Presença de T6P

O ensaio na presença de inibidor foi feito de forma muito similar ao ensaio da ausência de inibidor. A diferença está no tratamento do extrato com 13 μ L de trealose-6-fosfato 0,1 mM. Outra diferença é a quantidade de glicose adicionada ao meio. O ensaio foi feito com diferentes concentrações de glicose: 0,25mM; 0,5mM, 25mM, e 50mM no caso da cepa HXK2. As quantidades utilizadas no ensaio então presentes na tabela 9.

Tabela 9: Ensaio de dosagem de atividade de hexoquinase na presença de T6P

Reagente	Concentração no estoque	Concentração no ensaio	Volume (mL)
Tampão Tris	50mM	38,3mM	1,00
		0,25mM	
		0,5mM	
Glicose	1,3mM em tampão Tris	25mM	1,00
		50mM	
MgCl ₂	0,1M	7,7mM	0,20
ATP, sal dissódico	10mg/mL	0,72mM	0,10
Enzima G6PDH	10mg/mL	0,50U/mL	0,01
Extrato tratado com T6P	-	-	0,10
NADP ⁺	10mg/mL	1,0mM	0,20

3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados comparativamente utilizando o teste *t* de Student, com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software). Os dados estatisticamente diferentes são considerados estatisticamente diferentes para um valor $p < 0,05$ dentro de cada condição ou cepa estudada.

3.9. COMPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS

Através do banco de dados do Pubmed e do Protein Database (PDB) as estruturas cristalográficas das isoformas II da hexoquinase foram obtidas, sobrepostas e comparadas através do software Chimera (MENG et al., 2006) Foi usado o parâmetro RMSD (root-mean-square deviation) para comparação das proteínas sobrepostas.

Através do NCBI foi feito um BLAST com as sequências de aminoácidos das duas isoformas para obter a identidade. Foi escolhida a opção BLAST de proteínas e então foi adicionada a sequência de aminoácidos da hexoquinase 2 humana. Foi então selecionado o organismo com o qual se queria comparar a sequência de aminoácidos da hexoquinase 2 de humanos (no caso a *S. cerevisiae*) e foi feito o BLAST.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CONSTRUÇÃO DAS CEPAS

Após o PCR e a purificação dos fragmentos de DNA, foram corridos os géis de agarose que estão apresentados nas figuras 12 e 13.

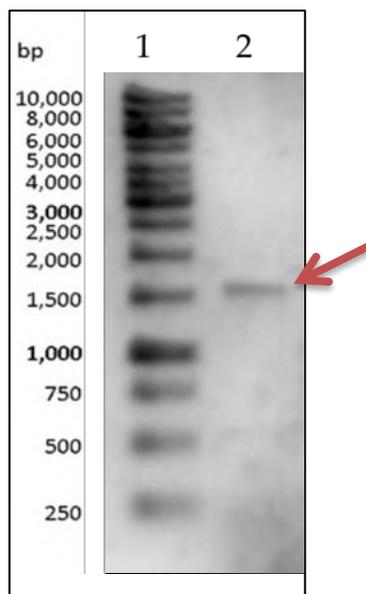


Figura 13: Gel de agarose do amplicon HXK1-LEU2

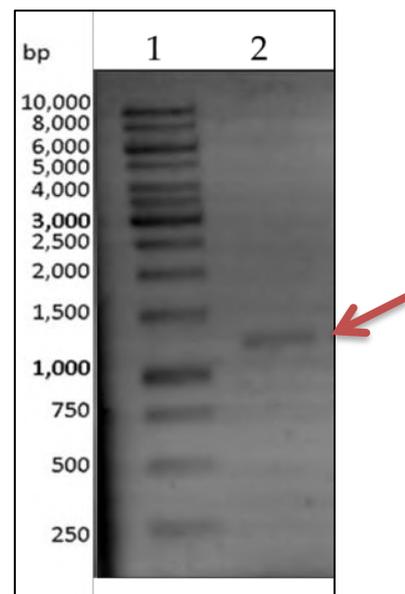


Figura 12: Gel de agarose do amplicon HXK2-URA3

No poço um em ambas as figuras, tanto na figura 12 quanto na 13, está o padrão de peso molecular de 1 kb e no poço dois está o amplicon. Na figura 12 é possível observar uma banda no poço dois em aproximadamente 1600 pb, que é o tamanho esperado para o *amplicon* HXK1-LEU2, mostrando sucesso no PCR. Na figura 13 é possível observar uma banda no poço dois em aproximadamente 1200 pb, que era o tamanho esperado para o *amplicon* HXK2-URA3. Com isso conclui-se que os dois *amplicons* foram obtidos com sucesso.

Os fragmentos obtidos foram purificados e transformados nas cepas por eletroporação. O fragmento HXK1-LEU2 foi transformado na cepa *glk1Δ* para obter a cepa *hxx1Δglk1Δ*, Hxk2, assim como também foi transformado na cepa *hxx2Δ* para obter a cepa dupladeletada *hxx1Δhxx2Δ* que apenas expressa a Glk1. Com isso passou-se para próxima etapa, onde foi feita a eletroporação e o plaqueamento das células após a eletroporação nos respectivos meios seletivos. As cepas que só expressariam Hxk2 e Glk1 foram plaqueadas em meio *dropout* sem leucina e com geneticina e o que se observou foi que houve sucesso na construção de ambas as cepas. Isso foi verificado pois as cepas das quais elas foram originadas (isogênica à BY4741 exceto *glk1::kaMX4*, no caso da cepa que só expressa a Hxk2 e isogênica à BY4741 exceto *hxx2::kaMX4*, no caso da cepa que só expressa a Glk1) necessitam de quatro requerimentos essenciais no meio para crescer, ou seja, são requerimentos nutricionais. Esses requerimentos são: histidina, metionina, leucina e uracila. A partir da introdução do fragmento adequado e efetividade da recombinação homóloga (integração genômica direcionada), a cepa recupera a capacidade auxotrófica de crescer em um meio sem leucina, visto que o gene *HXK1* foi substituído pelo *LEU2*, daí o plaqueamento no meio *dropout* sem leucina. Ambas as cepas cresceram no meio seletivo, indicando que houve sucesso no processo de recombinação homóloga (integração genica), e por tanto, na obtenção das cepas que expressam apenas as isoformas Hxk2 ou Glk1.

