

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Rita de Cássia Pereira de Lima

**Estudo das interações entre as proteínas envolvidas na
resposta a estresse na parede celular de *Saccharomyces
cerevisiae*.**

Recife
2013

Rita de Cássia Pereira de Lima

**Estudo das interações entre as proteínas envolvidas na
resposta a estresse na parede celular de *Saccharomyces
cerevisiae*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Marcos Antônio de Morais Júnior

Coorientador: Dr. José Roberto Tavares

Coorientador: Dra. Carolina Elsztein

Recife

2013

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima, Rita de Cassia Pereira de

Estudo das interações entre as proteínas envolvidas na resposta a estresse na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*./ Rita de Cássia Pereira de Lima– Recife: O Autor, 2013.

89 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antônio de Moraes

Coorientadores: José Roberto Tavares e Carolina Elsztein

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2013.**

Inclui bibliografia

- 1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Fermentação 3. Proteínas I. Moraes, Marcos Antônio de (orientador) II. Tavares, José Roberto (coorientador) III. Elsztein, Carolina (coorientadora) IV. Título**

Rita de Cássia Pereira de Lima

Estudo das interações entre as proteínas envolvidas na resposta a estresse na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Aprovado em 12/03/2013

Banca Examinadora:

Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Antônio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2013

A minha família, em especial a minha avó Joana
Bosca Pereira de Lima.

Agradecimentos

A minha família, em especial a minha mãe, a minha avó por todo amor e dedicação.

Ao meu orientador Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por suas brilhantes idéias.

Ao meu coorientador Dr. José Roberto Tavares por toda sua confiança e pela oportunidade de crescimento profissional oferecida.

A minha coorientadora Dra. Carolina Elsztein pela inestimável parceria e comprometimento na realização deste trabalho.

Ao meu namorado, Marcelo por toda sua ajuda no laboratório, carinho e paciência.

A minha amiga Dany por toda sua amizade e por está sempre disposta a ajudar.

A todos os amigosdo NEM/Genética/CETENE/LEMTE, pela ajuda e troca de experiências, pessoas as quais não posso mencionar os nomes para não cometer a injustiça de esquecer alguém.

As minhas amigas Kláudia e Carolina Simões.

A Dra. Márcia Cristina pelas cepas e vetores fornecidos.

A secretaria do Programa de Pós Graduação em Genética, a todos os funcionários do Departamento de Genética, do Laboratório Central pela eficiência e dedicação, em especial a senhora Luzinete.

Aos professores e amigos do Departamento de Genética, em especial ao professor Antônio Carlos de Freitas e seus alunos que permitiram a utilização de aparelhos e reagentes dos laboratórios.

A plataforma de sequenciamento laboratório central (Heidi e Thereza).

Ao NIT (Cássia e Viviane).

A equipe do professor Marcelo Guerra.

A coordenação do Programa de Pós Graduação em Genética, representada pelos professores Valdir Balbino e Neide Santos.

Ao CNPq e a FACEPE por conceder a bolsa e recursos para realização deste trabalho.

A banca examinadora pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

“Pessoas vem e vão... Importante é o que fica.

As lições, exemplos e os momentos.”

(Vinicius Alves)

Resumo

Durante o processo de fermentação, *Saccharomyces cerevisiae* resiste a vários tipos de estresses ambientais, tais como flutuações nas condições oxidativas e osmóticas, choque térmico e as variações de pH. Para suportar essas flutuações ambientais, a levedura apresenta mecanismos de respostas capazes de preservar a estrutura celular. Entre estas proteínas podemos citar Hog1p, envolvida em estresse hiperosmótico; Ylr194cp, Smi1p e Slg1p que participam da manutenção da parede celular; Yap1p e Skn7p, tolerância ao estresse oxidativo; Slt2p, manutenção da parede celular e choque térmico. Através do sistema duplo híbrido buscamos entender como a interação destas proteínas pode atuar em conjunto para manutenção da viabilidade celular durante os diferentes estresses. Desta forma, os genes *YLR194C*, *HOG1*, *SLG1*, *YAP1* e *SLT2* foram inseridos no vetor pGADC2 (contendo o domínio de ativação); *YLR194C* e *YAP1* foram inseridos no vetor pBTM (contendo o domínio de ligação). Nossos resultados indicaram interações entre os produtos dos genes *YLR194C* e *YAP1*; *YLR194C* e *SLT2* na ausência de agentes estressores, e novas interações entre as proteínas Yap1p e Slg1p; Ylr194cp e Slg1p; Ylr194cp e Hog1p, Yap1 e Slt2, Yap1 e Slg1 diante de um determinado agente estressor. Todos os resultados foram avaliados através da detecção da atividade do gene repórter *HIS3*.

Palavras-chave: Duplo híbrido; estresse; *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

During fermentation process, *Saccharomyces cerevisiae* withstands various environmental stress agents, such as oxidative and osmotic conditions fluctuations, heat shock and pH variations. In order to endure these conditions, yeast presents response pathways able to preserve cell structure. Among several proteins included in these pathways, as the best known, we may mention Hog1p, involved in hyperosmotic stress; Ylr194cp, Smi1p and Slg1p involved cell wall integrity; Yap1p and Skn7p, oxidative stress tolerance; Kre6p, cell wall β-1,6 glucans synthesis; Slt2p, heat shock and cell wall integrity. Using yeast two-hybrid system, our work tries to understand how interaction between these proteins has influence on cellular viability during distinct stress. *YLR194C*, *HOG1*, *SLG1*, *YAP1* and *SLT2* genes have been inserted into pGADC2 vector, which contain transcription activation domain (AD), while *YLR194C* and *YAP1* genes have been inserted into pBTM vector, which contain DNA-binding domain (DB). Our results indicated interaction between gene products *YLR194C* and *YAP1*, and interaction between *YLR194C* and *SLT2*, in the absence of stressors, and new interactions between Yap1p and Slg1p; Ylr194cp and Slg1p; Ylr194cp and Hog1p, Yap1 and Slt2, Yap1 and Slg1 proteins in the presence of a particular stressor. All results were evaluated by detecting the activity of the *HIS3* reporter gene.

Key words: two-hybrid; stress; *Saccharomyces cerevisiae*

Lista de Ilustrações

Figura 1: Relações entre os componentes da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	12
Figura 2: Via de manutenção da integridade da parede celular (CWI) em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Figura 3: Mecanismo proposto para resposta ao estresse osmótico em <i>S. cerevisiae</i> .	22
Figura 4: Mecanismo de resposta mediado pela via HOG em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	24
Figura 5: Via de resposta ao estresse oxidativo mediado por Yap1p.	27
Figura 6: Via de resposta mediada por Skn7p.	30
Figura 7: Vetor pBTM e pGADC2	33
Figura 8: Sistema do duplo híbrido de levedura.	40
Figura 9- Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR dos genes <i>YLR194C</i> , <i>SLG1</i> , <i>HOG1</i> , <i>SMI1</i> , <i>YAP1</i> , <i>SKN7</i> , <i>KRE6</i> , <i>SLT2</i>	41
Figura 10- Gel em gel de agarose 1% dos vetores pBTM e pGADC2.	42
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene <i>YAP1</i> clonado no vetor pGADC2	42
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene <i>HOG1</i> clonado no vetor pGADC2	43

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene <i>YLR194C</i> clonado no vetor pGADC2 .	43
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene <i>SLG1</i> clonado no vetor.	44
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de restrição com as enzimas <i>SmaI</i> e <i>BamHI</i> do gene <i>SLT2</i> clonado no vetor pGADC2.	44
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene <i>YLR194</i> clonado no vetor pBTM.	45
Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene <i>YAP1</i> clonado no vetor pBTM.	45
Figura 18: Análise das possíveis interações entre a proteína Ylr194cp, Slg1p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> .	46
Figura 19: Análise das possíveis interações entre a proteína Ylr194cp, Slg1p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> .	47
Figura 20: Análise das interações entre a proteína Ylr194cp e Yap1p.	47
Figura 21: Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> .	48
Figura 22: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de brancocalcoflúor	49

Figura 23: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de brancocalcoflúor	50
Figura 24: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de etanol 4%	51
Figura 25: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de etanol 4%	52
Figura 26 Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de etanol 6%	52
Figura 27: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de etanol 6%	52
Figura 28: Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de PHMB 0,00025%	53
Figura 29: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de PHMB 0,00025%	54
Figura 30: Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de PHMB 0,005%	54

Figura 31: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de PHMB 0,005%	55
Figura 32: Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de 0,5mg de vermelho congo	56
Figura 33: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de 0,5mg de vermelho congo	56
Figura 34: Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de 1mg de vermelho congo	57
Figura 35: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em <i>S. cerevisiae</i> , com adição de 1mg de vermelho congo	57
Figura 36: Motivos apresentados pela proteína Ylr194c	61

Lista de Tabelas

Tabela 1: Cepas da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas nesse estudo.	32
Tabela 2: Cepa de <i>E. coli</i> /utilizada nesse estudo.	33
Tabela 3: Plasmídeos utilizados nesse estudo.	34
Tabela 4: Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes por PCR	34
Tabela 5: Meios de cultura utilizados nesse estudo.	35
Tabela 6: Soluções e tampões de uso geral utilizados nesse estudo.	35
Tabela 7: Resumos das interações encontradas neste estudo	58

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
°C	Grau Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
mg	Miligramas
mPa	Mili Pascal
AD	Domínio de ativação
BD	Domínio de ligação
CWI	Via de Integridade da Parede Celular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GEF	Fator de troca de nucleotídeos
GPI	Glicosilfosfatidil-inositol
GTP	Guanina trifosfato
HOG	Via do Glicerol de Alta Osmolaridade
KoAc	Acetato de potássio
LB	Luria Bertani
MAP	Proteína quinase ativada por mitógenos
ORFS	Sequência aberta de leitura
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
PHMB	Polihexametileno biguanida
PIB	Produto interno bruto
PIR	Proteínas de repetição interna
PKC	Proteína quinase C
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPM	Rotações por minuto

SBF	Proteína de ligação ao ciclo celular
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tris, acetato, EDTA
TE	Tris-EDTA
X-Gal	5- bromo- 4- cloro- 3-indol- β -D- galactopiranosídeo
YNB	Meio mínimo de suplemento de nitrogênio para levedura
YPD	Meio de extrato de levedura, peptona, dextrose

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de ilustrações

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	2
2.1 Fermentação alcoólica	2
2.1.1 Agentes estressores presentes no processo industrial	3
2.2 Metabolismo da resposta a estresse em <i>S. cerevisiae</i>	9
2.2.1 A importância da integridade da parede celular para a levedura	9
2.2.2 Via de manutenção da integridade da parede celular (CWI)	15
2.2.3 Via do glicerol de alta osmolaridade (HOG)	21
2.2.4 Via de resposta ao estresse oxidativo	25
3. Objetivos	31
4. Material e Métodos	32
5. Resultados	41
6. Discussão	59
7. Conclusões	69
8. Referências Bibliográficas	70
10. Currículo Lattes atualizado (correspondente ao período do curso)	70

1. Introdução

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, além de ser considerada um modelo biológico para compreensão de diversos mecanismos moleculares em organismos eucariotos, também é relevante do ponto de vista econômico. Seu emprego inclui alguns dos mais importantes bioprocessos da indústria, como produção de bebidas alcoólicas, fermentação do pão e produção do bioetanol a partir da fermentação da cana de açúcar.

