



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

PROJETO FINAL DE CURSO

IQWX01

Acúmulo de trealose em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em proteínas do complexo enzimático trealose sintase

Rayne Stfhany Silva Magalhães

Rio de Janeiro

Abril/2013

ACÚMULO DE TREALOSE EM MUTANTES DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE DEFICIENTES EM
PROTEÍNAS DO COMPLEXO ENZIMÁTICO TREALOSE
SINTASE

Rayne Stfhany Silva Magalhães

PROJETO DE 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 A OBTENÇÃO DO GRAU DE QUÍMICO
COM ATRIBUIÇÃO TECNOLÓGICA

Aprovado por:

Prof.^aElis Cristina Araujo Eleutherio, D.Sc

Eduardo Thomaz Vasconcelos Trevisol, M.Sc

Prof.Marcos Dias Pereira, D.Sc

Prof.^a Joelma Freire De Mesquita, D.Sc

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
Abril/2013

Magalhães, Rayne.S.S.
ACÚMULO DE TREALOSE EM MUTANTES DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE DEFICIENTES EM
PROTEÍNAS DO COMPLEXO ENZIMÁTICO TREALOSE
SINTASE/ Rayne Stfhany Silva Magalhães – Rio de Janeiro:
UFRJ/IQ.
Dissertação (Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Centro de Ciências da Matemática e da Natureza,
Instituto de Química / DBQ, 2013.
Orientadores: Elis Cristina Araujo Eleutherio e Eduardo Thomaz
Vasconcelos Trevisol
1.Trealose. 2. Trealose 6-fosfato. 3. Estresse térmico. 4.
Saccharomyces cerevisiae. 5. Inibição enzimática I. Eleutherio, Elis
CristinaAraujo(Orient.) II.Trevisol, Eduardo Thomaz Vasconcelos.
III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química.
IV. Título.

Aos meus pais, Suelainy Delnya e Raimundo

“Desistir dos seus sonhos e esperanças é desistir da sua vida”

(Tim McIlrath)

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus por ter me dado condições de poder traçar o meu caminho até então;

Aos meus pais, Suselainy e Raimundo, meus heróis. Por sempre confiarem em mim, em meu potencial e me incentivarem. Por serem, acima de qualquer coisa, meus melhores amigos, me apoiando e sempre estando ao meu lado, com palavras sinceras e certas, sempre que precisei. Por terem permitido que eu seguisse meus sonhos de hoje poder ser uma química formada. Sem o apoio deles, carinho, confiança e amizade, nunca teria conseguido chegar tão longe.

Ao meu avô e padrinho, Raimundo Cardoso, “homenagem póstuma”, que mesmo não entendendo nada de Química, sempre me perguntava, ouvia e se interessava pelos meus trabalhos. Pelas nossas sábias conversas em todos os domingos, mesmo nos seus últimos dias. Pela nossa amizade, que sei que é eterna.

A professora e orientadora Elis Eleutherio, por ter acreditado em mim, e ter aceitado ser minha orientadora neste trabalho. Pela orientação, e por todos os ensinamentos passados. Pela dedicação e paciência ao longo deste ano que passamos discutindo resultados, e metodologias que deveriam ser empregadas.

Ao Eduardo, colega de bancada e orientador, pela paciência e por sempre me ajudar quando precisei.

A todos os professores na área de Bioquímica (Anderson de Sá Pinheiro, Thiago Parente, Reginaldo Menezes, Marcos Pereira, Elis Eleutherio), por terem me mostrado o quão belo e agradável pode ser o estudo de Bioquímica. Com o incentivo deles acabei descobrindo meu lugar nesta área.

Aos meus ex-orientadores Marta Medeiros (DQI) e Arnaldo Faro (DFQ), que além de terem sido ótimos orientadores enquanto trabalhei com eles, foram ótimos amigos que sempre estiveram disponíveis a me ouvir e me dar conselhos que carregarei para sempre.

Aos meus colegas do laboratório LIFE, que me acolheram com tanto carinho, e que sempre estiveram me ajudando durante esta jornada final da graduação.

Aos amigos que fiz ao longo dos 5 anos de faculdade no IQ, que continuaram ao meu lado, mesmo após tantos problemas. Por sempre acreditarem em meu potencial, e sempre me incentivarem.

Aos amigos queridos que não são do IQ, dentre eles meu querido Raphael, e minha amiga Karen de longa data, por terem tido paciência em meus longos períodos de ausência devido a graduação, mas nunca deixando de acreditar na nossa amizade.

Ao Instituto de Química por ter me proporcionado 5 anos de Química, e demonstrado o quão linda ela é.

RESUMO

PROJETO DE CURSO – IQWX01

TÍTULO: ACÚMULO DE TREALOSE EM MUTANTES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DEFICIENTES EM PROTEÍNAS DO COMPLEXO ENZIMÁTICO TREALOSE SINTASE

ALUNO: Rayne Stfhany Silva Magalhães

ORIENTADOR: Elis Cristina Araujo Eleutherio, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

CO-ORIENTADOR: Eduardo Thomaz Vasconcelos Trevisol, DBQ – Instituto de Química – UFRJ

Trealose é um dissacarídeo não redutor no qual dois resíduos de glicose estão ligadas por uma ligação do tipo $\alpha,\alpha,1,1$ -glicosídica. Está presente em vários organismos, exceto mamíferos, e é um composto ligado ao metabolismo de proteção celular. Em células de *Saccharomyces cerevisiae*, a trealose é acumulada em certas condições de estresse, tais como estresse térmico e estresse devido a escassez de nutrientes. Nestes organismos, a trealose é sintetizada a partir da reação entre UDP-Glicose e Glicose-6 fosfato, e catalisada por um complexo enzimático o qual contem quatro subunidades principais: Tps1, Tps2, Tps3 e Tsl1. As duas primeiras são catalíticas e estão relacionadas com a formação de Trealose-6-fosfato (T6P), e a liberação de moléculas de trealose livres, respectivamente. A função das subunidades Tps3 e Tsl1 ainda não foi totalmente esclarecida. Portanto, o objetivo do presente trabalho é entender o papel que as subunidades Tps3 e Tsl1 no complexo enzimático da síntese de trealose, usando como modelo células de *S. cerevisiae*, assim como verificar uma possível inibição da atividade trealose-6-fosfato sintase por T6P e o mecanismo de inibição. Como esperado, observou-se que células de *S. cerevisiae* acumulam trealose em condições de estresse nutricional (fase estacionária do crescimento) ou térmico (células crescendo exponencialmente em glicose a 28°C são tratadas a 40°C/1h). Além disso, verificou-se que a ausência de Tps3 ou Tsl1 não aboliu completamente a síntese de trealose, mas o nível de açúcar acumulado em resposta ao estresse térmico foi menor que o da linhagem controle (selvagem). Ainda de acordo com os resultados, o substrato intermediário da síntese de trealose, T6P, funciona como inibidor incompetitivo do complexo enzimático trealose sintase, em células de levedura crescendo em fase exponencial, meio rico em glicose, a 40°C.

Índice

Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	vii
Lista de siglas, abreviaturas e símbolos.....	viii
Lista de Anexos	ix
Introdução.....	1
Objetivo	3
Revisão Bibliográfica	4
Trealose	4
Modelo experimental: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Metabolismo de trealose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Material e Métodos	14
1) Cepas de <i>S. cerevisiae</i> e condições de crescimento	14
2) Curva de crescimento em glicose	14
3) Tratamento Térmico.....	15
4) Extração e Dosagem de trealose	15
5) Atividades enzimáticas.....	16
6) Efeito de trealose 6-fosfato na atividade de trealose 6-fosfato sintase	19
Resultados e Discussão	21
1) Curva de crescimento	21
2) Acúmulo de Trealose	25
3) Atividade trealásica e sintásica	30
4) Estudo da inibição de T6P no complexo enzimático trealosesíntase.....	34
Conclusão.....	44
Perspectivas	45
Anexos	46
1) Curva padrão para determinação do fator de peso seco.....	46
2) Curva padrão de dosagem de proteína pelo método de biureto modificado por Stickland.....	46
3) Curva padrão de dosagem de glicose pelo método de GOP	47
4) Curva padrão de dosagem de UDP	47
Bibliografia.....	48

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura do isômero de trealose de ocorrência natural (ligação glicosídica $\alpha, \alpha 1$	4
Figura 2. Exemplo de organismo anidrobionte, a planta do tipo <i>Selaginella lepidophylla</i> . Na parte superior, a planta em condições de total hidratação; na parte inferior, a mesma ainda viva, porém desidratada, na qual há um grande acúmulo de trealos (Singer & Lindquist, 1998).....	6
Figura 3. Molécula de maltose	7
Figura 4. Microscopia eletrônica de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
Figura 5. Aspecto da curva de crescimento diáuxico característico de células de <i>S. cerevisiae</i> crescendo em meio rico em glicose	10
Figura 6. Síntese de trealose em células de <i>S. cerevisiae</i>	11
Figura 7. Degradação da trealose a duas moléculas de glicose em células de <i>S. cerevisiae</i>	11
Figura 8. Curva de crescimento para a cepa WT em YPD 2%. As concentrações foram obtidas a partir da conversão das absorvâncias usando o fator de peso seco, 0,4 mg/mL, como descrito em Método.....	22
Figura 9. Gráfico para obtenção do fator da velocidade específica de crescimento para as células WT.....	22
Figura 10. Curva de crescimento para a cepa $\Delta ts11$ em meio YPD2%. As concentrações foram obtidas a partir da conversão das absorvâncias usando o fator de peso seco, 0,4 mg/mL, como descrito em Método.....	23
Figura 11. Gráfico para obtenção do fator da velocidade específica de crescimento para as células $\Delta ts1$	23

Figura 12. Curva de crescimento para a cepa $\Delta tps3$ em meio YPD 2%. As concentrações foram obtidas a partir da conversão das absorvâncias usando o fator de peso seco, 0,4 mg/mL, como descrito em Método.	24
Figura 13. Gráfico para obtenção do fator de velocidades específica de crescimento para as células $\Delta tps3$	24
Figura 14. Reações envolvidas na dosagem de trealose pelo método de antrona (Neto <i>et al</i> , 2008).....	27
Figura 15. Níveis intracelulares de trealose nas diferentes fases de crescimento em glicose nas cepas WT, $\Delta tps3$ e $\Delta ts1$. Os resultados são apresentados como uma média de três experimentos independentes \pm desvio padrão.....	28
Figura 16. Acúmulo de trealose, em resposta ao choque térmico, 40°C/1 h/160 rpm. As células foram coletadas no meio da 1ª LOG e a 28°C e a seguir tratadas a 40°C. Os resultados são apresentados como uma média de três experimentos independentes \pm desvio padrão	29
Figura 17. Atividade de trealase em células WT, $\Delta tps3$ e $\Delta ts1$ coletadas em 1ª LOG a 28°C e a seguir tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. Os resultados são apresentados como uma média de três experimentos independentes \pm desvio padrão.....	31
Figura 18. . Atividade de trealose sintase, a 28-40°C, nas cepas WT, $\Delta tps3$ e $\Delta ts1$, coletadas em 1ª LOG a 28°C e a seguir tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. Os resultados são apresentados como uma média de três experimentos independentes \pm desvio padrão	33
Figura 19. . Curva de velocidade em função de diferentes concentrações de UDPG à concentração fixa de 10 mM G6P. Os extratos foram obtidos de células WT coletadas em 1ª LOG e tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. A atividade T6P sintase foi determinada como descrito em Método. Os resultados são uma média de três experimentos independentes	34
Figura 20. Curva de velocidade em função de diferentes concentrações de G6P à concentração fixa de 5 mM UDPG. Os extratos foram obtidos de células WT coletadas em 1ª LOG e tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. A atividade T6P sintase foi determinada como descrito em Métodos	35
Figura 21. Gráfico de Lineweaver-Burk para o substrato UDPG	36

Figura 22. Gráfico de Lineweaver-Burk para o substrato G6P	36
Figura 23. Curva de velocidade em função de diferentes concentrações de UDPG a concentração fixa de 10 mM G6P. Os extratos foram obtidos de células WT coletadas em 1ªLOG e tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. A atividade T6P sintase foi determinada como descrito em Método, com a presença de inibidor. Os resultados são uma média de três experimentos independentes	37
Figura 24. . Curva de velocidade em função de diferentes concentrações de G6P a concentração fixa de 5 mM UDPG. os extratos foram obtidos de células WT coletadas em 1ªLOG e tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. A atividade T6P sintase foi determinada como descrito em Método, com a presença de inibidor	38
Figura 25. Gráfico comparativo de Lineweaver-Burk para substrato UDPG na presença e ausência de T6P	39
Figura 26. Gráfico comparativo de Lineweaver-Burk para substrato G6P na presença e ausência de T6P	40
Figura 27. Esquema da inibição acompetitiva, onde E= enzima; S= Substrato; P= Produto; I= Inibidor, ES= complexo Enzima-substrato; ESI= complexo enzima-substrato-inibidor; K'_i = constante de inibição(constante de dissociação do complexo).	41
Figura 28. Modificação do sitio catalítico do substrato pela entrada do inibidor, num processo de inibição acompetitiva.	41
Figura 29. . Gráfico de Lineweaver-Burk característico para inibição acompetitiva. [I]= concentração de inibidor; V_{max} = velocidade máxima; K_m = constante de Michaelis; K_i = constante de inibição;	42

Índice de Tabelas

Tabela 1 Perspectiva Histórica de trealose (adaptada de Singer & Lindquist , 1998).....	5
Tabela 2. Subunidades do complexo enzimático trealosesintase em células de <i>S. cerevisiae</i> (adaptada de Singer & Lindquist, 1998).....	12
Tabela 3. Isoformas da enzima trealase em células de <i>S. cerevisiae</i> (adaptada de Singer & Lindquist, 1998)	13
Tabela 4. Lista das cepas usadas durante os experimentos. Todas foram adquiridas da Euroscarf, Alemanha.	14
Tabela 5. Concentrações de G6P e UDPG	20
Tabela 6. Parâmetros cinéticos da trealose-6-fosfato sintase obtidos para UDPG e G6P	36
Tabela 7. Comparação entre os parâmetros cinéticos de T6P sintase para UDPG na ausência e presença de T6P	39
Tabela 8. Parâmetros cinéticos de T6P sintase para G6P na presença de T6P	40

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

ADP- Adenosina difosfato

AMPc- Adenosina monofosfatocíclica

ATP- Adenosina trifosfato

CuSO₄- Sulfato de Cobre

DNPH- 2,4-dinitrofenilhidrazina

EtOH- Etanol

G6P- Glicose 6-fosfato

GOP- Glicose oxidase-peroxidase

IQ- Instituto de Química

LIFE- Laboratório de Investigação de Fatores de Estresse

MgCl₂- Cloreto de magnésio

NaOH- Hidróxido de Sódio

Orto-d- Orto-dianizidina

PEP- Fosfoenolpiruvato

PK- Piruvato cinase

T6P- Trealose-6-fosfato

Tampão MS- Tampão Maleato de Sódio

TCA- Ácido Tricloroacético

TPP- Trealose 6-fosfato fosfatase

TPS- Trealose 6-fosfato sintase

UDP- Uridina difosfato

UDPG- Uridina difosfato glicose

UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro

UTP- Uridina trifosfato

Lista de Anexos

- 1) Curva padrão de peso-seco
- 2) Curva padrão de dosagem de proteína pelo método de biureto modificado por Stickland
- 3) Curva padrão de dosagem de glicose pelo método de GOP
- 4) Curva padrão de dosagem de UDP

● *Introdução*

Trealose é um dissacarídeo não redutor no qual dois resíduos de glicose estão ligados por uma ligação do tipo $\alpha, \alpha, 1, 1$ -glicosídica. É um açúcar presente em vários organismos incluindo bactérias, fungos, leveduras, insetos, invertebrados e plantas, onde pode atuar como uma molécula sinalizadora para controle de outras vias metabólicas, na proteção durante condições de estresse e como um carboidrato de reserva (Elbein *et al*, 2003).

Este dissacarídeo pode ser sintetizado de três formas diferentes, sendo estas:

1. Reação envolvendo glicose e glicogênio;
2. Pelo rearranjo intramolecular da molécula de maltose;
3. Reação entre UDP-Glicose (UDPG) e Glicose-6-fosfato (G6P);

Em células de *Saccharomyces cerevisiae* a trealose é sintetizada pela rota 3.

As enzimas da via metabólica de trealose em células de *S.cerevisiae* são codificadas por sete genes diferentes, dos quais quatro estão relacionados com a síntese de trealose e os três restantes com a degradação. *TPS1* e *TPS2* codificam as enzimas responsáveis pela formação de trealose-6-fosfato (T6P) a partir da reação entre G6P e UDPG e pela liberação de moléculas livres de trealose a partir da abstração de um fosfato inorgânico da molécula de T6P, respectivamente. Tais enzimas são auxiliadas por subunidades codificadas pelos genes *TPS3* e *TSL1*, que possuem papel regulatório, porém não se tem, até então, conhecimento definitivo sobre o papel destas subunidades. As quatro proteínas fazem parte do complexo enzimático trealose sintase (Elbein *et al*, 2003).

Uma vez o organismo não precisando mais de moléculas de trealose, ocorre a ativação da via catabólica de trealose, na qual o açúcar é degradado gerando duas moléculas de glicose. Tal reação, quando ocorre no citoplasma da célula, é catalisada pela enzima trealase codificada pelo gene *NTH1*.

O entendimento do acúmulo de trealose em resposta aos variados tipos de estresse é um assunto de interesse em várias áreas. Na indústria alimentícia, entender e controlar o acúmulo de trealose é interessante para o congelamento de certos alimentos, ou a desidratação de outros, como por exemplo, o fermento em pó que tem sido comercializado desidratado. No fermento desidratado, o nível de trealose é alto. O aumento da tolerância das células de levedura ao etanol é de grande interesse de indústrias de bebidas

alcoólicas. Além disso, o entendimento do metabolismo de trealose tem ligação com o uso de leveduras para a produção de etanol combustível.