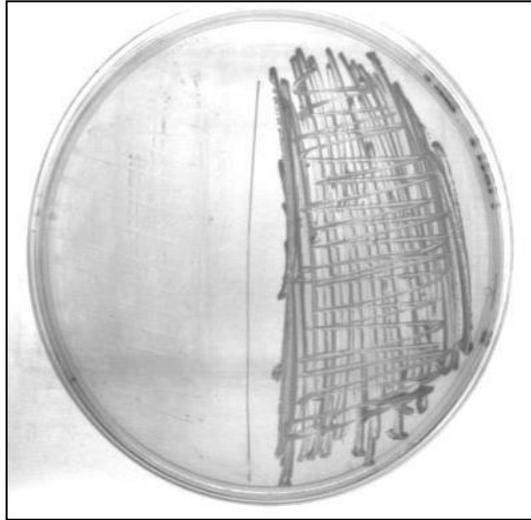


Figura 14: Meio sólido *dropout* sem leucina. Lado esquerdo da placa foram plaqueadas as células antes da transformação (Cepa *glk1Δ*). Lado direito foram plaqueadas as células depois da transformação (Cepa *hxk1Δglk1Δ*).

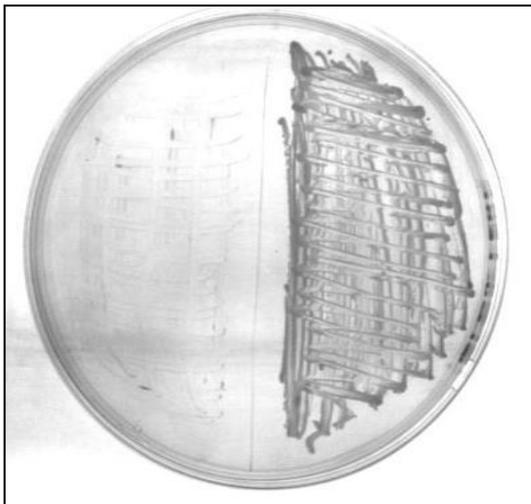


Figura 15: Meio sólido *dropout* sem leucina. Lado esquerdo da placa foram plaqueadas as células antes da transformação (Cepa *hxk2Δ*). Lado direito foram plaqueadas as células depois da transformação (Cepa *hxk1Δhxk2Δ*).

Não houve sucesso na construção da cepa HXK1 e, portanto, prosseguiu-se nos próximos experimentos sem a mesma.

4.2. CURVA DE CRESCIMENTO

Com os dados obtidos através da coleta dos pontos ao longo do tempo foi possível construir as curvas representadas no gráfico da figura 16.

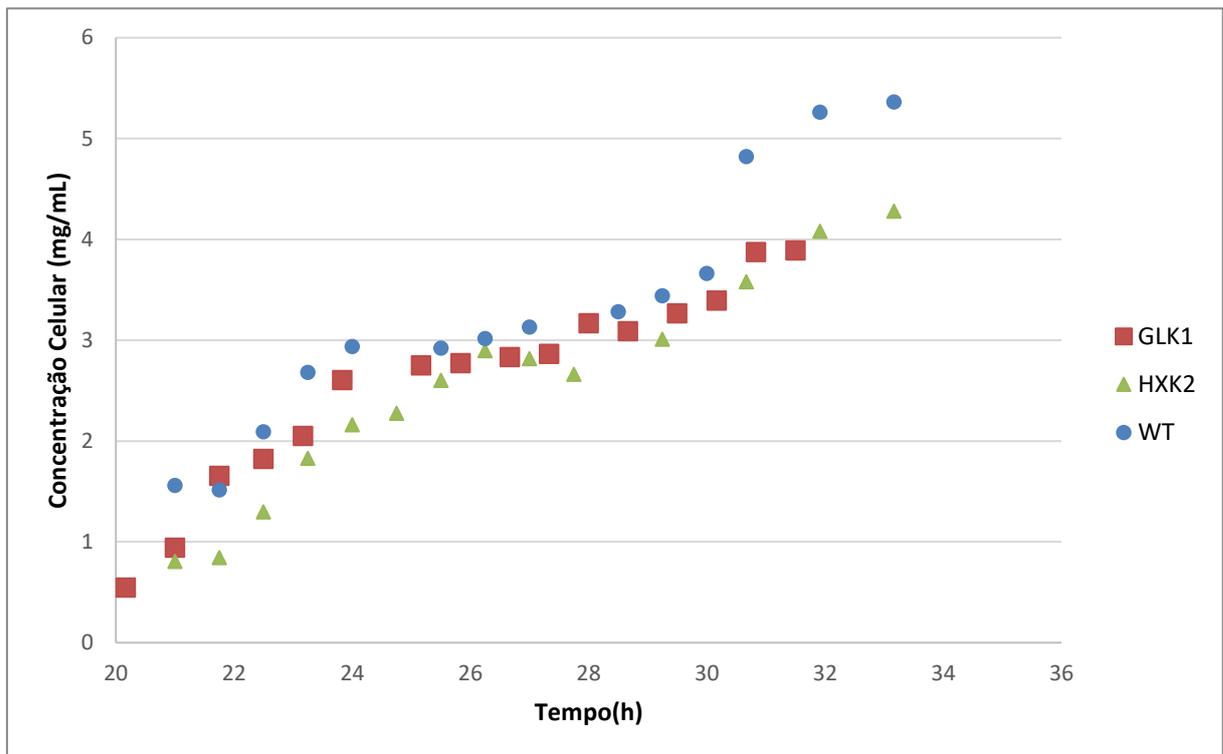


Figura 16: Curvas de crescimento das cepas WT, HXK2 e GLK1

As curvas de crescimento foram feitas em triplicata e foi feita uma curva Ln (concentrações) por tempo e através desta nova curva foi possível calcular taxa de crescimento específico de cada uma das replicatas. O resultado obtido está explicito na figura 17.

É possível observar com a curva de crescimento que todas as cepas apresentam as duas fases exponenciais, primeira fase exponencial com metabolismo fermentativo e segunda fase exponencial com metabolismo respiratório.

