



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE ENGENHARIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**ESTUDO PROTEÔMICO DE DIFERENTES LEVEDURAS
INDUSTRIAIS E ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE**

MARIA PRISCILA FRANCO LACERDA

**Dourados-MS
Fevereiro-2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE ENGENHARIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

MARIA PRISCILA FRANCO LACERDA

**ESTUDO PROTEÔMICO DE DIFERENTES LEVEDURAS
INDUSTRIAIS E ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental

Orientador: Prof.º Dr.º Gustavo Graciano Fonseca

Co-orientadora: Prof.º Dr.º Renata Roland Teixeira

**Dourados-MS
Fevereiro-2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

L131e	<p>Lacerda, Maria Priscila Franco.</p> <p>Estudo proteômico de diferentes leveduras da região centro-oeste. / Maria Priscila Franco Lacerda. – Dourados, MS : UFGD, 2015.</p> <p>106f.</p> <p>Orientador : Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Proteoma. 2. Quantificação. 3. 2D-PAGE. 4. <i>Shotgun</i>. I. Título.</p> <p>CDD – 664.68</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

Maria Priscila Franco Lacerda

ESTUDO PROTEÔMICO DE DIFERENTES LEVEDURAS INDUSTRIAIS E ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: _16__/_02__/_2015__

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
Grande Dourados

Instituição: Universidade Federal da

Prof. Dr. William Vega
Grande Dourados

Instituição: Universidade Federal da

Prof. Dr. Rodrigo M. Pereira
Grande Dourados

Instituição: Universidade Federal da

À Deus primeiramente, por tudo que me concedes.

Aos meus pais, José e Maria, que são tudo para mim.

À minha co-orientadora Renata Roland Teixeira, pelo imenso apoio, confiança e
companheirismo.

À UFGD, pelas oportunidades que me tem dado.

AGRADECIMENTOS

É com muito carinho que escrevo esta sessão de agradecimentos, pois as pessoas aqui mencionadas tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Prof^o Gustavo Graciano Fonseca, pelo empenho em conceder as melhores condições de pesquisa, e pelo imenso apoio durante toda minha jornada acadêmica.

A Renata Roland Teixeira, minha querida co-orientadora e amiga, pela imensa ajuda e conhecimento transmitido, e por abrir novas perspectivas ao meu trabalho.

Ao Prof^o Foued Salmen Espíndola, pela oportunidade de realizar meu experimento no LABIBI/UFU.

As colegas do Laboratório de Bioengenharia Cíntia, Janina e Marta pela ajuda com a cultura de células.

Aos amigos e colegas do LABIBI Hélen por toda ajuda e companheirismo durante todos esses meses em Minas Gerais; a Mari que se tornou minha grande amiga nesses meses me apoiando e que meu deu a honra de participar de um momento tão especial em sua vida; a Adrielle por toda ajuda nos meus experimentos, você é um exemplo de aluna de iniciação científica; a Danielle pela ajuda e pelas ótimas conversas; ao Alisson pela ajuda nos meus experimentos, enfim a todos do laboratório, pois quando as coisas davam erradas sempre tinha alguém disposto a me ajudar.

A minha amiga Camila que me ajudou imensamente durante todo o mestrado, sem ela tudo ficaria bem mais difícil.

A minha amiga Karolayne pelo companheirismo, pelas loucuras compartilhadas e por fazer minha vida mais divertida.

Aos meus amigos Kennyson, Ingrid, Pitty e Stanley, por fazerem parte de momentos tão especiais durante meu primeiro ano de mestrado.

Agradeço especialmente ao meu pai e minha mãe pelo amor, incentivo, amizade e dedicação em todos os momentos mais difíceis pelos quais passei, por sempre me mostrarem a importância dos estudos, por acreditarem em mim e por serem tudo em minha vida.

“Bom mesmo é ter problema na cabeça, sorriso na boca e paz no coração!

Aliás, entregue os problemas nas mãos de Deus e que tal um cafezinho gostoso agora?

A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso cante, chore, dance e viva intensamente antes que a cortina se feche!”

(Arnaldo Jabor)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 OBJETIVOS	14
2 INFLUÊNCIA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM GEL 2D DE LEVEDURAS ISOLADAS NA REGIÃO CENTRO-OESTE.....	15
2.1 INTRODUÇÃO.....	15
2.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	17
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
2.4 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	37
3 ANÁLISE PROTEÔMICA DA LEVEDURA INDUSTRIAL <i>S. CEREVISIAE</i> CAT-1 ATRAVÉS DA TECNOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO MULTIDIMENSIONAL DE PROTEÍNA (MUDPIT)	40
3.1 INTRODUÇÃO.....	40
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	42
3.3 RESULTADOS	45
3.4 DISCUSSÃO	51
3.5 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	57
MEMORIAL.....	61
ANEXO I (VIAS METABÓLICAS).....	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - (A) Gráfico de focalização isoeletrica da Abordagem 1 onde foi utilizado 2% de anfólitos na solução de reidratação, com acúmulo total de 16.379 Vh. (B) Gráfico de focalização isoeletrica da Abordagem 2 onde foi utilizado 0.5 % de anfólitos na solução de reidratação, com acúmulo total de 34.463 Vh.24

Figura 2.2 - Gráfico de focalização isoeletrica com adição de etapa de diálise.24

Figura 2.3 - Separação das proteínas da levedura 43 por eletroforese bidimensional. Sendo o gel A referente à abordagem 1; B à abordagem 2, e C à abordagem 3. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas proteicas de 225 kDa a 12 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis26

Figura 2.4 - Separação das proteínas da levedura 42 por eletroforese bidimensional. Sendo o gel A referente à abordagem 4; B à abordagem 5, e C à abordagem 6. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas proteicas de 225 kDa a 12 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis27

Figura 2.5 - Separação das proteínas da levedura CAT-1 por eletroforese bidimensional. Sendo o gel A referente à abordagem 7; B à abordagem 8; C à abordagem 9; D à abordagem 10, e E à abordagem 11. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas proteicas de 225 kDa a 12 kDa, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.....28

Figura 2.6 - Estatística diferencial dos *spots* de CAT-1 (A) Valores de área que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). $p < 0.05$ (a) 1 vs 4 (b) 2 vs 4 (c) 3 vs 4 (d) 4 vs 5. (B) Valores de volume que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). $p < 0.05$ (e) 1 vs 2 (b) 2 vs 4 (f) 2 vs 5 (c) 3 vs 4 (g) 3 vs 5. (C) Valores de intensidade que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). $p < 0.05$ (e) 1 vs 2 (h) 1 vs 3 (i) 2 vs 3 (b) 2 vs 4 (f) 2 vs 5 (c) 3 vs 4 (g) 3 vs 5. (D) Valores de saliência que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). $p < 0.05$ (a) 1 vs 4 (d) 4 vs 5.34

Figura 2.7 - Estatística diferencial dos *spots* da levedura 43 (A) Valores de área que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). $p < 0.05$ (a) 1 vs 3 (b) 2 vs 3. (B) Valores de volume que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). $p < 0.05$ (a) 1 vs 3 (b) 2 vs 3. (C) valores de Intensidade que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). (D) Valores de saliência que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). $p < 0.05$ (a) 1 vs 3 (b) 2 vs 3.....35

Figura 2.8 - Estatística diferencial dos *spots* da levedura 42 (A) Valores de área que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). $p < 0.05$ (a) 1 vs 3 (b) 2 vs 3. (B) Valores de volume que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). (C)

Valores de volume que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). **(D)**
Valores de Saliência que representam as médias \pm erro padrão da média (EPM). $p < 0.05$
(a) 1 vs 3 (b) 2 vs 3.....36

Figura 3.1- Análise do proteoma de CAT-1 representada por suas vias metabólicas exceto o metabolismo do carbono central. Foram identificadas 16 vias metabólicas. São indicadas em cada barra o número total de proteínas encontradas em cada via.....49

Figura 3.2- Localização celular das proteínas identificadas no lisado celular. Localização celular das proteínas identificadas foi designada pela base de dados *SGD (Saccharomyces Genome Database)*, onde foi usado como ferramenta o *SGD Gene Ontology Slim Mapper*. Porcentagem de proteínas em cada localização celular atribuída foi calculada com base no número de proteínas designadas pelo total das proteínas conhecidas, 28% de proteínas identificadas estão localizados no citoplasma, 18% das proteínas identificadas estão localizados no espaço extracelular, 14% de proteínas identificadas estão localizados na mitocôndria, 10% de proteínas estão localizadas no complexo ribonucleoproteico, 8% de proteínas estão localizadas na membrana, 8% de proteínas estão localizadas no ribossomo, 7% de proteínas estão localizadas no núcleo, 3% de proteínas estão localizadas na membrana plasmática, 2% de proteínas não foram mapeadas pelo *software*, 1% de proteínas estão localizadas no complexo oxiredutase, e 1% de proteínas estão localizadas no retículo endoplasmático.....50

LISTA DE TABELAS

TABELAS

- Tabela 2.1** - Valores de referência de densidade óptica média (DO m) em que os cultivos foram interrompidos, com base em estudos prévios de cinética dos micro-organismos realizados no laboratório segundo Camargo (2013)18
- Tabela 2.2** - Número de bandas detectadas em géis bidimensionais referentes a cada protocolo utilizado.....19
- Tabela 2.3**- Diferenças abordadas no protocolo de referência para Levedura 43. Em destaque estão as principais etapas de extração de proteínas, com as diferenças utilizadas em cada abordagem. No uso de “_” não houve utilização de tal componente ou processo.....19
- Tabela 2.4** - Diferenças abordadas no protocolo de referência para Levedura 42. Em destaque estão as principais etapas de extração de proteínas, com as diferenças utilizadas em cada abordagem. No uso de “_” não houve utilização de tal componente ou processo.....20
- Tabela 2.5** - Diferenças abordadas no protocolo de referência para Levedura CAT-1. Em destaque estão as principais etapas de extração de proteínas, com as diferenças utilizadas em cada abordagem. No uso de “_” não houve utilização de tal componente ou processo.....30
- Tabela 3.1**- Proteínas identificadas envolvidas em vias de metabolismo do carbono central encontram-se na tabela com seus respectivos números de identificação (ORF). A última coluna contém a média (MD) dos espectros de massa das quatro replicatas submetidas ao sistema MudPit, e o desvio padrão das mesmas (DVP).....46
- Tabela 3.2**- Foram testados 4 bancos de dados diferentes pertencentes ao SGD (*Saccharomyces Genome Database*). Todos os bancos de dados foram previamente tratados com o módulo *SearchDB* da plataforma *PatternLab for Proteomics*, para a combinação de sequências redundantes e apresentação de sequências não redundantes.....47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	microlitros
μM	micromol
2D-PAGE	Eletroforese Bidimensional em gel de poliacrilamida
CHAPS	[(3-Cholamidopropyl) dimethylammido] -1-propanesulfonate
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	(2S, 3S)-1,4-Bis-sulfanilbutano-2,3-diol
IEF	focalização isoeétrica
IPG	<i>Immobilized pH gel</i> – pH imobilizado em gel
KDa	Kilodaltons
mA	miliamper
mg	miligrama
mL	mililitro
pI	Ponto isoeétrico
PM	Peso molecular
RPM	rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
Tris	Tris-hidroximetilenodiamina
v	volume
Vh	volt-hora
w	weight (peso)
TCA	ácido tricarbóxico
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
TCEP	tris-2-carboxietil-fosfina
MuDPIT	Tecnologia de identificação multidimensional de proteínas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas
GO	<i>Gene Ontology</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MS	Espectrometria de massas

RESUMO

Estudo Proteômico de diferentes leveduras industriais e isoladas na Região Centro-Oeste

A proteômica é uma ciência fundamental uma vez que as proteínas desempenham funções biológicas importantes. A eletroforese bidimensional separa as proteínas de acordo com o ponto isoelétrico e o peso molecular, permitindo a resolução de milhares de proteínas no mesmo gel. Em paralelo à técnica 2D, análises *shotgun* vem sendo desenvolvidas para cobertura global do proteoma em estudo. Tal técnica inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão trípica de soluções proteicas complexas, seguida de análise por espectrometria de massas (MS). Objetivou-se através deste trabalho realizar a caracterização quantitativa proteômica de leveduras isoladas na Região Centro-Oeste do Brasil e verificar a influência dos diferentes métodos de extração de proteínas nesse perfil, além de quantificar e analisar o proteoma global da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 através da técnica de MudPit. Primeiramente, as leveduras foram cultivadas até o meio de sua fase exponencial, sendo sua biomassa obtida por centrifugação e liofilizada para a etapa seguinte de extração de proteínas, onde foram testados 11 protocolos em três leveduras diferentes. A técnica padronizada de extração de proteínas foi utilizada em células de CAT-1 para análise *shotgun*, onde como resultados obteve-se 618 proteínas, dos quais 65 foram identificadas na via metabólica do carbono central. Além da identificação de 17 vias metabólicas através da ferramenta Kegg. Os experimentos de eletroforese bidimensional serviram para compreender a relação entre grupos de amostras de leveduras e a alteração de proteínas obtidas a partir de diferentes protocolos. Já a análise *shotgun*, se mostrou uma técnica necessária em proteômica, no qual o rendimento de proteínas é maior comparado à técnica 2D, facilitando assim maior cobertura das vias metabólicas do organismo em estudo.

Palavras-chave: proteoma; quantificação; 2D-PAGE; *shotgun*

ABSTRACT

Proteomic study of different industrial and yeasts in the Midwest Region

Proteomics is an essential science since the proteins have important biological functions. The development and improvement of proteomic experimental methods for the detection of intracellular regulatory mechanisms are essential for clearer understanding of the systemic functioning of metabolic networks present in various organisms. Two-dimensional electrophoresis separates proteins according to the isoelectric point and molecular weight, allowing the resolution of thousands of proteins on the same gel. Parallel to the 2D technique, analyzes shotgun has been developed for global coverage of the proteome study. Such techniques include liquid chromatography separation of peptides obtained after tryptic digestion of complex protein solutions, followed by analysis by mass spectrometry (MS). The objective was to work through this perform proteomics quantitative characterization of yeasts isolated in the Central-West of Brazil and the influence of different protein extraction methods that profile and to quantify and analyze the global proteome of the yeast *S. cerevisiae* CAT- 1 through MudPit technique. First, yeast were grown to mid-exponential phase a, the biomass being obtained by centrifugation and lyophilized for the next step of protein extraction, in which 11 were tested in three different protocols yeast. The standard technique of protein extract was used in CAT-1 cells for shotgun analysis. The two-dimensional electrophoresis experiments served to understand the relationship between yeast samples groups and the change of proteins from different protocols. Since the shotgun analysis showed a necessary technique in proteomics, wherein the yield of protein is increased compared to 2D technique, thus facilitating greater coverage of the metabolic pathways of the organism under study.

Keywords: proteomics; quantification; 2D-PAGE; shotgun

1 INTRODUÇÃO GERAL

Esta dissertação apresenta as atividades realizadas pela aluna Maria Priscila Franco Lacerda durante o seu mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). O mestrado ocorreu de março de 2013 a fevereiro de 2015.

O texto foi estruturado de modo que cada capítulo venha corresponder a uma publicação, exceto esta introdução geral (Capítulo 1). Assim, este trabalho foi organizado da seguinte forma:

- Capítulo 2. Influência de métodos de extração de proteínas em gel 2D de leveduras isoladas na região centro-oeste;
- Capítulo 3. Análise Proteômica da levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1 através da Tecnologia de identificação multidimensional de proteína (MudPit).

1.1 Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Caracterizar quantitativamente as proteínas de três leveduras isoladas na região centro-oeste do Brasil;
- Verificar a influência dos diferentes métodos de extração de proteínas em géis bidimensionais;
- Reportar o proteoma total da levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1 a fim de elucidar suas vias metabólicas.

2 Influência de métodos de extração de Proteínas em Gel 2D de Leveduras Isoladas na Região Centro-Oeste

RESUMO

A proteômica é uma ciência fundamental uma vez que as proteínas desempenham funções biológicas importantes. Objetivou-se através deste trabalho realizar a caracterização quantitativa proteômica de leveduras isoladas na Região Centro-Oeste do Brasil e verificar a influência dos diferentes métodos de extração de proteínas nesse perfil. Primeiramente, as leveduras foram cultivadas até o meio de sua fase exponencial, sendo sua biomassa obtida por centrifugação e liofilizada para a etapa seguinte de extração de proteínas, onde foram testados diferentes abordagens para cada levedura. Deste modo foram três protocolos testados para levedura 43, três para levedura 42, e cinco para levedura CAT-1, cujo organismo tem maior importância industrial em ambiente usineiro no Brasil. Somente para a levedura 43 se obteve um protocolo que satisfizesse em quantificação e qualidade a detecção de *spots*. A levedura 42 não teve nenhuma resposta satisfatória em relação aos três protocolos testados. Os experimentos de eletroforese bidimensional serviram para compreender a relação entre grupos de amostras de leveduras e a alteração de proteínas obtidas a partir de diferentes protocolos.

Palavras-chave: proteoma; 2D-PAGE; quantificação.