O acúmulo de trealose é geralmente visto como um fator positivo para a sobrevivência de organismos que se adaptam a novas condições ambientais. Porém, quando relaciona-se esse acúmulo a fungos, bactérias que usam mamíferos como hospedeiros, a síntese de trealose é vista como uma resposta negativa. Estes organismos quando presentes no hospedeiro enfrentam como estresse o aumento da temperatura, devendo se adaptar a temperaturas elevadas, maiores que as suas temperaturas ótimas de crescimento. Já foi estudado que o choque térmico ativa a síntese de trealose, que leva a níveis elevados do dissacarídeo o qual é importante para a sobrevivência do organismo infectante. Portanto, os organismos patogênicos usam o acúmulo de trealose para poder passar a virulência ao hospedeiro. Com base em tal observação e no fato de mamíferos não sintetizarem o dissacarídeo, o estudo de metabolismo de trealose pode levar ao desenvolvimento de novas terapias pra tratamento de doenças infecciosas (Petzold *et al*, 2006).

Portanto, o entendimento do metabolismo de trealose(incluindo as funções das subunidades Tps3 e Tsl1, assim como o papel inibidor de T6P) é interessante para o desenvolvimento principalmente na área da biotecnologia. Como exemplo pode-se citar o desenvolvimento de novos bactericidas e fungicidas. Estudos já mostraram que baixas concentrações de trealose em *Candida albicans* resultaram numa baixa virulência (Maidan *et al*, 2008) .

- **Objetivo**

Avaliar a regulação do complexo enzimático trealose sintase em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito das ausências de Tps3 e Tsl1 no acúmulo de trealose.
- Avaliar as atividades trealase e sintase em mutantes *tps3* e *tsl1*.
- Avaliar o efeito de trealose-6-fosfato na atividade trealose-6-fosfato sintase.

• *Revisão Bibliográfica*

• Trealose

Definição e Histórico

Trealose é um dissacarídeo não redutor no qual dois resíduos de glicose são ligadas por uma ligação do tipo $\alpha,\alpha,1,1$,glicosídica (Figura 1). Além desta conformação, existem mais dois possíveis isômeros da trealose, os quais são $\alpha,\beta-1,1-$, $\beta,\beta-1,1-$, porém apenas o $\alpha,\alpha,1,1-$ já foi isolado de organismos (Elbein *et al*, 2003). Sua síntese ocorre em resposta a algum tipo de estresse enfrentado pelo organismo.

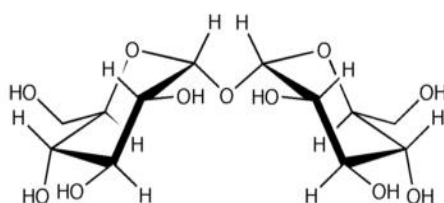


Figura 1. Estrutura do isômero de trealose de ocorrência natural (ligação glicosídica $\alpha,\alpha,1$)

A ausência dos grupos redutores confere à trealose uma maior estabilidade em meios alcalinos (Elbein *et al*, 2003; Panek, 1991). A maleabilidade encontrada em sua estrutura devido a ligação $\alpha,\alpha,1,1$,glicosídica (que impede a ocorrência de ligações hidrogênio intramoleculares) lhe confere a propriedade de manter a estrutura da membrana e de proteínas durante situações de desidratação.

É um carboidrato encontrado em fungos, bactérias, leveduras, alguns insetos, invertebrados e plantas (Elbein *et al*, 2003). Em mamíferos, não ocorre síntese de trealose, porém a enzima trealase, responsável pela degradação deste açúcar, já foi encontrada ativa no estômago destes animais, para situações que haja algum tipo de ingestão do carboidrato.

A trealose foi primeiramente isolada em 1832, por H.A.L.Wiggers, que detectou a presença de um açúcar ainda não conhecido no corpo das pragas que infestavam uma plantação de milho na época. Na época, o açúcar foi chamado de “treala”. Um quarto de século depois, o mesmo açúcar foi encontrado em casulos de besouros, e mais tarde, M. Berthelot analisou o açúcar contido na “treala”, e o chamou de trealose (Singer & Lindquist, 1998). A tabela 1 mostra fatos históricos relacionados à trealose.

Tabela 1 Perspectiva histórica de trealose (adaptada de Singer & Lindquist , 1998).

Ano	Acontecimento
1681	A primeira menção a “treala”, nome dado ao açúcar que estava no casulo de besouros .Este casulo era comumente encontrado nas plantas do gênero <i>Echinopsersicus</i> . A descrição apareceu na “Pharmacoppoea Persica by FriarAngeofTolouse”.
1832	Enquanto analisava os constituintes de uma colônia de fungos que infectaram grãos de cereais, H. A. L. Wiggers identificou um açúcar que ele chamou de “mutterkornzucker” (açúcar ergot).
1858	Mitsherlich preparou o açúcar descrito por Wigger e nomeou de “mycose” (fungos em grego). M. Guilbort descreveu “treala”, um dos itens da coleção de Materia Médica de contribuição de M. Della Sudda de Constantinopla para a exposição universal de Paris de 1855. M. Berthelot analisou o açúcar contido na treala e o nomeou de trealose. Berthelot notou a semelhança entre a trealose e a mycose.
1873-1876	M. A. Muntz encontrou trealose em cogumelo e em outro fungo, mas não conseguiu detectar em levedura. Ele examinou “mycose” e trealose e concluiu que eles eram o mesmo composto.
1893	E. Bourquelot isolou trealose de <i>Aspergillus niger</i> .
1895	E. Fischer detectou atividade trealásica em levedura.
1925	E. M. Koch e F.C.Koch descobriram trealose em levedura
1954	L.F.Leloir e E. Cabib descreveram a síntese enzimática de trealose
1958	Primeira síntese química de trealose reportada por R.U. Lemieux e H.F. Bauer.

Síntese

A sua síntese vai depender do organismo em que se esteja estudando. A seguir são apresentadas as três formas mais conhecidas da síntese de trealose (Elbein *et al*, 2003):

a) A partir da reação de UDPG e G6P

É o mecanismo encontrado principalmente em organismos anidrobiontes, que conseguem sobreviver em condições de quase total ausência de água. Tal grupo é composto por alguns tipos de plantas, leveduras, nematoides e bactérias, como a *Escherichia coli*, entre outros (Singer & Lindquist, 1998). A Figura 2 mostra a planta anidrobionte *Selaginella lepidophylla* hidratada e desidratada.

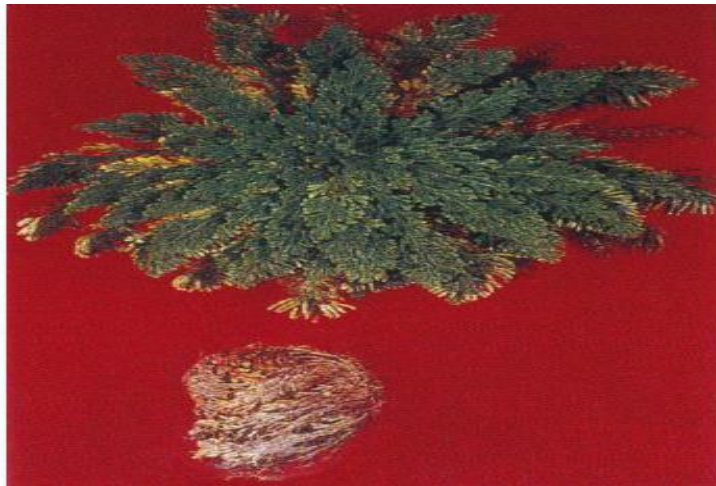


Figura 2. Exemplo de organismo anidrobionte, a planta do tipo *Selaginella lepidophylla*. Na parte superior, a planta em condições de total hidratação; na parte inferior, a mesma ainda viva, porém desidratada, na qual há um grande acúmulo de trealose (Singer & Lindquist, 1998).

A diferença principal entre a síntese em *E.coli* e em leveduras, por exemplo, são as proteínas envolvidas. Enquanto no primeiro organismo o complexo de síntese de trealose é formado por duas subunidades catalíticas, em leveduras o complexo é formado por quatro subunidades, duas catalíticas e duas regulatórias. Este mecanismo será abordado novamente neste trabalho.

b) Rearranjo intramolecular de maltose

É uma via metabólica encontrada em várias bactérias incomuns. Nela há um rearranjo da molécula de maltose (Figura 3), onde sua ligação $\alpha, \alpha 1,4$ é convertida a uma ligação do tipo $\alpha, \alpha, 1,1$, formando uma molécula de trealose.

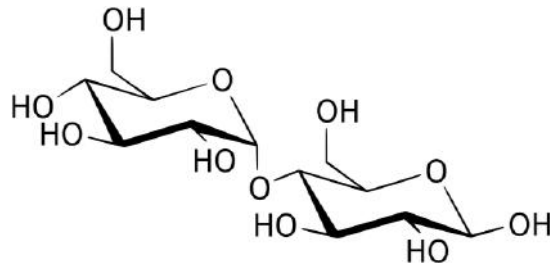


Figura 3. Molécula de maltose

c) Reação envolvendo cadeias de glicogênio

É uma rota que compreende um grande número de enzimas e reações envolvendo as terminações da cadeia de glicogênio e a liberação de trealose a partir das terminações redutoras do glicogênio.

A localização celular onde irá ocorrer a síntese de trealose também vai depender do organismo. Por exemplo, em células de levedura, a síntese ocorre no citoplasma. Uma vez sintetizada, transportadores específicos irão carregar a molécula de trealose até as regiões onde o açúcar é necessário. Estudos prévios já mostraram que a trealose é requisitada em ambos os lados da membrana celular da levedura para exercer sua função protetora durante a desidratação (Eleutherio *et al*, 1993).

Função

A função que a trealose desempenha depende do organismo em questão e em quais condições o mesmo se encontra. Por exemplo, em insetos a trealose é o principal carboidrato do linfoma e é usado como fonte de energia durante o voo (Panek, 1991).

Organismos anidrobióticos usam trealose para aumentar sua tolerância a condições de estresse. Nestes organismos a principal função é manter a estrutura das membranas celulares durante a desidratação. O fato das duas unidades de glicose estarem ligadas por uma ligação do tipo $\alpha, \alpha, 1, 1$, glicosídica permite que a mesma seja maleável, conferindo a trealose uma fácil adaptação a conformações diferentes. Desta forma, quando a camada de hidratação das biomoléculas é perdida durante a desidratação, as moléculas de trealose a substituem mantendo a estrutura conformacional intacta. Desta forma, durante o processo de re-hidratação, a conformação original das biomoléculas pode ser recuperada. Tal estabilidade conferida pela trealose às

proteínas e membranas em condições de estresse sugere aplicações bastante promissoras (Singer & Lindquist, 1998).

Em anidrobiontes, trealose é acumulada em resposta a algum tipo de estresse, como desidratação, estresse térmico, relacionado ao aumento ou diminuição da temperatura, estresse oxidativo e estresse nutricional, relacionado com a escassez ou mudança de fontes de nutrientes.

Em fungos, o acúmulo de trealose pode estar relacionado com a adaptação do organismo quando o mesmo se encontra em um novo ambiente de crescimento, como por exemplo ao infectar o hospedeiro (Van Dijck *et al*, 2002).

Além de servir como carboidrato de reserva e protetor celular contra condições de estresse, já foi mostrado que a trealose tem papel regulador de outras vias metabólicas, como por exemplo a via glicolítica, na qual a trealose controla o fluxo de entrada de glicose (Eastmond & Graham, 2003).

Estudos feitos em células de *S.cerevisiae* deficientes em Tps1 mostraram uma desregulação da glicólise após a adição de mais glicose ao meio, enfatizando que tal enzima controla o fluxo do açúcar na via glicolítica. T6P parece ser um inibidor da Hexocinase II em leveduras (Van Dijck *et al*, 2002).

- **Modelo experimental: *Saccharomyces cerevisiae***

O organismo escolhido como modelo experimental no presente trabalho foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

S. cerevisiae (Figura 4) é um organismo eucarioto, unicelular que pertence ao reino dos fungos. É a levedura usada na produção de pão, cerveja, etanol combustível. Na área de Bioquímica, Genética e Biologia Molecular tem sido amplamente usada como modelo experimental (Siggers & Lesser, 2008).

Existem várias vantagens em se trabalhar com esta levedura como modelo experimental. Tem fácil crescimento em laboratório, é facilmente manipulável geneticamente, todo seu genoma já foi sequenciado, sua bioquímica é semelhante a de células de mamíferos. Tem sido usado para estudo de processos bioquímicos de células eucarióticas há mais de 50 anos (Siggers & Lesser, 2008).

Quando suas células são tratadas em meio rico em glicose, seu metabolismo fermentativo é ativado, e apresenta um crescimento diáuxico. A Figura 5 mostra a curva de crescimento desta levedura em glicose como fonte de carbono.

O crescimento diauxico é composto de 5 fases , sendo estas (Neto *et al*, 2008):

- LAG: fase de adaptação ao meio.
- 1ª LOG: fase na qual as células usam a glicose do meio externo para crescer e excretam o etanol resultante da fermentação.
- Diauxia: após o término da glicose, as células se adaptam para o aproveitamento do etanol como fonte de carbono.
- 2ª LOG: fase na qual as células crescem metabolizando etanol.
- Estacionária: uma vez esgotado o etanol, ou outro nutriente essencial, as células não mais se dividem.

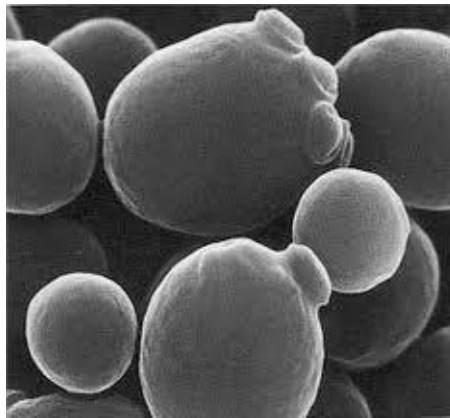


Figura 4. Microscopia eletrônica de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

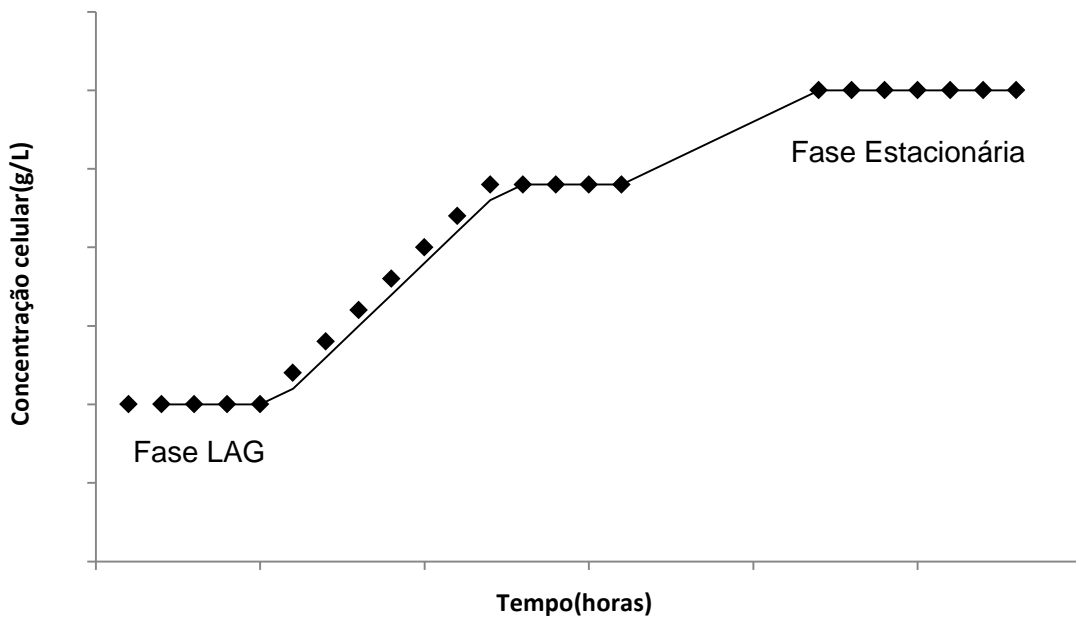


Figura 5. Aspecto da curva de crescimento diáuxico característico de células de *S. cerevisiae* crescendo em meio rico em glicose

- **Metabolismo de trealose em *Saccharomyces cerevisiae***

Como citado anteriormente, leveduras são organismos anidrobióticos, e portanto sintetizam trealose a partir da reação de UDPG e G6P. Tal reação é catalisada pelo complexo enzimático trealose sintase, que possui duas subunidades catalíticas a TPS ou Tps1 (trealose 6-fosfato sintase), que catalisa a reação dos dois substratos, liberando uma molécula de trealose 6-fosfato (T6P), e a TPP ou Tps2 (trealose 6-fosfato fosfatase), uma fosfatase específica, que abstrai um fosfato inorgânico da estrutura da T6P e liberando trealose (Figura 6).

Uma vez as células não estando mais numa situação de estresse, a molécula de trealose é degradada em duas moléculas de glicose, cuja reação é catalisada pela enzima trealase (Figura 7). Existem três isoformas da trealase: Nth1 e Nth2, ambas citoplasmáticas, e Ath1, que pode ser encontrada no vacúolo ou no espaço periplasmático (Singer & Lindquist, 1998).