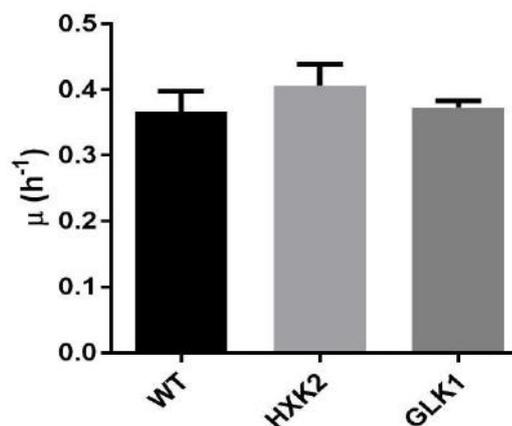


Figura 17: Taxa de crescimento específico da primeira fase exponencial

Na WT, devido à repressão catabólica, sabe-se que apenas a isoforma Hxk2 está sendo expressa. Isso porque já foi visto que a Hxk2 é translocada para o núcleo e age sobre a transcrição, estando envolvida em um *feedback* positivo na sua própria expressão, aumentando-a, e também um *feedback* negativo, agindo como um repressor da expressão da Hxk1 e Glk (RODRÍGUEZ et al., 2001). Desta forma, espera-se que a WT e a HXK2 cresçam da mesma forma em repressão catabólica, já que em ambos os casos apenas a Hxk2 está expressa.

No caso da cepa GLK1(*hvk1Δhvk2Δ*) não há expressão do gene HXK2, portanto não há o efeito da repressão catabólica sobre a expressão da isoforma Glk1. Com isso, a cepa GLK1 é expressa mesmo em condições de alta concentração de glicose e a célula cresce na mesma proporção que as outras cepas. Uma vez que a reação catalisada pela hexoquinase é tão fundamental para a célula, o nível de crescimento é mantido, apesar da diferença entre as isoformas Hxk2 e Glk1, uma vez que esta apresenta menor afinidade por glicose.

4.3. CONSUMO DE GLICOSE

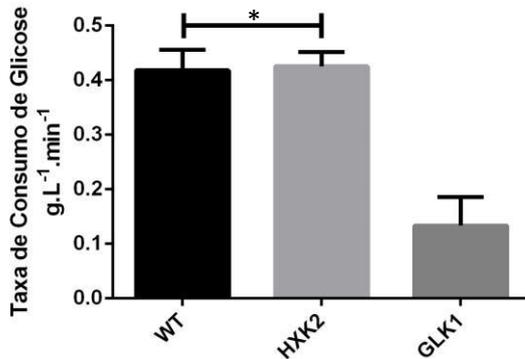


Figura 18: Consumo de glicose na primeira fase exponencial (metabolismo fermentativo). * estatisticamente iguais.

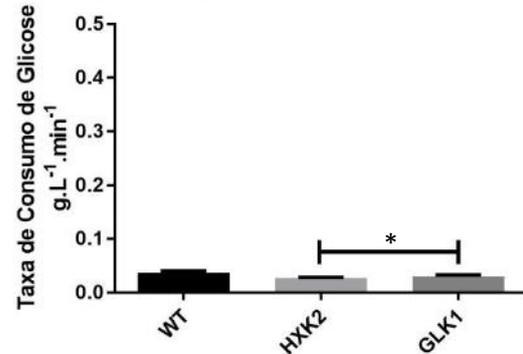


Figura 19: Consumo de glicose na fase estacionária (metabolismo respiratório) * estatisticamente iguais.

Na figura 19 é possível observar os valores das taxas de consumo de glicose na fase estacionária (metabolismo respiratório) e, ao comparar com os valores da figura 18, que apresenta os valores da taxa de consumo de glicose em metabolismo fermentativo, pode-se perceber que em metabolismo respiratório o consumo de glicose é cerca de dez vezes menor. Isso se dá, pois, em metabolismo respiratório, o ATP é obtido através da fosforilação oxidativa, gerando de 30 a 32 moléculas de ATP por glicose. Na glicólise, o rendimento de ATP é bem mais baixo, apenas 2 moléculas de ATP por glicose. A glicólise, cujo fluxo determina a taxa de consumo de glicose, possui três pontos de regulação, sendo o principal deles a PFK1. A PFK1 é regulada, dentre outros, pelo nível energético da célula, isto é, em baixas concentrações de ATP, sua atividade é aumentada. Portanto, como o rendimento da glicólise é baixo, é necessário um alto fluxo glicolítico, ou seja, consumo de glicose maior, para se manter o nível de ATP necessário para o funcionamento e sobrevivência da célula.

Os valores de consumo de glicose na fase respiratória das cepas WT, HXK2 E GLK1 são muito baixos e, por tanto, não há sensibilidade suficiente no ensaio para uma avaliação diferencial.

Na figura 18, que aborda os valores da taxa de consumo de glicose em metabolismo fermentativo, tem-se que as cepas selvagem e HXK2 tiveram mesma taxa de consumo de glicose. Como já foi discutido no tópico anterior (4.2.), nesse caso a cepa WT está sobre repressão catabólica, ou seja, não expressa as isoforma HXK1 e G, assim como a cepa HXK2.

Dessa forma as duas são células iguais em termos de expressão, então é esperado que elas apresentem o mesmo perfil metabólico.

A cepa GLK1 não está sujeita à repressão catabólica que ocorre em presença de alta concentração de glicose e no qual Hxk2 tem papel fundamental. Foi observado que a GLK1 apresentou consumo de glicose quase quatro vezes menor pois é capaz de respirar mesmo em altas concentrações de glicose.

4.5. CONSUMO DE OXIGÊNIO

Nas figuras 20 e 21, estão os resultados do consumo de oxigênio nos metabolismos fermentativo e respiratório.