2.1 INTRODUÇÃO

Com preocupações a respeito do impacto ambiental e segurança de fontes de combustíveis fósseis, a produção de combustível renovável tornou-se uma alternativa altamente atraente (Farrell et al., 2006); (Goldemberg, 2007). A utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como levedura produtora de etanol combustível está se tornando cada vez mais importante (Stambuk et al., 2009). Atualmente, mais de metade das destilarias no Brasil utilizam uma, ou mais cepas, geralmente uma mistura de duas ou mais. Estas cepas selecionadas são o ponto de entrada no processo de fermentação, o que coletivamente produzem bilhões de litros de álcool combustível por ano (Basso et al., 2008). Leveduras de laboratório e industriais, mesmo quando fazem parte da mesma

espécie, apresentam grandes diferenças, tanto em termos genéticos, quanto em termos de sua fisiologia (Benitez et al., 1996; Marullo et al., 2004; Querol et al., 2003).

As proteínas superficiais dos fungos são o ponto inicial de contato entre a célula e o seu meio ambiente. Muitas pesquisas são focadas na superfície celular, proteínas da parede celular, proteínas secretadas ou ainda proteoma total. A disponibilidade de uma técnica rápida que permita a identificação de proteínas em diferentes condições, ao longo do tempo, pode ser uma ferramenta poderosa para estudar tais organismos (Hernández et al., 2010).

Com o advento de muitos genomas sequenciados, a compreensão fisiológica das informações codificada pelo genoma foi aumentada. Considerando técnicas de grande porte, tais como perfil de expressão de mRNA e imunoprecipitação da cromatina ligada com o sequenciamento completo, fornecem a maior parte da informação genômica funcional, assim considera-se que a compreensão da informação genômica também irá exigir perfis do proteoma celular. O proteoma é considerado como sendo o complemento total de proteínas de células ou tecidos (Brill et al., 2009). A proteômica é uma ciência fundamental uma vez que as proteínas desempenham um papel importante nas funções biológicas. Essa ciência tem evoluído fortemente, encontrando-se em uma fase de pleno crescimento, que é refletida pela quantidade de dados gerados a partir de cada experimento. Essa abordagem tem proporcionado, pela primeira vez, a oportunidade de compreender aspectos biológicos da fisiologia humana, animal, bem como da fisiologia de plantas e micro-organismos (Cristoni and Mazzuca, 2011).

A atividade mais frequentemente associada à proteômica é o fracionamento e visualização de um grande número de proteínas celulares em géis bidimensionais de poliacrilamida (2D-PAGE). Este tipo de trabalho durante mais de 20 anos permitiu a construção de bases de dados de proteínas relativas a determinados tipos de células ou tecidos (Leite, 2010).

A eletroforese em gel 2D separa as proteínas de acordo com o ponto isoelétrico e o peso molecular, permitindo a resolução de milhares de proteínas no mesmo gel. A eletroforese em gel 2D é uma técnica capaz de analisar as respostas biológicas de centenas de proteínas simultaneamente e deve, portanto, permitir uma visão relativamente abrangente do metabolismo celular. Há três pilares sobre os quais se devem avaliar um resultado de gel bidimensional: (i) visualização de muitos *spots* de proteínas em simultâneo, (ii) quantificação da proteína em cada ponto, e (iii) identificação do produto do gene para cada *spot* (Futcher et al., 1999).

A produção de biocombustíveis coloca o Brasil como o país produtor mais importante deste mercado. A cana-de-açúcar atingiu o limite na produção de sacarose, um efeito da exploração da estreita base de genes utilizados nos cruzamentos dos programas de melhoramento convencional. Os dados gerados pelo perfil de expressão de proteínas podem elucidar o mecanismo molecular envolvido no processo de acúmulo de sacarose. No entanto para a obtenção de uma expressão proteica satisfatória, são de necessidade um protocolo de extração de proteínas que atenda nos quesitos qualidade e maior quantidade de *spots*.

Objetivou-se através deste trabalho realizar a caracterização quantitativa proteômica de três leveduras isoladas na região centro-oeste do Brasil e verificar a influência dos diferentes métodos de extração de proteínas nesse perfil.

2.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.2.1 Preservação e preparo do inóculo

Três linhagens de leveduras da rede centro oeste de leveduras (RECOL) foram obtidas liofilizadas e então transferidas para frascos tipo erlenmeyer, contendo 100 ml de meio líquido ypd (extrato de levedura, 10 g/l; peptona, 20 g/l; glicose, 20 g/l), para uma cultura *overnight* a 30°C (Kiers et al., 1998).

O preparo do inóculo consistiu em recolher uma única colônia de uma placa de petri contendo a linhagem desejada e transferi-la para um frasco do tipo erlenmeyer, contendo 250 ml de meio mineral segundo (Verduyn et al., 1992) ajustado para pH 6,0. Após se atingir uma densidade óptica (DO) da cultura a 600 nm (do 600nm) de $1 \pm 0,05$, tempo suficiente para que o final da fase exponencial de crescimento fosse atingido (a 30°C e 200 rpm), certa quantidade deste inóculo foi transferida para o cultivo principal.

2.2.2 Meio de cultura

O meio mineral (Verduyn et al., 1992) foi ajustado para pH 6,0 e autoclavado (121°C, 20 min.). Depois de resfriado a temperatura ambiente, solução filtro-esterilizada de vitaminas e solução traço preparada em água desmineralizada foram adicionadas. Foi utilizado como fonte de carbono glicose à concentração final de 10 g/l¹.

2.2.3 Cultivos em incubador rotativo

Frascos do tipo erlenmeyer, contendo cada um 250 ml do meio de cultura definido, foram inoculados com células obtidas conforme descrito anteriormente. No meio da fase exponencial, conforme Tabela 1, (Camargo, 2013) os cultivos foram interrompidos e a biomassa coletada para demais análises.

Tabela 1. Valores de referência de densidade óptica média (do m) em que os cultivos foram interrompidos, com base em estudos prévios de cinética dos micro-organismos realizados no laboratório segundo Camargo (2013).

Leveduras	DO m
CAT-1	0.555
42	0.535
43	0.518

2.2.4 Análise proteômica

2.2.4.1 Recolha celular, lise e obtenção da fração protéica

Os extratos protéicos das diferentes linhagens de leveduras foram preparados para análise por eletroforese em gel 2D utilizando diferentes abordagens de (Kolkman et al., 2005). Em resumo, as células das leveduras foram recolhidas por centrifugação e liofilizadas antes da extração de proteína. Entre 65 e 75 mg de células de leveduras foi utilizado como material de partida para a extração de proteínas. As células de levedura foram suspensas em 650 µl de solução tampão fervido a 95°C contendo SDS (0,1 m Tris-HCl, pH 7,0, 1,0% (w / v) , suplementado com inibidores de protease (GE healthcare, Milwaukee, WI, EUA). Para lise mecânica, foram utilizados três diferentes processos como esferas de vidro (600-800 µm) com agitação em vórtex em 6 tempos de 5 minutos cada; maceração com nitrogênio líquido e ultra-sonicação em 6 tempos de 1 minuto cada. As amostras foram arrefecidas em gelo durante 2 minutos entre as etapas de vórtex. A amostra foi fervida durante 10 minutos e subsequentemente arrefecida em gelo. Após a lise celular a amostra foi diluída por adição de 1 ml de um tampão de solubilização, contendo 7 m ureia, 2 m tiourea, 4% (w / v) de CHAPS, 2,5% (w / v), DTT, 2% (v / v) anfólitos, pH 3-10 não-linear, e inibidores da protease (GE healthcare, Milwaukee, WI, EUA), sendo agitados por um 1 hora à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. A concentração de proteína foi

determinada pelo ensaio de Bradford (Bio-rad, Hercules, CA) utilizando BSA como um padrão. Os sobrenadantes foram armazenados em alíquotas a -80°C .

O extrato de proteína foi então concentrado e purificado usando o kit 2D Clean-up (GE healthcare, Milwaukee, WI, EUA) ou Precipitação com metanol segundo (Wessel and Flügge, 1984). Cerca de 150 μg de amostra de proteína purificada foi dissolvida em 250 μl solução de reidratação (7 m ureia, 2 m tiourea, 4% (w / v) de CHAPS, 0,002% (w / v) de azul de bromofenol), 2,5% (w / v), DTT, 0.5% (v / v) anfólitos, pH 3-10 não-linear, e inibidores da protease (GE healthcare, Milwaukee, WI, EUA). A solução de reidratação com a proteína foi armazenada à temperatura ambiente por duas horas para melhor solubilização.

Nas Tabelas 2, 3 e 4 são descritas as principais diferenças em relação à levedura 43, levedura 42 e levedura CAT-1 respectivamente. Para a levedura 43 foram testadas três abordagens diferentes, numeradas de 1 a 3. Para a levedura 42, também foram testadas três abordagens, seguindo a mesma numeração de 1 a 3. Já para levedura CAT-1, foram testadas cinco diferentes abordagens sendo numeradas de 1 a 5. Tal numeração foi empregada para uma melhor compreensão dos resultados.

Tabela 2. Diferenças abordadas no protocolo de referência para Levedura 43. Em destaque estão as principais etapas de extração de proteínas, com as diferenças utilizadas em cada abordagem. No uso de “_” não houve utilização de tal componente ou processo.

Levedura 43					
Abordagens	Tampão de lise	Lise mecânica da célula	Solubilização	Purificação	Reidratação
1	Tris-Hcl/ SDS	Maceração NI2	_	2-D Clean-up kit	2.5% DTT, 2% anfólitos
2	Tris-Hcl/ SDS	Criólise	_	2-D Clean-up kit	1% DTT, 0.5% anfólitos
3	Tris-Hcl/ SDS	Maceração NI2	_	2-D Clean-up kit	1% DTT, 0.5% anfólitos

Tabela 3. Diferenças abordadas no protocolo de referência para Levedura 42. Em destaque estão as principais etapas de extração de proteínas, com as diferenças utilizadas em cada abordagem. No uso de “_” não houve utilização de tal componente ou processo.

Levedura 42					
Abordagens	Tampão de lise	Lise mecânica da célula	Solubilização	Purificação	Reidratação
1	Tris-Hcl/ SDS	Maceração NI2	_	2-D Clean-up kit	2.5% DTT, 2% anfólitos
2	Tris-Hcl/ SDS	Maceração NI2	_	2-D Clean-up kit	1% DTT, 0.5% anfólitos
3	Tris-Hcl/ SDS	Maceração NI2	_	2-D Clean-up kit	1% DTT, 2% anfólitos

Tabela 4. Diferenças abordadas no protocolo de referência para Levedura CAT-1. Em destaque estão as principais etapas de extração de proteínas, com as diferenças utilizadas em cada abordagem. No uso de “_” não houve utilização de tal componente ou processo.

Levedura CAT-1					
Abordagens	Tampão de lise	Lise mecânica da célula	Solubilização	Purificação	Reidratação
1	Tris-Hcl/ SDS	Esferas de vidro	Tampão uréia/tiouréia	2-D Clean-up kit	2.5% DTT, 0,5% anfólitos
2	Tris-Hcl/ SDS	Esferas de vidro	Tampão uréia/tiouréia	Precip. Metanol	2.5% DTT, 0,5% anfólitos
3	Tris-Hcl/ SDS	Esferas de vidro	Tampão uréia/tiouréia	Precip. Metanol	2.5% DTT, 0,5% anfólitos
4	Tris-Hcl/ SDS	Esferas de vidro	_	Precip. Metanol	2.5% DTT, 0,5% anfólitos
5	Tris-Hcl/ SDS	Ultra-sonicação	Tampão uréia/tiouréia	2-D Clean-up kit	2% anfólitos

2.2.4.2 Preparação para eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Para a primeira dimensão, cerca de 150 ou 110 ug de proteína dissolvida em 250 µl de tampão de reidratação foi adicionada sobre uma tira 13 centímetros de *immobiline dry-strip* pH 3-10 (GE healthcare, Milwaukee, WI, EUA). A reidratação foi realizada de forma passiva por 12-16 horas usando um *immobiline™ drystrip reswelling tray*. A focalização isoeétrica foi realizada no aparelho *ettan™ ipgpHor™3* (GE Healthcare) a 20°C, para um total de 40-45 kvh (1 h a 500 v, 1 hora a 1500 v seguido de 8,000 v de 38-43 kvh). Antes da segunda dimensão, as tiras de ipg foram incubadas durante 15 min em tampão de equilíbrio (50 mm tris-hcl, pH 8,8, ureia 6 m, 30% (v / v) de glicerol, 2% (w / v) de SDS) contendo 1% (w / v), DTT, seguido por 15 min de incubação em tampão de equilíbrio contendo 2,5% (w / v) de iodoacetamida. A segunda dimensão da eletroforese foi realizada em géis de 12,5% de poliacrilamida em sistema *ettan daltsix electropHoresis system* (GE Healthcare). As tiras de ipg foram colocadas no topo de géis e seladas com uma solução de 1% (w / v) de agarose contendo traços de azul de bromofenol.

Os géis referentes às 7 primeiras modificações de protocolos foram corridos a 10 ma por gel durante 15 minutos, seguido por 20 ma por gel até o azul de bromofenol ter migrado para o fundo do gel. A partir da abordagem 7 os géis foram corridos a 30 ma

durante 15 minutos, seguido por 75 ma até o azul de bromofenol ter migrado para o fundo do gel.

2.2.4.3 Coloração dos géis

Para as leveduras 43 e 42, os géis foram corados em coomassie R-250 de acordo com (Neuhoff et al., 1988). Para as metodologias usadas para a levedura CAT-1, os géis da abordagem 1 foi corado com *plusone silver staining kit* (GE healthcare, Milwaukee, WI, EUA). Já as abordagens 2, 3, 4 e 5, tiveram seu géis corados com *coomassie blue pHastgel blue R-350* (GE healthcare, Milwaukee, WI, EUA)

2.2.4.4 Aquisição de imagens

As imagens dos géis foram adquiridas através do scanner *Image Scanner Ii* (Amersham Bioscience, Milwaukee, Wi, Eua).

2.2.4.5 Análise das imagens

Os géis foram analisados no programa *imagemaster 2D platinum v6.0 software* da Amersham Bioscience/Ge Healthcare, Milwaukee, Wi, Eua.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Padronização dos géis

A proteômica estabeleceu-se como uma técnica bem sucedida capaz de realizar a análise de misturas complexas, como extratos de proteínas totais de um organismo. Dessa forma, reduzir o número de etapas no processo de extração, permite garantir uma maior integridade das proteínas a serem separadas na eletroforese bidimensional. As tentativas de construção de géis 2D para proteoma total utilizando métodos padronizados não demonstraram resultados satisfatórios (dados não mostrados). Tornou-se então necessário investir na otimização das condições para tais géis. O protocolo descrito por kolkman et al. (2005) foi desenvolvido para a extração de proteínas de *s. Cerevisae* cen.pk113-7d, e neste trabalho, foi aplicado para a extração de

proteínas das leveduras CAT-1, 43 e 42, sendo necessário realizar modificações de alguns parâmetros, sendo que para cada organismo foram utilizados parâmetros diferentes, demonstrando que são necessários protocolos de extração diferentes para cada levedura.

A extração de proteínas é um procedimento de extrema importância na garantia do sucesso da eletroforese bidimensional, sendo a etapa que sofreu mais modificações no decorrer deste trabalho. A etapa inicial em um protocolo de extração de proteínas é o rompimento da membrana celular para liberar as organelas e os constituintes químicos: sais, carboidratos, lipídeos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e fenóis (Bandil, 2008). A lise osmótica, lise por detergente, lise enzimática da parede celular, lise mecânica com esferas de vidro, sonicação, criólise ou maceração com nitrogênio líquido são procedimentos que podem ser utilizados para este fim. Leveduras são organismos mais resistentes e com paredes celulares mais espessas, sendo necessário um tratamento mecânico mais vigoroso para que se promova o rompimento. Testou-se neste trabalho a lise com esferas de vidro, sonicação, criólise e maceração com nitrogênio líquido. Cada levedura comportou-se de um modo diferente em relação ao tipo de lise. Para a levedura 43 na abordagem 2, foi realizada criólise para o rompimento celular, resultando em menos proteínas detectadas no gel 2D em comparação com a abordagem 1, em que utilizou-se maceração com nitrogênio líquido. Como para a levedura 43 o melhor resultado foi obtido por maceração com nitrogênio líquido, as tentativas de padronização para levedura 42 foram realizadas com tal método. Porém, durante a maceração havia muita perda de material (células liofilizadas), então foi testado com a levedura CAT-1 o rompimento celular com esferas de vidro, o que resultou em boa quantidade de proteínas sem perda de material celular. A sonicação também testada em CAT-1, não demonstrou diferença em relação à lise com esferas, pois resultou na mesma concentração de proteína pelo método de Bradford.

Os próximos passos são a inativação das enzimas proteolíticas e a remoção dos compostos interferentes tais como sais, lipídeos, ácidos nucleicos, polissacarídeos e fenóis. A atividade das enzimas proteolíticas pode resultar em *spots* artificiais e perda da massa molecular das proteínas (Görg et al., 2004). Em todas as abordagens, exceto a abordagem 5 para CAT-1, as proteases foram inativadas usando um mix de inibidores de proteases (Ge Healthcare, Milwaukee, Wi, Eua) junto à solução tampão de lise com tris e sds, com posterior fervura – tal procedimento é um dos mais eficientes para inibir proteases (Harder et al., 1999).

Anterior à etapa de remoção dos compostos interferentes, nas abordagens 1,2,3 e 5, realizadas com a levedura CAT-1, as proteínas foram solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e reduzidas em tampão de solubilização contendo agentes caotrópicos como a uréia e tiouréia, detergente não-iônico como o CHAPS, DTT como agente redutor, anfólitos e inibidores de proteases. Este processo de solubilização tem como objetivos quebrar as interações macromoleculares (interações não covalentes e pontes dissulfeto), prevenir modificações nas proteínas e mantê-las em solução (Rocha et al., 2005) para garantir que cada *spot* represente um polipeptídeo individual (Gorg et al., 2004).