No processo industrial, após a etapa da fermentação, as células de *S. cerevisiae* são separadas por centrifugação para serem reutilizadas em um novo ciclo. Para tanto, o material obtido é tratado com ácido sulfúrico com o intuito de reduzir a contaminação bacteriana presente no meio. Este processo de reciclagem acaba levando a levedura a enfrentar um conjunto de agentes estressores presentes no meio, dos quais citam-se: estresse oxidativo, osmótico, choque térmico e variações no pH, ocasionando diminuição na viabilidade celular.

Para suportar essas flutuações ambientais, a levedura desenvolveu mecanismos de respostas que convergem para manutenção da estrutura da parede celular. Essa estrutura é composta por polissacarídeos de β 1,3-glicanos, β 1,6-glicanos, quitina (polímeros de N-acetylglucosamina), manoproteínas glicosiladas. Tais características contribuem para a capacidade da célula de responder a diferentes condições osmóticas impostas pelo meio.

Diante deste cenário, nós buscamos entender como essas vias de respostas convergem para manutenção da viabilidade celular através da interação entre suas proteínas, utilizando o sistema de análise de interações duplo híbrido em levedura.

2. Revisão da Literatura

2.1 Fermentação alcoólica

O bioetanol é um combustível de fonte renovável, cuja produção é geradora de empregos, além de representar uma alternativa em substituição ao consumo de combustíveis fósseis, associados ao aumento da emissão do CO₂ na atmosfera (Demain, 2009). O Brasil é o segundo maior produtor de bioetanol do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos. A produção de bioetanol, associada à indústria açucareira, responde por cerca de 2,3% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional, gerando cerca de 4,5 milhões de empregos (Basso *et al.*, 2011).

Para o processo de fermentação, as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são cultivadas no caldo da cana de açúcar ou melaço sob agitação (Wheals *et al.*, 1999; Basso *et al.*, 2008), incubadas em fermentadores cilíndricos com retroalimentação periódica. Após processo fermentativo de seis a dez horas, as células são coletadas por centrifugação. Essas leveduras são recicladas, o que resulta em menor desvio do metabolismo de carboidratos para a produção de biomassa, estimando-se um aumento de biomassa de apenas cinco a dez por cento em relação à biomassa inicial (Basso *et al.*, 2008). O material obtido por centrifugação é transferido para recipientes, onde é tratado com solução aquosa de ácido sulfúrico (pH 1,8- 2,5) para reduzir a contaminação bacteriana (Melo *et al.*, 2010). Em geral, a reutilização das leveduras pode durar de quatro a seis meses, desde que não ocorram eventos de contaminações bacterianas ou por outras leveduras (Liberal *et al.*, 2007; Basilio *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2008; Lucena *et al.*, 2010).

2.1.1 Agentes estressores no processo industrial

O procedimento da reciclagem utilizado nas fermentações industriais expõe as células das leveduras a uma variedade de perturbações físicas, químicas e biológicas (Logothetis, Walker e Nerantzis, 2007). Essas condições impostas que venham a ameaçar a sobrevivência celular ou que, pelo menos, estejam fora dos padrões ideais do metabolismo fisiológico celular são referidas como estresse celular (Hohmann e Mager, 2003). Essas perturbações acabam reduzindo a viabilidade celular e a capacidade fermentativa devido à presença de agentes estressores no meio, dos quais são citados: potencial osmótico, presença do etanol, radicais livres, flutuações de pH, choque térmico, entre outros.

O estresse osmótico é causado principalmente pela presença dos sais provenientes do melaço da cana de açúcar, excesso de cálcio, potássio, magnésio (Basso *et al.*, 2011), entre outros. Também pode ser resultado das altas concentrações de açúcares presentes no meio (Saito e Posas, 2012). O aumento da osmolaridade externa induz o efluxo de água e o aumento das concentrações citosólicas de íons, a exemplo do sódio, resultando na plasmólise celular (Saito e Posas, 2012). Entretanto algumas leveduras conseguem suportar o aumento da osmolaridade através de respostas adaptativas que incluem parada no ciclo celular, regulação da transcrição e da tradução, síntese e retenção do glicerol (Saito e Posas, 2012). Um exemplo de mecanismo de resposta ao estresse salino, causado pela presença do cloreto de sódio é baseado em ajustes osmóticos por sistemas de transportes dos cátions de sódio (Logothetis, Walker e Nerantzis, 2007). Também podemos encontrar o acúmulo de osmólitos, como polióis, particularmente o glicerol (Blomberg, 2000).

Ainda que o etanol seja um produto fisiológico do metabolismo fermentativo, ao qual a levedura apresenta tolerância, seu acúmulo pode ser considerado um fator de estresse, cujas altas concentrações inibem o crescimento celular e provocam queda da eficiência da fermentação (Alexandre *et al.*, 2001; Aguilera *et al.*, 2006). Em baixas concentrações, o etanol pode atuar como um inibidor do crescimento celular alterando a taxa de divisão celular e diminuindo o volume celular médio, enquanto que altas concentrações de etanol reduzem a vitalidade celular e aumentam a taxa de morte celular (Birch e Walker, 2000). A exposição da levedura a determinados índices de etanol também influencia o metabolismo celular e a biossíntese de macromoléculas, induzindo, por exemplo, a produção de proteínas semelhantes às proteínas *heat-shock*, a redução de taxas de transcrição e tradução, o aumento da frequência de mutações pontuais, proteínas de desnaturação intracelular e enzimas glicolíticas, reduzindo ainda suas respectivas atividades (Hu *et al.*, 2007).

O oxigênio molecular, em vista da formação de espécies reativas de oxigênio ao longo do metabolismo aeróbico, apresenta potencial toxicidade às leveduras em crescimento com efeitos prejudiciais, a exemplo da peroxidação lipídica e mutagênese, além de alterações degenerativas associadas ao envelhecimento (Briggs *et al.*, 2004). Apesar disso, o oxigênio exerce papel essencial no processo de preparação que antecede a fermentação a nível industrial.

Uma boa quantidade de oxigênio é necessária para a etapa preparatória da fermentação com o intuito de gerar biomassa de levedura e assegurar condições fisiológicas ótimas para fermentação (Hammond, 2000; Hulse, 2003). Além disso, durante o processo de fermentação, a presença do oxigênio é

necessária para a síntese de ácidos graxos e esteróis, o qual permitem a manutenção da integridade da membrana plasmática e sua função, e, consequentemente, a replicação celular (Hammond, 2000; Briggs *et al.*, 2004). Entretanto, altos níveis de exposição da levedura ao oxigênio no tanque de fermentação podem resultar em crescimento celular excessivo à custa da produção de etanol (Briggs *et al.*, 2004). Níveis ótimos de oxigênio são, portanto, necessários para a adequada produção de etanol (Gibson *et al.*, 2007).

A teoria de envelhecimento celular mediado por radicais livres postula que espécies reativas de oxigênio, produzidas sob condições aeróbicas de crescimento, seriam a causa primária de danos aos componentes celulares associados ao envelhecimento (Barker, Brimage e Smart, 1999; Halliwell e Gutteridge, 1999). O estresse oxidativo poderia, portanto, ter participação na deterioração progressiva de células, ao longo de sua reutilização serial. Essa técnica de coleta e reutilização, comumente adotada na fermentação industrial, acaba selecionando leveduras com uma alta proporção de células envelhecidas (Powell *et al.*, 2000).

O tempo de vida replicativo de leveduras é estimado através da sua capacidade de produzir células filhas, o qual irá depender da linhagem utilizada (Maskell *et al.*, 2001) e está relacionado ao potencial antioxidante da célula (Barker *et al.*, 1999; Van Zandycke, Sohier e Smart 2002). Em suma, a eficiência de mecanismos de resposta da levedura ao estresse oxidativo e sua sensibilidade intrínseca aos radicais oxidativos podem determinar o número de ciclos de reutilização que uma cultura de leveduras em preparação pode tolerar (Gibson *et al.*, 2006).

O pH típico do mosto fermentativo varia entre 5,5 e 4,1 (Coote e Kirsop, 1976; Rowe, Simpson e Hammond 1994). Este baixo pH é decorrente da produção de ácido carbônico proveniente do CO₂, da secreção de ácidos orgânicos e consumo de compostos tamponantes (aminoácido básicos e fosfatos primários) (Gibson *et al.*, 2007). O pH final é dependente da capacidade de tamponamento do mosto, do pH inicial, da extensão do crescimento da levedura (Heggart *et al.*, 1999). Evidências sugerem que algumas leveduras conseguem tolerar uma queda de dois a 1,5 unidades de pH durante a fermentação (Boulton e Quain, 2001). Entretanto, trabalhos recentes caracterizaram cepas mais sensíveis a variações de pH, com taxas de crescimento reduzidas (Maskell, 2003; Gibson *et al.*, 2007) e mudanças no padrão de expressão gênica. Em uma cepa haplóide de *S. cerevisiae*, foi observado que após a redução do pH de 5,5 para 3,5 ocorreu aumento na expressão de 36 genes relacionados com parede celular, com o metabolismo de carboidratos e metabolismo redox, com o controle da expressão gênica, transporte nuclear e genes relacionados com mecanismos de proteção contra diversas condições de estresse (Kapteyn *et al.*, 2001).

Durante o processo de reciclagem das leveduras, as células são submetidas a baixos níveis de pH com o intuito de reduzir contaminações bacterianas (Melo *et al.*, 2010), o que implica em diferenças significativas nos perfis de fermentação quando comparados àqueles apresentados por cepas não tratadas (Cunningham e Stewart, 1998). Foram observadas perturbações fisiológicas decorrentes do vazamento de nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio, e redução nos níveis de trealose (Ferreira, Amorim e Basso, 1999). A adição do ácido dietilesterol durante a lavagem reduz a viabilidade celular (Uchida, Ohsumi e Anraku, 1988). Esse ácido atua como inibidor da ATPase-H⁺

de membrana plasmática, levando à morte da levedura devido à acidificação intracelular por perda da capacidade de troca de íons (Carmello, Bogaerts e Sá-Correia, 1996).

O mais fundamental estresse experimentado pela levedura é aquele promovido pela adaptação da célula à temperatura ambiente. *S. cerevisiae* exibe crescimento ótimo entre 25-30°C. Entretanto, em temperaturas acima de 36-37°C, as células da levedura ativam um programa transcripcional protetor, denominado resposta a choque térmico, e altera outros componentes de sua fisiologia, incluindo composição da membrana plasmática e fluxo de carboidratos (Morano, Grant, e Moye-Rowley, 2011). *S. cerevisiae* e outras leveduras mesofílicas mantêm seu crescimento em temperaturas de até 42°C, aproximadamente, mas são incapazes de lidar com exposição crônica a temperaturas superiores (de fato, a RNA polimerase II de levedura é inativa em temperaturas superiores a 42°C) (Yamamoto *et al.*, 2008).