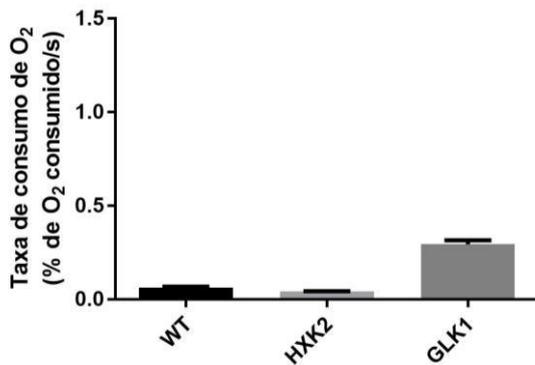


Figura 21: Consumo de oxigênio na primeira fase exponencial (metabolismo fermentativo)

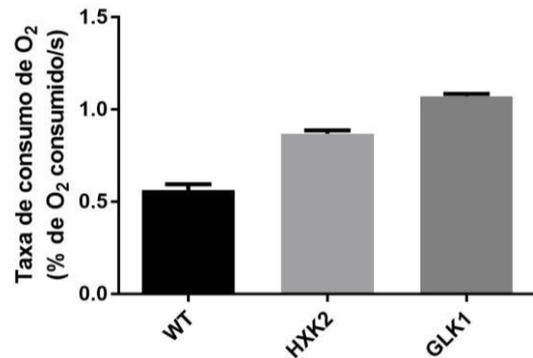


Figura 20: Consumo de oxigênio na fase estacionária (metabolismo respiratório)

Em metabolismo fermentativo o consumo de oxigênio é muito baixo nas cepas selvagem e HXK2. Isso é esperado, pois o consumo de oxigênio está relacionado à atividade da cadeia de transporte de elétrons (metabolismo respiratório); o oxigênio é o aceptor final de elétrons da cadeia. Tanto a WT quanto a HXK2 apresentam metabolismo fermentativo nessa fase, já que estão submetidas à repressão catabólica quando as proteínas relacionadas à fosforilação oxidativa tem sua expressão reprimida. Porém, na fase exponencial também é observado que a GLK1 consome quantidades significativas de oxigênio, quase cinco vezes mais que a WT na mesma fase e sendo mais da metade do que a WT consome na estacionária. Como a cepa GLK1 não expressa a isoforma Hxk2, importante para a repressão catabólica, mesmo na presença de glicose apresenta metabolismo respiratório. Então se conclui que a cepa GLK1 possui a repressão catabólica dificultada, reafirmando o papel da Hxk2 na repressão catabólica não sendo, porém, a única proteína envolvida, já que a repressão catabólica é um processo que envolve vários reguladores como Snf1 e Mig1.

Já foi reportado que as isoformas Hxk1 e a Glk1 são as mais expressas em metabolismo respiratório (RODRÍGUEZ et al., 2001). Por isso talvez o consumo de oxigênio seja mais alto na GLK1. Esse resultado indica que deve haver um balanço entre a expressão das isoformas que regula o consumo de oxigênio em metabolismo respiratório.

4.4. ATIVIDADE DE HEXOQUINASE

4.4.1. Atividade de Hexoquinase na Ausência de Trealose-6-fosfato

A hexoquinase é uma enzima que obedece o modelo cinético de Michaelis-Menten (MENSONIDES et al., 2013), onde uma reação enzimática ocorre a medida que o substrato entra em contato com o sítio catalítico de uma enzima e forma o complexo enzima-substrato rapidamente. Esse complexo é desfeito em uma reação mais lenta, onde o produto é formado e a enzima regenerada. Esse processo é descrito segundo o seguinte modelo: $S + E \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$, onde E é a enzima livre, S o substrato, ES é o complexo formado pela enzima e o substrato no momento da reação e P é o produto.

Para determinar a atividade usamos apenas os valores de velocidade inicial, pois neste ponto, a reação $ES \rightarrow E + P$ pode realmente ser considerada irreversível, quando a reação $E + P \rightarrow ES$ ainda é negligenciável.

Os dados obtidos no experimento formam uma curva de absorvância por tempo, como a exemplificada na figura 22.

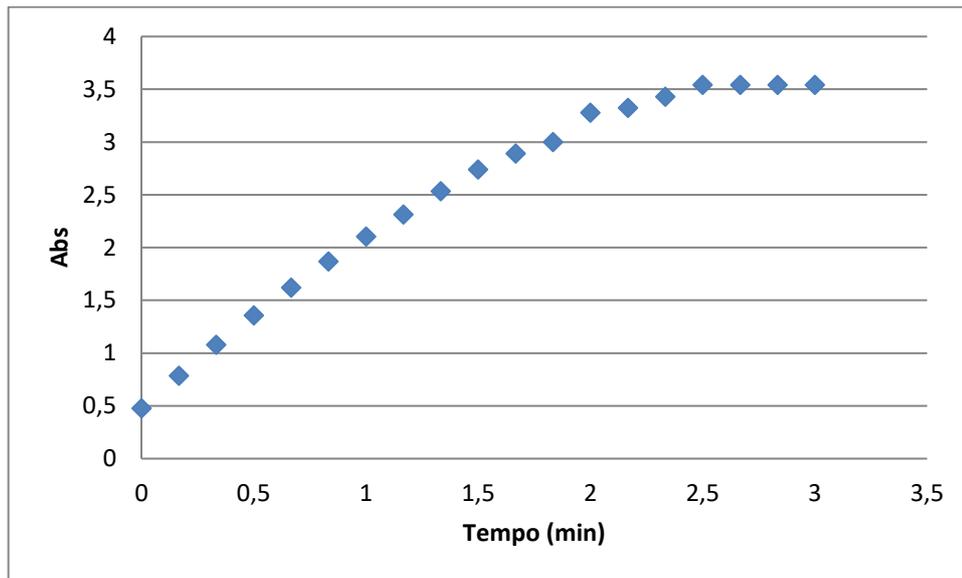


Figura 22: Gráfico absorvância X tempo (min) para determinação de atividade. Essa curva especificamente pertence a uma das replicatas da HXX2

Fazendo os cálculos considerando a velocidade inicial, foi possível chegar aos gráficos presentes nas figuras 23 e 24.