Os agentes caotrópicos utilizados para o rompimento de interações não covalentes, como a uréia, alteram os parâmetros do solvente e exerce profundos efeitos sobre todos os tipos de interações não covalentes. Já a tiouréia é um agente caotrópico mais eficiente do que a ureia, mas pouco solúvel em água. Assim, a mistura uréia-tiouréia tem sido muito utilizada, pois sua eficiência é maior (Rabilloud et al., 1997). A redução das pontes dissulfeto é também de extrema importância para um tampão de solubilização. O β -mercaptoetanol foi o agente redutor mais usado no princípio da técnica bidimensional, porém com ação tamponante, destrói o gradiente de pH na região básica das tiras de gel. O DTT passou então a ser utilizado por ser mais eficiente e apresentar melhores resultados (Rocha et al., 2005).

Para rompimento das interações hidrofóbicas, são usados detergentes não-iônicos com carga líquida neutra, um dos mais usados recentemente é o CHAPS (Rocha et al., 2005). Após a solubilização, a amostra contendo as proteínas é purificada, sendo eliminados os sais e outros interferentes.

Altas concentrações de sal aumentam a condutividade do gel na focalização isoeletrica (IEF) prolongando o tempo requerido para atingir o estado de equilíbrio. Uma das maiores dificuldades encontradas durante a padronização foi a presença de grande quantidade de sal nas amostras. Isto possivelmente está relacionado ao meio mineral em que as leveduras são cultivadas, e que não foi totalmente retirado durante as etapas de limpeza, resultando em um gráfico de IEF com acúmulo de Vh não satisfatório, conforme figura 1. O que melhorou o gráfico de IEF com consequente acúmulo do total de vh, foi a diminuição na quantidade de anfólitos usada na solução de reidratação, de 2 % segundo kolkman (2005) para 0.5%. Houve a tentativa de diminuição de 2.5% de DTT segundo kolkman (2005) para 1% na solução de reidratação, porém não foi notada nenhuma diferença significativa.

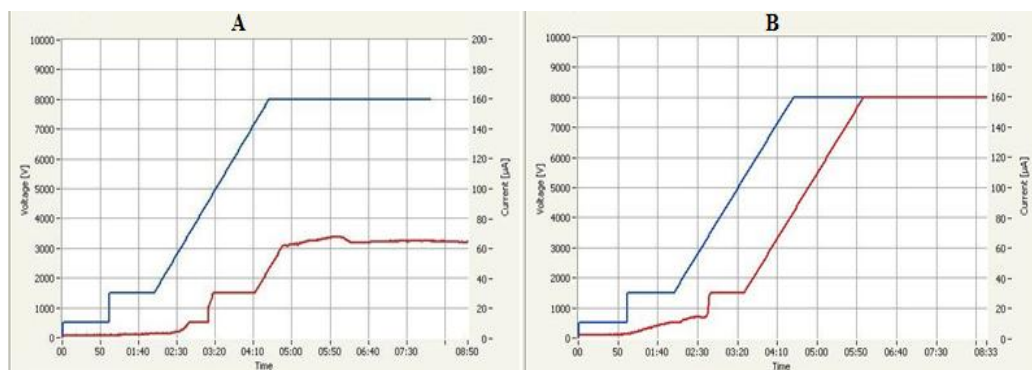


Figura 1. (a) gráfico de *focalização isoelétrica* da abordagem 1 onde foi utilizado 2% de anfólitos na solução de reidratação, com acúmulo total de 16.379 vh. (b) gráfico de *focalização isoelétrica* da abordagem 2 onde foi utilizado 0.5 % de anfólitos na solução de reidratação, com acúmulo total de 34.463 vh.

Para a levedura CAT-1 tentou-se a retirada de sais por diálise como uma etapa adicional de limpeza, porém o gráfico de IEF demonstrou que não houve um perfil satisfatório e nem acúmulo de Vh necessário, conforme figura 2. Não seguindo assim, com a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida.

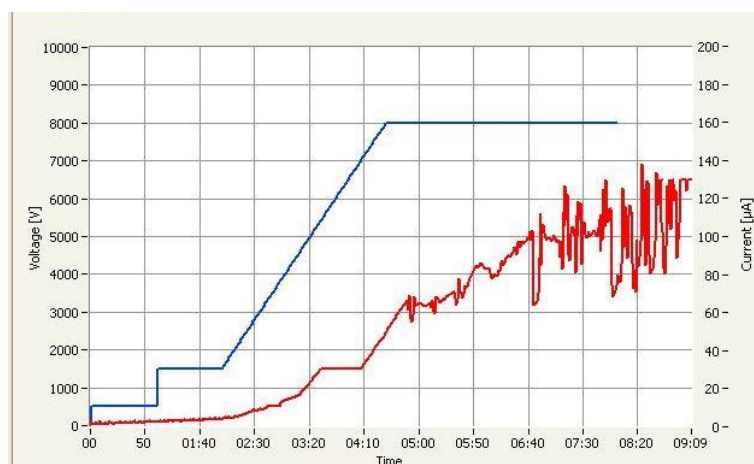


Figura 2. Gráfico de *focalização isoelétrica* com adição de etapa de diálise.

O sal pode ser removido precipitando as proteínas com solventes orgânicos como álcool e acetona (Gorg et al., 2004). Outros interferentes são os lipídeos que podem interagir com proteínas de membrana e consumir detergentes. Os lipídeos podem

ser removidos por centrifugações em alta velocidade (GE healthcare) e/ou utilização de álcool ou acetona, entretanto ocorre a perda de proteínas de baixo peso molecular.

Polissacarídeos e ácidos nucléicos aumentam a viscosidade da solução e interagem com anfólitos e proteínas, podendo obstruir os poros do gel de poliacrilamida. Para remoção dos sais, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos, foi utilizado o kit 2D clean-up (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA) e precipitação com metanol (Wessel & Flugge, 1983), sendo o kit 2D clean-up mais eficiente para uma melhor qualidade do gel, entretanto utilizando precipitação com metanol houve aparecimento de maior número de *spots* referente à levedura CAT-1, como pode ser visto na figura 5 (d).

A abordagem 1 para levedura 43 e a abordagem 4 para levedura CAT-1, permitiram a extração de uma grande variedade de proteínas, pois foi observada nos géis bidimensionais a presença de proteínas ácidas, básicas, de altas e de baixas massas moleculares. As etapas desse método possibilitaram a eliminação de muitos interferentes, garantindo géis de boa qualidade. Muitos autores relatam como aspecto favorável, quando a solução usada para solubilizar as proteínas do precipitado extraído possui constituição praticamente igual à da solução de reidratação, pois isso facilita a absorção das proteínas no gel de poliacrilamida durante a etapa de reidratação das tiras de ipg. Entretanto, as abordagens 1 e 4 que resultaram em géis com maior quantidade de proteínas, não utilizaram tampão de solubilização como forma de diminuir os interferentes durante a focalização isoeétrica.

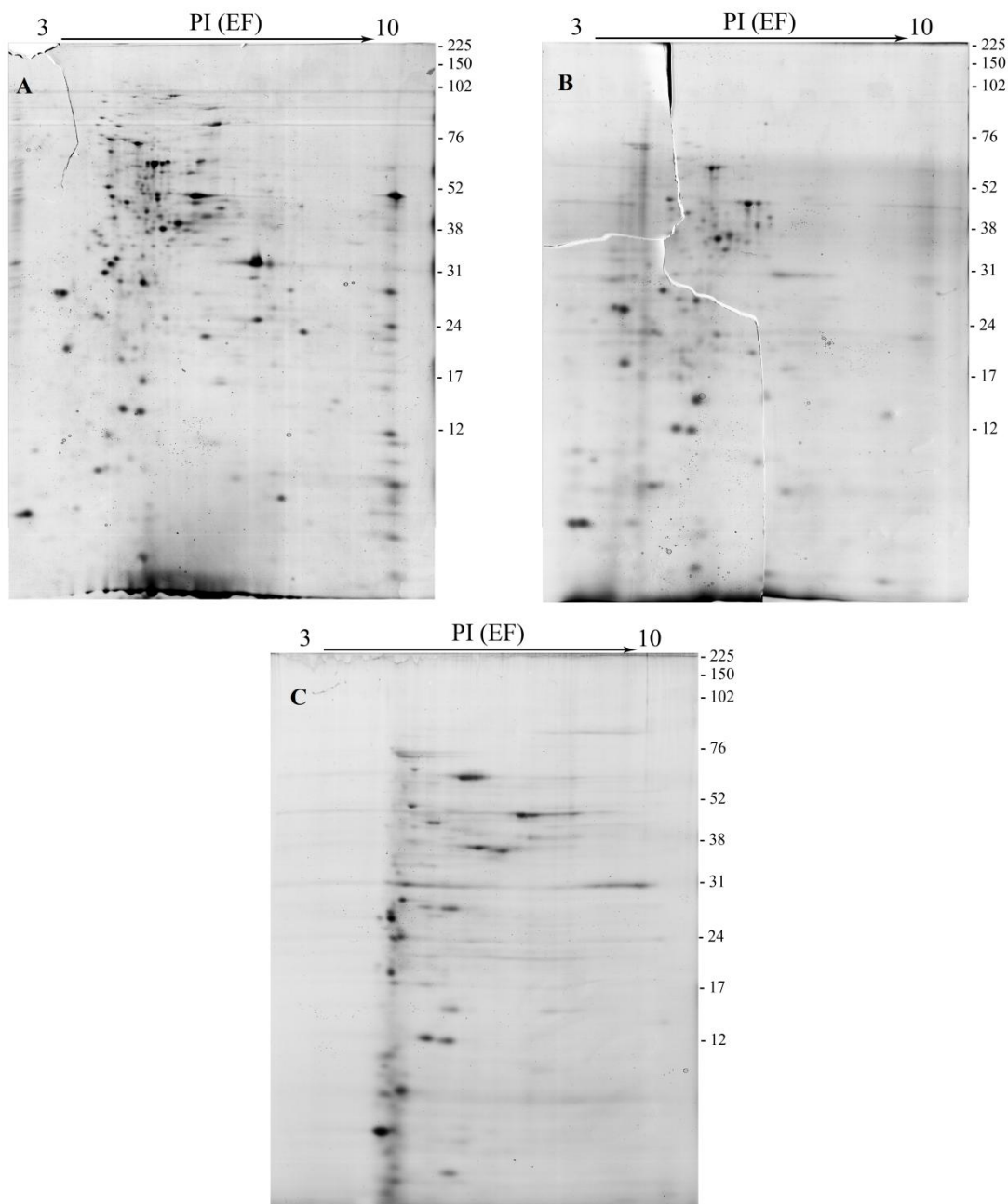


Figura 3 – separação das proteínas da levedura 43 por eletroforese bidimensional. Sendo o gel a referente à abordagem 1; b à abordagem 2, e c à abordagem 3. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas proteicas de 225 kda a 12 kda, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

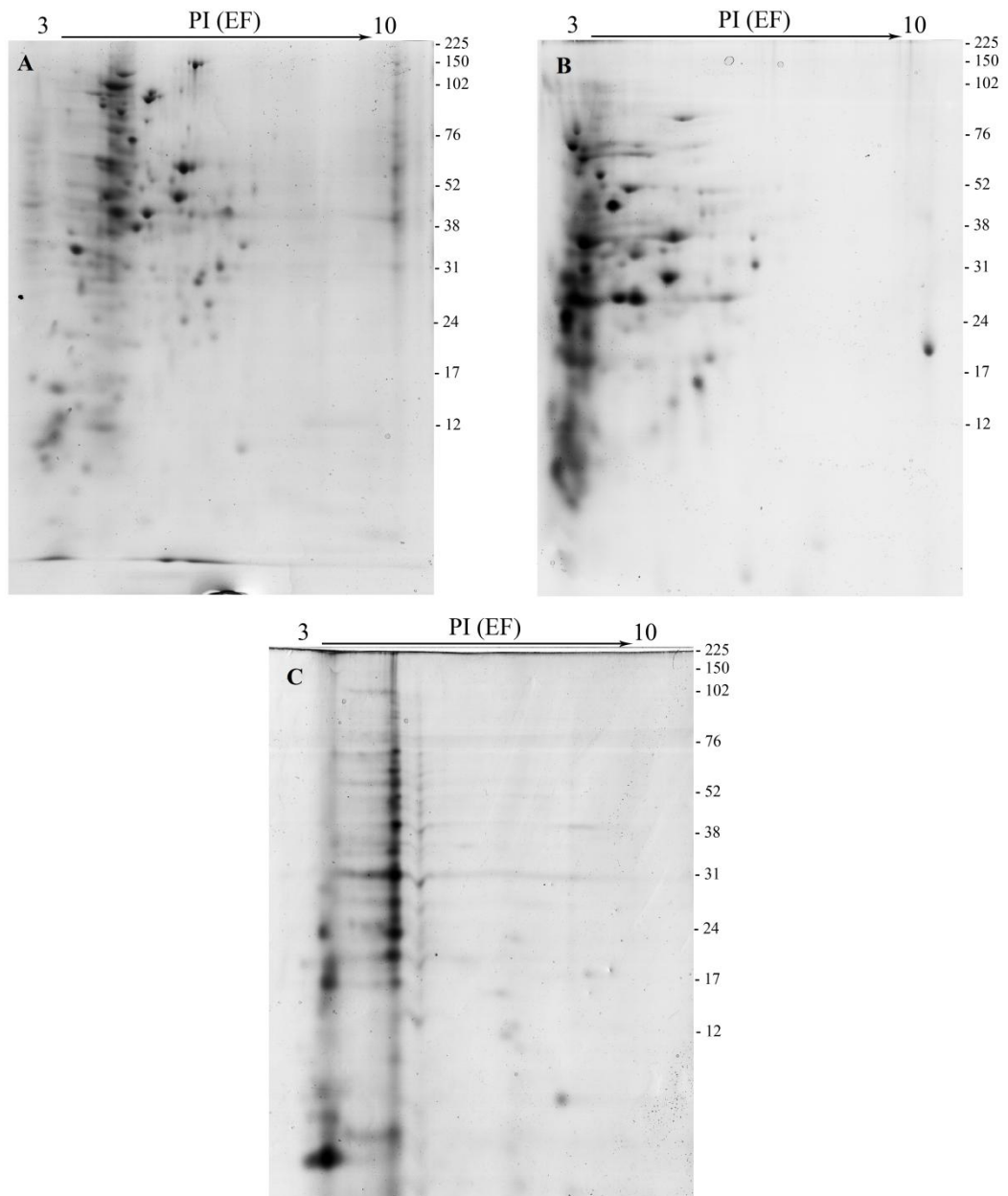


Figura 4 – separação das proteínas da levedura 42 por eletroforese bidimensional. Sendo o gel a referente à abordagem 4; b à abordagem 5, e c à abordagem 6. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas proteicas de 225 kda a 12 kda, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

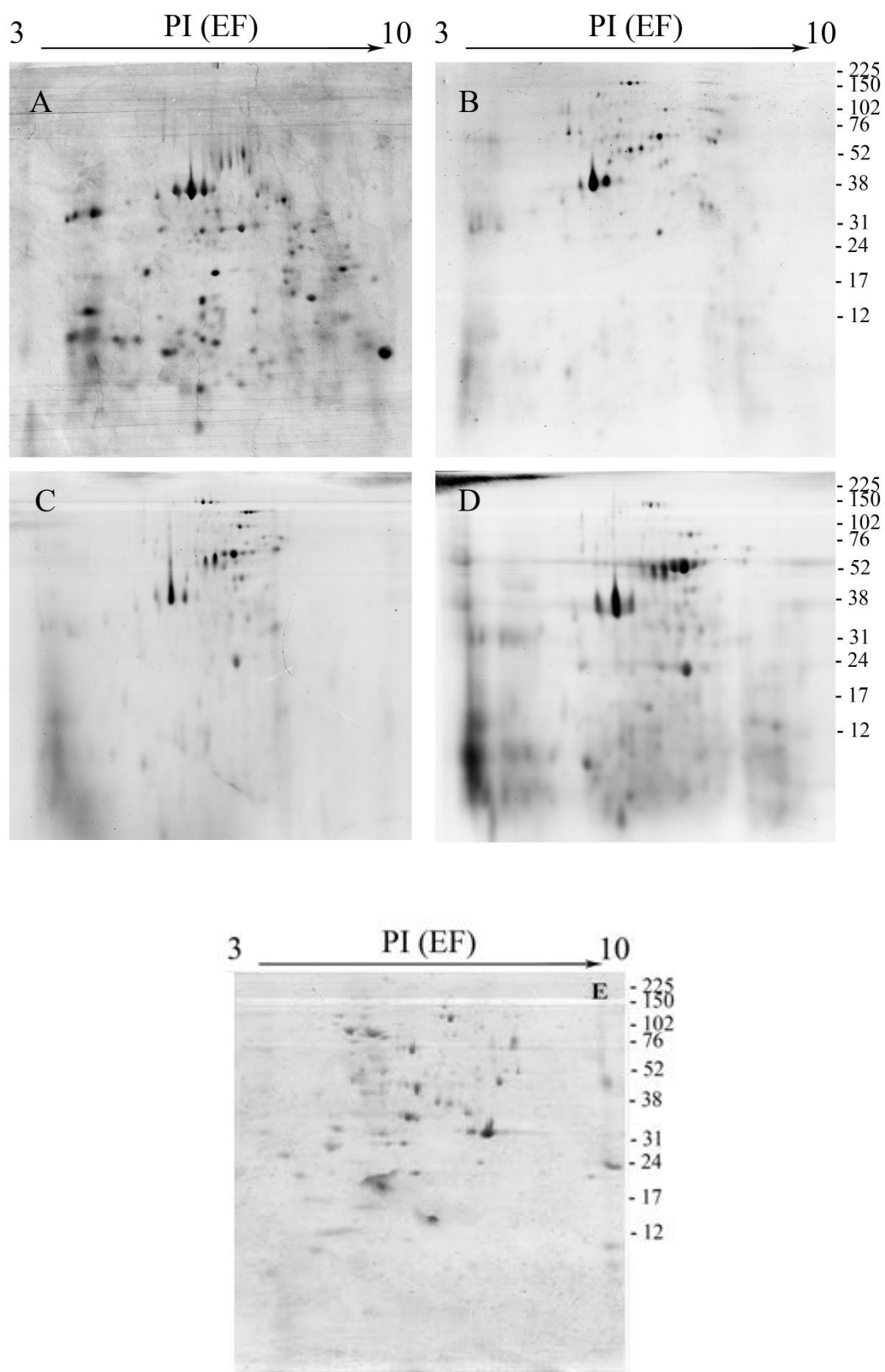


Figura 5 – separação das proteínas da levedura CAT-1 por eletroforese bidimensional. Sendo o gel A referente à abordagem 7; B à abordagem 8; C à abordagem 9; D à abordagem 10, e E à abordagem 11. A direção do gradiente de pH está indicada na parte superior dos géis. Foi usado marcador de peso molecular com bandas proteicas de 225 kda a 12 kda, cujas posições estão indicadas a esquerda dos géis.