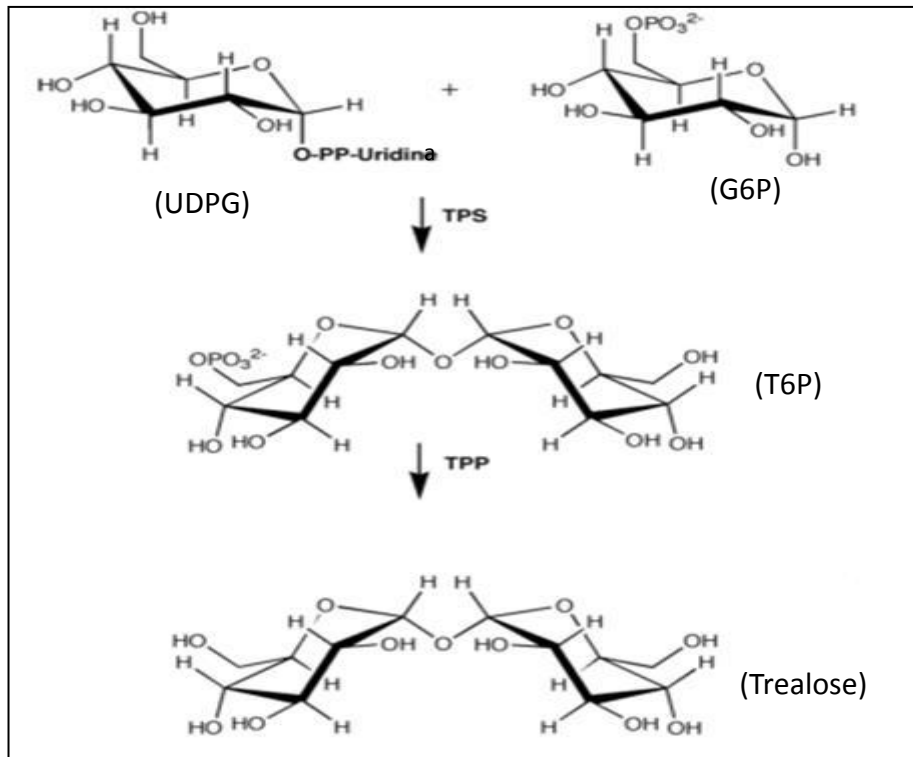


Figura 6. Síntese de trealose em células de *S. cerevisiae*.

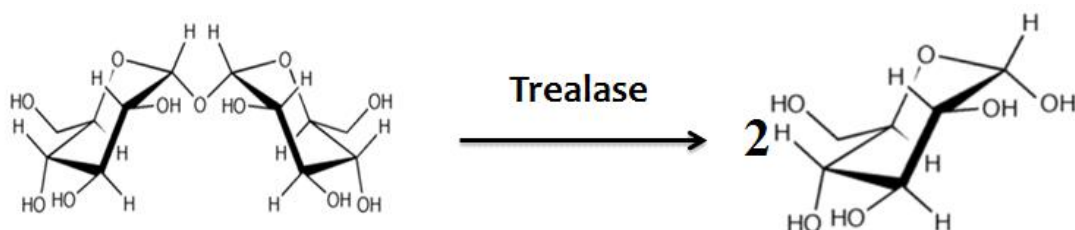


Figura 7. Degradação da trealose a duas moléculas de glicose em células de *S. cerevisiae*

Em condições de crescimento diáuxico, o acúmulo de trealose só é observado na fase estacionária (estresse nutricional devido à carencia de nutrientes). O acúmulo de trealose começa na fase diauxia, ainda em quantidade baixas, e atinge níveis máximos em fase estacionária. Uma vez as células terem atingido tal fase, depois de um período, observa-se a queda gradual de concentração de trealose (Werner-Washburne, *et al*, 1993).

As enzimas da via metabólica da trealose em células de *S. cerevisiae* são codificadas por sete genes diferentes, dos quais quatro estão relacionados com a síntese de trealose e três com sua degradação. A tabela 2 descreve cada um dos constituintes do complexo de síntese de trealose, Tps1, Tps2, Tsl1 e Tps3. Os dois primeiros têm atividade catalítica, enquanto os dois

últimos parecem ter papel regulador. Uma vez não sendo mais necessária a sua síntese, a trealose é degradada pela trealase. Estudos já demonstraram o que irá determinar o acúmulo de trealose será o grau de ativação das enzimas de síntese e degradação, que será de acordo com a situação ambiental (Petzold *et al*, 2006).

Tabela 2. Subunidades do complexo enzimático trealosesintase em células de *S. cerevisiae* (adaptada de Singer & Lindquist, 1998)

Subunidade	Características
Tps1	Catalisa a síntese de T6P a partir de UDPG e G6P. É expressa continuamente e é altamente induzida pelo aquecimento. Células que não contem esta proteína não conseguem crescer em meio rico em glicose e não adquirem termotolerância .
Tps2	Remove o íon fosfato da T6P gerando trealose. Também é expressa continuamente e induzida pelo aquecimento.
Tsl1	É um regulador da síntese de trealose. Sua expressão aumenta na fase estacionária.
Tps3	É um regulador da síntese de trealose, e sua expressão é constante na fase estacionária e exponencial .

Sabe-se que o tamanho do complexo de síntese é de aproximadamente 630-800 kDa, o que indica que há mais de uma unidade de cada subunidade do complexo (Singer & Lindquist, 1998). Tps1 é a menor subunidade, com aproximadamente 56 kDa, enquanto que Tps2 tem um tamanho próximo de 100kDa. Tsl1 é a maior subunidade, com 123 kDa. Tps3 é uma subunidade homóloga a Tsl1 (Bell *et al*, 1998).

Acredita-se que as subunidades Tps1 e Tps2 interajam entre si, enquanto que Tsl1 e Tps3 só interajam com as outras subunidades, ligando-se cada uma em um ponto específico de Tps1 e Tps2. Estudos já mostraram que além da Tps1 ligada ao complexo, existe uma Tps1 monomérica livre, que tem forte ligação com o controle da glicólise (Bell *et al*, 1998).

Como mencionado anteriormente, a trealase possui três isoformas, cujas características são listadas na tabela 3.

Tabela 3. Isoformas da enzima trealase em células de *S. cerevisiae* (adaptada de Singer & Lindquist, 1998)

Isoformas de trealase	Características
Nth1	Enzima principal para a degradação de trealose. É expressa continuamente e é induzida por aquecimento. Células que não continham tal enzima tiveram termotolerância e recuperação após choque térmico diminuídas. É também conhecida como trealase neutra, devido ao seu pH ótimo próximo de 7,0. Localiza-se no citoplasma da levedura
Nth2	É altamente homologa a Nth1. Localizada no citoplasma. Sua função na degradação de trealose não é muito clara.
Ath1	Pode ser encontrada no vacúolo e espaço periplasmático. Células que não contem tal isoformas não conseguem usar a trealose como fonte de carbono e apresentam um aumento na sobrevivência a congelamento, desidratação e estresse causado pelo etanol.

A enzima trealase é mais comum na natureza que o próprio dissacarídeo trealose. Já foi detectada em variados organismos, inclusive em mamíferos. Esta enzima está presente em todas as fases do crescimento celular de levedura, diminuindo sua atividade quando se atinge a fase diauxia, onde nenhuma síntese proteica ocorre (Kasumi *et al*, 1986). A quebra da molécula de trealose pela trealase pode fornecer energia necessária para a recuperação ao estresse (Panek, 1991). A partir de vários estudos em vários tipos de levedura, foi demonstrado que todos os genes (de síntese e degradação) devem estar presentes para que haja um funcionamento ótimo do metabolismo de trealose (Petzold *et al*, 2006).

• **Material e Métodos**

1) Cepas de *S. cerevisiae* e condições de crescimento

A tabela a seguir mostra as cepas usadas durante o presente trabalho

Tabela 4. Lista das cepas usadas durante os experimentos. Todas foram adquiridas da Euroscarf, Alemanha.

Cepa	Genótipo	Fenótipo
BY4741)	<i>MATa;his3;leu2;met15;ura3</i>	Selvagem (WT)
Δ tps3	Isogênica à BY4741 exceto <i>tps3::kanMX4</i>	Deficiente em Tps3
Δ tsl1	Isogênica à BY4741 exceto <i>tsl1::kanMX4</i>	Deficiente em Tsl1

As cepas foram estocadas em meio sólido YPD 2%(1% extrato de lêvedo, 2% peptona, 2% glicose, 2% agar). No caso das mutantes, o meio sólido continha também 200 mg/L de geneticina. Foi feito um repique fresco das células 24 h antes do cultivo em meio líquido.

Em seguida, as células foram inoculadas em meio YPD 2% (meio fermentativo e rico em glicose) em frascos erlenmeyers com 1/5 do volume preenchido de meio que foram incubados a 28°C/160 rpm.

2) Curva de crescimento em glicose

Para a obtenção da curva de crescimento, para cada cepa foram preparados três inóculos diferentes e os cultivos foram incubados durante cerca de 17 h, a 28°C e rotação de 160 rpm. No dia seguinte, de hora em hora, foram coletadas alíquotas de cada inóculo e suas absorvâncias lidas em Espectrofotometro UV/Visível a 570 nm.

Para a obtenção da concentração celular de cada amostra, usou-se a relação de Lambert-Beer, mostrada abaixo:

$$M = f \cdot x \cdot Abs$$

Onde :

- Abs= absorvância, a 570 nm, de uma suspensão de células.
- M= concentração celular, mg/mL

- f= fator do peso seco, mg/mL

O fator do peso seco (f) foi determinado a partir da filtração de um volume adequado de suspensão de células em filtro Milipore (0,45 μm) que, posteriormente, foi colocada para secar sob luz de infravermelho até atingir o peso constante. O valor usado nos cálculos é de 0,4 mg/mL. Para cada cepa, as concentrações iniciais de inóculo usadas foram as mesmas, e são citadas abaixo:

a) Cepa WT

Inóculo I: 10 μg de células em 50 mL YPD 2% 0,0002 mg/mL

Inóculo II: 40 μg de células em 50 mL YPD 2% 0,0008 mg/mL

Inóculo III: Alçada

b) Cepas Δtps3 e Δtsl1

Inóculo I: 10 μg de células em 50 mL YPD 2% 0,0002 mg/mL

Inóculo II: 100 μg de células em 50 mL YPD2% 0,002 mg/mL

Inóculo III: Alçada em 50 mL YPD2 %

3) Tratamento Térmico

As células cresceram em meio YPD líquido até a metade da primeira fase exponencial de crescimento (1,0 mg de peso seco/mL). Em seguida, elas foram tratadas a 40°C/160 rpm/60 min. Ao final do tratamento as células eram separadas por centrifugação, lavadas com água destilada e usadas para determinação do teor de trealose ou atividades enzimáticas (trealase e trealose sintase).

4) Extração e Dosagem de trealose

4.1) Extração

A trealose intracelular foi extraída de 12 mg de células (peso-seco) com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,5 M durante 20 min a 0°C. O sobrenadante foi coletado por centrifugação 3000 rpm/5 min e usado para dosagem de trealose.

4.2) Dosagem pelo método de Antrona

A trealose foi quantificada pelo método de antrona. Para tal, adicionou-se 0,3 mL de amostra (diluída com água, quando necessário) a 3 mL de reagente de Antrona, o qual consiste de uma mistura de H₂SO₄ e água 3:1(v/v) contendo 0,05% de antrona e 1% de tiuréia.

A reação ocorreu a 100°C/10 min, seguida de incubação dos tubos por 20 min em local escuro a temperatura ambiente. A concentração de trealose foi determinada pela medida de absorvância da solução resultante a 620 nm. Para conversão das absorvâncias em concentração, determinou-se a absorvância equivalente a 15 µg de trealose usando-se uma solução padrão de trealose 100 µg/mL.

Para a obtenção da concentração de trealose por massa de célula a relação matemática usada foi a seguinte:

$$C = \frac{15 \times Abs(a) \times 2 \text{ mL de TCA}}{Abs(p) \times V(a) \times 12 \text{ mg de célula}}$$

Onde:

- C= Concentração intracelular de trealose em µg de trealose/mg de células
- Abs(a) absorvância do extrato;
- Abs(p) absorvância do padrão;
- V(a) volume de amostra, em mL;

5) Atividades enzimáticas

5.1) Preparo dos extratos celulares

Os extratos celulares foram preparados a partir da lise de 50 mg de células (peso seco) com 1,5 g de pérolas de vidro (diâmetro entre 450-600 µm) e 0,5 mL de tampão maleato de sódio 50 mM, pH 6,0, por agitação com períodos de 1min a 1min de repouso no gelo. Tal ciclo foi repetido três vezes. O homogeneizado foi centrifugado com velocidade máxima por 3 minutos em microcentrífuga e o sobrenadante coletado e estocado no gelo.

5.2) Dosagem de proteína nos extratos células

Uma vez obtidos os extratos, dosou-se proteína seguindo o protocolo de método de biureto modificado por Stickland (Stickland, 1951). Para tal, a 4,9 mL de água destilada, adicionou-se 0,1 mL do extrato obtido, 0,9 mL de NaOH 20% e 0,15 mL de CuSO₄ 25%. Seguiu-se uma centrifugação a 2000Xg /4 min, e o sobrenadante lido numa absorvância de 550 nm.

Para este experimento, construiu-se uma curva padrão (em anexo), usando como padrão uma solução de albumina extraída do fígado de boi, para obtenção do fator da curva, f, cujo valor usado foi de 23,15 mg. A relação matemática usada é

$$C = \frac{Abs(a) \times 23,15 \text{ mg}}{0,1 \text{ mL de extrato}}$$

Onde:

- C= concentração de proteínas, em mg/mL;
- Abs= absorvância da amostra;

5.3) Atividade Trealase

A atividade trealásica foi determinada seguindo protocolo de Dellamora-Ortiz e col (1986), sendo o volume final de reação igual a 200 µL, contendo 100 µg de preparo enzimático, 100 µL de trealose 0,1 M em tampão maleato de sódio 50 mM pH 6,0, e o restante do volume completado com tampão maleato de sódio. Para cada amostra foi preparado um branco que continha tampão maleato de sódio e 100µg de preparo de enzima. A reação ocorreu a 30°C/15 min e foi interrompida a 100°C/3 min.

Após resfriamento das amostras, a glicose formada durante a reação foi dosada pelo método de glicose oxidase-peroxidase (GOP), modificado de Zimmerman e Eatres (1974).

A relação matemática que fornece a atividade de Trealase é dada por:

$$A = \frac{[Abs(a) - Abs(p)] \times f(GOP)}{(15 \text{ min}) \times 0,1 \text{ mg de proteína}}$$

- Onde:
- A= Atividade Trealase, em mU/mg de proteína
- Abs(a)= absorvância da amostra;
- Abs(p)= absorvância do branco do extrato;
- f(GOP)= fator de conversão da curva padrão de GOP;

Uma unidade de atividade trealásica equivale a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 nmol de glicose por minuto a 30°C e pH 6,0. Tal atividade é expressa em mU/mg de proteína.

O fator de conversão, f(GOP), foi obtido a partir de uma curva padrão, em anexo, utilizando como padrão glicose 1 mM em tampão maleato. O valor usado foi de 204,25 nmoles de glicose.

5.4) Atividade de enzima Trealose 6-fosfato sintase

A atividade de TPS foi medida pela formação de UDP como descrito por Cabib e Leloir, 1958. O volume final da mistura reacional foi de 200 µL e continha 80 µg de extrato celular, 35 µL de tampão MOPS 2 M, pH = 6,8, 50 µL de MgCl₂ 40 mM, e 25 µL de solução contendo UDPG e G6P.

A reação ocorreu a 37°C/5 min e foi paralisada a 100°C/3 min. Em uma etapa seguinte foram adicionados 25 µL de fosfoenolpirvato (PEP) 0,02 M e 25 µL de Piruvato-cinase(PK), obtendo uma mistura reacional a qual foi incubada a 37°C por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 150µL de DNPH 0,1% em HCl 2 N e a mistura permaneceu a temperatura ambiente durante 5 minutos. A seguir, acrescentou-se 200 µL de NaOH 10 N e 1,1 mL de etanol absoluto para formação de composto colorimétrico.

A suspensão foi centrifugada e a absorvância do sobrenadante lida a 520 nm. Para controle, foi preparado o mesmo ensaio, omitindo a adição do substrato UDPG/G6P, para eliminar possíveis reações interferentes que poderiam produzir UDP e piruvato.

A atividade de TPS é calculada a partir da relação matemática abaixo:

$$A = \frac{[Abs(a) - Abs(p)] \times f(UDP)}{(5 \text{ min}) \times 0,08 \text{ mg de proteína}}$$

Onde:

- A= Atividade sintase, em mU/mg de proteína
- Abs(a)= absorvância da amostra;
- Abs(p)= absorvância do branco do extrato;
- f(UDP)= fator de conversão da curva padrão de UDP;

Uma unidade de atividade trealose-6-fosfato sintase equivale a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 nmol de UDP por minuto a 37°C e pH 6,8. Tal atividade é expressa em mU/mg de proteína

O valor do fator de conversão foi obtido a partir da curva padrão, em anexo, usando solução padrão de 1 mM UDP. O valor encontrado foi de 337 nmol de UDP.

6) Efeito de trealose 6-fosfato na atividade de trealose 6-fosfato sintase

Para avaliar o poder inibitório do substrato T6P na atividade de TPS, o extrato celular foi obtido a partir das células tratadas a 40°C/1 hora, que foram tratadas 10 µL de T6P 100 mM, incubando-se a 37°C durante 5 min. A seguir procedeu-se a determinação da atividade sintase usando-se diferentes concentrações de UDPG, mantendo-se a concentração de G6P fixa (10 mM) ou diferentes concentrações de G6P mantendo-se a concentração de UDPG fixa (5 mM), como descrito na Tabela 5 (Vandercammen *et al*, 1989). O experimento foi repetido na ausência de T6P.

Tabela 5. Concentrações de G6P e UDPG

[G6P] = 10 mM + [UDPG] (mM)	[UDPG] = 5 mM + [G6P] (mM)
0,2	1,0
0,5	2,0
1,0	5,0
2,0	10,0
5,0	50,0
25,0	-
50,0	-

• *Resultados e Discussão*

1) Curva de crescimento

Inicialmente verificou-se o efeito das mutações Tsl1 e Tps3 no acúmulo de trealose nas diferentes fases de crescimento da levedura em meio de cultivo contendo glicose. Com o objetivo de determinar as concentrações celulares das principais fases de crescimento (1ª LOG, diauxia e estacionária), foi acompanhado o crescimento das três cepas utilizadas, WT, $\Delta tps3$ e $\Delta tsl1$.