Uma vez que células de levedura podem experimentar uma variação de temperatura ao longo do curso do ciclo dia/noite, estudos acerca da resposta ao choque térmico induzido pela mudança de 30°C para 37°C (o choque térmico clássico) em condições laboratoriais são fisiologicamente relevantes (Morano Grant, e Moye-Rowley, 2011). Nos últimos 25 anos, estudos demonstraram como as células de leveduras respondem ao choque térmico, incluindo fatores de transcrição que regulam mudanças na expressão gênica, e a reprogramação metabólica que permite à célula resistir desde a exposição crônica até temperatura sub-leais (Trott e Morano, 2003).

Além de todos esses agentes estressores mencionados anteriormente, podemos encontrar o estresse imposto pelo tratamento com biocidas, como

polihexametileno biguanida (PHMB), capaz de matar leveduras contaminantes do processo fermentativo. O tratamento com este agente leva a ativação dos genes de resposta da via de manutenção da integridade da parede celular (CWI) (Elsztein *et al.*, 2011). O tratamento com o corante fluorescente branco calcoflúor e o vermelho congo induz a falhas no processo de montagem adequada do envelope celular (Ketela *et al.*, 1999; De Nobel *et al.*, 2000). Mutantes de *SWI4* e *6*, dois componentes da via de manutenção da integridade da parede, são hipersensível ao branco calcoflúor, apoiando uma papel para o complexo SBF na resposta a este agente (Kim *et al.*, 2010), enquanto o vermelho congo irá atuar na perturbação da rede formada pelos polímeros de β -1,3 glicanos, levando a ativação MAP quinase Slt2p (Ketela *et al.*, 1999; De Nobel *et al.*, 2000).

2.2. Metabolismo da resposta a estresse em *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1 A importância da integridade da parede celular para as leveduras

Como visto, as células de *S. cerevisiae* são afetadas por uma quantidade significativa de agentes estressores inerentes ao processo de fermentação. Entretanto, para que este processo seja realizado de forma adequada, as leveduras devem ser capazes de detectar e responder de forma hábil aos estímulos ambientais sem perda de sua viabilidade (Bauer e Pretorius, 2000). Portanto, quando as condições ambientais são alteradas, a adaptabilidade celular permite o rápido ajuste de seu metabolismo de forma a resistir, ou melhor, aproveitar os distintos recursos aos quais está sendo exposta (Hohmann e Mager, 2003). Para atingir este objetivo, as células apresentam sistemas de sensores presentes na parede celular com a finalidade de detectar flutuações no ambiente, a exemplo das variações nos níveis de pH, radicais livres e osmolaridade.

Após a etapa da detecção das perturbações, ocorre a ativação de vias de transdução de sinais. Essas vias terão como resultado final a alteração do padrão de expressão gênica, com síntese de moléculas de proteção, ou a modulação do nível e/ou atividade de proteínas por meio de modificações pós-traducionais ou de localização subcelular (Hohmann e Mager, 2003; Rodrigues-Pousada, Nevitt e Menezes, 2005).

As respostas a agentes estressores encontradas em *S. cerevisiae* podem ser agrupadas em diferentes fases, desde alterações locais imediatas a perturbação com resposta direta até modificações na homeostase celular (Logothetis, Walker e Nerantzis, 2007).

A parede celular das leveduras proporcionam uma primeira barreira às mudanças ambientais e determina a integridade e a morfologia de suas células (Rodicio e Heinisch, 2010). A estrutura da membrana plasmática e suas funções parecem ser um alvo predominante para o etanol. A exposição da levedura ao etanol resulta em aumento da fluidez da membrana e consequente diminuição de sua integridade (Mishra e Prasad, 1989). Uma diminuição na disponibilidade de água devido à presença do etanol provoca a inibição de enzimas glicolíticas chave, provavelmente devido a sua desnaturação (Hallsworth, 1998).

A manutenção da sua estrutura e organização representa um ponto chave para suportar a exposição aos agentes estressores (Levin, 2005; Fuchs e Eleftherios, 2009). Os mecanismos de controle de remodelamento da parede celular da levedura durante o crescimento têm despertado interesse de pesquisa, levando a realização de vários estudos nas últimas décadas (Levin, 2005; Klis, Boorsma e De Groot, 2006; Lesage e Bussey, 2006). A estrutura dinâmica dessa parede é responsável pela sua estabilidade osmótica e proteção contra estresse mecânico, configurando uma estrutura forte, mas ao mesmo tempo elástica, capaz de suportar mudanças na força de compressão, além de conferir a morfologia celular (Cidet *al.*, 1995; Harold, 2002), a qual é essencial para a divisão celular (Levin, 2011).

A parede celular fornece suporte para proteínas de superfície, sobre as quais os polissacarídeos atuam como matriz de ligação para glicoproteínas (Zlotnick *et al.*, 1984; Kliset *al.*, 2006). As glicoproteínas incluem fatores de aglutinação sexual (Cappellaro *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2001), adesinas que permitem o contato célula-célula durante a formação de filamentação, crescimento invasivo e biofilme (Reynolds e Fink 2001; Douglas *et al.*, 2007;

Levin, 2011) Dada à importância da parede para a sobrevivência das células em condições estressantes, existe um investimento enérgico considerável para sua biogênese, uma vez que a parede compõe cerca de 10 a 25% do peso seco da célula (Adams, 2004). Dados de micrografia eletrônica revelaram que a organização do envoltório celular da levedura *S. cerevisiae* é realizada por diversos polissacarídeos (Orlean, 1997; Lipke e Ovalle, 1998; Kliset. al., 2002; Yin et al., 2005). A resistência mecânica da parede é dada principalmente pela sua camada interna, composta por cerca de 80-90% de polímeros de β 1,3-glicanos; 8 a 18% de polímeros de β 1,6-glicanos e quitina (polímeros de N-acetilglicosamina), contribuindo com 1 a 2% (Levin, 2011).

A presença de moléculas com ligações β 1,3 permite a associação local dos polímeros através de pontes de hidrogênio (Klis, Boorsma e De Groot, 2006) (Figura 1). Essa conformação leva à formação de uma rede tridimensional contínua e elástica, permitindo assim que a célula consiga responder a diferentes condições osmóticas impostas pelo meio. As extremidades não redutoras das moléculas β 1,3-glicanos podem funcionar como sítios de ligação covalente para outros polissacarídeos presentes na parede, como por exemplo, quitina (Lesage e Bussey, 2006). Na face externa podemos encontrar moléculas com ligações a polímeros de β 1,6-glicanos, que, por sua vez, podem ser ligadas a quitinas e manoproteínas (Montijn et al., 1997; Kapteyn et al., 1997; Fujii, Shimoji e Limura, 1999).

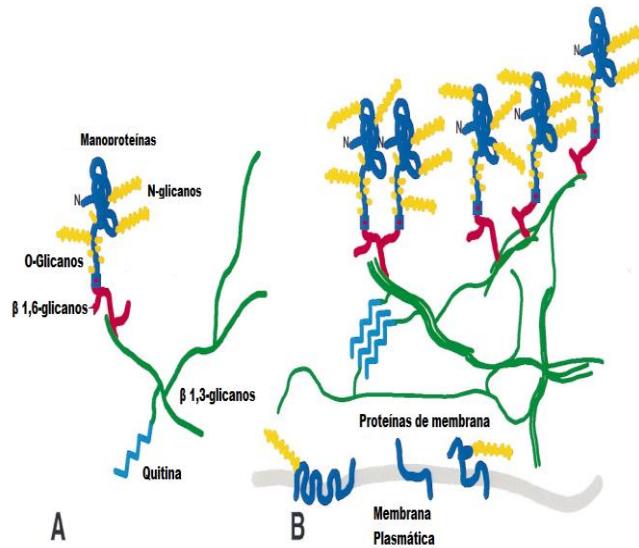


Figura 1: Relações entre os componentes da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. (A) componentes mostrados individualmente: polipeptídios de manoproteínas em azul, oligossacarídeos mostrados em amarelo ligados com oxigênio ou nitrogênio. Alguns dos pontos de ramificação de glicanos são mostrados. Quitina pode ser ligada a β -1,6 glicanos. (B) Associação dos componentes mostrados em A. β -1,6 glicanos estão ligados para formar triplas hélices, quitina é mostrada como um microdomínio cristalino. (Retirado e adaptado de Lipke e Ovalle, 1998).

No interior das redes de β 1,3-glicanos encontram-se ligadas algumas moléculas de quitina, as quais são encontradas apenas após a citocinese, demonstrando que a quitina não confere resistência mecânica às paredes laterais. A quitina pode se ligar também às cadeias de β 1,6-glicanos, em resposta ao estresse de parede (Klis *et al.*, 2006). Em contraste à estrutura microfibrilar dos β 1,3-glicanos, encontramos os polímeros mais curtos de β 1,6-glicanos, que atuam como uma cola por formação de ligações cruzadas para β 1,3-glicanos, quitina e para as manoproteínas (Kollar *et al.*, 1997). A camada externa é composta por uma variedade de polissacarídeos que receberam a denominação de manoproteínas. São estruturas glicosiladas provenientes da superfície celular

(Figura 1) (Baba e Osumi, 1987; Cappellaro *et al.*, 1994) com estrutura variável entre diferentes espécies de leveduras (Gemmill, e Trimble, 1999).

São descritas duas classes de glicoproteínas da parede celular (Lesage e Bussey, 2006). A primeira classe é composta pelas glicofosfatidilinositol (GPI), que compõe a maioria das proteínas de parede e é indiretamente ligada à rede de β 1,3-glicanos (Klis *et al.*, 2006). Estas proteínas são dirigidas para a face extracelular da membrana através da secreção de âncoras de lipídios em seus C terminais. As destinadas à parede são liberadas a partir da clivagem de suas âncoras (Kollar *et al.*, 1997). Lipídios GPI menores ficam unidos à superfície externa da rede de β 1,3-glicanos indiretamente através de cadeias β 1,6-glicanos (Klis *et al.*, 2006).

A segunda classe é composta por um grupo menor de glicoproteínas de parede que estão diretamente ligadas à rede de β 1,3-glicanos, sendo representada por cinco polipeptídeos relacionados PIR (proteínas de repetição interna) (Toh-e *et al.*, 1993; Kapteyn *et al.*, 1999; Mrsa e Tanner 1999; Klis *et al.*, 2006). Apesar dos genes relacionados à PIR não serem essenciais, cepas que tiveram múltiplas deleções de *PIR1* e *PIR4* apresentaram defeitos na viabilidade celular decorrentes da sensibilidade aos agentes estressores de parede celular (Mrsa e Tanner, 1999).

Além destas duas classes principais de proteínas de paredes, também podemos encontrar proteínas que são ligadas de forma não covalentes, a exemplo de Bgl2p, ou através de pontes de dissulfeto a outras proteínas, a exemplo da subunidade aglutinina Aga2p em células Mata (Klebl e Tanner, 1989; Cappellaro *et al.*, 1994). Algumas proteínas citosólicas, a exemplo de enzimas

glicolíticas, podem chegar à parede celular através de proteínas de exportação (Cleves *et al.*, 1996; Molina, 2000).

As manoproteínas exercem a função de proteção da camada interna da degradação por enzimas (Zlotnick *et al.*, 1984; de Nobelet *et al.*, 1990; de Nobel e Barnett, 1991; Klis *et al.*, 2002). Também são importantes para eventos de reconhecimento célula-célula durante aglutinação sexual, e formação do biofilme (Lipke e Kurjan, 1992; Cappellaro *et al.*, 1994; Reynolds e Fink, 2001).