2.3.2 Coloração

Foram utilizados diferentes métodos de coloração, como Coomassie Brilliant Blue G-250, Coomassie Brilliant Blue R-250, Coomassie R-350 e nitrato de prata. Não houve diferenças entre os mesmos, todos detectaram de forma satisfatória os *spots*.

2.3.3 Análise das imagens

Com o aumento da sensibilidade dos métodos de detecção e identificação das proteínas, tornou-se uma tarefa muito laboriosa e pouco confiável a análise dos géis 2D apenas por inspeção visual. Atualmente, estão disponíveis no mercado diversos softwares que podem oferecer aos pesquisadores um método automático, prático e estatisticamente seguro para análise comparativa dos géis 2D (Rocha et al., 2005).

Os géis de eletroforese bidimensionais corados foram digitalizados com o auxílio de um scanner *imagescanner ii*, e analisados com o *imagemaster 2D platinum v6.0* software da *amersham bioscience/ge healthcare*. Este sistema permitiu a contagem do número de *spots*, a análise dos níveis de expressão, assim como diversos outros recursos para o melhoramento da qualidade da imagem.

A análise das imagens dos géis foi estruturada da seguinte forma:

- 1) Edição das imagens
- 2) Detecção e edição dos *spots*
- 3) Análise diferencial dos *spots*

2.3.4 Edição das imagens

O tamanho das imagens selecionadas foi ajustado com o uso de ferramentas de imagem do software, assim como brilho e contraste, de maneira que todas as imagens apresentassem a maior semelhança entre si, de modo que facilite a comparação e a detecção das diferenças de intensidade entre os *spots*. Os ajustes na qualidade da imagem dos géis, como brilho e contraste, foram feitos com o objetivo de que as diferenças de abundância dos *spots* detectadas pelas análises sejam de fato biológicas, e não outras características das imagens ou ainda devido à coloração do plano de fundo do gel.

2.3.5 Detecção e edição dos *spots*

Após a digitalização das imagens dos géis bidimensionais, cada gel foi analisado individualmente. A detecção automática dos *spots*, realizada através do *software*, é muito sensível. Toda e qualquer alteração de intensidade do gel de poliacrilamida (manchas, por exemplo) são consideradas como *spot*, mascarando resultados. Deste modo, foram necessárias correções manuais para garantir que os *spots* marcados representem somente pontos protéicos (Bandil, 2008).

Para a detecção dos *spots* foram escolhidos os parâmetros para serem utilizados automaticamente em todas as imagens, para levedura CAT-1 os parâmetro de *smoth* e *mini-area* foram 9, sendo saliência com base em 350.000. Para a levedura 43, os valores para *smoth* e *mini-area* foram de 3 e 6 respectivamente, com saliência de 810.000. Já para levedura 42, *smoth* e *mini-area* foram de 9 e 9 respectivamente, com saliência de 410.000. Dessa maneira, o software teve padrões para a definição de *spots*, distinguindo-os de manchas inespecíficas presentes nas imagens. Após a detecção, os *spots* foram editados manualmente para eliminar qualquer erro cometido pelo software.

Tabela 5. Número de bandas detectadas em géis bidimensionais referentes a cada protocolo utilizado.

Leveduras	Abordagens	N° de bandas detectadas
43	1	283
43	2	218
43	3	86
42	1	91
42	2	110
42	3	99
CAT-1	1	187
CAT-1	2	118
CAT-1	3	91
CAT-1	4	216
CAT-1	5	192

A figura 3 mostra os géis com o número aproximado de *spots* bem definidos nas faixas de pH 3 a 7 para a, o que classifica esse método como melhor abordagem para a levedura 43. Na figura (b), os *spots* ficaram bem definidos, porém não tiveram uma boa separação isoeletrica, assim não se encontram *spots* nas medidas mais ácidas e mais

básicas de pH. Já na figura (c) tem-se uma imagem com estrias horizontais, e poucos *spots* detectados, porém na mesma faixa de pH que na imagem c, podendo ser resultado de uma amostra que precisou ser mais solubilizada, ou ainda aumentar a concentração de anfólitos, segundo (Healthcare, 2007).

A figura 4 mostra os géis com o número aproximado de *spots* em baixa abundância, porém bem definidos nas faixas de pH de 3 a 5, que pode ser característico do proteoma da levedura 42. Na figura 4 (b), em que se utilizou menos DTT e menos anfólitos, apesar de ter um acúmulo satisfatório na primeira dimensão, de ~35.000 vh, os *spots* não ficaram bem definidos e houve ausência de *spots* de maior peso molecular, provavelmente pela diminuição na quantidade de DTT, pois este como agente redutor, melhora a resolução dos *spots*. Na figura 4 (c), tem-se uma imagem com estrias horizontais, e poucos *spots* detectados, problema que pode ter sido causado por excesso de impurezas iônicas, e ainda a combinação de pouca quantidade de DTT, e demasiada quantidade de anfólito, combinação esta que não proporcionou uma separação iônica adequada. Na figura 4 (a), consta um gel com maior número de *spots* em relação ao b e o c, porém ainda com aparência e quantidade de *spots* insatisfatórios.

A figura 5 contém as imagens de protocolos abordados para levedura CAT-1. A imagem a representa a abordagem 1, apresentando *spots* bem definidos e uma separação isoelétrica satisfatória, já que os *spots* atingem toda a faixa de pH de 3 a 10. No entanto, em comparação com as outras imagens (b, c, d e e), percebe-se a ausência de proteínas de maior peso molecular, fato que pode ter ocorrido por proteólise da amostra, equilíbrio de DTT e iodocetamida insuficiente, fraca transferência de proteína da tira da primeira dimensão para a segunda, e ainda fraca reidratação da amostra na solução de reidratação. Todos estes fatores foram desconsiderados, pois foi utilizado inibidores de proteases; o tempo de equilíbrio da tira é o recomendado e igual às demais abordagens que não apresentaram esse problema; foi usada uma corrente inicial baixa para a transferência das proteínas da tira para o gel de poliacrilamida, e a amostra foi deixada reidratando por duas horas a temperatura ambiente. A imagem b e c representam praticamente o mesmo protocolo, sendo diferenciados com 150 µg de proteínas na imagem b, e 110 µg de proteínas na imagem c. Tal diferença foi proposta com a intenção de ser testado o desempenho do gráfico de focalização isoelétrica, porém os dois géis acumularam a mesma quantidade de vh e pouca diferença na quantidade de *spots*, sendo 118 para b e 91 para c, demonstrando que o uso de maior concentração de proteína é melhor para qualidade na resolução dos *spots*, já que em b os mesmos

apresentam-se mais destacados. Visto que foi utilizada uma etapa de centrifugação para solução de reidratação, se obteve como resultado o não aparecimento de proteínas de menor peso molecular, pois estas provavelmente foram sedimentadas, assim não foi utilizada tal etapa na imagem d.

Na imagem d, a extração de proteínas foi feita sem adição de tampão de solubilização, com precipitação com metanol e com 110 µg de proteínas, a fim de testar melhor separação isoelétrica sem muitos interferentes. O que demonstrou ser bastante eficaz, apresentando maior número de *spots* em relação à imagem a e maior resolução dos *spots* de maior peso molecular e aparecimento das proteínas de menor peso molecular. Assim como boa distribuição de *spots* em diferentes faixas de pH ao longo do gel.

Na imagem e foi testado um uma abordagem modificada de (Zhao et al., 2014). Tal abordagem apresentou características diferentes em relação aos outros géis da mesma levedura, como baixa resolução dos *spots*, e concentração dos mesmos numa faixa de pH de 3 a 8, mesmo tendo um gráfico de separação isoelétrica com acúmulo total de v_h adequado. Foi usada a etapa de centrifugação sequencial à reidratação, justificando o não aparecimento de proteínas de baixo peso molecular.

2.3.6. Análise diferencial dos *spots*

A intensidade de cada *spot* é dada pela sua densidade ótica (OD) obtida pela coloração utilizada. Baseado nos valores obtidos de intensidade, volume, área e saliência dos *spots* foi usado o *software Graphpad Prism*, em que foi aplicado o teste anova para a análise de diferenças significativas desses valores entre os diferentes protocolos aplicados para a mesma levedura. O teste compara a média de todos os valores, no caso os valores obtidos de um *spot* de um protocolo, com os valores obtidos de *spots* de protocolos diferentes, para determinar se há diferença significativa entre eles. O nível de significância escolhido foi 95%, sendo assim, 5% a probabilidade de aceitação de um falso-positivo para a diferença de características dos *spots*.

O componente básico de um gel é o *spot*, que delinea uma região relativamente pequena do gel onde a proteína está presente. Esta forma é automaticamente diferenciada por um algoritmo de detecção de ponto. Cada *spot* em uma imagem é quantificado, sendo sua intensidade, área, saliência e volume computado.

O parâmetro de saliência é uma medida baseada na curvatura do *spot*. Ela indica que medida o *spot* sobressai em relação ao seu ambiente. Os *spots* geralmente têm altos valores de saliência, manchas que não são proteínas têm valores de saliência pequenos. O programa calcula a intensidade de um *spot* baseando-se nas intensidades de maior pixel calibrado.

A área de um *spot* não é determinada em sua base, pois a base é muitas vezes arbitrária e difícil de determinar. Calcula-se em uma altura intermediária do *spot*. Mais precisamente, o *imagemaster* computa área de 75% da intensidade da mancha, tal como medido a partir do pico do *spot*. Os contornos exibidos no *imagemaster* rodeiam exatamente a área calculada do *spot* (em mm²).

O volume de um *spot* é calculado como o volume acima do esboço do *spot*, que se situa a 75% da sua altura (medido a partir do pico).

O objetivo da análise diferencial de *spots* é comparar as mudanças de expressão de proteínas entre os diferentes géis. A figura 6 representa a análise diferencial dos *spots* referentes à levedura CAT-1. Na imagem a, nota-se que a abordagem 4 se sobressai neste parâmetro, diferindo estatisticamente com $p < 0.05$ em relação às demais abordagens. O volume é uma medida bastante eficiente para avaliar diferenças de expressão de proteínas entre géis, já a intensidade não é tão relevante para a mesma função. No entanto, são observadas que as comparações de volume e intensidade são muito semelhantes, tendo como diferenças estatísticas somente (i) e (h). O que delineia que o relatório de quantificação dos *spots* para os géis de CAT-1 foram satisfatórios. Sendo a saliência baseada em altos valores para indicar a presença de proteínas, a imagem d ressalta como satisfatória a quantificação do relatório dos *spots*, trazendo pouca diferença estatística entre as abordagens, e ressaltando a diferença da abordagem 4 em relação às demais. Esta diferença é notória na imagem do gel desta abordagem, em que nota-se a diferença na qualidade de imagem dos *spots*.

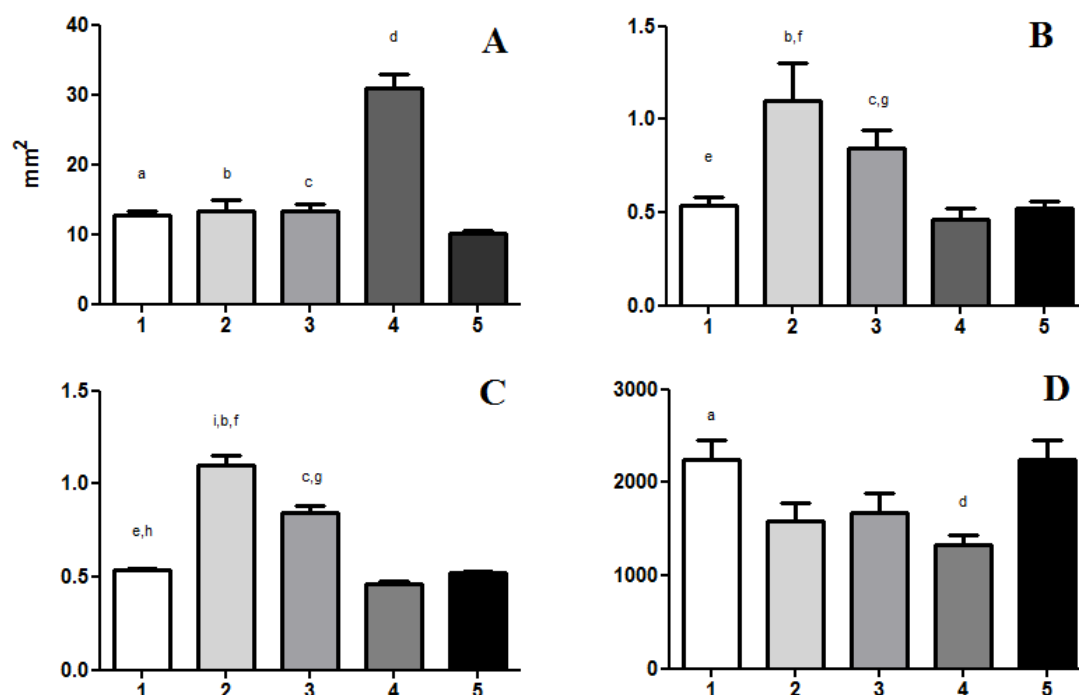


Figura 6. Estatística diferencial dos *spots* de CAT-1 (a) valores de área que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). $P < 0.05$ (a) 1 vs 4 (b) 2 vs 4 (c) 3 vs 4 (d) 4 vs 5. (b) valores de volume que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). $P < 0.05$ (e) 1 vs 2 (b) 2 vs 4 (f) 2 vs 5 (c) 3 vs 4 (g) 3 vs 5. (c) valores de intensidade que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). $P < 0.05$ (e) 1 vs 2 (h) 1 vs 3 (i) 2 vs 3 (b) 2 vs 4 (f) 2 vs 5 (c) 3 vs 4 (g) 3 vs 5. (d) valores de saliência que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). $P < 0.05$ (a) 1 vs 4 (d) 4 vs 5.

Na figura 7, é representada a análise diferencial dos *spots* para a levedura 43. A área dos *spots* para esta levedura tem um delineamento menor em comparação aos dados de área para levedura CAT-1 e levedura 42, sendo uma característica favorável em decorrência de uma boa corrida eletroforética na abordagem 1, resultando em boa visualização para posterior análise em espectrometria de massas. Houve diferença estatística somente entre 1 e 3, e 2 e 3, em detrimento do alto valor de área da abordagem 3, pois esta não resultou em *spots* bem definidos. Assim como nas análises para CAT-1, os valores de volume e intensidade para a levedura 43 são muito semelhantes, o que resulta de um relatório satisfatório de quantificação de *spot*, assim como a área, somente houve diferença estatística entre 1 e 3, e 2 e 3. Já para saliência, os valores foram relativamente baixo em relação às outras leveduras, e não houve diferença estatística entre as abordagens empregadas.