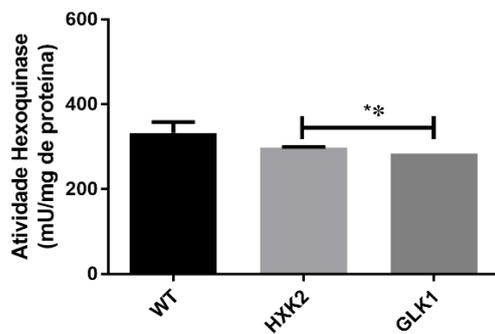


Figura 23: Atividade de hexoquinase na primeira fase exponencial (metabolismo fermentativo)
**Estatisticamente diferentes

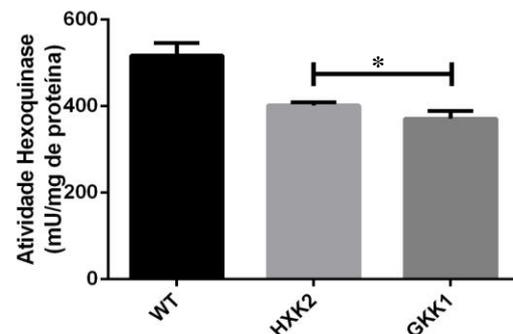


Figura 24: Atividade de hexoquinase na fase estacionária (metabolismo respiratório). *Estatisticamente iguais

Pelos valores dispostos nos gráficos das figuras 23 e 24, é possível observar que em metabolismo respiratório todas as cepas, principalmente a WT, apresentam atividade maior, no caso da WT 1,5 vezes maior, que em metabolismo fermentativo, isso pode ser explicado

pelo fato que a G6P é substrato para outras vias que não a glicólise em metabolismo respiratório, sendo essencial para essas outras vias nesse metabolismo. No metabolismo respiratório devido à formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) é muito importante que haja um balanço redox na célula. Uma das espécies mais importante para esse balanço é o NADPH, que é gerado na via das pentoses-fosfato. A via das pentoses-fosfato é uma das vias para quais o G6P pode ser desviado e isso poderia estar sendo feito para neutralizar o ROS gerado devido à respiração. Sendo então esse o possível motivo pelo qual, em metabolismo respiratório, a atividade da hexoquinase é mais alta que em metabolismo fermentativo, já que a demanda de G6P pode ser alta (KRUSHNA C.; HATM, 2014).

Em metabolismo fermentativo, é possível observar que todas as cepas, apesar de estatisticamente diferentes, apresentaram atividades muito próximas. Devido à repressão catabólica a WT, assim como a HXK2, possui apenas a isoforma Hxk2, então é esperado que elas possuam mesma atividade. A GLK1, apesar de ter apresentado atividade estatisticamente diferente, devido à ordem de grandeza, essa diferença se torna irrelevante, portanto a GLK1 também apresentou mesma atividade que as outras duas. Isso pode estar relacionado à ausência da Hxk2 na cepa GLK1, fazendo que ela não tenha a expressão do gene GLK1 reprimida.

Quando a disponibilidade de glicose começa a ficar baixa no meio, ocorre um mecanismo de desrepressão da transcrição dos genes HXK1 e GLK1, com isso as isoformas predominantes na fase estacionária passam a ser a Hxk1 e a Glk1.

No metabolismo respiratório a WT apresenta maior atividade de hexoquinase que as outras cepas, possivelmente devido ao fato de que o experimento dosa a atividade de hexoquinase total e na WT três isoformas estão sendo expressas. No metabolismo respiratório, como evidenciado pelo consumo de oxigênio que o balanço das três isoformas é importante para regular a expressão das três isoformas. Nesse caso, houve uma diminuição da atividade das isoformas HXK2 e GLK1 em relação à WT em metabolismo respiratório, que corrobora a ideia de que em metabolismo respiratório as três isoformas são importantes.

4.4.2. Atividade de Hexoquinase na Presença de Trealose-6-fosfato

Os procedimentos de cálculo da atividade de hexoquinase foram feitos da mesma forma que no descrito no tópico anterior e a quantidade de proteína total foi dosada pelo método patenteado Qubit, como descrito pela metodologia.

Os ensaios foram realizados com diferentes concentrações de glicose para ser possível construir uma curva $1/v \times 1/[S]$ e determinar o eventual mecanismo de inibição. As atividades obtidas em função da concentração de glicose usada no ensaio, na ausência e presença de T6P, são apresentadas nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10: Medidas da atividade da cepa HXK2

[S](mM)	ATIVIDADE sem T6P (mU/mg de proteína)	ATIVIDADE com T6P (mU/mg de proteína)
50	624	320
25	716	409
0,5	558	78
0,25	478	

Tabela 11: Medidas de atividade da cepa GLK1

[S] (mM)	ATIVIDADE sem T6P (mU/mg de proteína)	ATIVIDADE com T6P (mU/mg de proteína)
25	449	208
0,5	296	199
0,25	483	180

Com esses dados foi possível construir os gráficos dispostos nas imagens 25 e 26.

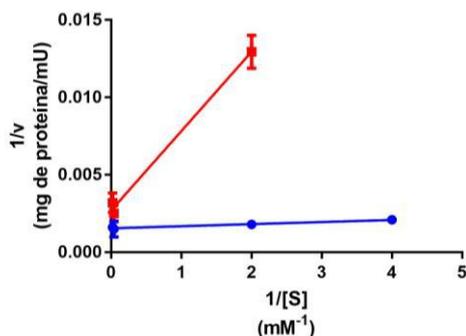


Figura 26: Atividade de Hxk2

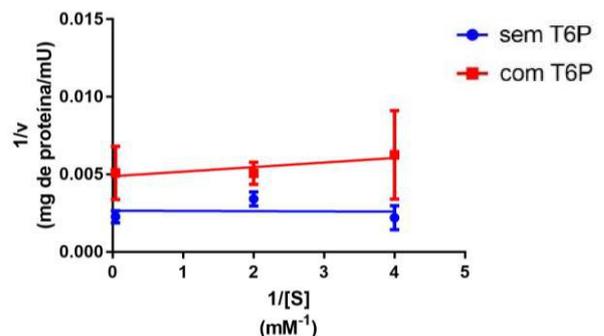


Figura 25: Atividade de Glk

Na glicoquinase não é possível identificar inibição, as retas estão praticamente paralelas, indicando que não houve inibição pela T6P. Esse resultado corrobora com resultados presentes na literatura que foram feitos com as isoformas purificadas (BLÁZQUEZ et al., 1993).

Existem três tipos de inibição simples, a competitiva, a não-competitiva e a acompetitiva. A inibição acompetitiva o inibidor atua na enzima complexada com o substrato. Na inibição não-competitiva o inibidor atua em um centro que não é o catalítico da enzima, podendo se ligar tanto no complexo enzima substrato quanto na enzima livre. Já a inibição competitiva o inibidor compete com o substrato pela ligação à enzima, formando o complexo EI, que não gera produto, de acordo com o modelo abaixo.