As células foram inoculadas em um meio contendo 2% de glicose, 2% de peptona e 1% de extrato de levedo (YPD 2%). Desta forma, esperava-se que as células obtivessem uma curva do tipo diauxica, com as cinco fases principais já mencionadas (Figura 5). A adição destes três suprimentos tem como objetivo mimetizar o meio natural de proliferação de células de levedura. O extrato de levedo é um exemplo de fonte rica em nitrogênio, e bastante usada por possuir um alto teor de proteínas e nutrientes essenciais para o crescimento das leveduras, inclusive em escala industrial, além de possuir baixo custo. Tem como vantagem um controle rigoroso do crescimento de leveduras, pois pode ser específico para certas linhagens de levedura, entre elas a *S. cerevisiae*. A peptona é um tipo de substrato que pode ser digerido pela tripsina secretada pelo pâncreas, e serve como fonte de nitrogênio. E por fim, a glicose é usada como fonte de carbono(Vianna & Vieira, 2008).

A seguir, são apresentadas as curvas de crescimento obtidas para cada cepa (Figuras 8, 10 e 12). Como observado nas Figuras 8, 10 e 12 todas as cepas apresentaram um crescimento diauxico. Usando os dados da fase exponencial, plotou-se um gráfico $\ln[\text{Concentração celular}]$ versus tempo, para a obtenção da velocidade específica de crescimento(μ), cujos valores foram usados para calcular os inóculos posteriores (Figuras 9, 11 e 13).

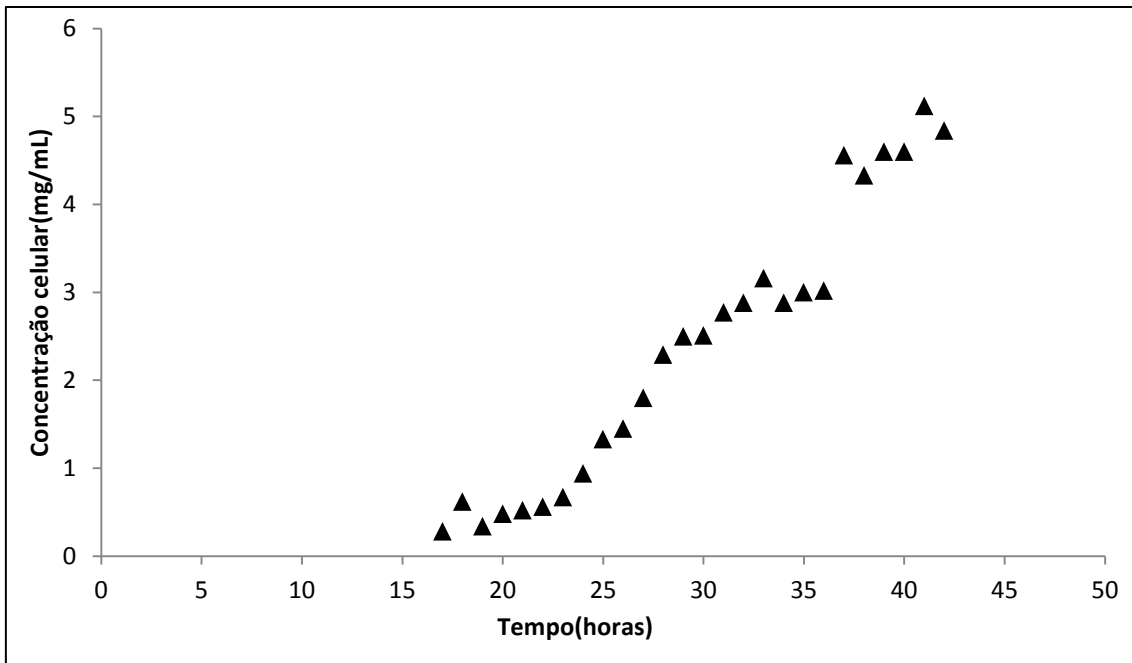


Figura 8. Curva de crescimento para a cepa WT em YPD 2%. As concentrações foram obtidas a partir da conversão das absorvâncias usando o fator de peso seco, 0,4 mg/mL, como descrito em Método.

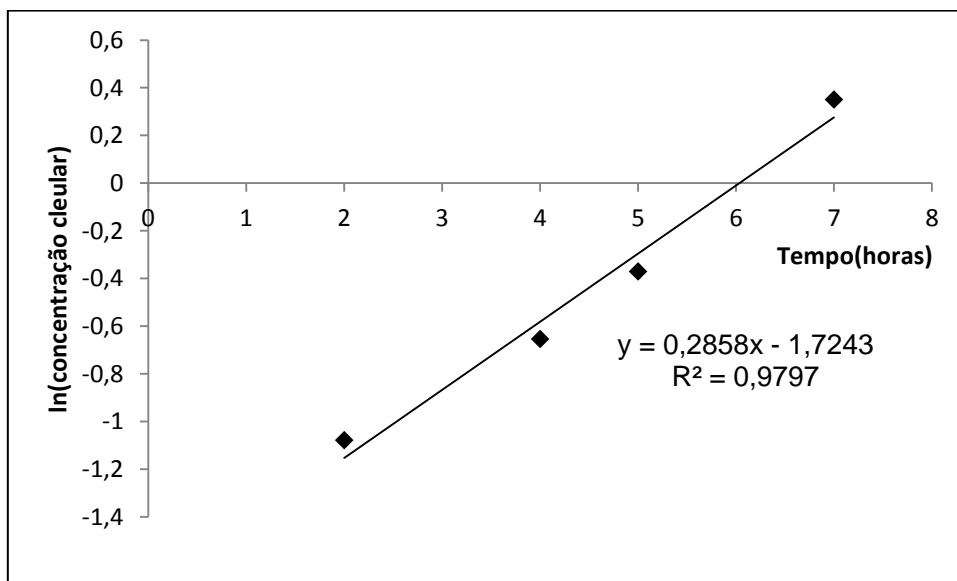


Figura 9. Gráfico para obtenção do fator da velocidade específica de crescimento para as células WT.

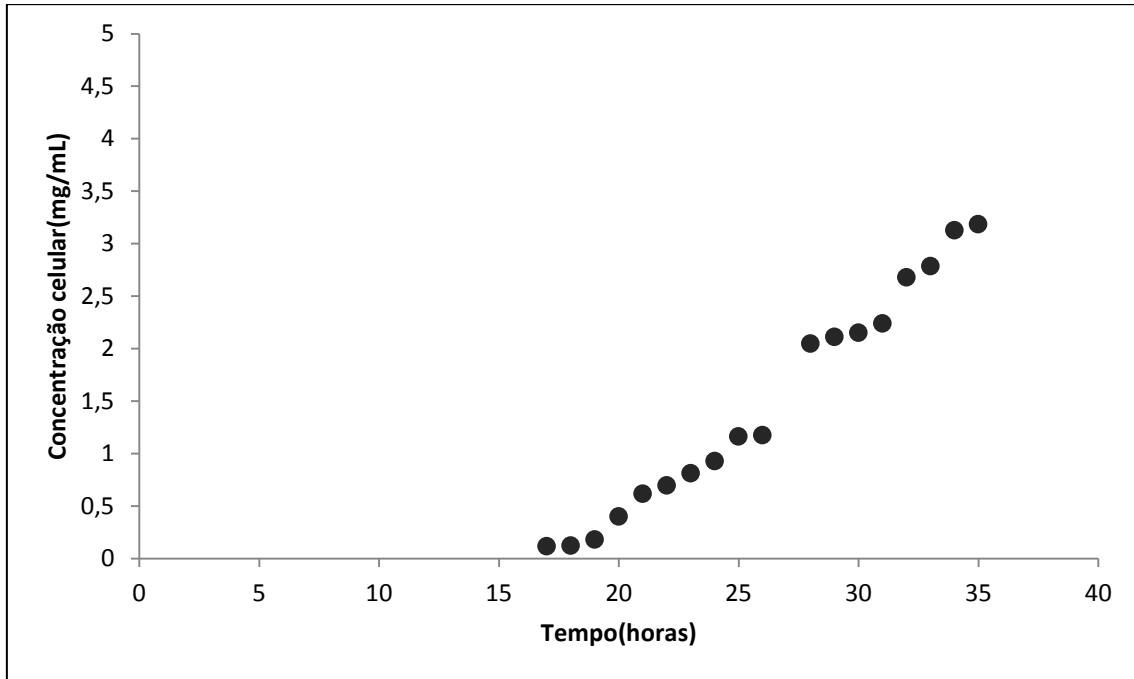


Figura 10. Curva de crescimento para a cepa $\Delta ts1$ em meio YPD2%. As concentrações foram obtidas a partir da conversão das absorvâncias usando o fator de peso seco, 0,4 mg/mL, como descrito em Método.

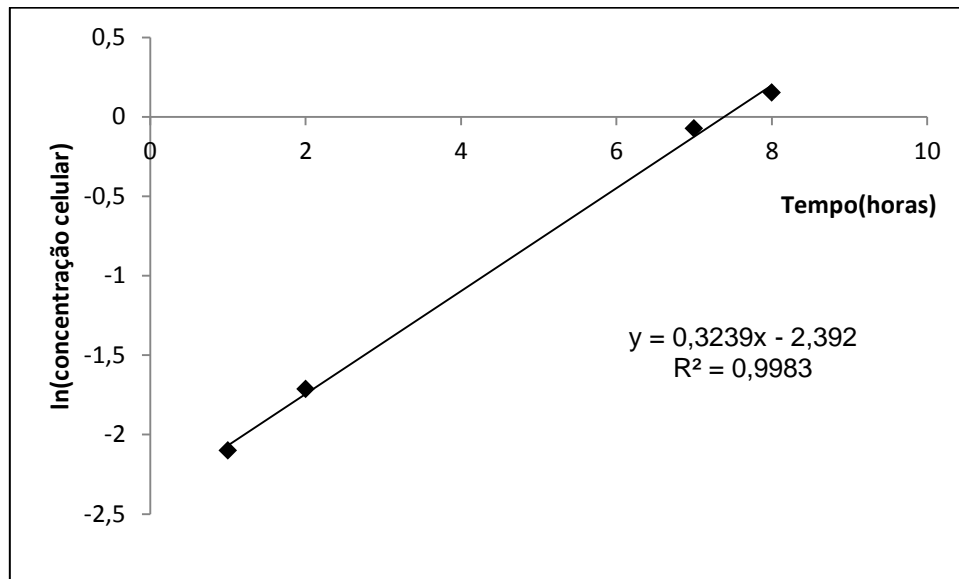


Figura 11. Gráfico para obtenção do fator da velocidade específica de crescimento para as células $\Delta ts1$.

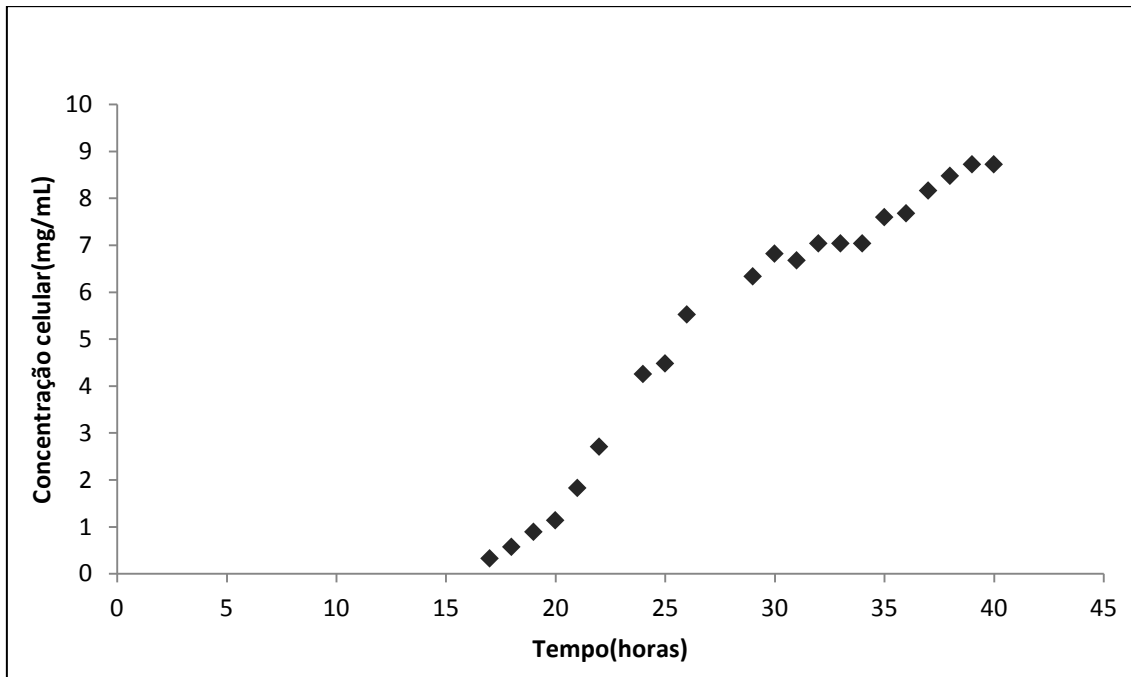


Figura 12. Curva de crescimento para a cepa $\Delta tps3$ em meio YPD 2%. As concentrações foram obtidas a partir da conversão das absorvâncias usando o fator de peso seco, 0,4 mg/mL, como descrito em Método.

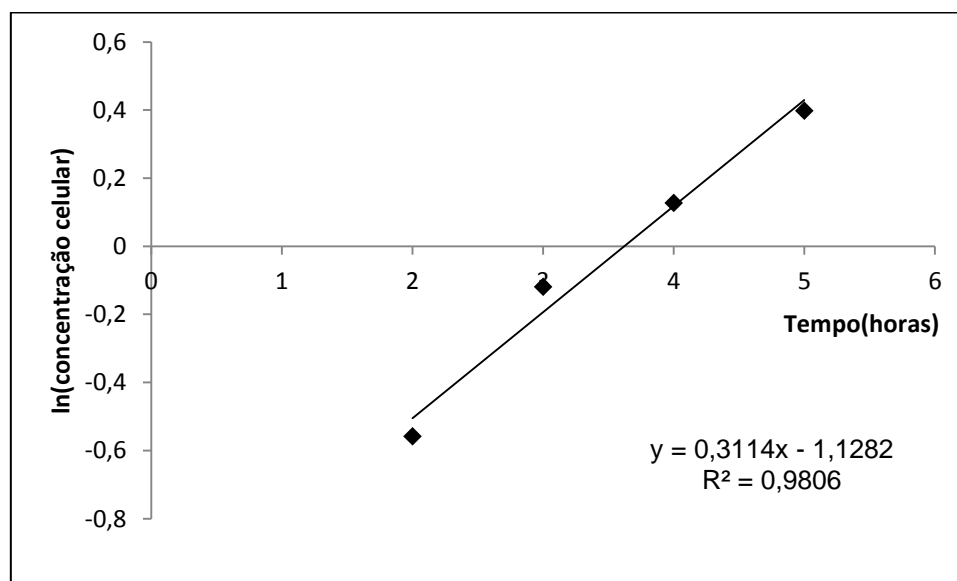


Figura 13. Gráfico para obtenção do fator de velocidades específica de crescimento para as células $\Delta tps3$.

De acordo com a Figura 9, o valor μ encontrado para as células WT foi de $0,29 \text{ (h)}^{-1}$. A Figura 10 mostra a curva de crescimento das células $\Delta tps1$. Como verificado, a ausência de tal subunidade não inibe o crescimento células em meio rico em glicose. Em comparação com a cepa WT, as células da

mutante $\Delta ts11$ apresentaram uma fase LAG maior e o rendimento celular foi menor. A concentração celular de $\Delta ts11$ na fase estacionária foi de 3 mg/mL contra 5 mg/mL da WT. Porém, as fases exponencial, diauxia e estacionária ficaram bem definidas. A velocidade específica de crescimento da mutante $\Delta ts11$ foi semelhante ao da WT, de $0,32 \text{ h}^{-1}$ (Figura 11).

As células $\Delta tps3$ apresentaram um crescimento diferenciado em relação WT e $\Delta ts11$ (Figura 12), além de apresentarem uma fase LAG longa. Sua fase exponencial em glicose foi bem demorada, e atingiu concentrações bem elevadas. O μ obtido para a cepa $\Delta tps3$, $0,31 \text{ h}^{-1}$, foi similar aos da WT e $\Delta ts11$ (Figura 13).

As curvas das células modificadas confirmaram o que estudos prévios já tinham reportado. Células de *S.cerevisiae* conseguem crescer em meio rico em glicose, mesmo sendo deficientes nas subunidades Tps3 e/ou Tsl1. O mesmo estudo mostrou que na ausência da subunidade Tps1, o crescimento é inibido (Bell *et al*, 1998). Desta forma pode-se concluir que as subunidades Tps3 e Tsl1 não são obrigatórias para o crescimento celular, mas ajudam a regular um crescimento ótimo, definindo melhor as fases do crescimento diauxico, e ajudando a uma melhor adaptação aos nutrientes presentes no meio em questão.

2) Acúmulo de Trealose

Uma vez definidas as diferentes fases de crescimento para as três cepas, a seguir estudou-se o acúmulo de trealose nas fases 1^a LOG, diauxia e estacionária.

Como descrito na metodologia, a extração de trealose foi a partir do uso ácido tricloroacético (TCA). Este ácido é muito usado para a precipitação de macromoléculas tais como proteínas, DNA, RNA, e polissacarídeos. Desta forma a adição de TCA rompe as células, deixando solúveis as moléculas menores, dentre elas a trealose, e ao mesmo tempo precipitando as macromoléculas.