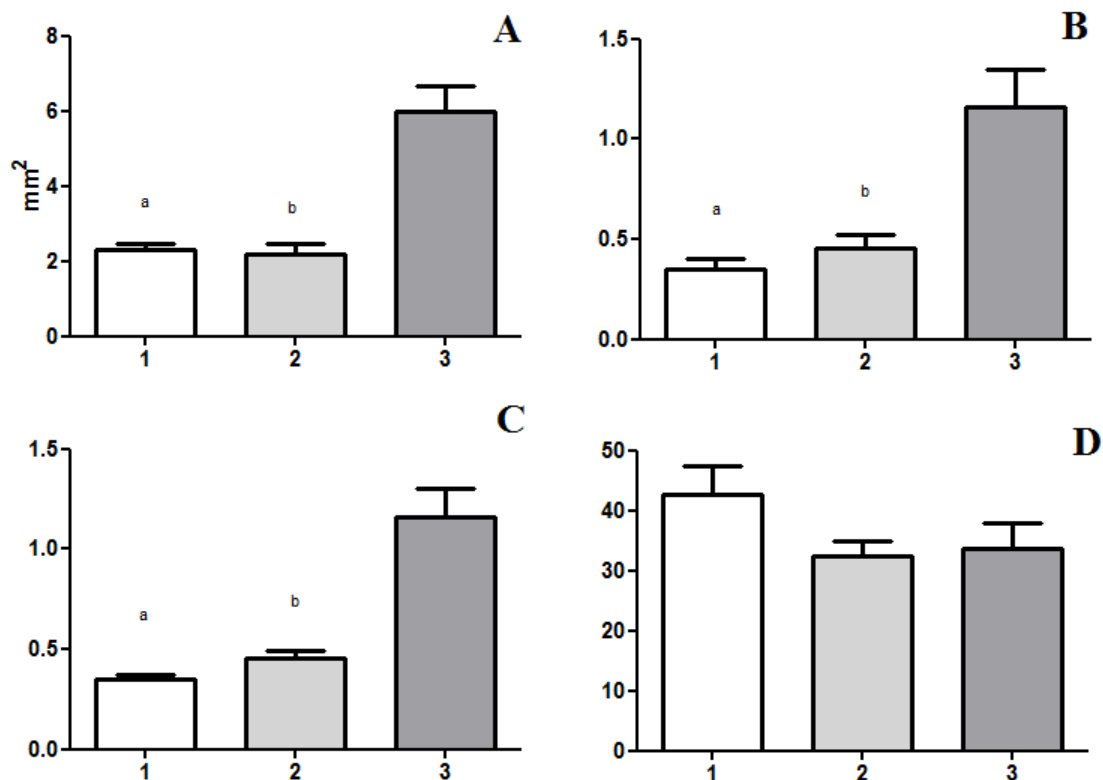


Figura 7. Estatística diferencial dos *spots* da levedura 43 (a) valores de área que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). $P < 0.05$ (a) 1 vs 3 (b) 2 vs 3. (b) valores de volume que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). $P < 0.05$ (a) 1 vs 3 (b) 2 vs 3. (c) valores de intensidade que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). (d) valores de saliência que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). $P < 0.05$ (a) 1 vs 3 (b) 2 vs 3.

A análise diferencial dos *spots* da levedura 42 está representada na figura 8. Para a levedura 42, não houve um protocolo de análise bidimensional satisfatória, em quesito de quantificação e qualidade de proteínas. Entretanto, os valores de área, volume, intensidade e saliência, resultam de um relatório de quantificação dos *spots* satisfatório. Na imagem a, houve diferença estatística entre 1 e 3, e 2 e 3, pois a abordagem 3 não resultou em uma definição de *spots* adequada, por este motivo apresenta alto valor do delineamento de área. Um ponto favorável a esta análise, foi a semelhança estatística de volume e intensidade assim como para as outras leveduras, não havendo nenhuma diferença entre as abordagens representadas. Apesar de pouca representação e baixa

qualidade de imagem dos *spots*, foram detectados altos valores de saliência, sugerindo confiabilidade na detecção das proteínas selecionadas. A diferença estatística ficou entre 1 e 3, e 2 e 3, conforme pode ser observado nas imagens dos géis correspondentes, onde o gel c (abordagem 3), se difere consideravelmente em relação ao gel a (abordagem 1) e gel b (abordagem 2).

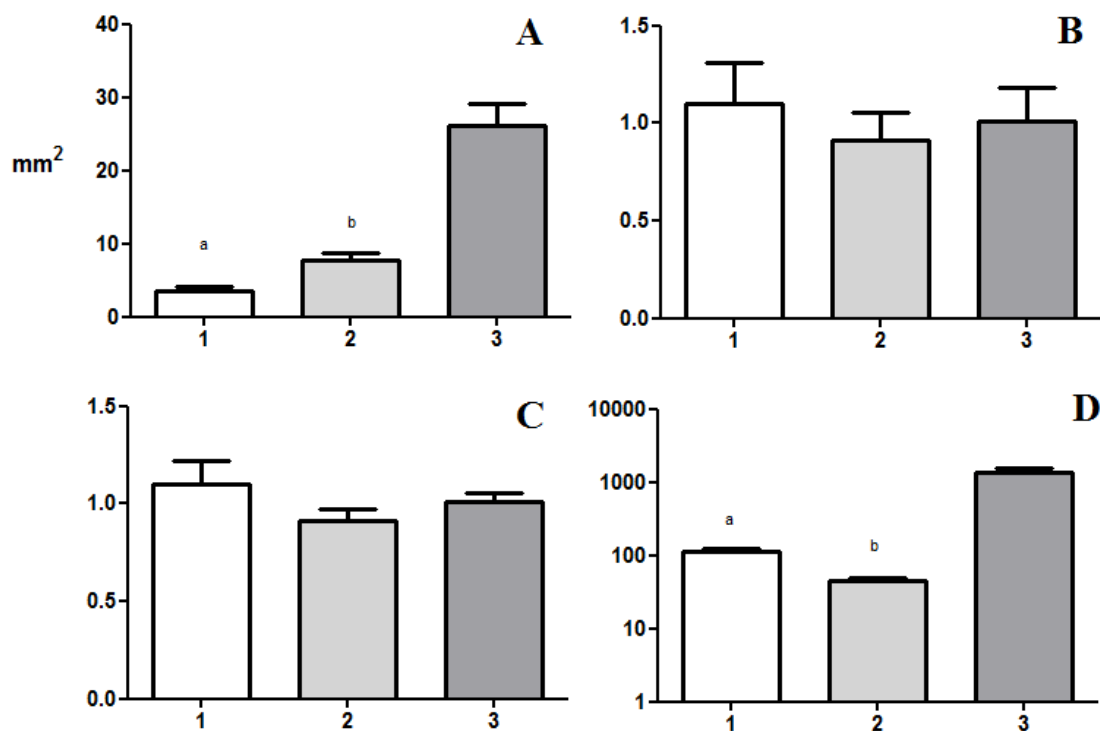


Figura 8. Estatística diferencial dos *spots* da levedura 42 (a) valores de área que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). $P < 0.05$ (a) 1 vs 3 (b) 2 vs 3. (b) valores de volume que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). (c) valores de volume que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). (d) valores de saliência que representam as médias \pm erro padrão da média (epm). $P < 0.05$ (a) 1 vs 3 (b) 2 vs 3.

2.4 CONCLUSÃO

A utilização de diferentes protocolos para a extração de proteínas das amostras de leveduras foi fundamental para verificar a influência que esses métodos exercem na alteração de proteínas visualizadas em eletroforese bidimensional. Além disso, verificamos também que a padronização do método de extração de proteínas e as condições das amostras no gel bidimensional devem ser específicas para cada levedura.

As redes de proteínas e suas interações são uma área de grande interesse, tais interações regulam a função celular, e, assim, compreender essas interações é uma fonte de interesse para a biotecnologia de sistemas.

Para a levedura 43, foi considerado como método padronizado a abordagem 1, pois foi satisfatório na quantificação e definição de *spots*. Para levedura 42, foram realizadas três tentativas para padronização, porém sem sucesso em alguma abordagem.

Já para levedura CAT-1, que foi submetida a cinco protocolos, não foi considerado até então um método que seja satisfatório para a padronização. Sendo assim necessário, mais tentativas de abordagens que satisfaçam em quantidade e qualidade de *spots* em uma mesma abordagem.

Todas as abordagens resultaram em aproximadamente 200 *spots*, fato que pode ser justificado pelo pouco tempo de cultivo das leveduras (em torno de 5 a 6 horas), tempo esse que foi estipulado para comparação com dados metabolômicos adquiridos em pesquisas já realizadas no laboratório. Para análise de proteoma total é sugerido cultivo acima de 20 horas (Zhao et al., 2014), ou até mesmo por 7 dias (Webb et al., 2013).

Em relação à análise diferencial dos *spots*, a visualização de dados específicos dos *spots* oferece uma técnica de detecção de mudanças das proteínas na pesquisa proteômica. Embora tais ferramentas não alterem os dados inerentes, as mesmas podem ser muito úteis na exibição de dados sobre a qualidade dos *spots*.

REFERÊNCIAS

- Bandil, B. G., 2008, **Análise Proteômica comparativa do fruto de café (*Coffea arabica*) em dois estágios iniciais de desenvolvimento**, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 84 p.
- Basso, L. C., H. V. De Amorim, A. J. De Oliveira, and M. L. Lopes, 2008, Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil: **FEMS yeast research**, v. 8, p. 1155-1163.
- Benitez, T., P. Martinez, and A. Codon, 1996, Genetic constitution of industrial yeast: **Microbiologia** (Madrid, Spain), v. 12, p. 371-384.
- Brill, L. M., K. Motamedchaboki, S. Wu, and D. A. Wolf, 2009, Comprehensive proteomic analysis of *Schizosaccharomyces pombe* by two-dimensional HPLC-tandem mass spectrometry: **Methods**, v. 48, p. 311-319.
- Camargo, J., 2013, **Estudo da fisiologia de diferentes leveduras industriais e isoladas na região Centro-Oeste**, Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, 95 p.

- Cristoni, S., and S. Mazzuca, 2011, *Bioinformatics Applied to Proteomics*, INTECH Open Access Publisher.
- Farrell, A. E., R. J. Plevin, B. T. Turner, A. D. Jones, M. O'hare, and D. M. Kammen, 2006, Ethanol can contribute to energy and environmental goals: **Science**, v. 311, p. 506-508.
- Futcher, B., G. Latter, P. Monardo, C. McLaughlin, and J. Garrels, 1999, A sampling of the yeast proteome: *Molecular and cellular biology*, v. 19, p. 7357-7368.
- Goldemberg, J., 2007, Ethanol for a sustainable energy future: **Science**, v. 315, p. 808-810.
- Görg, A., W. Weiss, and M. J. Dunn, 2004, Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics: **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685.
- Harder, A., R. Wildgruber, A. Nawrocki, S. J. Fey, P. Mose Larsen, and A. Görg, 1999, Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis: **Electrophoresis**, v. 20, p. 826-829.
- Healthcare, G., 2007, **2-D electrophoresis: Principles and methods**, GE Healthcare Limited.
- Hernández, M. L., P. Ximénez-Embún, M. Martínez-Gomariz, M. D. Gutiérrez-Blázquez, C. Nombela, and C. Gil, 2010, Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach: **Journal of proteomics**, v. 73, p. 1404-1409.
- Kiers, J., A. M. Zeeman, M. Luttik, C. Thiele, J. I. Castrillo, H. Steensma, J. P. Van Dijken, and J. T. Pronk, 1998, Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359: **Yeast**, v. 14, p. 459-469.
- Kolkman, A., M. M. Olsthoorn, C. E. Heeremans, A. J. Heck, and M. Slijper, 2005, Comparative proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostat cultures limited for glucose or ethanol: **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, p. 1-11.
- Leite, J. E. C., 2010, **Resistência a compostos anti-tumor e seus alvos biológicos**.
- Marullo, P., M. Bely, I. Masneuf-Pomarede, M. Aigle, and D. Dubourdiou, 2004, Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains: **FEMS yeast research**, v. 4, p. 711-719.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt, 1988, Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250: **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262.
- Querol, A., C. Belloch, M. T. Fernández-Espinar, and E. Barrio, 2003, Molecular evolution in yeast of biotechnological interest: **International Microbiology**, v. 6, p. 201-205.
- Rabilloud, T., C. Adessi, A. Giraudel, and J. Lunardi, 1997, Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: **Electrophoresis**, v. 18, p. 307-316.
- Rocha, T. L., P. Da Costa, J. C. Magalhães, R. G. Evaristo, E. de VASCONCELOS, M. Coutinho, N. Paes, M. Da Silva, and M. d. F. GROSSI-DE-SÁ, 2005, Eletroforese bidimensional e análise de proteomas: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico**.
- Stambuk, B. U., B. Dunn, S. L. Alves, E. H. Duval, and G. Sherlock, 2009, Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis: **Genome research**, v. 19, p. 2271-2278.

- Verduyn, C., E. Postma, W. A. Scheffers, and J. P. Van Dijken, 1992, Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation: **Yeast**, v. 8, p. 501-517.
- Webb, K. J., T. Xu, S. K. Park, and J. R. Yates III, 2013, Modified MuDPIT separation identified 4488 proteins in a system-wide analysis of quiescence in yeast: **Journal of proteome research**, v. 12, p. 2177-2184.
- Wessel, D., and U.-I. Flügge, 1984, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids: **Analytical biochemistry**, v. 138, p. 141-143.
- Zhao, S., X. Zhao, H. Zou, J. Fu, G. Du, J. Zhou, and J. Chen, 2014, Comparative proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under different nitrogen sources: **Journal of proteomics**, v. 101, p. 102-112.

3 Análise Proteômica da Levedura Industrial *S. cerevisiae* Cat-1 através da Tecnologia De Identificação Multidimensional de Proteína (MudPit)

RESUMO

A identificação e a compreensão dos mecanismos proteômicos, que regem o metabolismo a nível intracelular são hoje um dos maiores desafios para o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos. Desta forma, o desenvolvimento e aprimoramento de métodos experimentais para a detecção desses mecanismos regulatórios intracelulares são imprescindíveis, pois se torna possível compreender de maneira mais clara e ampla o funcionamento sistêmico das redes metabólicas presentes nos mais diversos organismos, no caso específico deste projeto, em *Sacharomyces cerevisiae* CAT-1. Neste trabalho, reportamos o proteoma total através de análise *shotgun* pela Tecnologia de Identificação Multidimensional de proteínas (MudPit) desta levedura a fim de elucidar suas vias metabólicas. A combinação dessas análises pode trazer *insights* sobre quais são as enzimas estão ativas e quais não estão e, em qual via metabólica específica e ainda sua localização celular. Em um segundo momento a proteômica foi comparada com a metabolômica já realizada anteriormente em nosso laboratório, destacando as proteínas Pgm1 e Mae1p, que tiveram suas funcionalidades destacadas entre as duas análises. Tudo isso produz informação fisiológica importante para espécies bem caracterizadas, tais como as atividades das vias do metabolismo do carbono central, e enzima málica.

Palavras-chave: proteoma total, *shotgun*, metabolismo.

3.1 INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos da proteômica é medir e quantificar o teor de proteína total de amostras em uma variedade de diferentes condições celulares. Com as recentes melhorias na instrumentação estamos progredindo cada vez mais perto desse objetivo. Várias publicações têm relatado a cobertura completa do proteoma de *S. cerevisiae*. Em 2008, Godoy e colaboradores, relataram a identificação de 4.399

proteínas na levedura. Esta abordagem envolveu grandes quantidades de extrato celular, de um extenso fracionamento e longo tempo de análise instrumental (Webb et al., 2013).

A capacidade para medir as diferenças na expressão da proteína tem se tornado chave para compreender os fenômenos biológicos (Hebert et al., 2014). Entre os sistemas celulares, o metabolismo é único porque a topologia da rede é quase completamente conhecida (Duarte et al., 2007); (Feist et al., 2008). Especificamente, a maioria das reações, as enzimas que catalisam tais reações, os genes que codificam as enzimas, e os metabolitos convertidos, já são conhecidas (Sauer, 2006).

Um desafio crítico na era pós-genômica é o desenvolvimento de métodos analíticos de proteínas para realização em larga escala de análises qualitativas e quantitativas de proteínas em tecidos, células, organelas e complexos. Este desafio levou ao rápido desenvolvimento de tecnologias em proteômica na última década. De especial importância à capacidade da proteômica a impactar em descobertas biológicas tem sido o acoplamento de tecnologias em espectrometria de massa na separação de proteínas e de péptidos (Washburn, 2004). Geralmente, a tecnologia 2D-PAGE permite uma cobertura limitada de um proteoma, e isso tem impulsionado a necessidade de desenvolver estratégias alternativas na proteômica.

Atualmente, Mudpit está provando ser uma excelente ferramenta para a análise detalhada de complexos proteicos e proteoma global. Nesta estratégia, um complexo de proteína de interesse é purificado, e cerca de um quarto da matéria após purificação final é analisado via espectrometria de massa. A vantagem é que mais material pode ser carregado numa coluna MudPit sem perdas de amostras como em géis bidimensionais (Washburn and Yates III, 2000).

Abordagens genéticas de todo o genoma pode certamente ajudar identificar e compreender a base molecular de traços complexos no organismo de *S. cerevisiae*. Desde o sequenciamento do genoma completo da estirpe de S288c (Goffeau et al., 1996), os genomas de várias outras estirpes de *S. cerevisiae* foram sequenciados fornecendo informações importantes sobre a diversidade molecular evolutiva e ecológica deste organismo modelo chave. Em 2012, Babrzadeh e colaboradores reportaram o genoma completo da estirpe CAT-1, uma das cepas mais comuns utilizadas hoje em dia pelas usinas de etanol combustível no Brasil. Neste trabalho, reportamos o proteoma total desta levedura a fim de elucidar suas vias metabólicas.

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Caracterização fisiológica de *S.cerevisae* CAT-1

3.2.1.1 Preservação e preparo do inóculo

A levedura *S.cerevisae* CAT-1 foim obtida liofilizada e então transferida para frascos tipo erlenmeyer, contendo 100 ml de meio líquido YPD (extrato de levedura, 10 g/l; peptona, 20 g/l; glicose, 20 g/l), para uma cultura *overnight* a 30°C (Kiers et al., 1998).

O preparo do inóculo consistiu em recolher uma única colônia de uma placa de petri contendo a linhagem e transferi-la para um frasco do tipo erlenmeyer, contendo 250 ml de meio mineral segundo (Verduyn et al., 1992) ajustado para pH 6,0. Após se atingir uma densidade óptica (DO) da cultura a 600 nm (do 600nm) de $1 \pm 0,05$, tempo suficiente para que o final da fase exponencial de crescimento fosse atingido (a 30°C e 200 rpm), certa quantidade deste inóculo foi transferida para o cultivo principal.