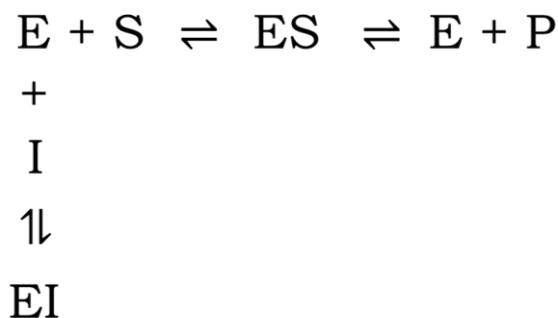


Figura 27: Modelo de inibição competitiva

É uma característica da inibição competitiva que a velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) não se altere, enquanto a enzima inibida apresenta uma constante de Michaelis-Menten aparente maior.

Ao observar o gráfico na figura 25 é possível perceber que as duas curvas convergem com valores de b na reta próximos. Esse gráfico é típico de uma inibição competitiva que possui a equação da reta descrita abaixo:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Com valores de b muito próximo, se obtém valores de $V_{m\acute{a}x}$ muito próximos, o que corrobora para a inibição competitiva. Ao fazer o ajuste linear das retas e substituir os valores nessa equação os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ das duas curvas foram encontrados.

Após o ajuste linear as retas obteve-se a reta $y = 0,0001361x + 0,00154$ para a situação sem inibidor e obteve-se $y = 0,005122x + 0,00298$ com inibidor.

Tabela 12: Valores de Km e Vmáx para a cepa HXK2 na presença e ausência de T6P

	Sem T6P	Com T6P
Km (µM)	88	1848
Vmáx (U/mg de proteína)	649	371

Com esses valores é possível calcular o Ki através da equação:

$$Km (\text{Com inibidor}) = Km (\text{sem inibidor}) \left(1 + \frac{[I]}{Ki}\right)$$

Com isso obteve-se Ki (constante de inibição) de 24,42 µM para a inibição na T6P na hexoquinase 2 em extrato celular. Esse resultado em extrato celular é um resultado muito interessante, pois leva em consideração vários fatores relacionados às condições intracelulares como modificações pós-traducionais e condições do meio intracelular. Hxk2, por exemplo, sofre fosforilação e tem a atividade alterada e o equilíbrio entre as subunidades alterada (BEHLKE et al., 1998). Existe reportado na literatura ensaios de inibição da T6P na hexoquinase de *S. Cerevisiae*, porém com as isoformas purificadas. O resultado de (BLÁZQUEZ et al., 1993) corrobora o do presente trabalho, já que nele foi encontrado Ki de 40µM. Sendo assim, os resultados de inibição da Hxk2 em extrato celular se destacam, pois para uso em tratamentos contra o câncer é necessário pensar em uma inibição *in vivo* e em um extrato celular as características da enzima estão mais próximas às características das enzimas *in vivo*.

4.5. MODELAGEM *IN SILICO*

Para validar o modelo utilizado no trabalho foram analisadas as estruturas e as sequências de aminoácidos das isoformas dos de hexoquinase da *S. cerevisiae* e de seres humanos. Por meio do PDB (Protein Database) e do PubMed foi possível acessar as estruturas cristalográficas das hexoquinase II de humanos e de levedura, bem como sua sequência de aminoácidos. É possível baixar os arquivos no formato PDB e com eles analisar suas estruturas e compará-las através de programas, como o Chimera e o PyMOL.

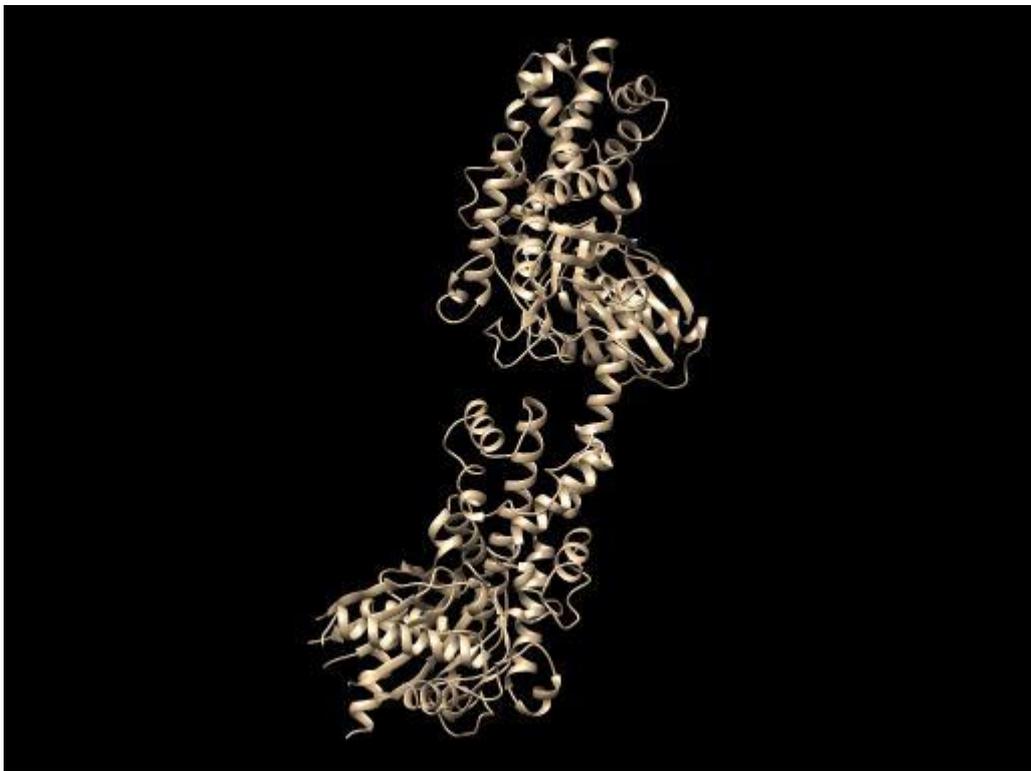


Figura 28: Representação estrutural da HK2 obtida no Chimera através do arquivo 2NZZ do PDB



Figura 29: Representação estrutural da Hxk2 obtida pelo Chimera através do arquivo 1IG8 do PDB

Usando as sequências de aminoácidos obtidas no PubMed e a ferramenta de acesso livre BLAST fornecida pelo NCBI, onde é possível comparar as sequências de aminoácidos das duas proteínas, as sequências foram comparadas e foi obtido um valor de identidade de sequência. O valor obtido foi de 33% e se encontra na figura 30.