A quitina é um polímero linear de β 1,4-glicanos ligados a N-acetilglicosamina, formando miofibrilas estabilizadas por pontes de hidrogênio (Lesage e Bussey, 2006). Como visto, a quitina é pouco encontrada nas paredes celulares de *S. cerevisiae* na ausência de condições de estresse. Entretanto, em condições de estresse de parede celular, seus níveis aumentam para valores de até 20% (Popolo *et al.*, 1997; García-Rodríguez, Durán e Roncero, 2000; Valdivieso *et al.*, 2000). A quitina pode ser ligada tanto a polímeros de β 1,3-glicanos como de β 1,6-glicanos por transacetilases redundantes Crh1p e Crh2p (Cabib *et al.*, 2007, 2008; Cabib, 2009).

Dada à importância da parede celular para sobrevivência da levedura, perturbações no seu ambiente decorrentes da presença de agentes estressores levam a ativação de mecanismos de respostas denominadas de mecanismos de compensação. Estas respostas são caracterizadas por um aumento no conteúdo de β - glicanos, quitina, polissacarídeos e proteínas, além da relocalização de proteínas importantes da maquinaria de construção da parede celular. (Arroyo, 2009).

2.2.2. Via de manutenção da integridade da parede celular (CWI)

Dada à facilidade de manipulação genética de leveduras, em especial *S. cerevisiae*, seu estudo tem permitido uma melhor compreensão das vias de resposta associadas a mudanças ambientais (Dohlman e Thorner, 2001; Hohmann, 2002; Levin, 2005). Uma função essencial presente nas células eucarióticas é captar alterações no seu ambiente e ajustar sua fisiologia em função dessa modificação. A percepção desses sinais é realizada por receptores presentes na membrana plasmática, a exemplo dos receptores de membrana da família de proteínas Wsc (Slg1p/Wsc1p, Wsc2p, Wsc3p e Mid2p homólogo de Mlt1p) (Verna *et al.*, 1997; Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et. al.*, 1999). Em geral, os receptores estão relacionados com ativação de uma cascata de transdução de sinal específica de acordo com o agente estressor presente no meio (Rodicio e Heinisch, 2010).

Em muitos casos, estas vias irão desencadear respostas transitórias, voltando aos seus níveis de atividade basal, mesmo com a persistência do estímulo através do processo de adaptação (Molina, Cid e Martin, 2010). Estas respostas irão atuar nos níveis de expressão gênica e modificações pós-traducionais, e implicará na localização espacial e temporal de proteínas para deposição precisa de um determinado componente da parede celular (Heinisch *et al.*, 1999; Levin, 2005). Cerca de 1.200 genes participam direta e indiretamente na síntese e organização da parede celular de *S. cerevisiae* (Klis 1994; Lesage *et al.*, 2000; Basmaji *et al.*, 2006).

Os organismos eucariotos, desde os mais simples aos mais complexos, fazem uso da via proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Essa via apresenta-se bem conservada ao longo da evolução e está relacionada não apenas a presença de agentes estressores, mas também com a proliferação celular, diferenciação celular, desenvolvimento e apoptose (Qi e Elion, 2005). Em *S. cerevisiae*, podemos encontrar cinco MAPKs: Fus3p, Kss1p, Hog1p, Slt2p/Mpk1p e Smk1p que controlam o acasalamento, a filamentação/invasão, alta osmolaridade, integridade da parede celular e esporulação (Qi e Elion, 2005).

A via de manutenção da integridade da parede celular (*Cell Wall Integrity - CWI*) é ativada durante o crescimento e divisão celular e também pode ser ativada em condições de estresse de parede (Martin *et al.*, 2000; Levin, 2005) como, por exemplo, no tratamento com vermelho congo, branco calcoflúor e choque térmico (Rodriguez-Pena *et al.*, 2010). Deste modo, mutantes que apresentam defeitos no gene *FKS1*, o qual codifica uma unidade catalítica da glucano sintase, exibem uma ativação constitutiva da via CWI que é essencial para sua viabilidade (de Nobel *et al.*, 2000). O mecanismo de resposta mediado pela via CWI (Figura 2) é iniciado quando os receptores de membrana celular Mid2p e Wsc1p captam perturbações no envelope (Ketela, Green e Bussey 1999; Rajavel *et al.*, 1999). Estes são os mais importantes entre os vários tipos de sensores descritos; a deleção do gene *WSC1* resulta na lise celular em temperaturas entre 37°C a 39°C (Levin, 2011). Deleções em ambos os genes demonstraram a necessidade de um suporte osmótico para a sobrevivência celular (Ketela Green e Bussey, 1999; Rajavel *et al.*, 1999), revelando a função complementar entre esses dois sensores (Levin, 2011).

Os receptores Mid2p e Wsc1p interagem com um fator de troca de nucleotídeos GDP/GTP (GEF) Rom2p (Ozaki *et al.*, 1996; Philip e Levin, 2001), que converte a GTPase Rho1p em sua forma ativa ligada ao GTP, ativando a proteína quinase C (Figura 2) (Rodicio e Heinisch, 2010). Rho1p é considerado um dos pontos chave da via CWI, pois integra sinais a partir da superfície e do ciclo celular, regula a biogênese da parede celular, organização do citoesqueleto de actina e direcionamento correto de vesículas secretoras para o local de crescimento (Levin, 2011). Rho1p altera a composição da parede celular através da ativação das glucano sintases Fks1p e Fks2p, relacionadas com a síntese de β 1,3-glicanos (Figura 1) (Rajavel *et al.*, 1999) e β 1,6-glicanos no local do remodelamento. Ainda, Fks1p e Fks2p podem se ligar à proteína quinase C (Pkc1p) (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1995) em duas regiões do domínio terminal; uma rica em resíduos de cisteínas e uma de homologia ao domínio da região um (HR1) (Nonaka *et al.*, 1995; Schmitz, Lorberg e Heinisch 2002).

Pkc1p é homóloga da proteína quinase C de mamíferos e ativa uma cascata de MAP quinases: MEKK (MAP quinase-quinase) Bck1p, duas MEKs redundantes (MAPK quinases) Mkk1p/Mkk2p que irão fosforilar resíduos de tirosina a treonina no subdomínio VIII da MAPK Slt2p/Mpk1p (Gustin *et al.*, 1998; Hohmann, 2002 Martin-Yken *et al.*, 2003) (Figura 2). A deleção do gene *PKC1* é letal em condições normais de crescimento, levando a lise celular, podendo ser corrigido pelo suporte osmótico adequado, a exemplo de sorbitol (Levin e Bartlett-Heubusch 1992; Paravicini *et al.*, 1992). A fosforilação de Slt2p/Mpk1p promove o seu direcionamento para o núcleo, onde irá atuar nos fatores SBF fator de ligação ao ciclo celular(cell cycle box binding factor)que consiste em duas proteínas:

Swi4p e Swi6p, e Rlm1p. Esses fatores iniciarão a expressão de genes relacionados à síntese de parede (Fuchs e Mylonakis, 2009).

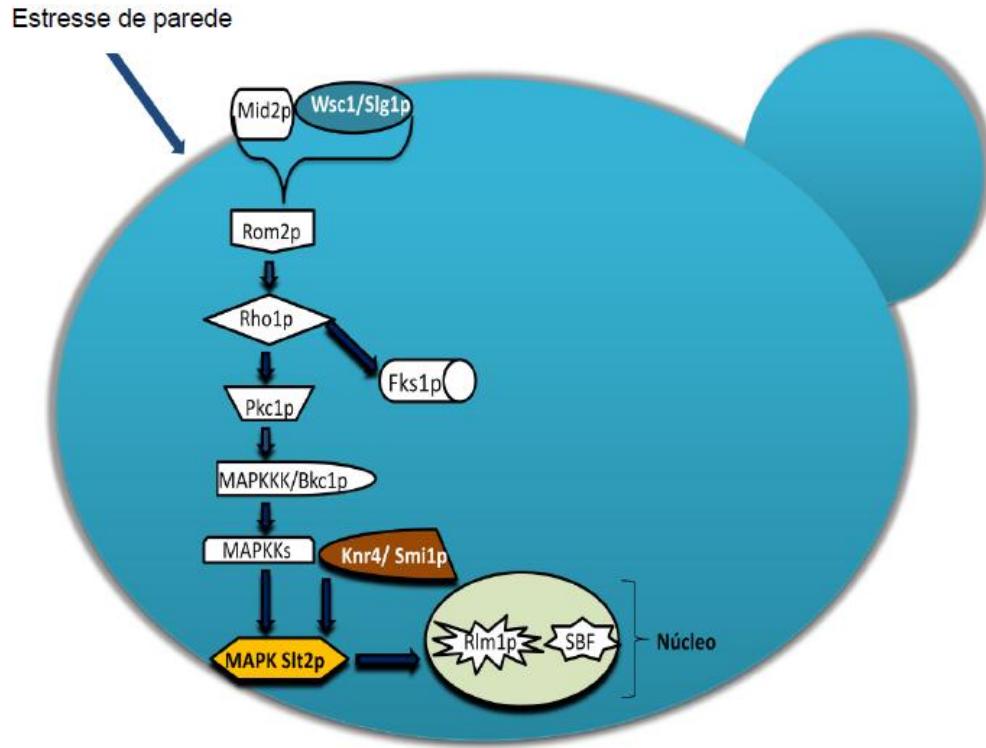


Figura 2: Via de manutenção da integridade da parede celular (CWI) em *Saccharomyces cerevisiae*. Sob condição de estresse, os receptores de parede Mid2p e Wsc1p/Slg1p interagem com GEF Rom2p, o qual converte Rho1p a sua forma ativa, ligada ao GTP. Rho1p ativa diretamente Fks1p para síntese de β 1,3-glicanos, ou ativa Pkc1p provocando a ativação de uma série de MAPK quinases (Bck1p), duas MAPK quinases redundantes (Mkk1p e Mpkk2p) e a MAPK quinase Slt2p, que vai ser direcionado para o núcleo através de Knr4p/Smi1p. Uma vez no núcleo, Slt2p irá ativar os fatores transcripcionais Rlm1p e SBF que irão regular genes envolvidos na biossíntese da parede celular.

A ativação da Slt2p/Mpk1p é necessária para a estimulação do influxo do cálcio através da membrana plasmática, graças à abertura dos canais de cálcio, os quais ativam a calcineurina (Cyert *et al.*, 1992). Esta desfosforila o fator de

transcrição Crz1p (Cyert *et al.*, 2003), permitindo a sua retenção no núcleo, promovendo a expressão de genes envolvidos com a resposta ao estresse. O mecanismo de como Slt2p/Mpk1p promove a abertura dos canais de cálcio não é claro, mas envolve a fosforilação de uma ou ambas as subunidades. A fosforilação e consequente ativação da via MAPK representa um importante evento na ativação sequencial, sendo regulada de forma negativa por fosfatas que desfosforilam essas quinases (Martin *et al.*, 2005). Outra forma de regulação é a formação de complexos proteicos de atuação espacial e temporal, responsáveis por transduzir o sinal específico através dos domínios de interação das proteínas sinalizadoras, com auxílio de proteínas acessórias (Molina, Cid e Martin, 2010). Essas últimas atuam como centros organizadores do fluxo através da via de sinalização, impedindo comunicação equivocada entre as vias (Molina, Cid e Martin, 2010).