3.2.1.2 Meio de cultura

O meio mineral (Verduyn et al., 1992) foi ajustado para pH 6,0 e autoclavado (121°C, 20 min.). Depois de resfriado a temperatura ambiente, solução filtro-esterilizada de vitaminas e solução traço preparada em água desmineralizada foram adicionadas. Foi utilizado como fonte de carbono glicose à concentração final de 10 g^l.

3.2.1.3 Cultivos em incubador rotativo

Frascos do tipo erlenmeyer, contendo cada um 250 ml do meio de cultura definido, foram inoculados com células obtidas conforme descrito anteriormente. No meio da fase exponencial (Camargo, 2013), os cultivos foram interrompidos e a biomassa coletada para demais análises.

3.2.2 Análise proteômica

3.2.2.1 Recolha celular, lise e obtenção da fração protéica

Os extratos protéicos da levedura *S.cerevisae* CAT-1 foi preparado para análise *shotgun* utilizando uma abordagem modificada de (Kolkman et al., 2005). Em resumo, as células das leveduras foram recolhidas por centrifugação e liofilizadas antes da extração de proteína. Entre 65 e 75 mg de células de leveduras foi utilizado como material de partida para a extração de proteínas. As células de levedura foram suspensas

em 650 µl de solução tampão fervido a 95°C contendo SDS (0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, 1,0% (w / v) , suplementado com inibidores de protease (GE healthcare, Milwaukee, WI, EUA). Para lise mecânica, foram utilizadas esferas de vidro (600-800 µm) com agitação em vórtex em 6 tempos de 5 minutos cada. A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bio-rad, Hercules, CA) utilizando BSA como um padrão. Os sobrenadantes foram armazenados em alíquotas a -80°C.

3.2.2.2 Informação do cultivo das células, tampão e procedimento de lise.

Alíquotas de 100 µg de extrato proteico de *S. cerevisiae* CAT-1 foram precipitadas com clorofórmio e metanol (Wessel e Fluegge, 1984). Os precipitados foram ressuspensos em tampão com 8 M de ureia e 0,1 M de Tris, pH 7,5, e seguiu-se protocolo de digestão adaptado de Klammer e MacCoss (2006). Brevemente, pontes dissulfeto foram reduzidas com 10 mM de tris-2-carboxietil-fosfino (TCEP) por 20 min a 37°C e alquiladas com 50 mM de iodoacetamida por 20 min a temperatura ambiente, no escuro. A ureia foi diluída para a concentração de 2 M pela adição de tampão Tris e as proteínas foram digeridas com tripsina (Promega, USA) em uma razão de 1:100 (enzima:substrato) na presença de 1 mM de cloreto de cálcio por 18 h a 37°C. Ácido fórmico foi adicionado para finalizar a reação (5 % v/v, concentração final).

3.2.2.3 Colunas de MuDPIT, colunas analíticas e LC-MS/MS

Colunas de MuDPIT (Multidimensional Protein Identification Technology, (Washburn et al., 2002) foram preparadas bloqueando uma ponta de um capilar de sílica (diâmetro interno de 250 µm) com Kasil (silicato de potássio). Colunas foram empacotadas por pressão, em duas fases: a primeira composta de 2 cm de resina de fase reversa (Aqua 3µm C18, Phenomenex) e a segunda de 2 cm de resina de troca catiônica forte (Partisphere SCX, Phenomenex). Colunas analíticas foram fabricadas produzindo um *tip* de 3 µm de diâmetro interno em uma extremidade e empacotando por pressão 11 cm de resina de fase reversa (Aqua 3µm C18, Phenomenex).

O fracionamento por HPLC foi realizado em bombas de split-flow (Agilent). A separação dos peptídeos foi realizada a um fluxo de aproximadamente 300 nL/min. As soluções utilizadas são: solução A, 5 % acetonitrila/0.1 % ácido fórmico; solução B, 80

% acetonitrila/0.1 % ácido fórmico; solução C, acetato de amônio 500 mM /5 % acetonitrila/0.1 % ácido fórmico.

As amostras, 50 µg de extrato proteica em um volume de 150 µL de solução A (5 % de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico em água) foram carregadas diretamente nas colunas de MuDPIT por sistema de pressão. A separação cromatográfica por MuDPIT envolve gradientes bidimensionais de separação de peptídeos.

O programa cromatográfico automatizado consiste de vários ciclos. O ciclo inicial, de transferência, consiste de um gradiente de 70 minutos, em que a coluna de MuDPIT é submetida a um gradiente linear até 40 % solução B (90 % de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico em água) por 55 minutos; o sistema é então reequilibrado em solução por 15 minutos. Nessa etapa, todos os peptídeos da resina de C18 para a resina de troca catiônica forte.

A etapa de transferência é seguida de 10 corridas cromatográficas onde um breve pulso de solução C (acetato de amônio 500 mM, 5 % acetonitrila e 0,1 % de ácido fórmico em água) desloca peptídeos da resina de troca catiônica forte para a coluna analítica, onde um gradiente de separação de peptídeos de aproximadamente 2 horas é aplicado. Os pulsos de solução C são de 3 minutos e em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % de solução C). A separação de peptídeos consiste em gradiente linear de 0-40 % de solução B por 90 minutos seguida de gradiente isocrático de 40 % de solução B por 5 minutos e finalmente reequilíbrio do sistema em solução A por 10 minutos.

A eluição e emissão dos peptídeos em fonte de nano-eletrospray ocorreram diretamente da extremidade da coluna analítica. O instrumento LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific) foi programado para ciclos de aquisição, em modo de ionização positiva, de um espectro de MS1 no intervalo de razão massa/carga (m/z) de 400-1800 com resolução de 30.000 (em m/z 400) no Orbitrap, seguido de oito espectros de MS2 dos íons mais abundantes em baixa resolução no Iontrap. Dissociação induzida por colisão (CID) foi utilizado como método de fragmentação, com uma ativação Q de 0,250, um tempo de ativação de 30 ms, energia de colisão normalizada de 35%, e uma amplitude de isolamento de 1 Da. Para explorar a complexidade da amostra e adquirir espectros de peptídeos menos abundantes, massas de peptídeos adquiridos foram adicionadas a uma lista de exclusão dinâmica com tamanho de 100 íons e tempo de permanência de 30 s durante a aquisição dos espectros MS2.

3.2.2.4 Análise de Dados

Identificação de peptídeos e proteínas foi realizada com software *Patternlab for Proteomics* (Carvalho et al., 2012). Espectros de MS2 foram buscados diretamente dos arquivos RAW pelo software de busca *Comet* (Eng et al., 2013). O módulo *SearchDB* foi utilizado para gerar um banco de dados não-redundante de sequências das cepas CBS7960 e ZTW1, obtidos do *Saccharomyces Genome Database* (yeastgenome.org). O espaço de busca incluiu peptídeos candidatos com uma ou duas extremidades trípticas. Carbamidometilação de cisteínas foi considerada como modificação fixa. Dados foram buscados com tolerância de 50 ppm para íons precursores e 1 Da para íons fragmento. Espectros identificados foram filtrados usando o software *Search Engine Processor* (Carvalho et al., 2012). Peptídeos identificados foram agrupados de acordo com estado trípticos e carga. Os parâmetros Xcorr, DeltaCN, DeltaMass, Peaks Matched e Spec Count Score foram usados para gerar um *score* bayesiano. Um valor de corte foi estabelecido para aceitar 1% de falso positivo baseado nas identificações do banco de dados reverso. Adicionalmente, um comprimento de sequência mínimo de 6 resíduos foi usado. Os resultados foram pós-processados para acertar identificações com menos de 10 ppm de variação de massa.

3.3 RESULTADOS

As redes de proteínas e suas interações são uma área de grande interesse, tais interações regulam a função celular, e, assim, compreender essas interações é uma fonte de interesse para a biotecnologia de sistemas.

Misturas de proteínas geradas a partir de lisados de células eucariontes têm alta complexidade e criam um desafio para a criação de perfis de proteínas satisfatórios. Neste trabalho mostramos a identificação de proteínas por espectrometria de massa-cromatografia multidimensional conhecido como "MuDPIT", que permitiu a rápida identificação de proteínas presentes em uma mistura complexa de lisado da levedura *S. cerevisiae* CAT-1, ignorando alguns dos problemas associados com a análise de polipeptídeos excisados de géis de SDS-poliacrilamida. As células de levedura foram colhidas e as proteínas foram extraídas utilizando o protocolo desenvolvido por Harder et al., o que foi ainda otimizado para a nossa levedura CAT-1. No protocolo de Harder, as células de levedura são sonicadas em tampão contendo SDS para perturbar as paredes celulares e dissolver as proteínas. A fim de melhorar a desagregação de células e para

minimizar proteólise, foi realizado um passo adicional, as células foram liofilizadas e subsequentemente submetidas à ruptura celular com esferas de vidro, tal como descrito por (Boucherie et al., 1996), antes da ebulição com SDS. Além disso, os inibidores de protease foram adicionados à amostra com tampão SDS para a máxima redução da atividade da enzima proteolítica endógena. Foi observada maior concentração de proteínas na amostra quando foi utilizado este protocolo otimizado.

As proteínas recolhidas foram precipitadas e digeridas em solução de tripsina para gerar misturas de peptídeos complexos. Os peptídeos produzidos por digestão com tripsina foram então separados e introduzidos em um espectrômetro de massa, em que m/z são medidos e os espectros de fragmentação são criados. As sequências de peptídeos e as proteínas foram subsequentemente identificadas por bioinformática.

As análises dos resultados foram realizadas contra o banco de dados de três diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, S288C geralmente utilizada como estirpe padrão, CBS7960 isolado de uma usina brasileira produtora de etanol, ZTW1 um isolado de purê de milho usado para a produção de etanol industrial na China e um banco combinando o CBS e o ZTW. Esses bancos de dados foram baixados do SGD e tratados (remoção de redundâncias) com o *PatternLab*. Conforme é mostrado na Tabela 1, foi de preferência utilizar como resultado na identificação de proteínas a combinação dos bancos CBS + ZTW, em que se obteve 9962 sequências não redundantes, notavelmente com números distantes dos outros bancos.

Tabela 1. Foram testados 4 bancos de dados diferentes pertencentes ao SGD (*Saccharomyces Genome Database*). Todos os bancos de dados foram previamente tratados com o módulo *SearchDB* da plataforma *PatternLab for Proteomics*, para a combinação de sequências redundantes e apresentação de sequências não redundantes.

Banco de dados (SGD)	Sequências não redundantes
S288C	5818
CBS7960	5239
ZTW1	6253
CBS + ZTW	9962

Com base nesta análise foram identificadas 618 proteínas. Todas as sequências protéicas foram submetidas ao *Gene Ontology* (GO) (Ashburner et al., 2000), utilizando

o gProfiler -<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/> para busca de possíveis vias metabólicas envolvidas.

Como princípio neste estudo, serão discutidas as proteínas que foram classificadas como pertencentes ao metabolismo do carbono central, listadas na Tabela 1. No total, 65 proteínas que desempenham um papel no metabolismo central de carbono foram relativamente quantificadas e identificadas. Estas foram listadas em quatro categorias diferentes, ou seja, enzimas glicolíticas e da gliconeogênese, enzimas que convertem o piruvato em etanol e acetil-CoA e vice-versa, as enzimas do ciclo do TCA (ácido tricarbóxico), e enzimas do ciclo glioxilato e dicarboxilato.

Tabela 2. Proteínas identificadas envolvidas em vias de metabolismo do carbono central encontram-se na tabela com seus respectivos números de identificação (ORF). A última coluna contém a média (MD) dos espectros de massa das quatro replicatas submetidas ao sistema MudPit, e o desvio padrão das mesmas (DVP).

Proteína	Descrição	ORF	Qtde de abundância normalizada	
			MD	DVP
<i>Proteínas envolvidas no metabolismo do carbono central</i>				
Glicólise/Gliconeogênese				
CDC19	pyruvate kinase	YAL038W	0,00179035	0,000516722
PGI1	glucose-6-phosphate isomerase	YBR196C	0,003651783	0,002068408
PGK1	phosphoglycerate kinase	YCR012W	0,009523962	0,0080715
TPI1	triose-phosphate isomerase	YDR050C	0,020813984	0,013061036
ALD5	aldehyde dehydrogenase (NAD(P)(+))	YER073W	0,000152638	6,47443E-05
PDA1	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) subunit E1 alpha	YER178W	0,000339004	0,500169502
LPD1	dihydrolipoyl dehydrogenase	YFL018C	0,000287235	0,000199074
HXK1	hexokinase 1	YFR053C	0,000209566	9,34522E-05
HXK2	hexokinase 2	YGL253W	0,00063647	0,000549824
TDH3	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)	YGR192C	0,102163473	0,061875894
PFK1	6-phosphofructokinase subunit alpha	YGR240C	0,001052953	0,000594693
ENO1	phosphopyruvate hydratase ENO1	YGR254W	0,106471366	0,069707381
ENO2	phosphopyruvate hydratase ENO2	YHR174W	0,127314806	0,03978225
TDH1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)	YJL052W	0,004315975	0,001541164
TDH2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)	YJR009C	0,005944303	0,002757776
FBA1	fructose-bisphosphate aldolase	YKL060C	0,073278421	0,014548592
PGM1	phosphoglucomutase	YKL127W	0,000124896	1,93837E-05
GPM1	phosphoglycerate mutase	YKL152C	0,014932234	0,007585761
SHB17	Shb17p	YKR043C	0,000410079	0,500205039
PDC1	indolepyruvate decarboxylase 1	YLR044C	0,023882979	0,007366476
ACS2	acetate--CoA ligase	YLR153C	0,001112652	0,001044073
ADH3	alcohol dehydrogenase	YMR083W	0,000949223	0,001217243
PFK2	6-phosphofructokinase subunit beta	YMR205C	0,000866293	0,000148824
ADH1	alcohol dehydrogenase	YOL086C	0,00284344	0,000611519
ALD4	aldehyde dehydrogenase (NADP(+))	YOR374W	0,000672575	0,000547475
ALD6	aldehyde dehydrogenase (NADP(+))	YPL061W	0,000652849	0,000181017
Ramificação de piruvato				
CDC19	pyruvate kinase	YAL038W	0,00179035	0,000516722

DLD1	Dld1p	YDL174C	0,000169816	0,000100677
LYS20	homocitrate synthase	YDL182W	0,000847512	0,000516738
ALD5	aldehyde dehydrogenase (NAD(P)(+))	YER073W	0,000152638	6,47443E-05
PDA1	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) subunit E1 alpha	YER178W	0,000339004	0,500169502
LPD1	dihydrolipoyl dehydrogenase	YFL018C	0,000287235	0,000199074
PYC1	pyruvate carboxylase 1	YGL062W	0,000425665	0,000390548
MAE1	malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating)	YKL029C	0,000143197	2,9995E-05
MDH1	malate dehydrogenase	YKL085W	0,000592657	0,000367595
ACS2	acetate--CoA ligase	YLR153C	0,001112652	0,001044073
LEU4	2-isopropylmalate synthase	YNL104C	0,000118074	0,500059037
MLS1	malate synthase	YNL117W	0,000257007	0,577498652
ACC1	acetyl-CoA carboxylase	YNR016C	0,000433762	0,000240886
ALD4	aldehyde dehydrogenase (NADP(+))	YOR374W	0,000672575	0,000547475
ERG10	acetyl-CoA C-acetyltransferase	YPL028W	0,000316588	0,000211561
ALD6	aldehyde dehydrogenase (NADP(+))	YPL061W	0,000652849	0,000181017
Ciclo TCA				
PYC2	pyruvate carboxylase 2	YBR218C	0,000547016	0,000397475
KGD2	alpha-ketoglutarate dehydrogenase	YDR148C	0,001190738	0,00103161
PDA1	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) subunit E1 alpha	YER178W	0,000339004	0,500169502
LPD1	dihydrolipoyl dehydrogenase	YFL018C	0,000287235	0,000199074
PYC1	pyruvate carboxylase 1	YGL062W	0,000425665	0,000390548
KGD1	alpha-ketoglutarate dehydrogenase	YIL125W	#	#
MDH1	malate dehydrogenase	YKL085W	0,000592657	0,000367595
SDH1	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	YKL148C	0,00031522	0,000200221
ACO1	aconitate hydratase	YLR304C	0,002609311	0,002617122
IDH1	isocitrate dehydrogenase (NAD(+))	YNL037C	0,000292129	0,00019485
IDH2	isocitrate dehydrogenase (NAD(+))	YOR136W	0,000213015	8,17124E-05
Ciclo gliossilato e dicarbossilato				
SHM1	glycine hydroxymethyltransferase	YBR263W	0,000147223	2,73702E-06
CTA1	catalase	YDR256C	0,000141918	0,500070959
ICL1	isocitrate lyase 1	YER065C	0,00022757	3,96722E-05
MDH1	malate dehydrogenase	YKL085W	0,000592657	0,000367595
SHM2	glycine hydroxymethyltransferase	YLR058C	0,002924062	0,002013517
ACO1	aconitate hydratase	YLR304C	0,002609311	0,002617122
MLS1	malate synthase	YNL117W	0,000257007	0,577498652
ERG10	acetyl-CoA C-acetyltransferase	YPL028W	0,000316588	0,000211561
GLN1	glutamate--ammonia ligase	YPR035W	0,009418368	0,004587277

Também foram encontradas 14 vias metabólicas exceto a Via do Carbono Central, sendo mostrado na Fig. 1.