		Download	GenPept	Graphics	Sort by: E value		
Chain A, Crystal Structure Of Yeast Hexokinase Pii With The Correct Amino Acid Sequence							
Sequence ID: 1IG8_A Length: 486 Number of Matches: 2							
Range 1: 16 to 438				GenPept	Graphics	Next Match	Previous Match
Score	Expect	Method	Identities		Positives	Gaps	
244 bits(622)	1e-72	Compositional matrix adjust.	144/437(33%)		242/437(55%)	31/437(7%)	
Query 449	LADQHRARQKTLLEHLQ----	LSHDQLLEVKRRMKVEMERGLSKETHASAPVKMLPTYVCA				584	
	+AD + + +E+ + + + L V +	E+E+GLSK+ + M+P +V					
Sbjct 16	MADVPKELMQQIENFEKIFTVPTETLQAVTKHFISELEKGLSKK---	GGNIPMIPGIVMD				72	
Query 505	TPDGTEKGFALDLGGTNFRVLLVRVNRGKMGVEMHNKIYAIPQEVHGT--	GDELFD				562	
	P G E GDFLA+DLGGTN RV+LV++ + + Y +P + M T	DEL++					
Sbjct 73	FPTGKESGDFLALDLGGTNLRVVLKLGDDR--	TFDTTQSKYRLP-DAMRTTQNPDELWE				129	
Query 563	HIVQCIADFLFYMGKGVSS--	LPLGFTFSFPCQNSLDESILLKWTGFKASGCEGEDVV				620	
	I + F F++ +G+S +PLGFTFSFP QN ++E IL +WTKGF E DVV						
Sbjct 130	FIADSLKAFIDEQFPQGISEPIPLGFTFSFPASQNKINEGLQRWTKGFDIPNIENHDVV					189	
Query 621	TLLKEAIHREEFFLDVWVAVNDTVGTWMT	CGFEDPHCEVGLIVGTGSNACYMEEMRNV				680	
	+L++ I +R ++VVA++NDT GT++ + DP ++G+I GTG N Y + ++E						
Sbjct 190	PMLQKQITKRN-IPIEVVALINDTTGTLVASYYDPETKMGVIFGTGVNGAYDVCSIE					248	
Query 681	LVEGE-----	EGRMCVNMWGAFGDNGCLDDFRTEFDVADEL	SLNPGKQRFKMSISG			733	
	++G+ M +N E+G+F DN + RT++D+ +DE S PG+Q FEKM SG						
Sbjct 249	KLQGLSDDIPPSAPMAINCEYGSF-DNEHVLPRTKYDITIDEE	SPRPGQQTFEKMSISG				307	
Query 734	MYLGEIVRNILIDFTKRGLLFRGRISERLKTGRIFETKFLSQIESDCLALLQ-VRAILOH					792	
	YLGEI+R L+D K+G +F+ + + + +T + ++IE D L+ + Q+						
Sbjct 308	YYLGEILRLALMDMYKQGFIFKNQDLSKFDKPFVMDTSYPARIEEDPFENLEDTDDLQFN					367	
Query 793	-LGLESTCDDSIIVKEVCTVVARAAQLCGAGMAAVDRIRENRGLDALKVTGVVDGTL					851	
	G+ +T + + + + + ++ RAA+L G+AA+ + G + DG++Y						
Sbjct 368	EFGINTTVQERKLIRRLSELIGARAARLSVCGIAAICQKRGYKTG-----	HIAADGSVY				421	
Query 852	KLHPHFAKVMHETVKDL	868					
	+P F + +KD+						
Sbjct 422	NRYPGFKEKAANALKDI	438					

Figura 30: BLAST sequência de aminoácidos da HK2 (2NZT) e da Hxk2 (1IG8)

O valor é baixo, porém de acordo com a literatura as regiões de maior homologia são as extremidades N- e T- terminais, que são as regiões que possuem atividade catalítica (AHN et al., 2009). Portanto, esse valor baixo de semelhança entre as sequências de aminoácidos pode se dar a outras regiões mais internas da proteína que tenham papel mais estrutural que catalítico ou que sejam ligadas a alguma região reguladora.

No programa Chimera as duas estruturas obtidas pelo PDB foram sobrepostas com o objetivo de comparar as semelhanças estruturais. A sobreposição se encontra na figura 31.

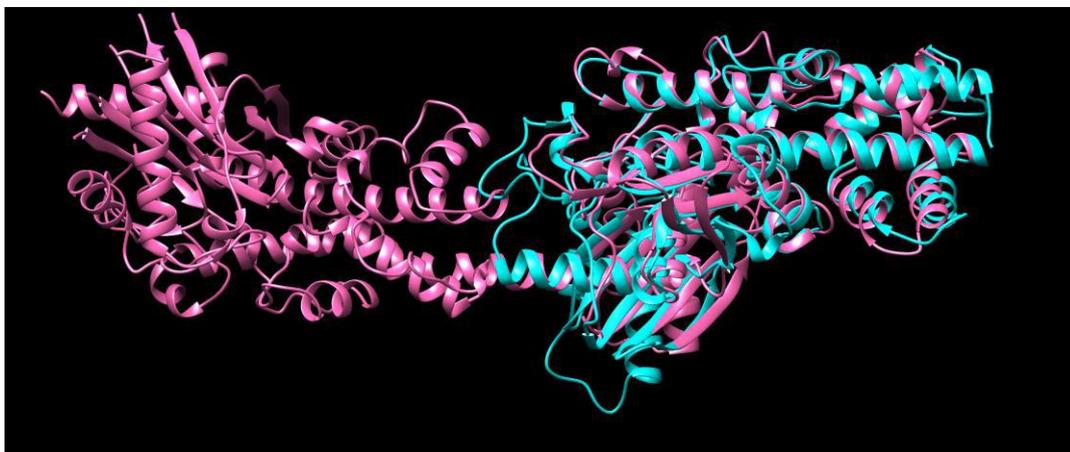


Figura 31: Sobreposição dos monômeros da HK2 (rosa) e Hxk2 (azul). Imagem gerada pelo Chimera (MENG et al., 2006)

O valor de RMSD encontrado através da sobreposição foi de aproximadamente 1,2Å. Como o RMSD é um parâmetro que relaciona a distância entre os átomos de uma estrutura tridimensional, quanto mais baixo o valor, mais próximos os átomos, ou seja, mais similar a estrutura. Nesse caso, tem-se que as estruturas são bastante similares, já que o desvio médio foi baixo. Isso é um indicativo de que a utilização da *S. cerevisiae* para esse estudo é muito válida.