Outro elemento adicional que compõe a via CWI é a proteína Knr4p/Smi1p, a qual é necessária para o correto direcionamento da MAP quinase Slt2p para atuar em seus fatores de transcrição alvos no núcleo (Martin-Yken *et al.*, 2003). O gene *KNR4* foi isolado originalmente de um mutante resistente a uma hipertoxina denominada de HM-1, de *Hansenula mrakii* (Hong *et al.*, 1994), cujo efeito citocida é o encolhimento da parede celular no ápice do broto. Este gene também foi isolado de vários mutantes sensíveis a branco calcoflúor, através da repressão de genes que codificam quitina sintases (Martin *et al.*, 1999). Dada à importância da via MAP quinase em condições de crescimento normal e na presença de agentes estressores, o rompimento da sinalização mediada por esta via resulta em lise celular em sítios de crescimento polarizado (Levin, 2011).

Em suma, diferentes sensores e mecanismos de resposta são utilizados na via de sinalização de manutenção da parede celular em *S. cerevisiae*, dado um agente estressor presente no meio. A consequência final é a indução do programa transcrional mediado pela via CWI. Estudos realizados por Elsztein *et al.*, (2011) e Iwahashi *et al.*, (2005) demonstram que o gene *YLR194c* foi superexpresso em *S. cerevisiae* submetidas ao polihexametileno biguanida (PHM) e a uma pressão hidrostática de 30 MPa, quando comparados a pressão de 0,1MPa. Esse gene pode estar localizado na parede celular, e está envolvido na manutenção e remodelamento da parede em resposta a agentes estressores de parede, ou por mutação do gene *FKS1* (Eslztein, *et al.*, 2011).

2.2.3. Via do glicerol de alta osmolaridade (HOG)

Como visto na via CWI, para se adaptar a constantes mudanças ambientais e, portanto, suportar diversas situações de estresse molecular, *S. cerevisiae* desenvolveu vias de sinalização dependentes de MAPK em resposta a estímulos específicos. Como mencionado anteriormente, duas vias MAPK, mais especificamente, são responsáveis pela resposta a estímulos estressores, a saber, a via do glicerol de alta osmolaridade (HOG) e a via de integridade da parede celular (CWI) (Rodríguez-Peña *et al.*, 2010).

Em *S. cerevisiae*, mudanças osmóticas externas elicitam respostas de ambas as vias CWI e HOG. De modo geral, a via CWI pode responder a condições hiposmóticas, enquanto a via HOG de *S. cerevisiae* responde a condições hiperosmóticas. Entretanto, em fungos patogênicos, a via HOG parece estar implicada na regulação de respostas de estresse a diferentes estímulos além do choque osmótico, como estresse oxidativo, exposição a luz UV, metais pesados e altas temperaturas (Alonso-Monge *et al.*, 2003, Bahn *et al.*, 2007, Boisnard *et al.*, 2008).

Apesar de condições osmóticas opostas ativarem as vias CWI e HOG, alguma comunicação cruzada entre as duas coordena sua regulação, o que pode ser demonstrado por Slt2p/Mpk1p. Enquanto soluções hipotônicas induzem a fosforilação de Slt2p/Mpk1p, em uma via dependente da proteína quinase C (PKC), soluções hiperóticas induzem a transcrição do gene *SLT2/MPK1* que é dependente de Hog1p e Rlm1p (Hahn *et al.*, 2002.). A transcrição deste gene dependente de Hog1p da via CWI, em condições hiperosmóticas, e a ativação de Slt2p/Mpk1p induzida pela cascata fosforilativa de CWI sugerem algum nível de regulação entre as vias HOG e CWI para a homeostase osmótica (Figura 3).

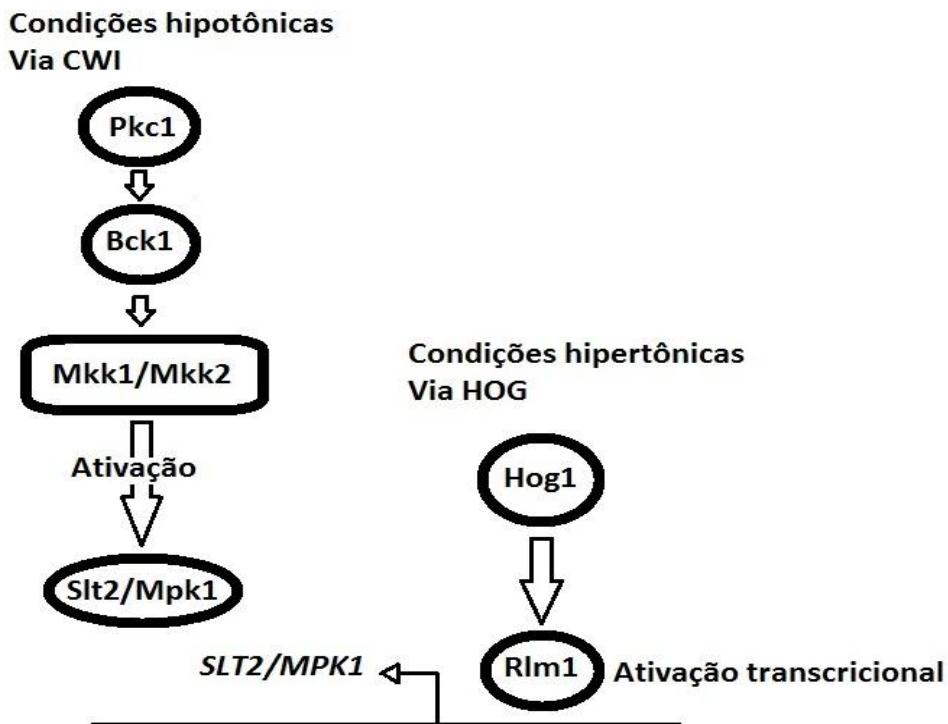


Figura 3: Mecanismo proposto para resposta ao estresse osmótico em *S. cerevisiae*. A via CWI é ativada em resposta ao estresse hiposmótico, levando à fosforilação de Slc2p/Mpk1p. A via HOG é ativada em resposta a condições de estresse hiperosmótico, o que envolve a ativação do fator transcrecional Rlm1p, o qual regula a expressão do gene *SLT2/MPK1*. (Adaptado de Fuchs e Mylonakis, 2009).

O ambiente osmótico para leveduras é particularmente crítico e sujeito a frequentes mudanças para aquelas em contanto com altas concentrações de açúcares, por exemplo. Uma vez que células de levedura são imóveis e, portanto, incapazes de evadir de um ambiente hostil, elas realizam ajustes internos para se adaptarem ao aumento da osmolaridade externa. Para tanto, as células sintetizam e retêm osmólitos compatíveis, tais como glicerol, para aumentar sua osmolaridade interna (Albertyn, et al., 1994), modificando assim o efluxo de água e ajustando a progressão do ciclo celular. Como consequência, células de

levedura expostas ao choque hiperosmótico rapidamente sofrem crenação e começam a sintetizar glicerol (Blomberg e Adler, 1992).

A via HOG coordena esta resposta adaptativa (Hohmann, 2009), na qual dois ramos distintos ativam o módulo MAPK por diferentes mecanismos. O ramo Sho1p (Figura 4) requer Sho1p e duas proteínas semelhantes à mucina denominadas Hkr1p e Msb2p para detectar o estresse osmótico (Tatebayashi *et al.* 2007). A sinalização dependente de Sho1p necessita de uma pequena proteína G, a Cdc42p, e os membros da família PAK, Ste20p e Ste50p. O alvo de Ste20p é a MAPKKK Ste11p, a qual ativa a MAPKK Pbs2p, em condições hiperosmóticas, levando a ativação de Hog1p (Hohmann, 2009). Outro ramo que leva a ativação de Pbs2p (figura 4) envolve um sistema de transmissão de grupos fosfatos de dois componentes, com inativação da proteína quinase transmembrana Sln1p e desfosforilação das proteínas reguladoras de resposta Ypd1p e Ssk1p (Posas, 1998). A Ssk1p não-fosforilada ativa duas MAPKKKs redundantes (Ssk2p/Ssk22p), as quais participam da fosforilação de Pbs2p, que é o principal responsável pela ativação final de Hog1p.

Uma vez ativado, Hog1p é transportado para o núcleo, onde coordena o programa transcricional necessário para a adaptação celular ao estresse osmótico (O'Rourke e Herskowitz, 2004). Outros trabalhos demonstram a ativação de Hog1p em vias de resposta a outros tipos de estresse, incluindo estresse oxidativo (Bilsland, 2004), estresse ácido (Mollapour e Piper, 2006), exposição ao metilgioxal (Aguilera, Rodriguez-Vargas e Prieto, 2005) e queda de temperatura (Panadero *et al.*, 2006).

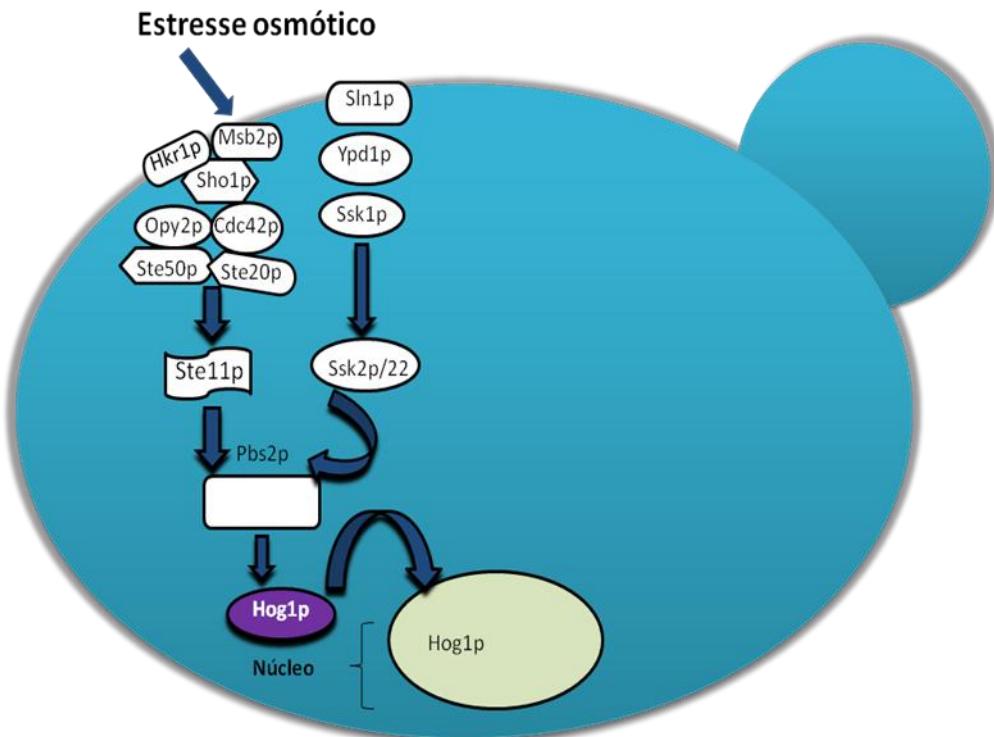


Figura 4: Mecanismo de resposta mediado pela via HOG em *Saccharomyces cerevisiae*.