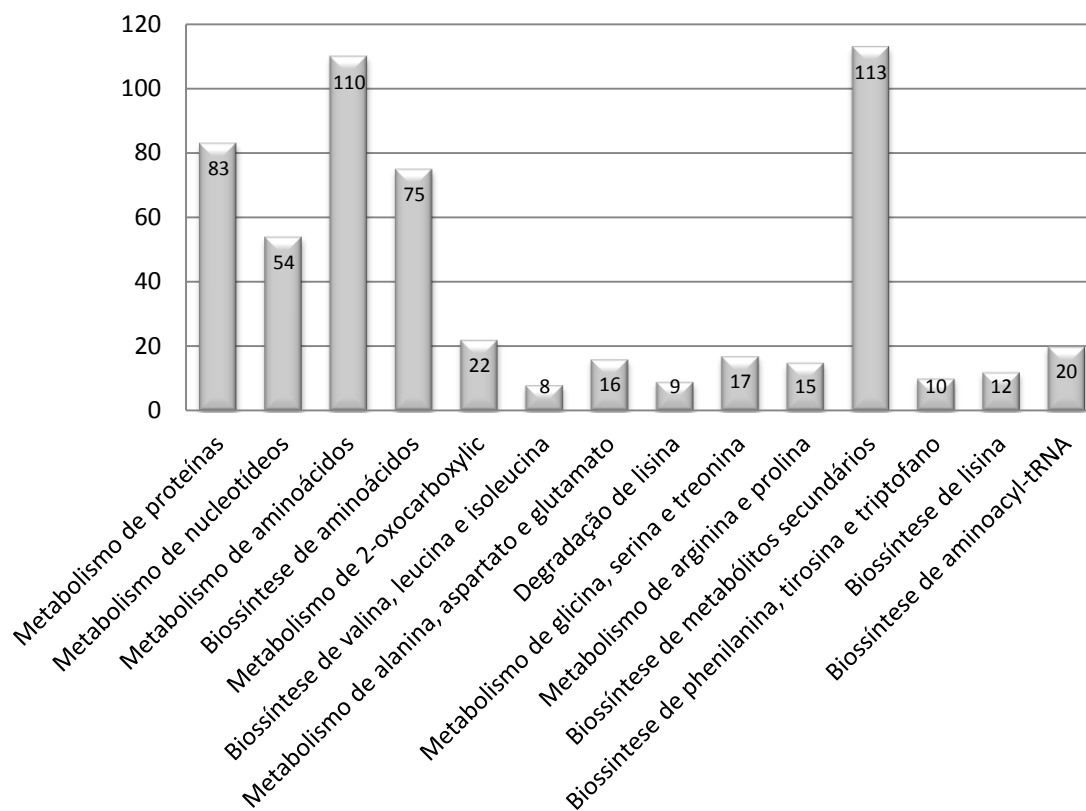


Figura 1. Análise do proteoma de CAT-1 representada por suas vias metabólicas exceto o metabolismo do carbono central. Foram identificadas 16 vias metabólicas. São indicadas em cada barra o número total de proteínas encontradas em cada via.

Para garantir ainda uma cobertura global do proteoma, investigou-se a localização celular das proteínas identificadas no lisado celular. A localização celular das proteínas identificadas foi obtida com base na classificação do banco de dados *SGD* (*Saccharomyces Genome Database*) (Cherry et al., 1998), onde foi usado como ferramenta o *SGD Gene Ontology Slim Mapper*. A distribuição celular de proteínas com

localização celular conhecida foi classificada e é mostrada na Fig. 2, em que 28% de proteínas identificadas estão localizados no citoplasma, 18% das proteínas identificadas estão localizados no espaço extracelular, 14% de proteínas identificadas estão localizados na mitocôndria, 10% de proteínas estão localizadas no complexo ribonucleoproteico, 8% de proteínas estão localizadas na membrana, 8% de proteínas estão localizadas no ribossomo, 7% de proteínas estão localizadas no núcleo, 3% de proteínas estão localizadas na membrana plasmática, 2% de proteínas não foram mapeadas pelo *software*, 1% de proteínas estão localizadas no complexo oxiredutase, e 1% de proteínas estão localizadas no retículo endoplasmático.

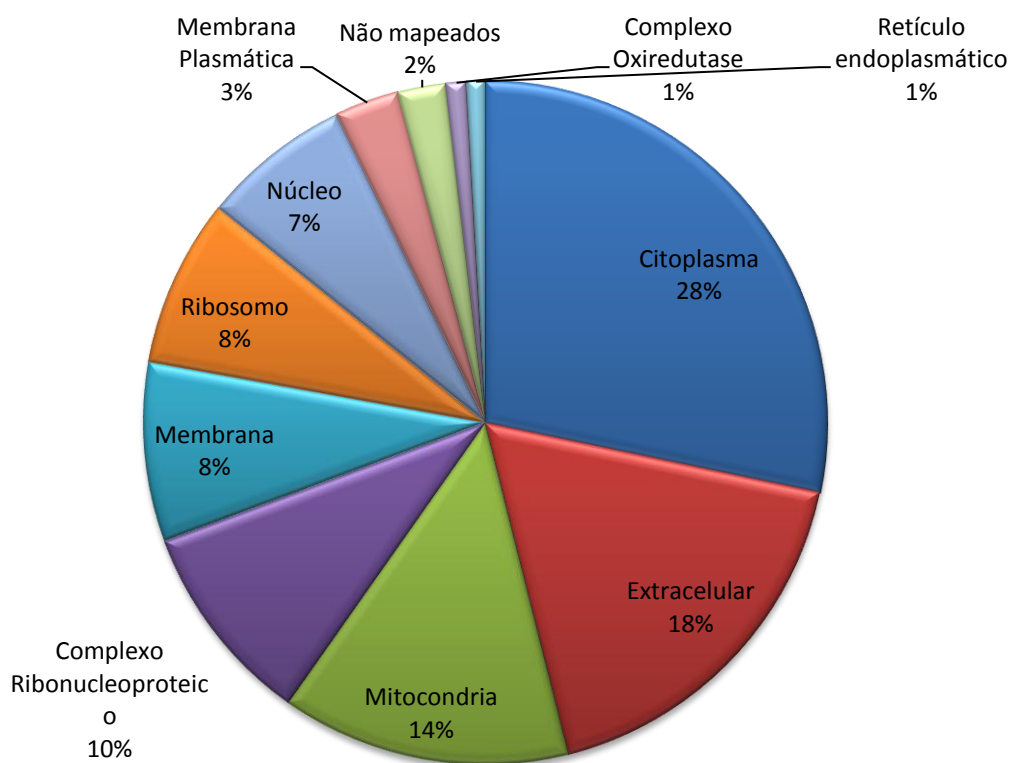


Figura 2. Localização celular das proteínas identificadas no lisado celular. Localização celular das proteínas identificadas foi designada pela base de dados *SGD (Saccharomyces Genome Database)*, onde foi usado como ferramenta o *SGD Gene Ontology Slim Mapper*. Porcentagem de proteínas em cada localização celular atribuída foi calculada com base no número de proteínas designadas pelo total das proteínas conhecidas, 28% de proteínas identificadas estão localizados no citoplasma, 18% das proteínas identificadas estão localizados no espaço extracelular, 14% de proteínas identificadas estão localizados na mitocôndria, 10% de proteínas estão localizadas no complexo ribonucleoproteico, 8% de proteínas estão localizadas na membrana, 8% de proteínas estão localizadas no ribossomo, 7% de proteínas estão localizadas no núcleo, 3% de proteínas estão localizadas na membrana plasmática, 2%

de proteínas não foram mapeadas pelo *software*, 1% de proteínas estão localizadas no complexo oxiredutase, e 1% de proteínas estão localizadas no retículo endoplasmático.

3.4 DISCUSSÃO

Foi analisada a resposta proteômica da levedura *S. cerevisiae* CAT-1, com crescimento em cultura limitada para glicose em meio aeróbico. O presente estudo permitiu a análise dos níveis de expressão das proteínas em nível de proteoma total, isto resultou na identificação de 20 vias metabólicas, sendo 4 destas vias pertencentes ao metabolismo do carbono central. Abaixo, vamos discutir em maior detalhe o resultado da nossa análise do proteoma, enfocando as diferentes partes do metabolismo de carbono central.

Proteínas Glicolíticas - As enzimas glicolíticas, que estão envolvidas na conversão de glicose em piruvato, apresentaram-se em um número significativamente alto totalizando 26 proteínas. (Carroll et al., 2011) descreveram a quantificação de enzimas da via glicolítica em *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando a estratégia QconCAT, e foram quantificadas 27 proteínas glicolíticas (incluindo isoformas). A única proteína não identificada em comparação a este estudo foi Glk1, que é transcricionalmente regulada em resposta a fonte de carbono do meio de crescimento, e é expresso a um nível basal na presença de glicose, reprimido mais de 6 vezes em condições de limitação de açúcar e mais do que 25 vezes em condições de indução etanol (Herrero et al., 1995). Em particular, a ativação e desativação da regulação de Hxk1p são mais provavelmente devido ao fato desta enzima catalisar o primeiro passo e irreversível na glicólise que é específica para o metabolismo da glicose. A enzima Hxk2p também é conhecida por estar envolvida neste primeiro passo na glicólise (Kolkman et al, 2005). A desativação de genes PPP (via das pentoses fosfato e fotossíntese) também ocorreu, já que somente foram identificadas 11 proteínas nesta via. À medida que a quantidade de oxigênio disponível para o metabolismo celular é reduzido, o fluxo relativo através da PPP diminui (Messiha et al., 2014), e o fluxo através da glicólise aumenta. No entanto, os transcritos de RNAm de genes envolvidos na glicólise e aqueles que estão envolvidos na PPP, são mantidos a níveis mais elevados em condições em que o oxigênio está prontamente disponível, como no cultivo realizado neste trabalho, do que em condições com pouco ou nenhum oxigênio (Daran-Lapujade et al., 2004). (ter Kuile and Westerhoff, 2001) procuraram determinar se o

controle sobre a rede metabólica ocorre em nível da transcrição e tradução (regulação hierárquica) ou por meio de regulação metabólica. Ao analisar enzimas glicolíticas por meio de modelos matemáticos, concluíram que a regulação quase nunca é completamente hierárquica, Daran-Lapujade et al, (2004) compararam dados transcriptômicos com distribuições de fluxo do metabolismo do carbono central, mostrando que há pouca correlação entre níveis de transcrição, os perfis de fluxo e a atividade da enzima. Apenas Hxk1 e Tdh1, mostraram uma diminuição no nível de transcrição, o que indica que os fluxos através da glicólise são controlados no nível pós-transcricional.

Enzimas em toda a Ramificação do Piruvato - Na via de ramificação do piruvato (o produto final da glicólise), o piruvato pode acompanhar três destinos metabólicos diferentes, dependendo das espécies de leveduras e condições ambientais (Pronk et al., 1996). Por outro lado, o fluxo de carbono pode ser distribuído entre os sistemas respiratórios e vias fermentativas. O piruvato pode ser convertido em acetil-CoA no citosol através de acetaldeído e para acetato pela Via PDH (complexo piruvato desidrogenase). Neste trabalho não foi identificada nenhuma enzima piruvato Descarboxilase, que converte piruvato em acetaldeído, fato que pode explicado pela maior expressão de genes PDC em condições anaeróbicas em que condições aeróbicas, segundo (van Hoek et al., 1998). Porém, foram identificadas 3 enzimas acetaldeído desidrogenase (ALD), ALD4, ALD5 e ALD6, que convertem o acetaldeído para acetato, e somente uma enzima da classe ACS, a ACS2, que converte acetato para acetil-CoA citosólica. Essas enzimas tem atividade chave na Via PDH, e podem então ser unidirecionalmente na mitocôndria através do sistema de carnitina acetiltransferase (Rodrigues et al., 2006). A subunidade de piruvato desidrogenase (Pda1), uma enzima que desempenha um papel na conversão global do piruvato em acetil-CoA e CO₂ (Kolkman et al., 2005), também foi identificada, no entanto com baixa abundância (Tabela 2).

Proteínas do Ciclo Tricarboxílico - A maioria dos genes envolvidos no ciclo do TCA foram identificados, como seria de esperar em um cultivo aeróbico. Foram identificadas as enzimas IDH1 e IDH2, as isocitrato desidrogenase (DIH) que são ativadas pela AMP e inibidas por ATP (Hu, et al., 2006), enquanto baixo nível de NADH / NAD⁺ favorecem a atividade das enzimas principais envolvidos no controle do ciclo. Os principais locais de regulação no ciclo TCA estão no nível de citrato sintase, isocitrato desidrogenase e α -cetogluturato desidrogenase (Papini, 2012), neste

trabalho foram identificadas também as enzimas KGD1 e KGD2, que são enzimas α -cetoglutarato desidrogenase, porém não foi identificada nenhuma enzima citrato sintase. ACO1 também foi identificada e juntamente com KGD1 são os genes com maior índice de abundância em relação aos espectros de massa obtidos, ACO1 é um gene que codifica a enzima aconitase que catalisa a segunda reação de ciclo TCA, levando à conversão de citrato em isocitrato (Papini, 2012), MDH, também encontrada, codifica malato desidrogenase, uma enzima que catalisa a última reação do ciclo TCA. Curiosamente, a proteína desidrogenase lipoamida, que é codificada pelo gene *LPDI*, é também um componente de piruvato desidrogenase, complexos de aminoácidos de cadeia ramificada e complexo desidrogenase. Entre as enzimas mais importantes do Ciclo TCA, *SDHI* foi também identificado, e codifica a succinato desidrogenase que é uma proteína de membrana integral constituída por quatro subunidades (Przybyla-Zawislak et al., 1999). Segundo (Nakayama et al., 2008), com *S. cerevisiae* em condições aeróbias, a produção extracelular de ácido succínico é marcadamente aumentada pelo rompimento de *SDHI*. Isto significa que o metabolismo do ácido é dependente da atividade da parte oxidante do ciclo de Krebs, e a produção de ácido é diretamente regulada pelo complexo SDH.

Proteínas do Ciclo de Glioxilato e Dicarboxilato – O ciclo do glioxilato é uma modificação do ciclo do TCA, utilizado para converter compostos C2 em ácidos dicarboxílicos C4 contornando a descarboxilação oxidativa. Na presença de glicose acima de 1%, por exemplo, a síntese das enzimas desta via é reprimida, enquanto este desvio é ativo em condições totalmente respiratórias. A localização desta via é ainda uma questão de debate e parece ser capaz de operar tanto nos peroxissomas e no citosol (Papini, 2012), Isocitrato Liase (Icl1) e malato sintetase 1 (Mls1), que são ambas enzimas-chave no ciclo do glioxilato, foram detectadas neste trabalho. O ciclo do glioxilato é composto por cinco atividades enzimáticas, dois dos quais são exclusivos para o ciclo, ou seja, ICL1 e Mls1, enquanto as outras três atividades, citrato sintase, aconitase e malato desidrogenase, são compartilhados com o ciclo TCA e são frequentemente realizados por isoenzimas (Piekarska et al., 2008), SHM1 e SHM2 são os genes que codificam as vias para a formação de L-serina e L-glicina, Organismos procarióticos contêm um único SHMT, enquanto os eucariotas produzem isoformas citoplasmáticas e mitocondriais, cada um codificado por genes nucleares separados, assim, em *Saccharomyces cerevisiae* o gene *SHM1* é mitocondrial e *SHM2* é citosólica, Recentemente, foi sugerido que a síntese de DNA induzida pelo análogo de aminoácido

mimosina, ocorre através da inibição da SHMTs em células de mamífero. Deste modo, estes resultados indicam que SHMT é uma enzima essencial. Em contraste, (McNeil et al., 2000) relataram que a ruptura de um ou ambos os genes de SHMT em *Saccharomyces cerevisiae*, não resultou em qualquer necessidade auxotrófica, assim ainda permanece incerta sua função nesta via.

Proteoma global de S. cerevisiae CAT-1

Foram identificadas 14 Vias metabólicas exceto ao metabolismo do carbono central, conforme a Fig. 1. São mais de 500 proteínas distribuídas entre essas vias, sendo o metabolismo de aminoácidos e a biossíntese de metabólitos secundários as vias com mais proteínas envolvidas, 110 e 113 respectivamente. As famílias de aminoácidos são facilmente identificáveis neste trabalho e incluem a família de glutamato (o glutamato, glutamina, arginina, prolina, e lisina); a família aromática (fenilalanina, tirosina e triptofano); a família de serina (serina, glicina, cisteína e metionina); a família aspartato (aspartato, asparagina, treonina, e α -aminoácidos contendo enxofre cisteína e metionina); e a família piruvato (alanina e o ramificada aminoácidos valina, leucina e isoleucina). A histidina e a via de biossíntese de nucleotídeos estão ligadas, isso explica a alta quantidade de proteínas identificadas no metabolismo de nucleotídeos, com uma margem de 54 proteínas. A importância do glutamato e glutamina, e conseqüentemente as reações núcleo central no metabolismo do nitrogênio, tornam-se aparente, realçando o seu envolvimento em reações de transaminação necessárias para a síntese de cada um dos aminoácidos (Ross et al., 2004). Os microrganismos, na fermentação industrial, produzem metabólitos primários e secundários, Os metabólitos primários são formados ao mesmo tempo em que as células e a curva de produção seguem a curva de crescimento celular, quase em paralelo, com um atraso mínimo (Soares, 2006).