A trealose, como já mencionado, é um glicídio, e, portanto, não apresenta uma reação específica. Para sua dosagem, o que se faz é caracterizar os grupos químicos específicos presente em sua estrutura. O método escolhido foi o de reação com Antrona (Neto *et al*, 2008), que usa a desidratação do glicideo em presença de um ácido mineral forte.

A antrona reage especialmente com carboidratos em solução concentrada de ácido sulfúrico produzindo uma característica coloração verde azulada. Tal coloração é atribuída a reação dos produtos de degradação do açúcar, hidroximetilfurfural ou furfural com antrona (Figura 14) (Oliveira *et al*, 2004). Tais compostos são gerados devido a presença do ácido sulfúrico concentrado que age tanto como um hidrolisante, convertendo os açúcares a monossacarídeos (no caso da trealose, ela libera moléculas de glicose) e como agente desidratante levando a formação de hidroximetilfurfural e furfural (Neto *et al*, 2008). A coloração verde azulada indica que a degradação resultou numa hexose e em hidroximetilfurfural.

A Figura 15 mostra os níveis intracelulares de trealose encontrados nas cepas estudadas em diferentes fases de crescimento, 1^aLOG, diauxia e estacionária.

Para as células WT, acúmulo de trealose seguiu de forma esperada. Os níveis de trealose em células de 1^aLOG são baixos, pois as células não se encontram em nenhum tipo de estresse de forma que não há necessidade da síntese de trealose. Na fase diauxia, como é um período de adaptação celular, não é considerado um estresse e portanto a concentração de trealose permanece baixa. Na fase estacionária observa-se quase uma duplicação na concentração do açúcar. Tal resultado está relacionado a adaptação das células a um tipo de estresse, estresse ambiental causado pela escassez de nutrientes. Nesta fase, as células se vem sem nenhuma fonte de carbono para continuarem a crescer, de forma que a síntese de trealose é ativada e seus níveis passam a ser altos.

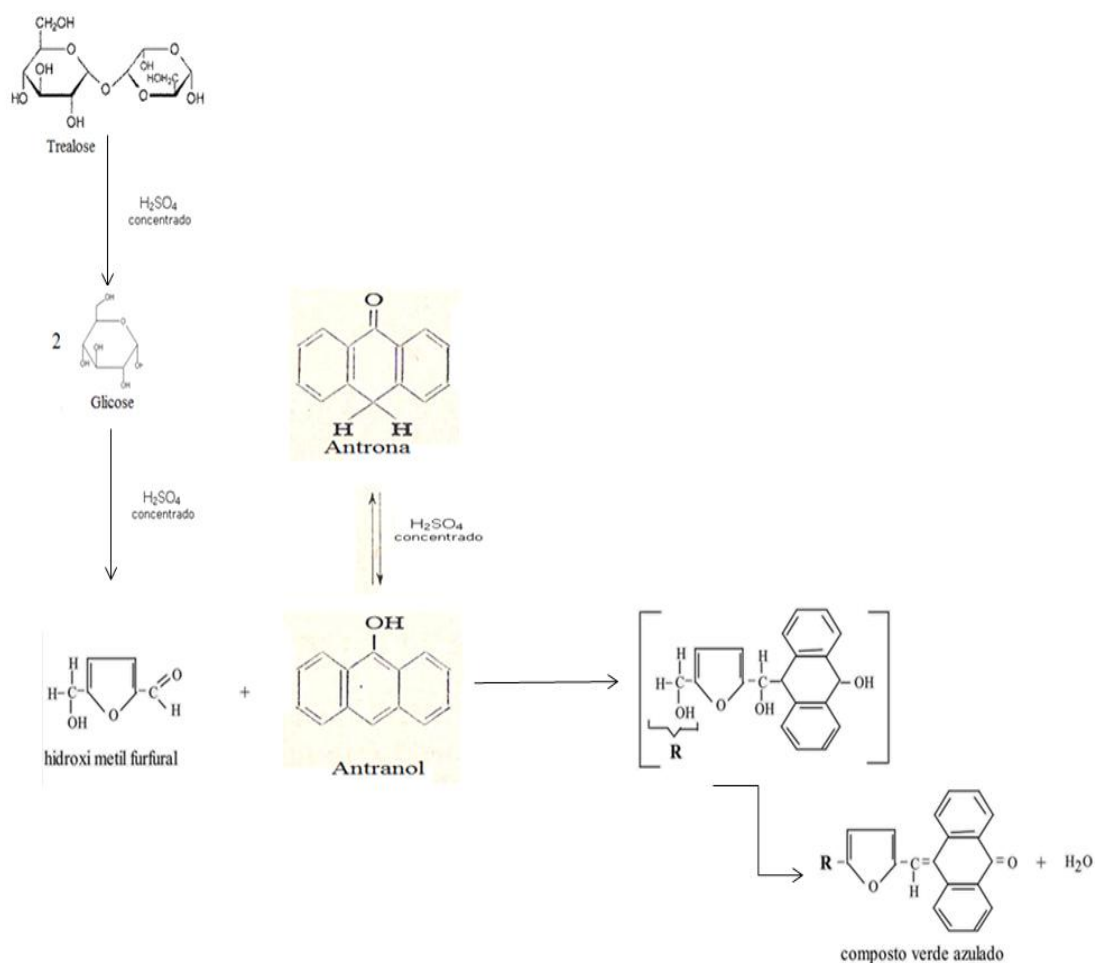


Figura 14. Reações envolvidas na dosagem de trealose pelo método de antrona (Neto *et al*, 2008).

O resultado observado para a cepa $\Delta tps3$ foi bastante interessante. Na 1ª LOG e diauxia, manteve uma concentração baixa, e similar ao encontrado nas células WT. No entanto, na fase estacionária, a concentração de trealose atingiu um valor de 40 μg de trealose/mg de célula, aproximadamente duas vezes maior que o encontrado nas células WT. Estudos já haviam mostrado que, células de *S.cerevisiae* crescendo em meio contendo galactose apresentavam um acúmulo de trealose elevado na fase estacionária para células do tipo $\Delta tps3$ (Bell *et al*, 1998). O valor alto encontrado pode ser o resultado não somente de trealose e pode estar relacionado ao acúmulo do intermediário T6P, uma vez que o método de antrona não é específico para trealose. Caso o valor encontrado for de fato relacionado a concentração de T6P, este resultado poderia indicar que a subunidade Tps3 é reguladora da segunda etapa de síntese de trealose, de forma que sua ausência diminui a

atividade da subunidade Tps2, responsável pela liberação das moléculas de trealose no meio, levando a um acúmulo de T6P.

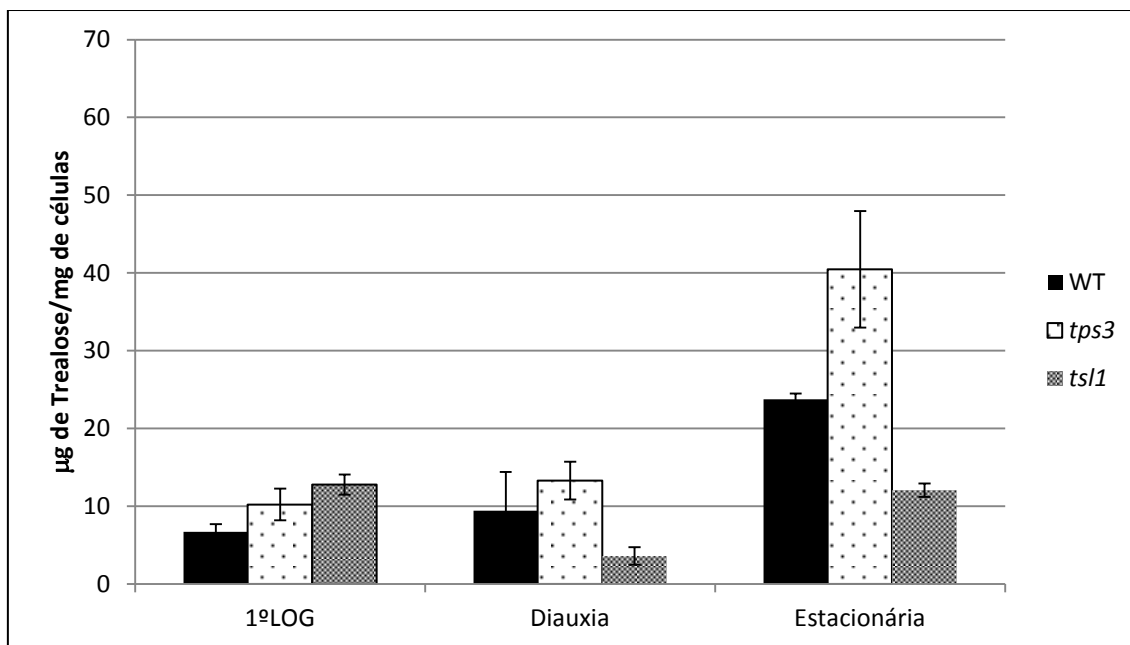


Figura 15. Níveis intracelulares de trealose nas diferentes fases de crescimento em glicose nas cepas WT, $\Delta tps3$ e $\Delta ts1$. Os resultados são apresentados como uma média de três experimentos independentes \pm desvio padrão.

Para as células $\Delta ts1$ o resultado encontrado estava dentro do esperado. Nas três fases de crescimento apresentadas, os níveis de trealose permaneceram baixas, indicando que as células com ausência de tal subunidade não conseguem sintetizar em largas quantidades trealose, mesmo em situação de estresse ambiental, fase estacionária. Este resultado pode indicar que a subunidade Tsl1 é essencial para um acúmulo amplo de trealose na condição de estresse, e que sua função está relacionada à regulação da primeira etapa da síntese de trealose, ou seja, da subunidade Tps1.

Para o estudo do efeito do estresse térmico, efetuado a 40°C/1h/160rpm, usou-se apenas células na 1ºLOG, fase na qual as células, crescem em condições ótimas, a 28°C, sem serem submetidas a nenhum estresse. Estudar o acúmulo de trealose a 40°C nas fases diauxia e estacionária não traria resultados interessantes. Na fase diauxia, as células estão em adaptação com grandes alterações metabólicas. Na fase estacionária, as células já estariam num estado de estresse, de forma que o metabolismo de trealose já está

ativado, e não sentiria nenhuma diferença ocasionada pelo aumento da temperatura.

Na Figura 16, observa-se a concentração de trealose após estresse térmico. A concentração de trealose nas células WT aumentou seis vezes em relação a mesma fase a 28°C, indicando que um tratamento de 40°C por uma hora foi suficiente para se ativar a síntese de trealose. Para as células das mutantes, ambas aumentaram também a concentração de trealose, porém em apenas 3 vezes, aproximadamente. Tal resultado indica que, mesmo na ausência de Tps3 e Tsl1, as células de *S.cerevisiae* conseguem ativar a síntese de trealose, e se protegerem do estresse causado pelo aumento da temperatura. O fato do nível de trealose após o tratamento térmico nas células WT ser duas vezes maior do que nas células mutantes, indica que ambas Tps3 e Tsl1 são necessárias para que haja uma otimização para resposta ao estresse provocado, porém não são essenciais. De acordo com os resultados, a ausência de Tps3 ou Tsl1 causa efeitos semelhantes na síntese de trealose em resposta ao aumento da temperatura (já que os valores de trealose encontrados foram bem próximos) enfatizando que as subunidades Tps3 e Tsl1 possuem papéis reguladores e semelhantes.

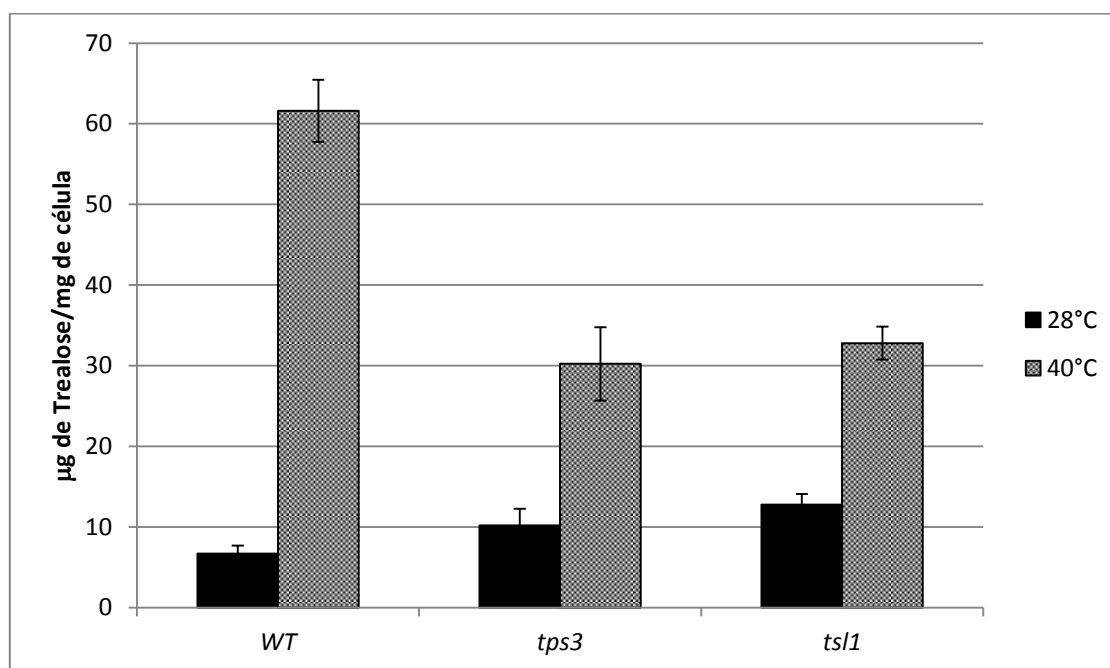


Figura 16. Acúmulo de trealose, em resposta ao choque térmico, 40°C/1 h/160 rpm. As células foram coletadas no meio da 1ª LOG e a 28°C e a seguir tratadas a 40°C. Os resultados são apresentados como uma média de três experimentos independentes ± desvio padrão

3) Atividade trealásica e sintásica

A seguir dosou-se as atividades trealase e sintase para melhor compreender os níveis de trealose encontrados. Nesta etapa, estudaram-se apenas as células de 1^aLOG submetidas ao estresse térmico.

Para a dosagem de atividade trealásica, primeiramente se estudou a cinética de formação de glicose, produto da hidrólise da trealose. A dosagem de glicose consiste de duas etapas principais. Numa primeira, a glicose livre reage com a glicose oxidase, enzima específica para glicose, que ao se ligar ao açúcar promove uma quebra do mesmo até metabólitos que logo em seguida são hidrolisados havendo a formação de ácido glucônico e moléculas de peróxido de hidrogênio. A quantidade de H₂O₂ gerada é proporcional a quantidade de moléculas de glicose hidrolisadas. H₂O₂ é dosado pela enzima peroxidase, na presença de orto-dianizidina. A peroxidase catalisa reações de oxidação de grupos orgânicos, usando o peróxido de hidrogênio como acceptor de elétrons (agente oxidante). Neste caso, a orto-dianizidina funcionou como o composto orgânico. Como resultado da reação, tem-se um composto colorido, cuja intensidade de cor é proporcional a quantidade de peróxido contida no meio. Consequentemente, quanto mais intensa a cor, mais peróxido e portanto, mais moléculas de glicose formadas pela ação da trealase sobre a trealose (Gochman & Schmitz, 1972)..

A seguir, são apresentados os resultados de dosagem e atividade trealase (Figura 17). O que pode ser primeiramente observado é o fato de que, com exceção das células *Δtps3*, a atividade da enzima não variou muito com o aumento da temperatura. Estudos já haviam mostrado que células de levedura na fase exponencial quando aquecidas não apresentavam aumento considerável na atividade trealásica (Eleutherio *et al*, 1992).

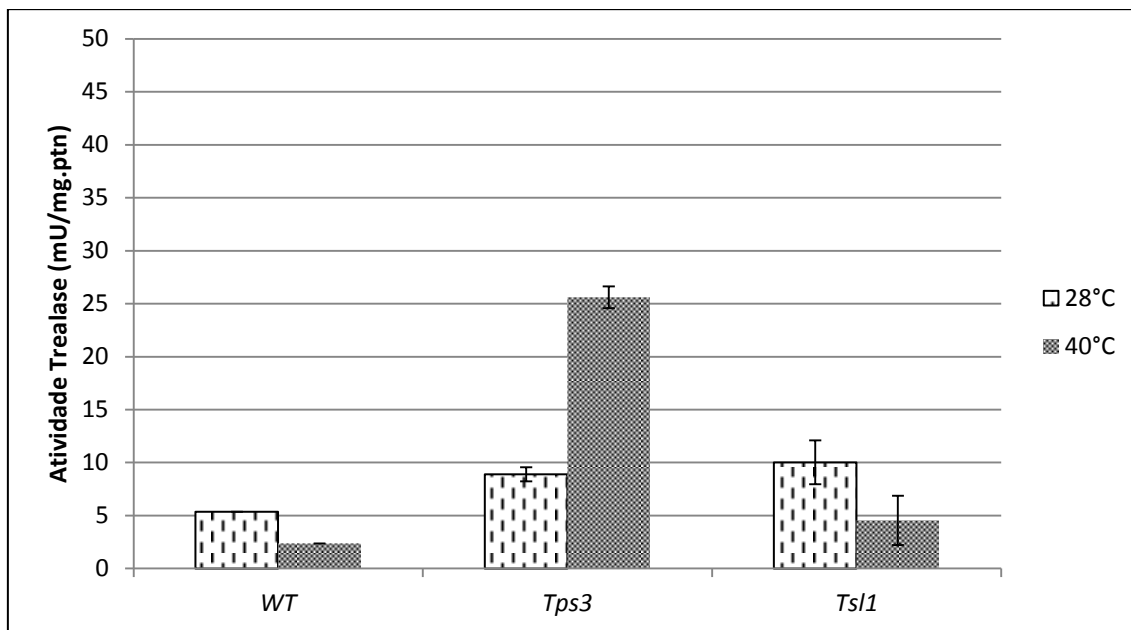


Figura 17. Atividade de trealase em células WT, $\Delta tps3$ e $\Delta tsl1$ coletadas em 1^aLOG a 28°C e a seguir tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. Os resultados são apresentados como uma média de três experimentos independentes \pm desvio padrão.