Esta via é ativada por agentes estressores que causam estresse hiperosmótico. Na presença destes, os osmosensores Hkr1p e Msb2, medeiam à sinalização dependente de Sho1p necessitando das proteínas Cdc42p, Opy2p, Ste20p e Ste50. Ste11p ativa a MAPKK Pbs2p, levando a ativação de Hog1p. Outro ramo que leva a ativação de Pbs2p envolve Sln1p e a desfosforilação das proteínas reguladoras de resposta Ypd1p e Ssk1p que ativa duas MAPKKs redundantes (Ssk2p/Ssk22p), as quais participam da fosforilação de Pbs2p, que é o principal responsável pela ativação final de Hog1p.

Por fim, demonstrou-se que Hog1p e Pbs2p são membros críticos da via de resposta a condições de hiperosmolaridade, uma vez que mutações nestes genes causaram aumento de osmosensibilidade e redução no acúmulo de glicerol em células de levedura (Brewster *et al.*, 1993).

2.2.4 Via de resposta ao estresse oxidativo

Os organismos aeróbios estão continuamente expostos à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), decorrentes da redução incompleta do oxigênio molecular durante o processo de respiração (Xin-Jian e Fassler, 2005). Como visto anteriormente, ROS são responsáveis por danos ao DNA, proteínas e estruturas celulares (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996). Em *S. cerevisiae*, o estresse oxidativo está relacionado com o processo de reciclagem das células, onde temos um elevado percentual de células envelhecidas devido o maior acúmulo de ROS (Powell *et al.*, 2000). O tempo de vida da levedura está relacionado com o potencial antioxidante da célula (Zandycke Van,Sohier e Smart, 2002) e pelos seus mecanismos de resposta ao estresse oxidativo(Gibson *et al.*, 2006).

Uma característica fundamental na resposta ao estresse oxidativo é a necessidade de uma rápida detecção na alteração do equilíbrio redox da célula, seguido de uma rápida resposta. Esta resposta inclui a ativação das vias de modulação da atividade dos reguladores de transcrição, levando a alteração no padrão de expressão gênica (Moye-Rowley, 2003).Um dos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo é a ativação da via HOG que interage com a via CWI fornecendo uma defesa adicional contra os agentes oxidantes (Fuchs e Mylonakis, 2009). O mecanismo de resposta ao estresse oxidativo também envolve a participação de fatores transcripcionais, a exemplo, de Yap1p e Skn7p (Mulford e Fassler, 2011), embora outros fatores transcripcionais, tais como Msn2p/Msn4p, também desempenhem um papel secundário nessa resposta (Gasch *et al.*, 2000).

A exposição de *S. cerevisiae* a diamida altera a glutationa e grupos tióis oxidados e peróxido de hidrogênio, que promove a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA. Esses grupos são capazes de ativar a via CWI, através da fosforilação Slt2p/Mpk1p com diferentes atividades cinéticas(Fuchs e Mylonakis, 2009).O fator transcrecional Yap1p é um componente central na resposta ao estresse oxidativo (Moye-Rowley, 2003; Rodrigues-Pousada, Menezes e Pimentel 2010). Este apresenta um zíper de leucina contendo um regulador positivo da transcrição, (Harshman,Moye-Rowley e Parker 1988; Jones *et al.* 1988). Vários trabalhos evidenciaram a importância de Yap1p para a tolerância a diversos oxidantes, tais como peróxido de hidrogênio, diamida e metais pesado, como o cádmio (Kuge e Jones 1994; Wu e Moye-Rowley, 1994).

Evidências genéticas apontam que a proteína Yap1p tem sua atividade regulada pela sua localização celular (Kuge *et al.*, 2001). Experimentos utilizando ensaios com a proteína GFP demonstraram que na ausência de condições de estresse, esta se liga ao receptor de exportação nuclear Crm1p e direciona Yap1p do núcleo para o citoplasma (Kuge, Jones e Nomoto, 1997; Yan, Lee e Davis, 1998) (Figura 5). O tratamento com um agente oxidante, como por exemplo, a diamida ou o dimetil maleato que atuam diretamente modificando os resíduos de cisteínas presentes na porção C do domínio rico em cisteína C-CRD levando a alterações conformacionais que impedem a interação entre Yap1p e Crm1p, resultando na acumulação de Yap1p no núcleo ativando a expressão de genes alvos (Kuge, Jones e Nomoto, 1997).

A resposta mediada por Yap1p durante o estresse oxidativo, iniciada pela exposição ao peróxido de hidrogênio, é detectado pela Gpx3p peroxidase (Delaunay *et al.*, 2002) que transduz um sinal para Yap1p através da formação de

pontes dissulfeto entre uma cisteína (Cys-598) na C-CRD (Delaunay *et al.*, 2002), dependente da presença da proteína de ligação Ybp1p (Veal *et al.*, 2003; Gulshan, Rovinsky e Moye-Rowley, 2004). O intermediário Gpx3p-Yap1p não pode ser formado na ausência de Ybp1p (Veal *et al.*, 2003) (Figura 5).

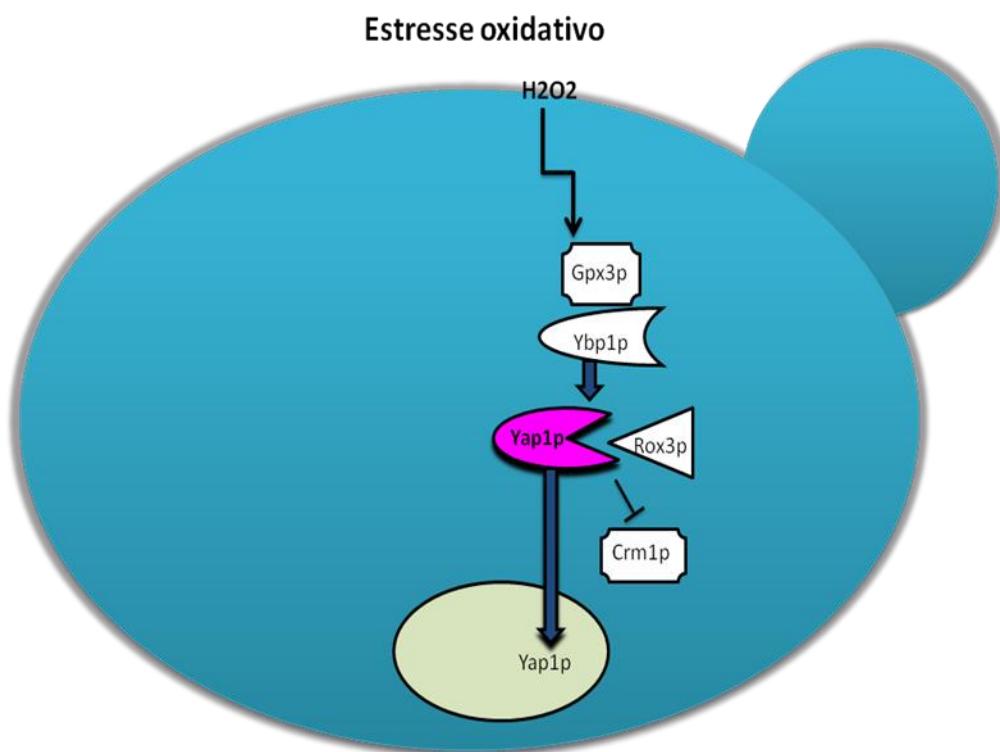


Figura 5: Via de resposta ao estresse oxidativo mediado por Yap1p. A resposta durante o estresse oxidativo é iniciada pela exposição ao peróxido de hidrogênio, e detectado pela Gpx3p peroxidase que transdiz um sinal para Yap1p através da formação de pontes dissulfeto dependente da presença da proteína de ligação Ybp1p. Esta ligação altera a conformação de Yap1p que fica incapaz de interagir com Crm1p e recruta Rox3p.

Esta nova conformação adotada por Yap1p é incapaz de interagir com Crm1p e capaz de recrutar Rox3p, um componente transcricional mediador para promotores alvos na resposta ao peróxido de hidrogênio (Gulshan, *et al.*, 2005). A

função de Ybp1p no dobramento de Yap1p ainda não é muito bem conhecida; sabe-se que Ybp1p é necessária para a resposta ao peróxido de hidrogênio, mas não é necessária para a resistência a diamida (Veal *et al.*, 2003; Gulshan, Rovinsky e Moye-Rowley, 2004).

A superprodução de Ybp1p, mas não de Yap1p, possibilitou um aumento na resistência ao peróxido de hidrogênio (Gulshan, Lee e Scott Moye-Rowley, 2011). Comparando o resultado obtido com diamida, foi caracterizado um fenótipo hipersensível em relação ao fenótipo selvagem. A maior produção de Ybp1p também aumentou sua associação com Yap1p vivo. Sua conformação permite a indução de genes alvos, de modo que Yap1p apresenta dois diferentes conjuntos definidos pela associação com Ybp1p.

Contrastando com a regulação redox de Yap1p, encontramos Skn7p que é constitutivamente nuclear (Brown, Bussey e Stewart, 1994; Lu, Deschenes e Fassler, 2003). Skn7p é capaz de associar-se com promotores de resposta ao estresse oxidativo. Porém existe uma provável convergência entre Yap1p e Skn7p, já que estes fatores transcripcionais estão envolvidos na ativação de promotores na manutenção de genes da tioredoxina, a exemplo, do *TRX2*, que é alvo da regulação por ambos os fatores transcripcionais. Essa convergência não é restrita apenas para genes relacionados com a tioredoxina (Morano, Grant e Scott Moye-Ro, 2011).

Em condições normais de crescimento, o receptor de osmolaridade Sln1p é mantido em seu estado fosforilado. Em condições de estresse, a perturbação osmótica, num processo MAPK dependente, irá deprimir a atividade quinase associada à fosfotransferase para Ypd1p, Ssk1p e Skn7 (Maeda, Wurgler-Murphy e Saito, 1994). A redução da atividade quinase e fosfotransferase resulta no

acúmulo da forma não fosforilada de Ssk1p, o que estimula Ssk2p e Ssk22p MAP quinases da via HOG (Posas e Saito, 1998). Em contraste, a fosforilação de Skn7 não afeta a resposta osmótica (Fassler e West, 2011).

O papel do Skn7p na sinalização da via de resposta da parede celular é dependente da fosforilação de Sln1p e independente do estresse oxidativo (Fassler e West, 2011). Skn7p codifica um regulador de resposta que contém um domínio receptor típico para sistemas de transdução de sinal de dois componentes (Brown,North e Bussey,1993,Morgan *et al.*, 1995). Um fosfo aceptor de resíduos de aspartato (D427) no domínio receptor, fosforilado por Sln1p, necessário para a ativação de Skn7p (Ketela *et al.*, 1998, Li *et al.*, 1998).