Já os metabólitos secundários não são produzidos até que o microrganismo tenha completado toda sua fase de crescimento logarítmico e tenha iniciado sua fase estacionária (TORTORA et al., 2000). De acordo com Soares (2006), estima-se que 5% do açúcar metabolizado pela levedura sejam desviados para gerar produtos secundários da fermentação, sendo que o restante, 95%, resultam no rendimento em etanol. Assim, fermentação alcoólica produz álcool etílico em maior quantidade e muitos outros compostos secundários, tal como aldeído, metanol, álcoois superiores, ácidos e ésteres (Soares, 2006). Em contraposição, neste trabalho foram encontradas mais enzimas

referentes ao aldeído do que ao etanol, podendo ser pelo meio de cultivo utilizado, já que o objetivo não foi fermentação para obtenção de etanol. Em relação ao etanol foram encontradas as enzimas Pcd1, Adh1, Adh3 e Ald4, já relacionadas ao aldeído foi identificado um número maior, como as enzimas Tdh3, Tdh2, Tdh1, Tk11, Tk12, Adl6, Lys9, Lys2, Ald5 e Hom2. Não foi encontrada nenhuma proteína específica para metanol e ésteres. A natureza e a qualidade desses componentes dependem do material bruto, fermentação, destilação e envelhecimento (Dato et al., 2005) (Estevez et al., 2004), provavelmente por isso não se obteve um número ainda maior de proteínas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários, mas ainda assim houve uma identificação satisfatória com 113 proteínas.

Localização Celular das proteínas identificadas

Dados de localização de proteínas são uma valiosa fonte de informação útil para elucidar a função da proteína eucariótica (Kumar et al., 2002). A localização celular das proteínas identificadas foi obtida com base na classificação do banco de dados *SGD (Saccharomyces Genome Database)*, onde foi usado como ferramenta o *SGD Gene Ontology Slim Mapper*. A distribuição celular de proteínas com localização celular conhecida foi classificada e é mostrada na Fig. 2, em que 28% de proteínas identificadas estão localizados no citoplasma, 18% das proteínas identificadas estão localizados no espaço extracelular, 14% de proteínas identificadas estão localizados na mitocôndria, 10% de proteínas estão localizadas no complexo ribonucleoproteico, 8% de proteínas estão localizadas na membrana, 8% de proteínas estão localizadas no ribossomo, 7% de proteínas estão localizadas no núcleo, 3% de proteínas estão localizadas na membrana plasmática, 2% de proteínas não foram mapeadas pelo *software*, 1% de proteínas estão localizadas no complexo oxiredutase, e 1% de proteínas estão localizadas no retículo endoplasmático. O maior número de proteínas está localizado no citoplasma, com 28%, podendo pelo menos em parte, ter funcionalidades na manutenção e organização citoplasmática específica. A maioria destas proteínas (para funções que foram previamente atribuídas) está envolvida em ambos os processos de transcrição ou organização do citoesqueleto (Kumar et al., 2002). No nosso estudo, vários fatores de transcrição foram localizados, pelo menos em parte, para o citoplasma. Por exemplo, verificou-se o ativador de transcrição Pho4p localizado predominantemente no citoplasma. Este achado está de acordo com um trabalho

publicado na qual Pho4p encontra-se concentrada no núcleo apenas em condições de ausência de fosfato, em outras situações é encontrada no citoplasma (O'Neill et al., 1996). Estudos de localização celular em *S. cerevisiae*, como (Hu et al., 2006) e Kumar A. et al. (2002), indicam que a maioria das proteínas localizadas estão entre o citoplasma e o núcleo, o que não ocorre neste trabalho, já que somente 7% das proteínas identificadas são correlacionadas ao núcleo, fator que ainda não encontramos explicação. Devido à localização e a função da proteína estarem fortemente correlacionadas, a nossa análise de localização global fornece um meio através do qual a função de genes em levedura pode ser inferida numa escala de todo o genoma.

Análise Metabolômica versus Análise Proteômica

Os experimentos de metabolômica fornecem resultados únicos para melhorar a compreensão das informações biológicas relacionadas ao metaboloma e mais comumente à genômica funcional. O tamanho do metaboloma varia muito de acordo com cada organismo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, contém aproximadamente 600 metabólitos, identificados até o momento (Abdelnur, 2011). Foi realizada em nosso laboratório a análise metabolômica da levedura CAT-1 por Camargo (2013). A fim de realizar uma biologia de sistemas, será comparada neste trabalho a análise metabolômica com a análise proteômica.

De acordo com Camargo (2013) foi observado um metabolismo respiro-fermentativo durante a fase exponencial, o que é confirmado neste trabalho já que a maioria das proteínas das vias respiratória foi identificada em considerável abundância. As frações de glicose desviadas para a via das pentoses fosfato e para a via fermentativa foram inferiores aos valores previamente reportados para outras linhagens de *S. cerevisiae*. Em geral, as enzimas glicolíticas, na metade superior da via são reguladas para cima, enquanto aquelas na metade inferior são reguladas negativamente. Segundo (Gombert et al., 2001) isto sugere que o fluxo glicolítico é redirecionado, talvez para a via das pentoses fosfato, como evidenciado pelas alterações na expressão de várias enzimas da via das pentoses fosfato, em particular a enzima Pgm1 encontrada neste trabalho por análise proteômica, porém em baixa abundância com valor de 0,00012.

Ainda, na análise metabólica o fluxo correspondente à enzima málica foi superior ao observada em estudos anteriores. Boles et al. (1998) demonstraram que a

enzima málica (Mae1p), tem um papel que continua a ser bastante intrigante, e é ativa quando *S. cerevisiae* cresce em glicose. Esta enzima catalisa a conversão mitocondrial de malato em piruvato e pode explicar as diferenças entre as vias de piruvato e fosfoenolpiruvato, porém na análise proteômica é identificada em baixa abundância com 0,00021, o que pode ser explicado pelo fato de que sua regulamentação e localização sugerirem um papel na prestação de NADPH intramitocondrial ou piruvato sob condições de crescimento anaeróbias (Boles et al., 1998).

3.5 CONCLUSÃO

A análise de vias metabólicas, tal como aplicado no presente trabalho para as células de *S. cerevisiae* CAT-1, é uma ferramenta que pode ser utilizada para a inspeção quantitativa do metabolismo. O primeiro passo nesta análise foi a identificação da rede de proteínas, que conseguimos por análise shotgun em coluna MudPit e espectrometria de massas e análise bioinformática. A combinação dessas análises trouxe *insights* sobre quais as enzimas estão ativas e quais não estão. Foram classificadas 20 vias metabólicas entre as 618 proteínas identificadas na análise *shotgun*. O maior número de proteínas está localizado no citoplasma, com 28% podendo pelo menos em parte, ter funcionalidades na manutenção e organização citoplasmática específica. Somente 7% das proteínas estão localizadas no núcleo, um número abaixo em relação aos já descritos na literatura. Em um segundo momento a proteômica foi comparada com a metabolômica já realizada anteriormente em nosso laboratório, destacando as proteínas Pgm1 e Mae1p, que tiveram suas funcionalidades destacadas entre as duas análises. Tudo isso produz informação fisiológica importante para espécies bem caracterizadas, tais como as atividades das vias do metabolismo do carbono central, e enzima málica, como mostrado neste trabalho com *S.cerevisiae* CAT-1. A análise de vias metabólicas é uma ferramenta promissora para a investigação de outras espécies pouco caracterizadas com potenciais para aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, and J. T. Eppig, 2000, Gene Ontology: tool for the unification of biology: **Nature genetics**, v. 25, p. 25-29.
- Boles, E., P. de Jong-Gubbels, and J. T. Pronk, 1998, Identification and Characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme: **Journal of bacteriology**, v. 180, p. 2875-2882.
- Boucherie, H., F. Sagliocco, R. Joubert, I. Maillet, J. Labarre, and M. Perrot, 1996, Two-dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae*: **Electrophoresis**, v. 17, p. 1683-1699.
- Camargo, J., 2013, **Estudo da fisiologia de diferentes leveduras industriais e isoladas na região Centro-Oeste**, Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, 95 p.
- Carroll, K. M., D. M. Simpson, C. E. Eyers, C. G. Knight, P. Brownridge, W. B. Dunn, C. L. Winder, K. Lanthaler, P. Pir, and N. Malys, 2011, Absolute quantification of the glycolytic pathway in yeast: deployment of a complete QconCAT approach: **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, p. M111. 007633.
- Carvalho, P. C., J. S. Fischer, T. Xu, J. R. Yates, and V. C. Barbosa, 2012, PatternLab: From Mass Spectra to Label-Free Differential Shotgun Proteomics: **Current Protocols in Bioinformatics**, p. 13.19. 1-13.19. 18.
- Cherry, J. M., C. Adler, C. Ball, S. A. Chervitz, S. S. Dwight, E. T. Hester, Y. Jia, G. Juvik, T. Roe, and M. Schroeder, 1998, SGD: *Saccharomyces* genome database: **Nucleic acids research**, v. 26, p. 73-79.
- Daran-Lapujade, P., M. L. Jansen, J.-M. Daran, W. van Gulik, J. H. de Winde, and J. T. Pronk, 2004, Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* A chemostat culture study: **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 9125-9138.
- Dato, M. C. F., J. M. Pizauro Júnior, and M. J. R. Mutton, 2005, Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of "cachaça": **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 70-74.
- Duarte, N. C., S. A. Becker, N. Jamshidi, I. Thiele, M. L. Mo, T. D. Vo, R. Srivas, and B. Ø. Palsson, 2007, Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data: **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 1777-1782.
- Eng, J. K., T. A. Jahan, and M. R. Hoopmann, 2013, Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool: **Proteomics**, v. 13, p. 22-24.
- Estevez, P., M. Gil, and E. Falqué, 2004, Effects of seven yeast strains on the volatile composition of Palomino wines: **International journal of food science & technology**, v. 39, p. 61-69.
- Feist, A. M., M. J. Herrgård, I. Thiele, J. L. Reed, and B. Ø. Palsson, 2008, Reconstruction of biochemical networks in microorganisms: **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 129-143.
- Goffeau, A., B. Barrell, H. Bussey, R. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. Hoheisel, C. Jacq, and M. Johnston, 1996, Life with 6000 genes: **Science**, v. 274, p. 546-567.
- Gombert, A. K., M. M. dos Santos, B. Christensen, and J. Nielsen, 2001, Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression: **Journal of bacteriology**, v. 183, p. 1441-1451.

- Hebert, A. S., A. L. Richards, D. J. Bailey, A. Ulbrich, E. E. Coughlin, M. S. Westphall, and J. J. Coon, 2014, The one hour yeast proteome: **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, p. 339-347.
- Herrero, P., J. Galindez, N. Ruiz, C. Martínez-Campa, and F. Moreno, 1995, Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HXK1, HXK2 and GLK1 genes: **Yeast**, v. 11, p. 137-144.
- Hu, G., A.-P. Lin, and L. McAlister-Henn, 2006, Physiological consequences of loss of allosteric activation of yeast NAD⁺-specific isocitrate dehydrogenase: **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 16935-16942.
- Kiers, J., A. M. Zeeman, M. Luttk, C. Thiele, J. I. Castrillo, H. Steensma, J. P. Van Dijken, and J. T. Pronk, 1998, Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359: **Yeast**, v. 14, p. 459-469.
- Kolkman, A., M. M. Olsthoorn, C. E. Heeremans, A. J. Heck, and M. Slijper, 2005, Comparative proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostat cultures limited for glucose or ethanol: **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, p. 1-11.
- Kumar, A., S. Agarwal, J. A. Heyman, S. Matson, M. Heidtman, S. Piccirillo, L. Umansky, A. Drawid, R. Jansen, and Y. Liu, 2002, Subcellular localization of the yeast proteome: **Genes & development**, v. 16, p. 707-719.
- McNeil, J. B., J. Flynn, N. Tsao, N. Monschau, K. Stahmann, R. H. Haynes, E. M. McIntosh, and R. E. Pearlman, 2000, Glycine metabolism in *Candida albicans*: characterization of the serine hydroxymethyltransferase (SHM1, SHM2) and threonine aldolase (GLY1) genes: **Yeast**, v. 16, p. 167-175.
- Messiha, H. L., E. Kent, N. Malys, K. M. Carroll, N. Swainston, P. Mendes, and K. Smallbone, 2014, Enzyme characterisation and kinetic modelling of the pentose phosphate pathway in yeast, **PeerJ PrePrints**.
- Nakayama, S., T. Morita, H. Negishi, T. Ikegami, K. Sakaki, and D. Kitamoto, 2008, *Candida krusei* produces ethanol without production of succinic acid; a potential advantage for ethanol recovery by pervaporation membrane separation: **FEMS yeast research**, v. 8, p. 706-714.
- O'Neill, E. M., A. Kaffman, E. R. Jolly, and E. K. O'Shea, 1996, Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex: **Science**, v. 271, p. 209-212.
- Papini, M., 2012, **Metabolic Engineering of Central Carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*** The contribution of systems biology to physiological studies, Chalmers University of Technology.
- Piekarska, K., G. Hardy, E. Mol, J. van den Burg, K. Strijbis, C. van Roermund, M. van den Berg, and B. Distel, 2008, The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional β -oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane: **Microbiology**, v. 154, p. 3061-3072.
- Pronk, J. T., H. Y. Steensma, and J. P. Van Dijken, 1996, Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: **Yeast**, v. 12, p. 1607-1633.
- Przybyla-Zawislak, B., D. M. Gadde, K. Ducharme, and M. T. McCammon, 1999, Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes: **Genetics**, v. 152, p. 153-166.
- Rodrigues, F., P. Ludovico, and C. Leão, 2006, Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism, Biodiversity and ecophysiology of yeasts, **Springer**, p. 101-121.

- Ross, P. L., Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, and S. Daniels, 2004, Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents: **Molecular & cellular proteomics**, v. 3, p. 1154-1169.
- Sauer, U., 2006, Metabolic networks in motion: ¹³C-based flux analysis: **Molecular systems biology**, v. 2.
- Soares, L. T., 2006, **Álcoois, Ésteres E Aldeídos Produzidos Por Diferentes isolados De *Saccharomyces cerevisiae*** Universidade Federal de Lavras, Lavras, 87 p.
- ter Kuile, B. H., and H. V. Westerhoff, 2001, Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway: **FEBS letters**, v. 500, p. 169-171.
- Tortora, G. J., B. R. FUNKE, and C. L. CASE, 2000, **Microbiologia**, 6ª edição: Porto Alegre: Artmed.
- van Hoek, P., M. T. Flikweert, Q. J. van der Aart, H. Y. Steensma, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk, 1998, Effects of Pyruvate Decarboxylase Overproduction on Flux Distribution at the Pyruvate Branch Point in *Saccharomyces cerevisiae*: **Applied and environmental microbiology**, v. 64, p. 2133-2140.
- Verduyn, C., E. Postma, W. A. Scheffers, and J. P. Van Dijken, 1992, Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation: **Yeast**, v. 8, p. 501-517.
- Washburn, M. P., 2004, Utilisation of proteomics datasets generated via multidimensional protein identification technology (MudPIT): **Briefings in functional genomics & proteomics**, v. 3, p. 280-286.
- Washburn, M. P., R. Ulaszek, C. Deciu, D. M. Schieltz, and J. R. Yates, 2002, Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology: **Analytical chemistry**, v. 74, p. 1650-1657.
- Washburn, M. P., and J. R. Yates III, 2000, New methods of proteome analysis: multidimensional chromatography and mass spectrometry: **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 27-30.
- Webb, K. J., T. Xu, S. K. Park, and J. R. Yates III, 2013, Modified MuDPIT separation identified 4488 proteins in a system-wide analysis of quiescence in yeast: **Journal of proteome research**, v. 12, p. 2177-2184.

MEMORIAL

Maria Priscila Franco Lacerda

I - FORMAÇÃO

Graduação em Biotecnologia e mestranda em Ciência e Tecnologia Ambiental, na área de Tecnologia Ambiental.

IV – RELATO DE ATIVIDADES

No decorrer do mestrado houve participação nos projetos de pesquisa “Identificação in vivo de mecanismos de regulação alostérica em *Saccharomyces cerevisiae* através de dinâmicas metabolômicas quantitativas” e “Avaliação do potencial biotecnológico de diferentes leveduras isoladas na Região Centro-Oeste, visando à produção de etanol, através de uma abordagem sistêmica”.

Resultando na publicação do seguinte trabalho “Padronização do método de extração de proteínas para análise proteômica da levedura 43 isolada na região centro-oeste, visando à produção de etanol”.

Participei de duas pesquisas de rotina no laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, resultando na publicação dos trabalhos intitulados “Atividade hemaglutinante de extratos de casca do caule e folha de espécies família *Sapindaceae*” e “Atividade lectínica de extratos de *Tabebuia caraiba Bureau* e *Cybistax antisiphilitica*”.

Em relação aos eventos, houve participação de um curso oferecido pelo LNCC em Proteômica Estrutural com total de 90 horas, no ano de 2013. No ano de 2014, participei de três eventos, sendo estes o II Simpósio Nacional de Nanotecnologia e Nanomedicina, 2014; I Simpósio Nacional de Aplicações Biotecnológicas, 2014. (Simpósio) e I Congresso Internacional de Ciências Básicas da Saúde IV Encontro Regional de Biomedicina e I Workshop de Fisiologia Aplicada, 2014 (Congresso).