Na fase exponencial, em condições normais a 28°C, o meio se encontra rico em moléculas de AMPcíclico, que já se mostrou ser ativador da enzima trealase, indicando que esta é ativada na sua forma fosforilada. A presença de AMPcíclico também ativa a via glicolítica, que usa as moléculas livres de glicose para gerar moléculas de ATP, necessárias para o crescimento celular. A integração entre a glicólise e a possível ativação da trealase para degradar moléculas de trealose fazem com que mesmo que a enzima esteja ativa, sua atividade seja bem baixa, não surtindo algum efeito para o crescimento celular no momento. Em tais condições, sintetizar trealose a partir da glicose do meio para posteriormente ser hidrolisada não é uma vantagem para as células, pois além de consumir 3 moléculas de ATP para geração de trealose, sua hidrólise não gera energia, de forma a justificar a baixa atividade de trealase, mesmo em condições favoráveis a sua atividade (Hottiger *et al*, 1987).

A Figura 17 mostra que as subunidades Tps3 e Tsl1, a 28°C, não influenciam na atividade de trealase, como observado nas células WT. Porém, a 40°C, as células $\Delta tps3$ se comportaram de forma diferente as células WT e $\Delta tsl1$, que apresentaram um comportamento esperado, de diminuir a atividade de trealase pois durante um estresse, o metabolismo de síntese de trealose é ativado, enquanto que a degradação de trealose é inibida. Para o melhor entendimento de tal resultado inesperado, a atividade da trealose sintase nas mesmas condições foi estudada, como será discutido a seguir.

Assim como na atividade trealásica, dosou-se a atividade trealose 6-fosfato sintase de células de 1^aLOG submetidos ao tratamento térmico.

O ensaio de trealose sintase é dividido em duas etapas. A primeira consiste na cinética de formação dos produtos UDP e T6P a partir dos substratos UDPG e G6P na presença de Mg^{2+} . Os íons Mg^{2+} são necessários para ativação da enzima. Estudos já demonstraram que TPS tem atividade máxima em pH 6,6 e na presença de Mg^{2+} 25mM.

A presença do íon $Mg(II)$ é essencial para o funcionamento máximo da enzima. Estudos já mostraram que o íon Mg^{2+} se liga ao substrato G6P de forma a formar um complexo G6P-Mg, o qual é um substrato com maior afinidade com a enzima TPS do que o G6P livre. Porém, a concentração do íon magnésio deve respeitar um limite, em relação a concentração no volume final de ensaio, que deve se manter abaixo de 12 mM. Em tais concentrações, o íon se comporta como um ativador da sintase, porém, quando a concentração começa a se elevar, o íon passa a inibir a enzima. Em concentrações elevadas, o excedente de Mg^{2+} passa a interagir diretamente com a enzima, e não forma o complexo com o G6P, de forma a se tornar um inibidor competitivo da trealose sintase (Panek, 1991; Panek *et al*, 1987). Sabendo disto, no ensaio realizado, a concentração final do íon foi mantida em 10 mM .

Na etapa seguinte é determinada a concentração de UDP formado, pela reação com fosfo-enol-piruvato(PEP), pela ação da enzima piruvato-cinase. Piruvato-cinase é uma enzima específica, que atua na última etapa da via glicolítica e converte fosfoenolpiruvato a piruvato. UDP é uma molécula análoga a ADP e pode ser usada para o mesmo fim. Na reação, ocorre a abstração do grupo fosfato do substrato PEP, liberando piruvato e UTP, uma molécula análoga a ATP, que pode ser usada como fonte de energia. A quantidade de moléculas de piruvato liberadas é proporcional a quantidade de moléculas de UDP consumidas.

O substrato 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) é adicionado para dosar o quanto de piruvato formado. DNPH é um composto orgânico usado para dosar grupos carbonilados, tais como aldeídos cetonas. Na presença dos mesmos, ao se adicionar o DNPH à solução passa a ter uma coloração amarelada indicando a presença do grupo. No caso do ensaio, DNPH dosa o grupo cetona e éster do piruvato.

A Figura 18 mostra as atividades trealose sintase de células de 1^aLOG antes e após o choque térmico.

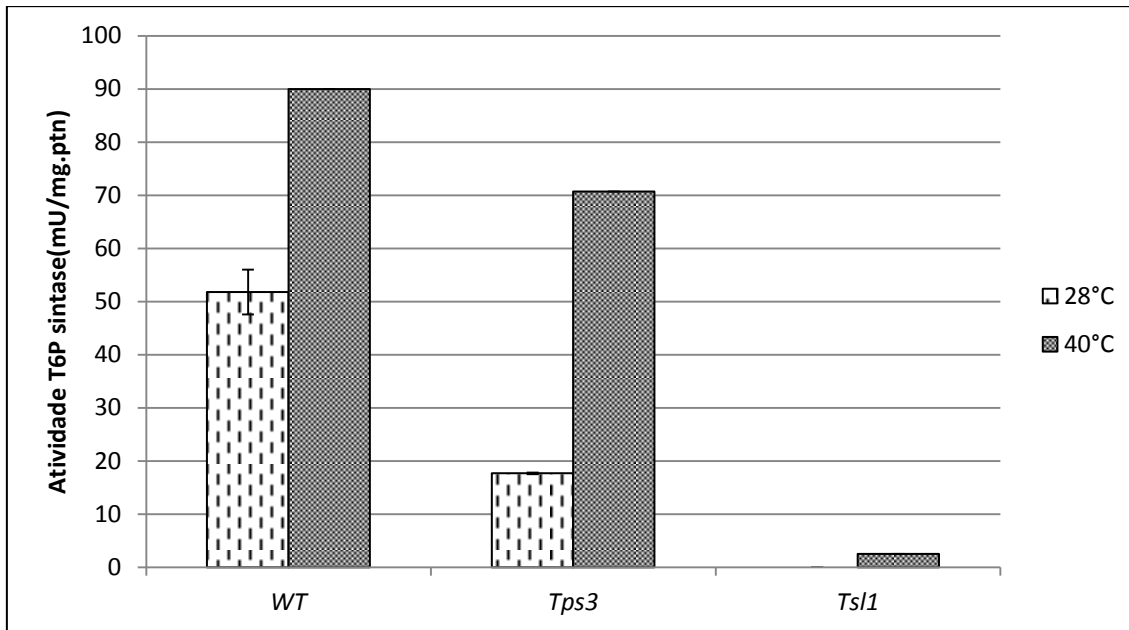


Figura 18. Atividade de trealose -6P sintase, a 28-40°C, nas cepas WT, $\Delta tps3$ e $\Delta ts1$, coletadas em 1^aLOG a 28°C e a seguir tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. Os resultados são apresentados como uma média de três experimentos independentes \pm desvio padrão.

Células de WT apresentaram um aumento significativo na atividade sintase após tratamento a 40°C. Esse resultado era esperado, pois a 28°C em 1^aLOG não há necessidade de sintetizar trealose, pois não há estresse. O interessante de se observar é que na mutante $\Delta tps3$ o nível de atividade sintase em resposta ao tratamento térmico foi inferior ao da WT. Além disto, células $\Delta ts1$ apresentaram níveis de atividade sintase muito baixos, reforçando a ideia que, a subunidade Tsl1 tem um papel regulador diretamente ligado a subunidade Tps1, como sugerido anteriormente, e mais significativo que a subunidade Tps3.

Juntando os resultados obtidos para célula de 1^aLOG tratadas a 40°C, de acúmulo de trealose e atividades de trealase e sintase, algumas considerações podem ser abordadas. Primeiramente, o acúmulo de trealose ocorreu em resposta ao estresse térmico mesmo quando as subunidades Tps3 e Tsl1 estavam ausentes, porém em níveis bem inferiores que aos de WT. Estes resultados também vieram a confirmar que a presença de todas as subunidades é necessária para uma ativação máxima e ótima do metabolismo de trealose para células em condições de choque térmico.

4) Estudo da inibição de T6P no complexo enzimático trealose síntase

Para estudar o efeito de T6P no complexo enzimático, foi usada apenas a cepa controle, WT, coletada em 1ªLOG e tratada a 40°C, onde a atividade sintase é máxima. Para poder estudar e determinar o mecanismo de inibição, primeiramente foram definidos os parâmetros cinéticos, k_m e V_m , dos substratos de G6P e UDPG na ausência de T6P. Uma vez obtidos os parâmetros em tal condição, se fez o mesmo estudo, obtendo-se os parâmetros, porém desta vez na presença de T6P. A seguir serão apresentados os resultados obtidos em cada um dos casos.

4.i) Obtenção dos parâmetros cinéticos para UDPG e G6P a 40°C

Para a obtenção de parâmetros cinéticos, k_m e V_m , deve se obter as velocidades iniciais (atividade) usando-se diferentes concentrações de substrato. Se a curva obtida for hiperboloide, a cinética seguida pelo substrato estudado é considerada Micheliana. Em seguida, se traça o gráfico de Lineweaver-Burk, para a obtenção de k_m e V_m .

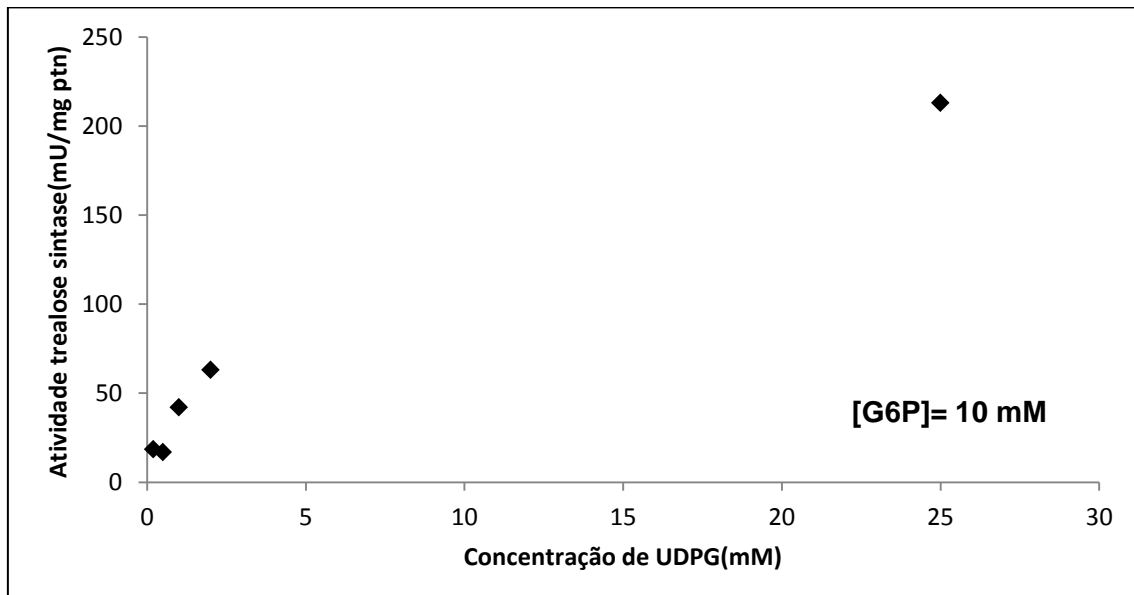


Figura 19. . Curva de velocidade em função de diferentes concentrações de UDPG à concentração fixa de 10 mM G6P. Os extratos foram obtidos de células WT coletadas em 1ªLOG e tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. A atividade T6P sintase foi determinada como descrito em Método. Os resultados são uma média de três experimentos independentes

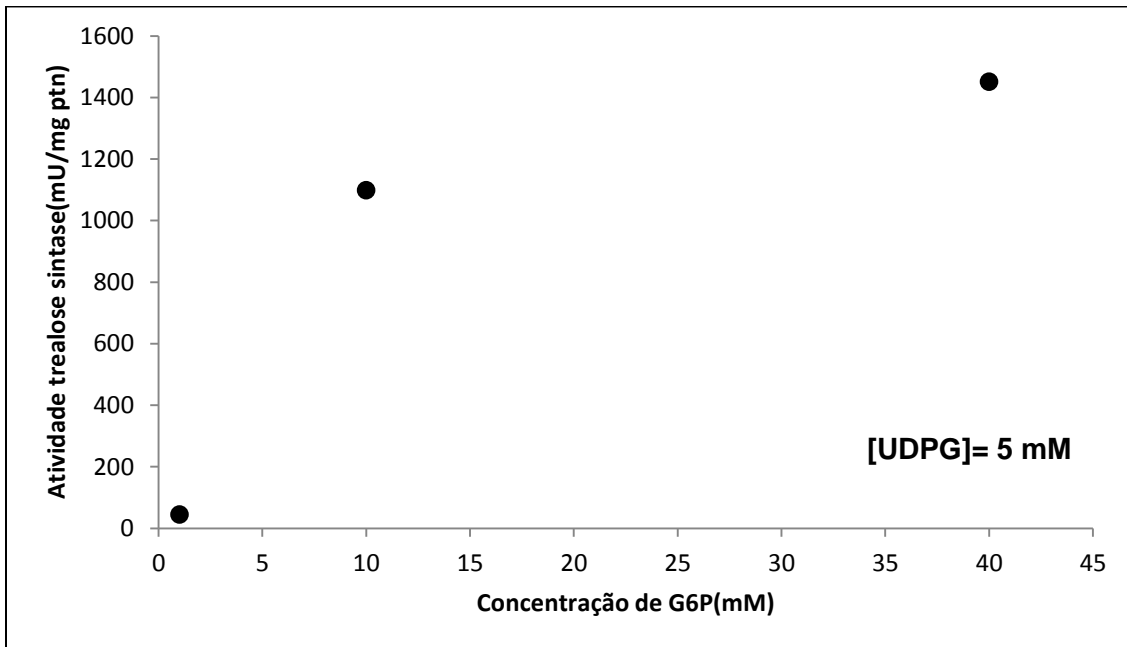


Figura 20. Curva de velocidade em função de diferentes concentrações de G6P à concentração fixa de 5mM UDPG. Os extratos foram obtidos de células WT coletadas em 1^oLOG e tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. A atividade T6P sintase foi determinada como descrito em Métodos

As Figuras 19 e 20 apresentam como a velocidade varia em função de cada substrato (UDPG ou G6P). Ambas apresentaram um comportamento hiperbólico, portanto a cinética do complexo trealose sintase segue o modelo Micheliano.

A seguir, são apresentadas as curvas de Lineweaver-Burk (Figuras 21 e 22), assim como os parâmetros obtidos após a obtenção da equação da reta para cada caso.

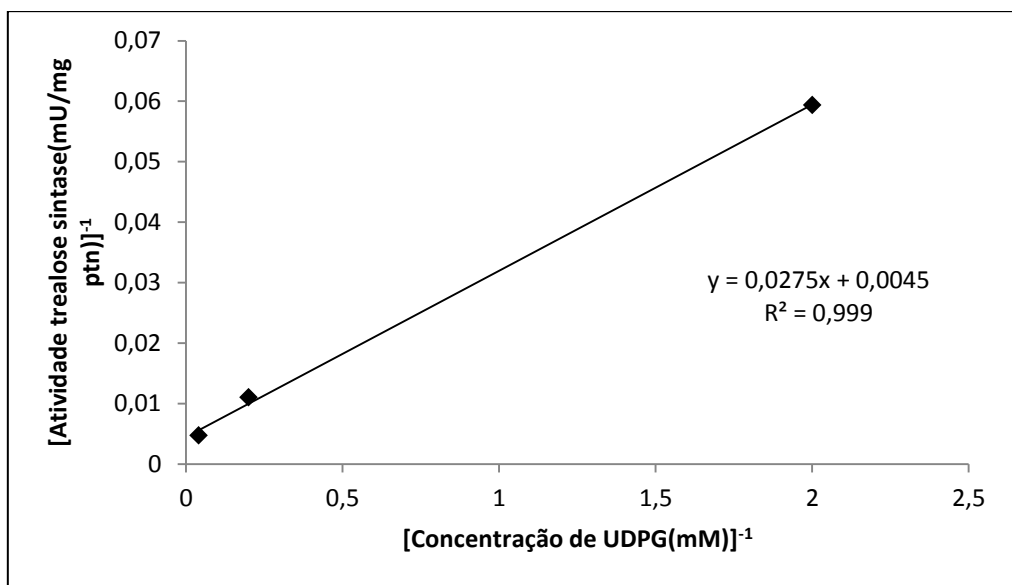


Figura 21. Gráfico de Lineweaver-Burk para o substrato UDPG

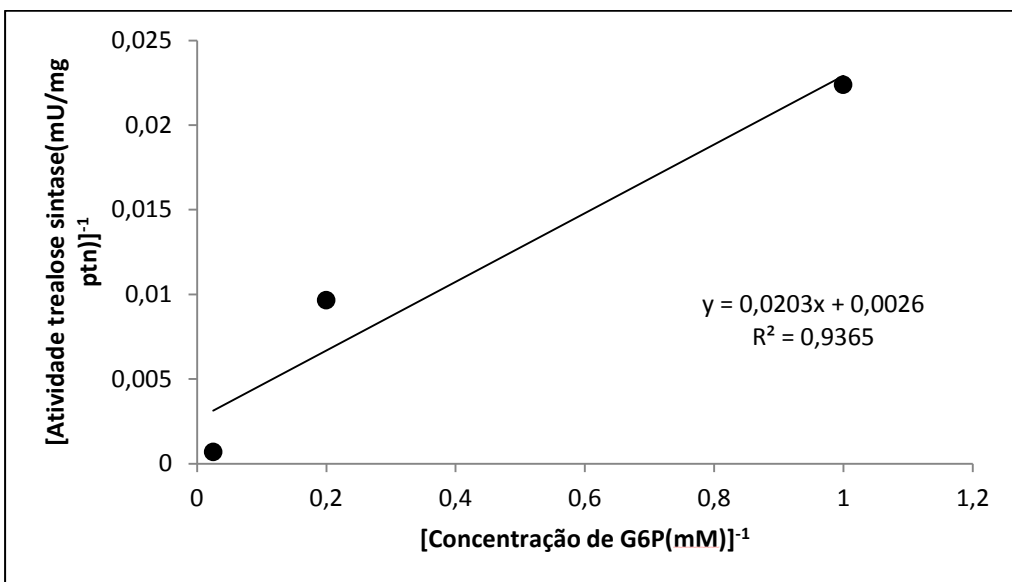


Figura 22. Gráfico de Lineweaver-Burk para o substrato G6P

Tabela 6. Parâmetros cinéticos da trealose 6-fosfato sintase obtidos para UDPG e G6P

Substrato	k_m (mM)	V_m (mU/mg ptn)
UDPG	6,1	222,2
G6P	7,8	384,6

Tendo em mente que k_m reflete a afinidade da enzima por um determinado substrato, e que quanto menor for seu valor, maior será sua

afinidade, pelos resultados apresentados na tabela 6, o complexo trealose sintase tem afinidade semelhante por ambos os substratos.