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados de perfil bioenergético, foi possível confirmar que a Hxk2 possui de fato um papel importante na repressão catabólica. Na sua ausência, como o que ocorre na cepa GLK1, observou-se menor consumo de glicose e maior consumo de oxigênio mesmo na presença de glicose.

T6P inibe a atividade de Hxk2 e não inibe Glk1 em condições próximas a de *in vivo* (extrato celular), ou seja, uma condição que também leva em conta as condições intracelulares como modificações pós-traducionais, por exemplo, além de levar em conta a questão metabólica que é bastante importante para esse trabalho. Esse resultado é um primeiro passo interessante para o estudo da ação inibitória da T6P e seu uso em tratamentos de câncer. Para um estudo mais aprofundado seria interessante a construção de uma cepa de *S. cerevisiae* tripladeletada (*hxk1 hxk2 glk1*) e a introdução das isoformas humanas para a realização dos experimentos de inibição com as mesmas.

Através do estudo sobre as estruturas das isoformas dois de *S. cerevisiae*, percebeu-se que, apesar de não terem sequência de aminoácidos tão semelhante, as suas estruturas são similares já que o valor de RMSD foi baixo. Esse é um estudo introdutório para se avaliar a semelhança entre as enzimas Hxk2 de *S. cerevisiae* e HK2 humana e a possível aplicação da T6P como um inibidor das isoformas humanas de hexoquinase.

6. REFERÊNCIAS

- AHN, K. J. et al. Enzymatic properties of the N-and C-terminal halves of human hexokinase II. **BMB Reports**, v. 42, n. 6, p. 350–355, 2009.
- BEHLKE, J. et al. Hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae*: Regulation of Oligomeric Structure by in vivo Phosphorylation at Serine-14 †. v. 2960, n. 98, p. 11989–11995, 1998.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Quinta Edição. [s.l.: s.n.].
- BLÁZQUEZ, M. A. et al. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. **FEBS Letters**, v. 329, n. 1–2, p. 51–54, 1993.
- COURTNAY, R. et al. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 4, p. 841–851, 2015.
- DIAZ-RUIZ, R.; RIGOLET, M.; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1807, n. 6, p. 568–576, 2011.
- ELBEIN, A. D. et al. New insights on trehalose: A multifunctional molecule. **Glycobiology**, v. 13, n. 4, p. 17–27, 2003.
- ELEUTHERIO, E. et al. Revisiting yeast trehalose metabolism. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 263–274, 2014.
- FRANCOIS, J.; PARROU, J. L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 125–145, 2001.
- GANCEDO, C.; FLORES, C.-L. Moonlighting proteins in yeasts. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 72, n. 1, p. 197–210, table of contents, 2008.
- HAMMAD, N. et al. The Crabtree and Warburg effects: Do metabolite-induced regulations participate in their induction? **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1857, n. 8, p. 1139–1146, 2016.
- HERRERO, P. et al. Transcriptional Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HXK1, HXK2 and GLK1 genes. v. 11, p. 137–144, 1995.

KACHROO, A. H. et al. Evolution. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. **Science**, v. 348, n. 6237, p. 921–925, 2015.

KRUSHNA C., P.; HATM, N. The pentose phosphate pathway and cancer. **Trends Biochem Sci.**, v. 39, p. 347–354, 2014.

LIS, P. et al. The HK2 dependent “Warburg effect” and mitochondrial oxidative phosphorylation in cancer: Targets for effective therapy with 3-bromopyruvate. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1–15, 2016.

MACKEY, M. C. et al. The utility of simple mathematical models in understanding gene regulatory dynamics. **In Silico Biology**, v. 12, n. 1,2, p. 23–53, 2014.

MENG, E. C. et al. Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. **BMC bioinformatics**, v. 7, p. 339, 2006.

MENSONIDES, F. I. C. et al. A new regulatory principle for in vivo biochemistry: Pleiotropic low affinity regulation by the adenine nucleotides - Illustrated for the glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 587, n. 17, p. 2860–2867, 2013.

NGO, D. C. et al. Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 4, p. 819–823, 2015.

RIERA, A. et al. Human pancreatic β -cell glucokinase: Subcellular localization and glucose repression signalling function in the yeast cell. **Biochemical Journal**, v. 415, n. 2, p. 233–239, 2008.

ROACH, P. J. et al. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. **Biochemistry Journal**, v. 441, n. 3, p. 763–787, 2016.

ROBERTS, D. J.; MIYAMOTO, S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 2, p. 364–364, 2015.

RODRÍGUEZ, A. et al. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Biochemical journal**, v. 355, n. Pt 3, p. 625–31, 2001.

RONA, G. B. et al. The PWWP domain of the human oncogene WHSC1L1 / NSD3 induces a metabolic shift toward fermentation. 2016.

SCATENA, R. et al. Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 10, p. 1533–1545, 2008.

SMITH, J.; BURKE, D. (EDS.). **Yeast Genetics: Methods and Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2014.

STICKLAND L., H. The Determination of Small Quantities of Bacteria by means of the Biuret Reaction. **J . gen. Microbiol**, v. 5, p. 698–703, 1951.

VANDER HEIDEN, M.; CANTLEY, L.; THOMPSON, C. Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2009.

WILSON, J. E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 12, p. 2049–2057, 2003.

WOLF, A. et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 2, p. 313–26, 2011.

ZHOU, W.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. The Warburg Effect and Mass Spectrometry-based Proteomic Analysis. **Cancer genomics & proteomics**, v. 14, n. 4, p. 211–218, 2017.