Expressão de genes relacionados com a manutenção da parede celular e ciclo celular são dependentes D427 de Skn7p indicando o envolvimento da via SLN1-SKN7 nestes processos (Brown, Bussey e Stewart, 1994; Morgan *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998; Raitt *et al.*, 2000).A quinase Sln1p é autofosforilada no resíduo H576 em condições fisiológicas; em condições de estresse, ocorre redução na sua atividade quinase e acúmulo de sua forma desfosforilada(Fassler e West, 2011). O grupo fosforil de H576 é transferido para o domínio receptor de Sln1p, seguindo para Ypd1p e, finalmente, para os domínios de Ssk1p e D427 de Skn7 (Figura 6). Nem todos os genes dependentes de Skn7p necessitam da fosforilação aspartil a exemplo dos genes relacionados ao estresse oxidativo.

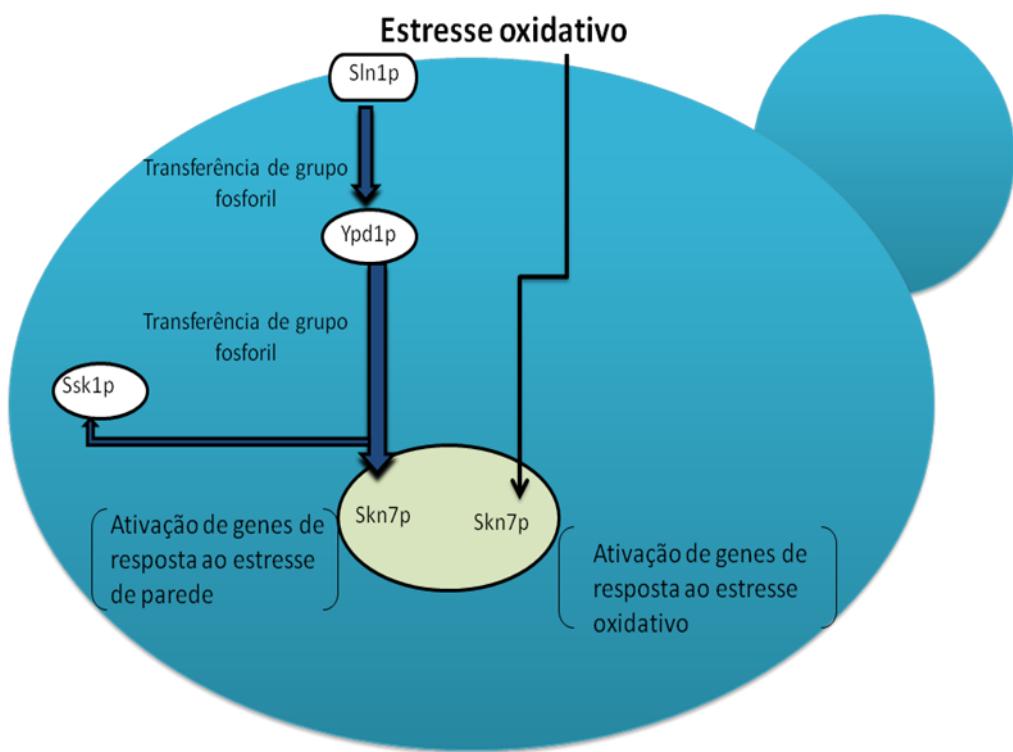


Figura 6: Via de resposta mediada por Skn7p. A transferência de um grupo fosforil de 576 para o domínio receptor de Sln1p e depois para Ypd1p e para os domínios de Ssk1p e Skn7p leva a ativação de genes relacionados com a resposta ao estresse de parede, enquanto que os genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo não são ativados por essas fosforilações.

A análise de algumas proteínas envolvidas em diferentes vias de resposta em *S. cerevisiae* sugere que estas proteínas estão envolvidas nas mesmas vias de respostas, podendo interagir entre si. Uma única proteína pode interagir com diversos parceiros em diferentes condições, resultando em diferentes efeitos biológicos(Cho *et al.*, 2004). Portanto o conhecimento das interações entre as proteínas seria de grande valor para compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na manutenção da viabilidade diante das perturbações induzidas por agentes estressores.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Compreender melhor a ação das proteína Ylr194c, Smi1, Yap1, Slg1, Slt2 no processo de manutenção da viabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1. Objetivo específicos

- 1.**Identificar possíveis pontos de conexão entre as diferentes vias de resposta a agente estressores em *Saccharomyces cerevisiae*;
- 2.**Caracterizar o efeito fisiológico das interações, se encontradas, diante de um agente estressor.

4. Material e Métodos

Os métodos de Biologia Molecular empregados nesse trabalho foram realizados de acordo com Sambrook *et al.* (1989), e métodos de cultura e manipulação de *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com Sherman *et al.*, (1986).

4.1.1. Cepas de leveduras

Tabela 1: Cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas nesse estudo.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Genótipo	Referência
L40	<i>MAT</i> α <i>his3d200trp1-901leu2-3,311ade2 lys2-801am URA3::(lexAop)₈-LACZ LYS2::(lexAop)₄-HIS3 GAL4 gal80</i>	Vojtek e Hollenberg, 1995
W303	<i>MAT-a ade2-1,100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, can1-100).</i>	Wallis <i>et al.</i> , 1989

4.1.2. Cepa bacteriana

Tabela 2: Cepa de *E. coli* utilizada nesse estudo.

<i>E. coli</i>	Genótipo	Referência
DH5α	<i>supE44 DlacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1</i>	Hanahan, 1983

4.1.3. Plasmídeos

Tabela 3: Plasmídeos utilizados nesse estudo.

Plasmídeos	Características	Referências
pBTM	BDLexA, TRP1 2μm	Bartel <i>et al.</i> , 1993
pGADC2	BDGAL4, Leu2 2μm	James <i>et al.</i> ; 1996

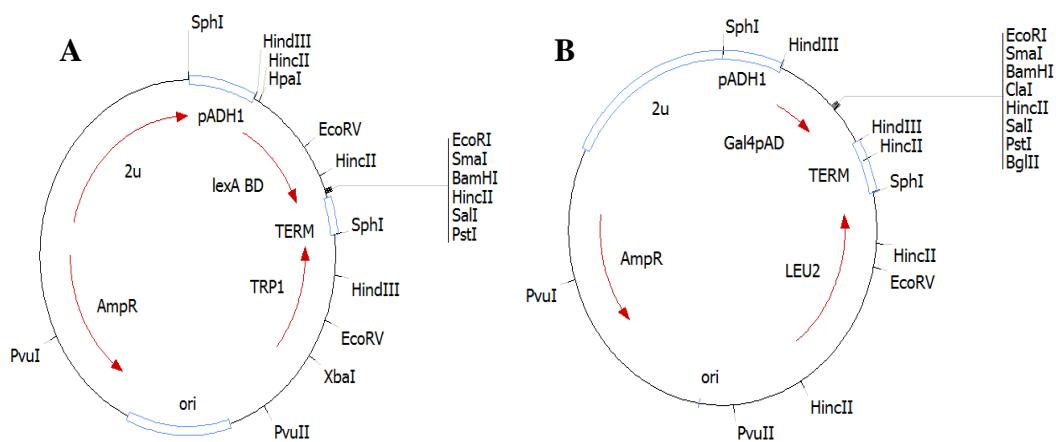


Figura 7: Desenho esquemático dos vetores pBTM (mostrado em A) e do vetor pGADC2 (mostrado em B).

4.1.4. Primers

Tabela 4: Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes por PCR. Em todas as PCRs, com exceção da ORF *SLT2*, foram utilizados ciclos de desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguidos por ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 52°C por um minuto, e extensão por dois minutos, seguidos por extensão final a sete minutos. Para a ORF *SLT2*, as condições de desnaturações foram mantidas, o anelamento foi realizado a 55°C por

um minuto, as denaturações foram alteradas para 66°C por quatro minutos e a final por 15 minutos.

ORFs	Sequências
<i>YLR194c</i>	F-5'CCCGGGCATGAAGGCCTGTTCCATA3'
<i>YLR194c</i>	R-5'GTCGACCTATAACAAAAGGGCACCA3'
<i>SLT2</i>	F-5'CCCGGGCATGGCTGATAAGATAGAG3'
<i>SLT2</i>	R-5'GGATCCCTAAAAATTTTCTATCTAATCC3'
<i>SLG1</i>	F-5' CCCGGGCATGAGACCGAACAAACA 3'
<i>SLG1</i>	R-5' GGATCCTCAATCAGCTTCGTCTGGA 3'
<i>HOG1</i>	F-5' CCCGGGCATGACCACTAACGAGGAA 3'
<i>HOG1</i>	R-5'GGATCCTACTGTTGGAACTCATTACGTACTGTAT3'
<i>YAP1</i>	F-5' CCCGGGCATGAGTGTCTACCGCC 3'
<i>YAP1</i>	R-5'GTCGACTTAGTCATATGCTTATTTC 3'

4.1.4. Meios de cultura

Tabela 5: Meios de cultura utilizados nesse estudo.

Meios de cultura	Composição
LB	Peptona ou triptona 1%; extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5
LB- Amp	LB contendo ampicilina na concentração final de 100µg/mL. Nos meios sólidos adiciona-se ágar a 2%.
YNB-Glicose	YNB 0,7%, glicose 2%. Aminoácidos e a base nitrogenada
YPD	Extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%, sólidos com ágar a 2%.

4.1.5. Soluções e tampões de uso geral

Tabela 6: Soluções e tampões de uso geral utilizados nesse estudo.

Soluções e tampões	Composição
Buffer Z	60 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , pH 7,0.
Solução de acetato de lítio/PEG	40% PEG ₄₀₀₀ , 100 mM acetato de lítio, 10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA pH 7,0.
GET	50mM glicose, 25mM Tris-Cl(pH=8,0) 10mM EDTA (pH=8,0)
TE	100mM de Tris-Cl (pH 8,0) e 10mM de EDTA (pH 8,0)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo em N,N-dimetilformamida (50 mg/mL).
Tampão PBS	NaCl 137mM, Fosfato 10mM, KCl 2,7mM (pH 7,4)

4.2. Manipulação do DNA

4.2.1. Extração do DNA plasmidial de *E. Coli*

Os plasmídeos foram extraídos através do método de lise alcalina (BirnboimDoly, 1979) segundo as modificações de Sambrook *et al.*, (1989).

Uma colônia de bactéria foi inoculada em 2mL de meio LB contendo o antibiótico, e incubados a 37°C sob agitação por 12h. Após o crescimento, cerca de 1,5mL de cultura foi centrifugada a 12.000 rpm por um minuto, tendo seu sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspendido em 100µl de GET. Logo após, adicionou-se 200µl da solução de SDS NaOH (1% de SDS, 200mM NaOH). As amostras foram homogeneizadas por inversão, e incubadas por cinco minutos no gelo. Em seguida adicionou-se 150µl de 7,5M acetato de amônio, e novamente inverte os tubos para homogeneização, seguidos por incubação por cinco minutos no gelo. Centrifugou-se o material a 12.000 rpm por 10 minutos, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Ao sobrenadante, adicionou-se 500µl de isopropanol, invertem-se os tubos, e centrifuga a 12.000 rpm por 10 minutos. Descarta-se o sobrenadante, e lava o pellet com 500µl de etanol 70%. Agitou-se o material no vórtex por dois minutos, e centrifuga a 12.000 rpm por 5 minutos. Retira-se todo o etanol, deixando o DNA secar por cinco minutos a temperatura ambiente. A seguir ressuspende o DNA em 100µl de TE.