4.ii) Obtenção dos parâmetros cinéticos de UDPG e G6P da trealose sintase a 40°C na presença de T6P

Para determinar o tipo de inibição a atividade sintásica foi determinada na presença de 0,125 mM T6P. Estudos prévios feitos em nosso laboratório já indicavam que o substrato T6P tinha poder inibidor sobre o complexo enzimático trealose sintase, mesmo em concentrações baixas. Frente a tais resultados, decidiu-se estudar o mecanismo de inibição.

Novamente, foram obtidas duas curvas de velocidade inicial versus concentração de substrato, uma para cada substrato, agora na presença de T6P. Como pode ser observada, a curva obtida na presença de T6P se apresentou mais baixa em ambos os casos, confirmando a inibição causada pelo T6P (Figuras 23 e 24). Além disso, a presença de T6P não impediu que a curva apresentasse perfil hiperbólico, de forma a se ter uma cinética de modelo Micheliano.

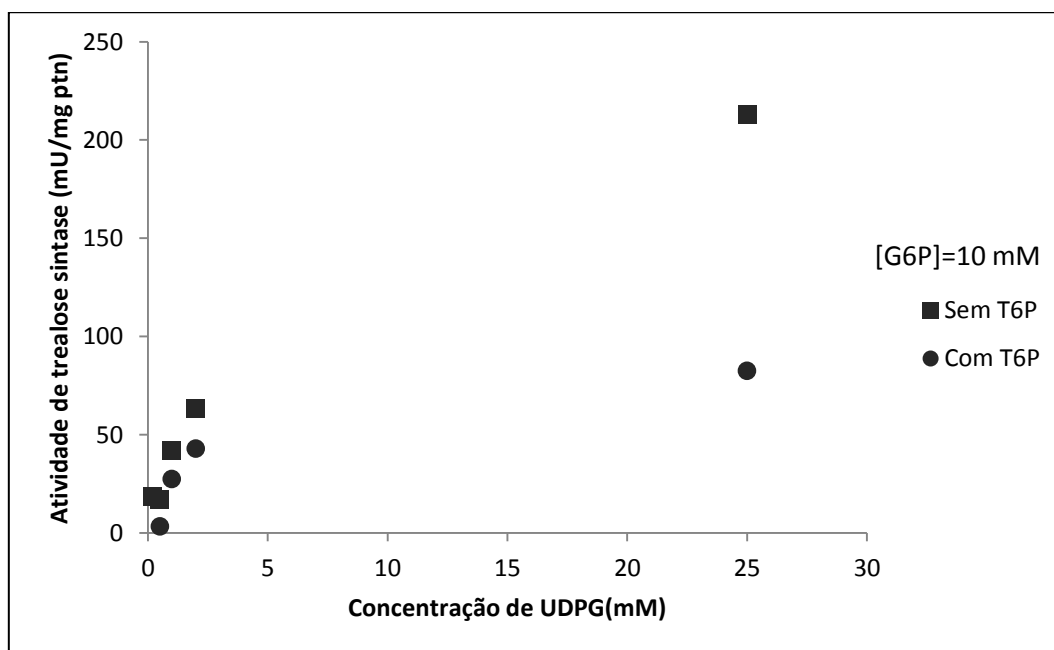


Figura 23. Curva de velocidade em função de diferentes concentrações de UDPG a concentração fixa de 10 mM G6P. Os extratos foram obtidos de células WT coletadas em 1^oLOG e tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. A atividade T6P sintase foi determinada como descrito em Método, com a presença de inibidor. Os resultados são uma média de três experimentos independentes

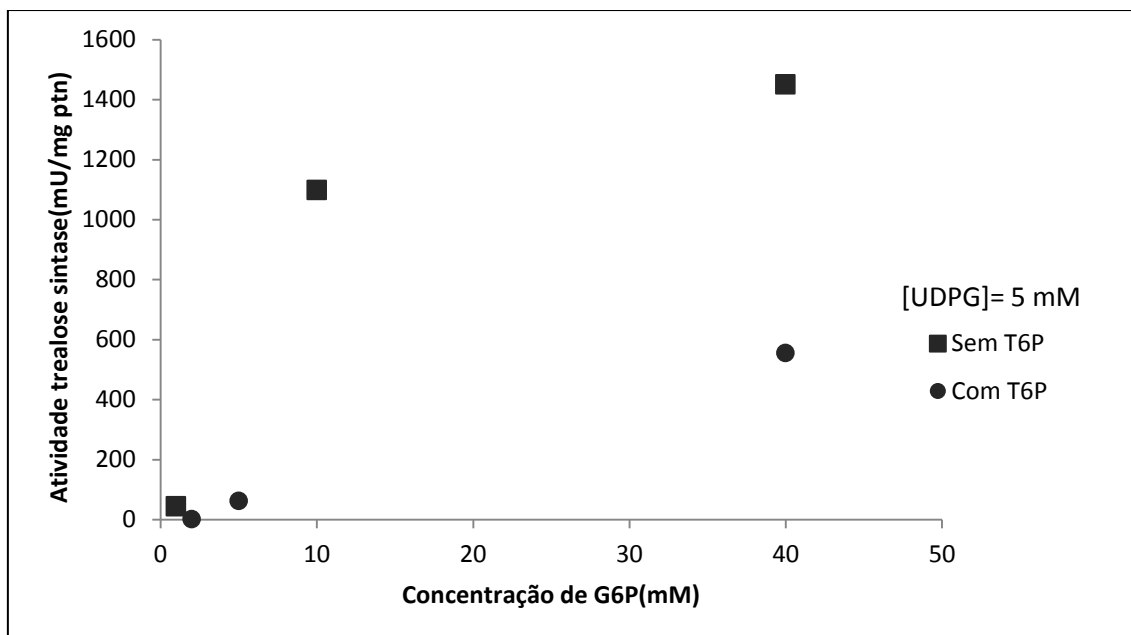


Figura 24. . Curva de velocidade em função de diferentes concentrações de G6P a concentração fixa de 5 mM UDPG. Os extratos foram obtidos de células WT coletadas em 1^aLOG e tratadas a 40°C/1 h/160 rpm. A atividade T6P sintase foi determinada como descrito em Método, com a presença de inibidores. Os resultados são uma média de três experimentos independentes

A seguir são apresentados os gráficos Lineweaver-Burk (Figuras 25 e 26) e os parâmetros cinéticos (tabelas 7 e 8) para trealose sintase na presença de T6P.

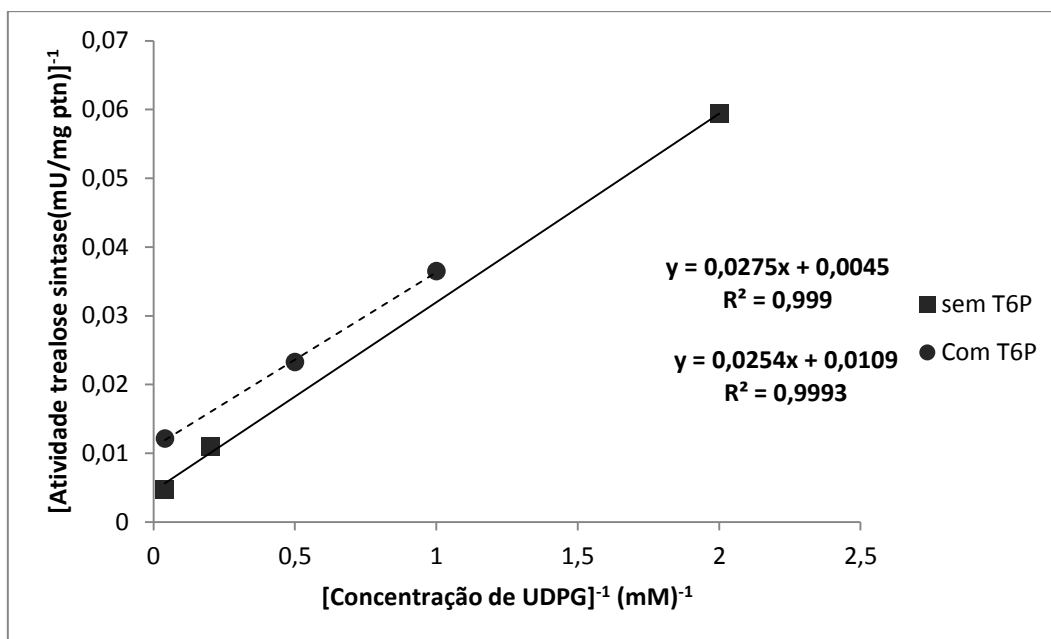


Figura 25. Gráfico comparativo de Lineweaver-Burk para substrato UDPG na presença e ausência de T6P

Tabela 7. Comparação entre os parâmetros cinéticos de T6P sintase para UDPG na ausência e presença de T6P

Condição	k_m (mM)	V_m (mU/mg ptn)
Sem T6P	6,1	222,2
Com T6P	2,3	91,7

Observando os valores obtidos para os parâmetros, tanto o k_m quanto o V_m tiveram seus valores reduzidos de um fator de cerca de 2,5 vezes, na presença do inibidor T6P. O valor novo de k_m indica que mesmo havendo uma inibição da enzima pela presença de T6P, o seu acúmulo faz com que a trealose sintase aumente sua afinidade pelo substrato UDPG em relação a condição quando não há o inibidor. O V_m reduzido indica que condições saturantes de substrato não foram capazes de reverter a inibição.

O mesmo foi observado para os ensaios feitos para a variação de G6P, Figura 26 e tabela 8. Os parâmetros cinéticos tiveram seus valores reduzidos em um valor de cerca de 2,5 vezes tanto para k_m quanto para V_m .

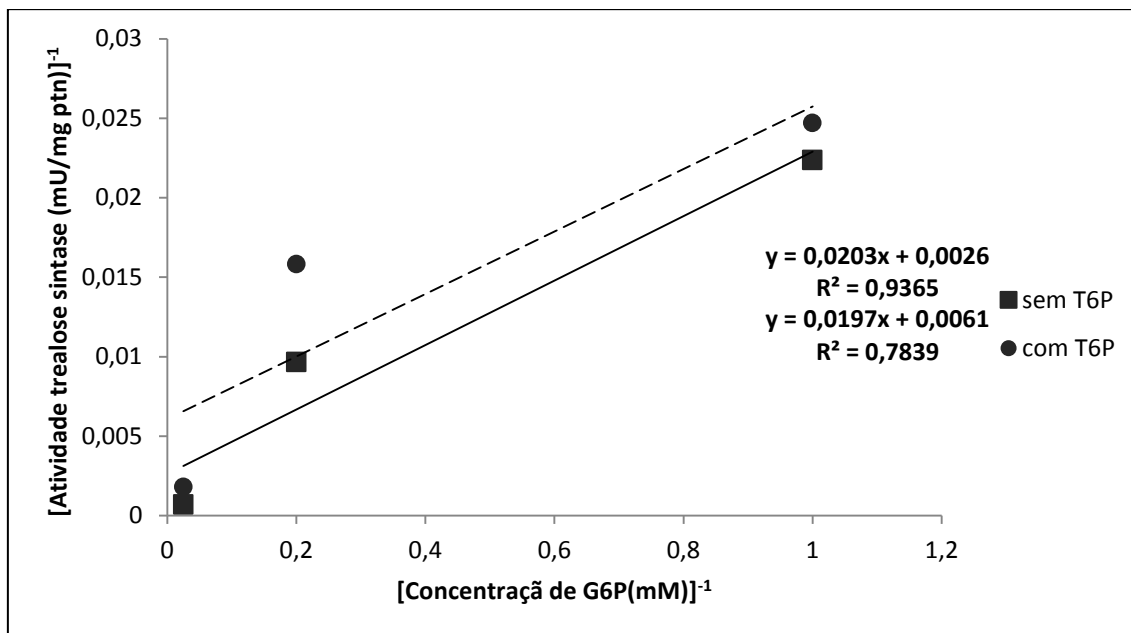


Figura 26. Gráfico comparativo de Lineweaver-Burk para substrato G6P na presença e ausência de T6P

Tabela 8. Parâmetros cinéticos de T6P sintase para G6P na presença de T6P

Condição	k_m (mM)	V_m (mU/mg ptn)
Sem T6P	7,8	384,6
Com T6P	3,2	163,9

Na literatura existem três tipos de inibição simples mais conhecidas, sendo estas:

- Inibição competitiva, onde o k_m diminui com a presença do inibidor, mas o V_m se mantém constante;
- Inibição não competitiva, V_m diminui, enquanto o k_m se mantém constante, na presença do inibidor ;
- Inibição acompetitiva, k_m e V_m diminuem com a presença do inibidor e do mesmo fator.

A inibição acompetitiva ocorre quando o inibidor(I) se liga, de forma reversível, somente após ser formado o complexo enzima-substrato(ES), não conseguindo se ligar à enzima livre. A estrutura da enzima contém um sítio catalítico para o inibidor, diferente do sítio do substrato, que é modificado com a

entrada do substrato, se tornando um sitio para a ligação com o inibidor. Uma vez o inibidor ligado ao complexo ES, há formação do complexo ESI que é um complexo que não leva à formação de produto. A associação do inibidor ao complexo ES modifica o sitio catalítico do substrato, não permitindo a saída do produto (Pinto & Menezes, 2009).

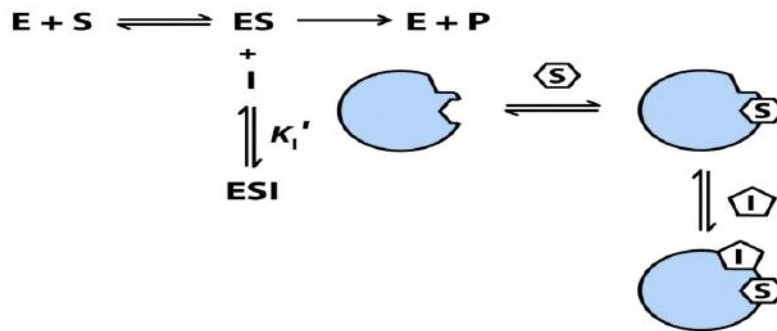


Figura 27. Esquema da inibição acompetitiva, onde E= enzima; S= Substrato; P= Produto; I= Inibidor, ES= complexo Enzima-substrato; ESI= complexo enzima-substrato-inibidor; K_i' = constante de inibição(constante de dissociação do complexo).

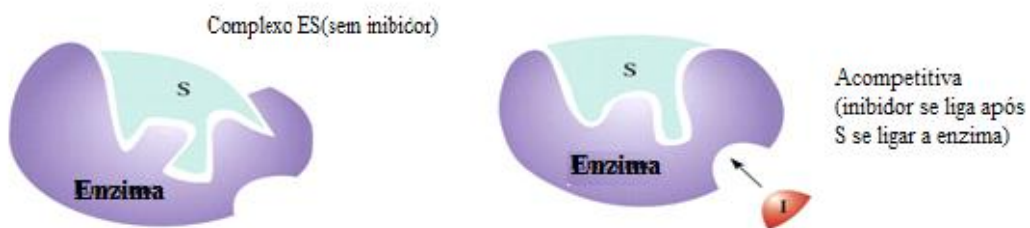


Figura 28. Modificação do sitio catalítico do substrato pela entrada do inibidor, num processo de inibição acompetitiva.

O gráfico característico de Lineweaver-Burk para este tipo de inibição apresenta retas paralelas entre a reta sem inibidor, e as retas com diferentes concentrações do substrato inibidor (Figura 29). Como os valores de k_m e v_m são alterados de um mesmo fator, a inclinação K_m/V_m se mantém constante, explicando as retas paralelas.

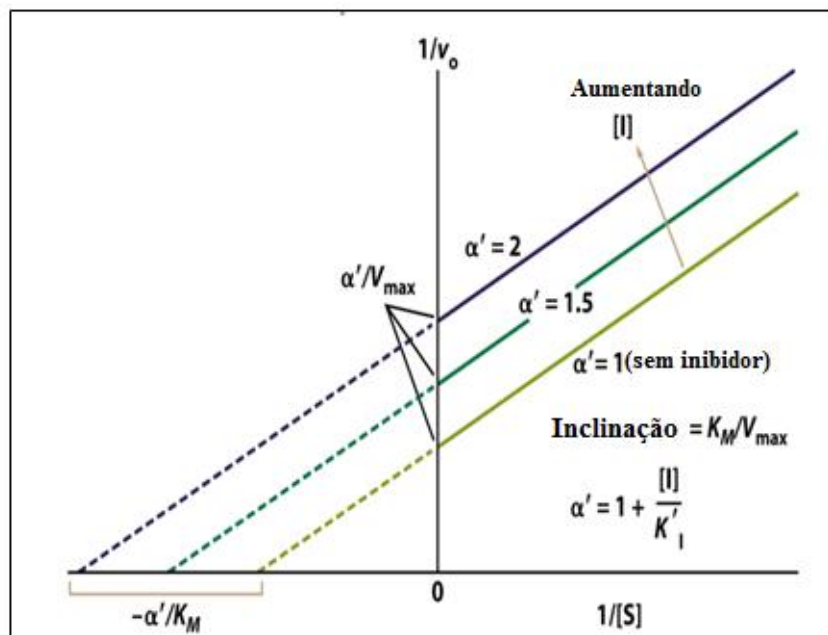


Figura 29. Gráfico de Lineweaver-Burk característico para inibição incompetitiva. [I]= concentração de inibidor; V_{max} = velocidade máxima; K_M = constante de Michaelis; K_i = constante de inibição;

Comparando os resultados encontrados dos experimentos na presença de T6P para ambos os substratos com as características dadas pela literatura, podemos concluir que o mecanismo de inibição do complexo enzimático trealose sintase pela presença de T6P é de forma incompetitiva.

Tal resultado está de acordo com o funcionamento do metabolismo de trealose. Primeiramente, a inibição do complexo tem de ser de forma reversível, ou seja, quando a condição for favorável a ativação da enzima, o inibidor saia do complexo e a atividade enzimática volte. Como o substrato T6P é o produto da própria enzima que ele inibe, o seu acúmulo representa uma situação na qual trealose não está sendo mais necessária, e sua síntese tem de ser interrompida. Nestas condições, tal substrato não se desprende do complexo, mas também não evita que possíveis moléculas de G6P e UDPG livres no meio, provenientes de outras vias metabólicas, se ligam a enzima. Tal resultado também está de acordo com estudos que mostram que células em condições não estressantes codificam o gene *TPS1*, responsável pela subunidade Tps1 e pela síntese de T6P. Em tais condições, a Tps1 sintetiza T6P, o qual não é consumido, e passa a ser acumulado. Tal acúmulo inibe a Tps1, mas não a inativa, de forma que quando o gene *TPS2* passar a ser expresso, numa situação de estresse, as moléculas de T6P passam a ser consumidas e a subunidade Tps1 volta a sua forma ativa.

Esta inibição também é condicente com o outro papel que a Tps1 e T6P possuem: regular a via glicolítica. Ao longo deste trabalho já foi mencionado

que tanto Tps1 quanto T6P tem papel importante na regulação da via glicolítica. O acúmulo de T6P inibe a hexocinase II, enzima que catalisa a primeira reação da glicólise (fosforilação da glicose a G6P às custas de ATP). Em situação de crescimento exponencial, a glicólise tem de ser mantida ativa para a geração de energia necessária para o crescimento celular. Para isto, tem de haver uma ligação entre as duas vias para que o acúmulo de T6P não iniba a glicólise. Tal conexão ocorre pela inibição da subunidade Tps1. A T6P se ligando e inibindo a subunidade Tps1, não há mais moléculas do próprio substrato livres no meio e portanto, a via glicolítica continua ativa, na condição desejada.

Uma vez sabendo como a síntese de trealose pode ser inibida usando o seu próprio substrato intermediário, um estudo interessante pode ser como induzir um acúmulo de T6P em células de fungos patogênicos, quando presentes no organismo de mamíferos, e desta forma inibir sua virulência, pelo bloqueio da síntese de trealose, um fator de proteção a condições ambientais do hospedeiro.

• **Conclusão**

- Células de *S.cerevisiae* identificam a fase estacionária como uma forma de estresse, e acumulam trealose em tais condições.
- O acúmulo de trealose se torna mais acentuado quando células crescendo em fase exponencial a 28°C passam a ser tratadas a uma temperatura de 40°C.
- As subunidades Tps3 e Tsl1 funcionam como reguladores no complexo enzimático trealose sintase e tem um comportamento homólogo entre si.
- Aparentemente a subunidade Tps3 tem mais ligação com a degradação de T6P, enquanto a Tsl1 tem mais ligação com a síntese de T6P.
- Ausência de ambas não inibe o metabolismo de trealose, porém sua presença é essencial para um funcionamento ótimo em condições de estresse térmico.
- O substrato intermediário da síntese de trealose, T6P, funciona como inibidor incompetitivo do complexo enzimático trealose sintase, em células de levedura crescendo em fase exponencial, meio rico em glicose, a 40°C.

- *Perspectivas*

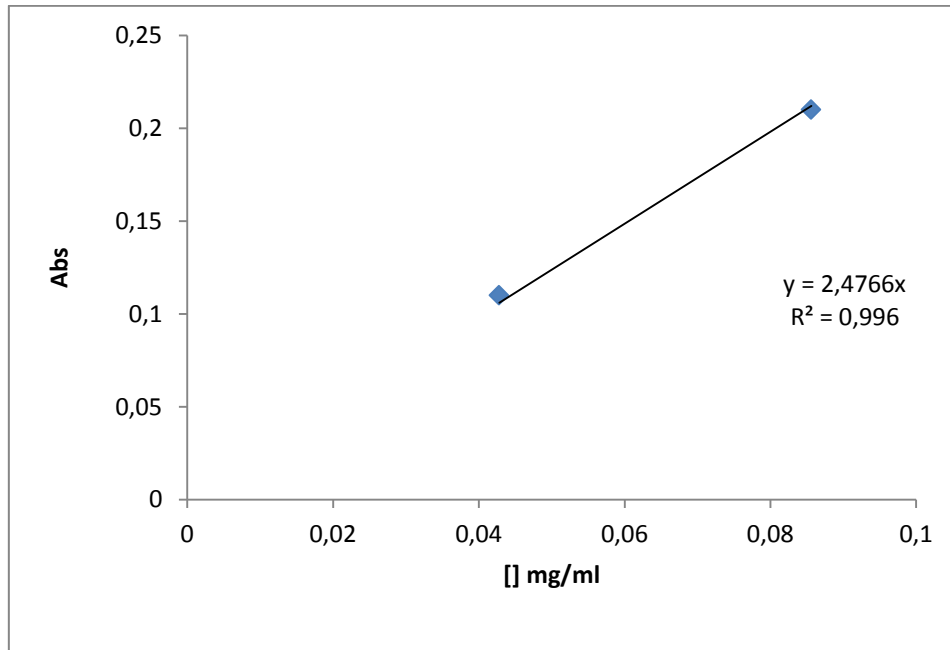
Com o último resultado obtido, sabendo que a trealose-6-fosfato inibe o complexo enzimático trealose sintase de forma acompetitiva, novos experimentos podem ser realizados com o objetivo de determinar qual concentração do substrato seria ideal para ter cada vez mais uma velocidade máxima menor tendendo a zero, e desta forma ter uma inibição mais eficaz.

Uma vez sabendo as condições ideais de inibição do complexo pela ação de T6P, estudos em outros tipos de células que utilizam a trealose como metabolismos de proteção contra estresse ambiental devem ser feitos, a fim de determinar como a T6P inibe tal metabolismo, e em quais condições existe uma inibição ótima.

Finalmente, uma vez conhecendo a inibição em células de organismos patogênicos, pesquisas para determinar como tal inibição pode ser induzida através de tratamentos em mamíferos devem ser feitas, a fim de se combater as doenças relacionados a esses organismos patogênicos.

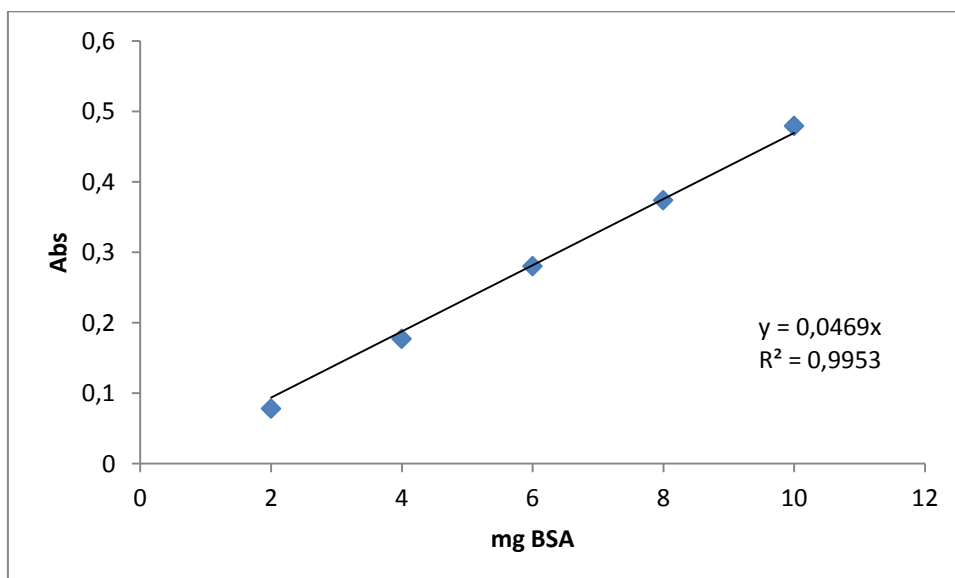
Anexos

1) Curva padrão para determinação do fator de peso seco



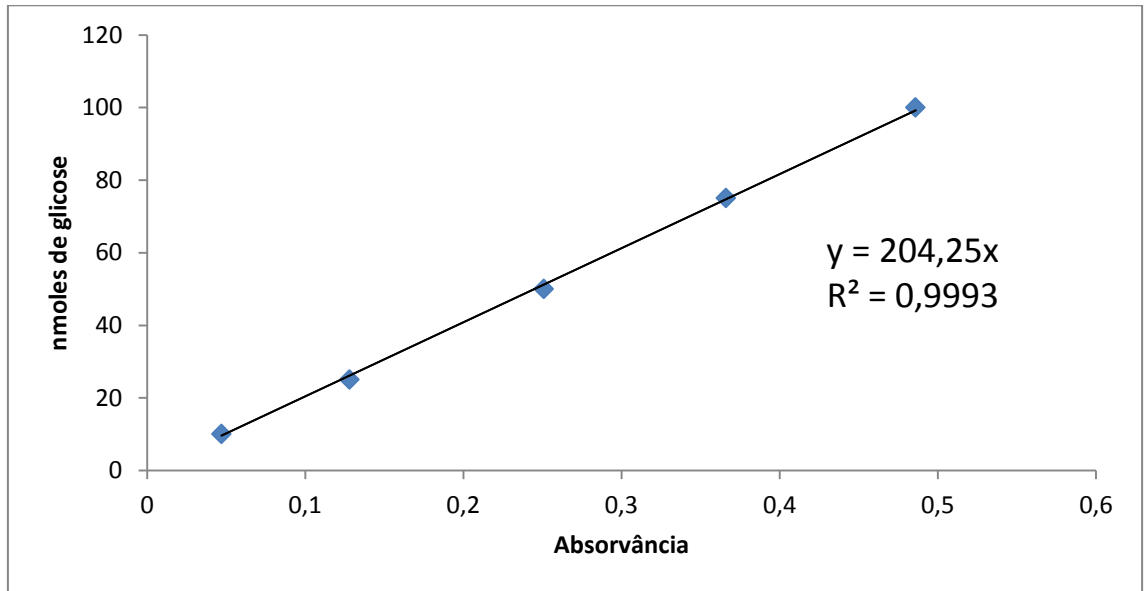
Fator de peso seco obtido foi de 0,4 mg/mL

2) Curva padrão de dosagem de proteína pelo método de biureto modificado por Stickland



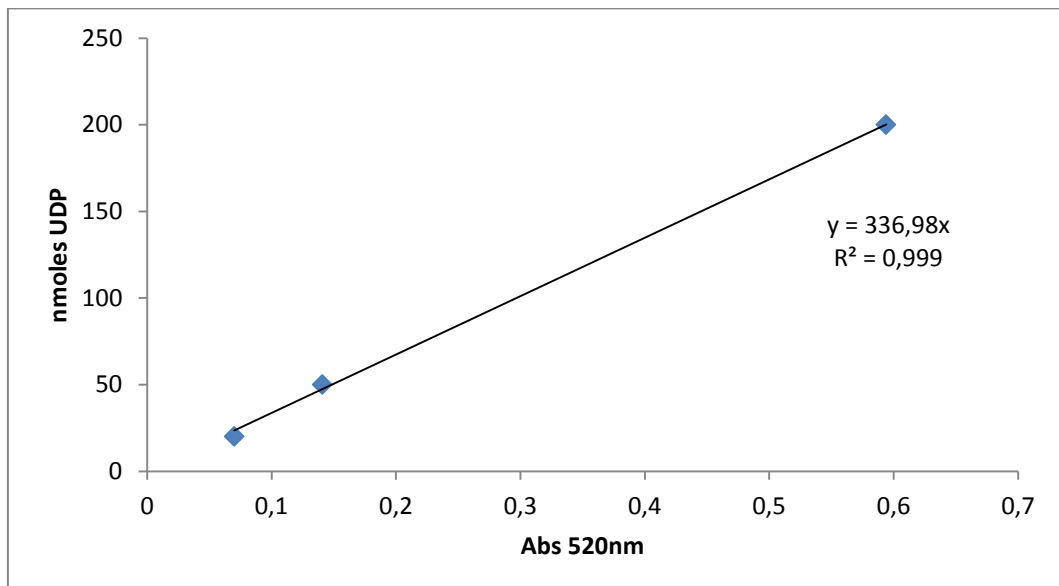
O padrão usado foi albumina tirada de boi. O fator encontrado foi de 21,3 mg.

3) Curva padrão de dosagem de glicose pelo método de GOP



O padrão usado foi solução de glicose. O fator encontrado foi 204,25 nmoles de glicose.

4) Curva padrão de dosagem de UDP



O padrão usado foi uma solução de UDP. O fator usado foi 337 nmoles de UDP.

Bibliografia

Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., Virgilio, de C., Wiemken, A. and Thevelein, J. M (1998). "Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex". The Journal of Biological Chemistry, Vol 273(50), 33311-33319.

Blásquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C. and Gancedo, J.M (1993). "Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases". Febs Letters, Vol 329(1,2), 51-54.

Cabib, E. and Leloir, L.F (1957). "The biosynthesis of trehalose phosphate", pag 259-275.

Eastmond, P.J. and Graham, I.A. (2003). "Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate?". Current Opinion in Plant Biology, Vol 6, 231-235.

Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. and Carrol, D. (2003). "Review. New insights on trehalose: a multifunctional molecule". Glycobiology, Vol 13(4), 17R-27R.

Eleutherio, E.C.A., Araujo, P.S., and Panek, A.D. (1993). "Protective role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*". Cryobiology, Vol 30-591-596.

Gochman, N. and Scmitz, J.M. (1972). "Application of a new peroxide indicator reaction to the specific, automated determination of glucose with glucose oxidase". Clinical Chemistry, Vol 18(9) 943-950.

Hottiger, T., Schmutz, P. and Wiemken, A. (1987). "Heat-Induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*". Journal of Bacteriology, Vol 169(12), 5518-5522.

Kasumi, T., Brewer, C.F., Reese, E.T. and Hehre, E. J. (1986). "Catalytic versatility of trehalose: synthesis of α -D-glucopyranosyl α -D-xylopyranoside from β -D-glucosyl fluoride and α -D-xylose". Carbohydrate Research, Vol 146, 39-49.

Maidan, M.M., de Rop, L., Relloso, M., Diez-Orejís, R., Thevelein, J.M. and Vand Dijck, P. (2008). "Combined inactivation of the *Candida albicans* *GPR1* and *TPS2* genes results in avirulence in a mouse model for systemic injection". Infection and Immunity, Vol 76(4), 1686-1694.

Neto e Colaboradores,(2008) "Cursos práticos em Bioquímica", UFRJ

Panek, A.C., Araujo, P.S., Neto, V.M. and Panek, A.D.(1987). "Regulation of the trehalose-6-phosphate synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*". *Current Genetics*, Vol 11, 459-465.

Panek, A. D (1991). "Storage Carbohydrates". *The yeasts* Vol4, Chapter 13, 2nd edition.

Petzold, E.W., Himmelreidn, V., Mylonaki, E., Rude, T., Toffaletti, D., Cox, G.M., Miller, J.L. and Perfect, J.R. (2006). "Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*". *Infection and Immunity*, Vol 74(10), 5877-5887.

Pinto, G. F., Menezes, R. R.," *Cinética Enzimática*". Rio de Janeiro 2009. E-papers.

Roose, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., Thevelin, J.M., de Virgilio, C., de Moor, B. and Winderickx, J. (2005). "PKA and Sch9 control a molecular switch importante for the proper adaption to nutrient availability". *Molecular Microbiology*, Vol 55(3), 862-880.

Siggers, K.A. and Lesser, C.F.(2008). "The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins". *Cell Host & Microbe* 4, 8-15.

Singer, M.A. and Lindquist, S. (1998). "Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose". *Elsevier Science*, Vol 16, 460-468.

Souza, N.O. and Panek, A.D.(1968). "Localization of trehalase and trehalose in yeast cells". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol 125, 22-28.

Stickland, L.H (1951). "The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction". *J. Gen. Microbiol*, Vol 5, 698-703.

Vandercammen, A., François, J. and Hers, H., G. (1989) "Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*". *Eur. J. Biochem*, Vol 182, 613-620.

Vand Dijck, P., De Rop, L., Szlufrik, K., Van Ael, E. and Thevelein, J. M. (2002). "Disruption of the *Candida albicans* *TPS2* gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase decrease infectivity without affecting hypha formation". *Infection and Immunity*, Vol 70(4), 1772-1782.

Vianna, C.R. and Vieira, E.D.(2008). "Biorigin: Aplicação de extrato de levedura em meios de cultivo". *Bionews*, ed 2.

Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G.C and Singer, R.A. (1993). "Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiological Reviews*, Vol 57(2), 383-401.