4.2.2. Eletroforese e purificação do DNA em gel de agarose

Os DNAs plasmidiais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, a uma voltagem de 100 volts por 30 minutos. A eletroforese foi realizada com TAE 1X (40mM Tris-acetato pH 8,5; 2mM EDTA).

Os Fragmentos de DNA foram recuperados de gel de agarose utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA), a purificação do DNA foi realizada por imobilização em coluna de troca iônica, sendo ligados a uma membrana se sílica gel, lavados com álcool, seguindo as instruções do fabricante.

4.2.3. Amplificação do DNA por PCR

Nas reações de PCR foram empregados primers específicos para cada gene, e amplificados de acordo com os ciclos descritos anteriormente (Tabela 6). Os amplicons foram separados em gel agarose a 1% e purificados através, do kit Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA), conforme descrito anteriormente.

4.2.4. Clonagem

Os primers correspondentes a cada uma das ORFs mencionadas anteriormente foram desenhados utilizando o software Clone Manager. A estes iniciadores foram acrescentados sítios de restrição para *BamHI* e *SmaI* nos primers de *HOG1*, *SMI1*, *SLG1*, *SLT2*, e *SmaI* e *Sall* nos primers de *YLR194C* e *YAP1*.

Todas as ORFs amplificadas por PCR foram digeridas com suas respectivas enzimas, bem como os vetores pBTM e pGADCC2(Bartelet *al.*, 1993),

As reações de ligação foram realizadas segundo Sambrook *et al.*, (1989) a 16ºC por pelo menos 12 horas com a enzima T₄ ligase com o seu tampão apropriado (*New England Biolabs*).

Os plasmídeos pGADC₂- *HOG1*, pGADC₂- *YLR194C*, pGADC₂-*YAP1*, pGADC₂-*SLG1*, pGADC₂-*SLT2*, pBTM-*YLR194C* e pBTM-*YAP1* foram utilizados para os testes em duplo híbrido. Todos estes genes foram clonados em fusão com o domínio de ativação de *GAL4*, presente no pGADC2, e dominínio de ligação de *LEXA* presente no pBTM.

4.3. Transformação em células competentes de *E. coli*

A transformação foi realizada de acordo com Kurien *et al.*, (1995). Bactérias foram incubadas a 37ºC até aproximadamente uma OD₆₀₀ de 0,6. As amostras foram ressuspendidas em solução de cloreto de cálcio 1mM e conservadas em 15% de glicerol a -80ºC. A suspensão de células competentes foram descongeladas, seguida da adição de 50ng de DNA plasmidial. As células foram mantidas no gelo por 30 minutos, e submetidas ao choque térmico a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1mL de LB líquido e incuba-se a 37ºC por 50 minutos. A cultura foi centrifugada e o sobrenadante, aproximadamente 950µl, descartado. A suspensão que restou, cerca de 100µl, foi plaqueada em meio seletivo (LB-Amp), para a seleção dos transformantes, e as placas incubadas por cerca de 12 horas a 37º C.

4.4. Análise de restrição

Os DNAs plasmidiais extraídos de bactéria foram clivados com as enzimas de restrição apropriadas e submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% a uma voltagem de 100 volts por 30 minutos.

4.5. Sequenciamento de plasmídeos

O DNA plasmidial extraído de *E. coli* foi sequenciado utilizando o *kit* BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando o seqüenciador ABI 3.500.

4.6. Transformação de levedura

A transformação foi feita com acetato de lítio e DTT, conforme descrito por Chen *et al.*, (1992). As células cresceram a 30°C com constante agitação por 18 horas até atingir a fase exponencial com OD₆₀₀ maior ou igual a 0,6. As células foram lavadas com TE, e em seguida ressuspensas em solução de LiAc-PEG-DTT (0,2 M acetato de lítio, 50% PEG, 1M DTT). Em seguida, foram adicionados 2-5 µg de DNA plasmidial e incubadas a 42°C por 30 minutos. Seguido de plaqueamento em meio seletivo (YNB com glicose, adenina e histidina).

4.7. Análise da interação entre proteínas pelo método do duplo híbrido

O plasmídeo pBTM utilizado nesse trabalho, apresenta a seqüência de ligação ao DNA do “DNA-Binding Domain” de LexA (BD-lexA), que se encontra sob o controle do promotor constitutivo *ADH1*, o qual possui a marca de seleção para *TRP1* em levedura.

Todos os genes inseridos no plasmídeo pBTM, geram proteínas de fusão LexA BD (Figura 7), ao genes inseridos no plasmídeo pGADC2 (James *et al.*, 1996) geraram proteínas de fusão com a seqüência do “Activation Domain” (AD, domínio de ativação) (Figura 7) de *Gal4*, sob o controle do promotor constitutivo *ADH1*, contendo *LEU2* como marca de seleção em levedura.

Para identificação das interações, o BD e o AD foram fusionados às proteínas de interesse (Figura 8), de modo que a transcrição do gene repórter

HIS3 depende da interação dessas proteínas fusionadas aos respectivos domínios. Após a transformação as colônias foram analisadas através das marcas de auxotrofia em placas de ágar contendo meio de cultura YNB, glicose e o aminoácido adenina. Já que os vetores possuem marcas para leucina, triptofano, e a interação promove a transcrição do gene repórter *HIS3* responsável por uma das etapas da via de síntese da histidina.

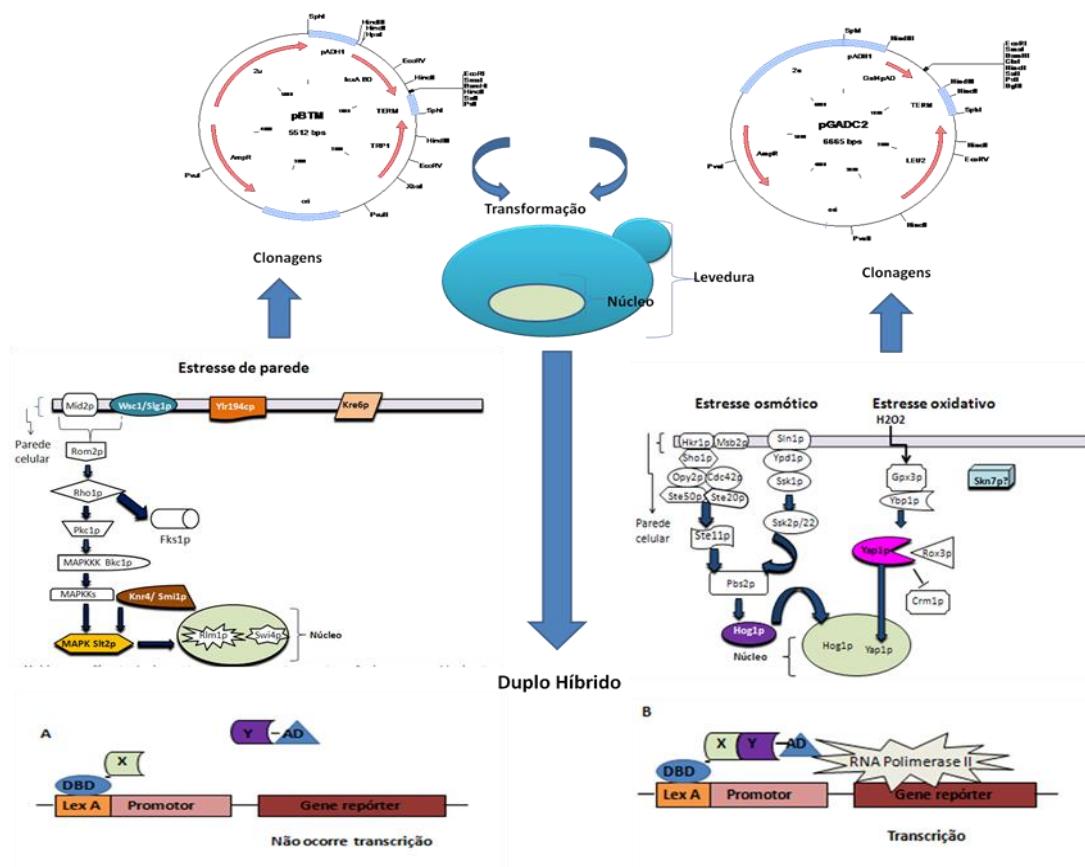


Figura 8: Sistema do duplo híbrido de levedura. Os genes responsáveis pelas proteínas X e Y são introduzidas nos vetores pBTM e pGADC2, e depois transformadas em *Saccharomyces cerevisiae* (A) Uma “isca” é formada com a proteína de interesse X fusionada ao domínio de ligação ao DNA (DBD). A “presa” é formada pela proteína Y fusionada ao domínio de ativação (AD). (B). A isca (DBDX) liga-se a sequência ativadora de LexA e a interação entre a isca e a presa permite o recrutamento da RNA polimerase para o sítio de ativação possibilitando a transcrição do gene repórter.

5. Resultados

5.1 Clonagens

Os genes alvos deste estudo foram amplificados a partir de *primers* construídos afim de inserir sítios de restrição para posterior ligação nos vetores pBTM e pGADC2 (Figura 9).

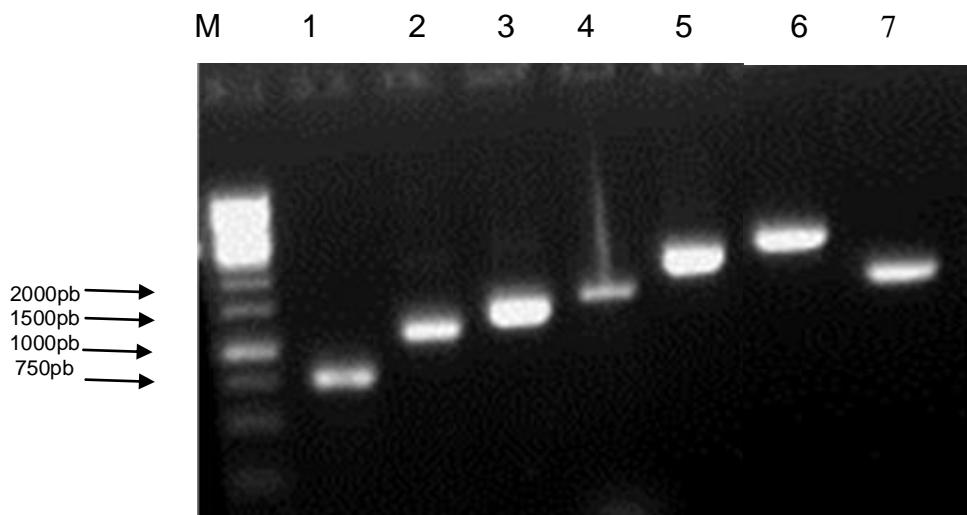


Figura 9- Eletrofrese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR dos seguintes genes: 1: *YLR194C* (tamanho 765pb); 2: *SLG1* (tamanho: 1.137pb); 3: *HOG1* (tamanho 1.308pb); 4: *SMI1* (tamanho: 1.518pb); 5: *YAP1* (tamanho: 1.953pb); 6: *KRE6* (tamanho 2.163pb); 7: *SLT2* (1.455pb); M: marcador generuler 1kb DNA ladder.

Para possibilitar a clonagem, os vetores pBTM e pGADC2 foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição cujos sítios estão presentes nos insertos amplificados (Figura 10).

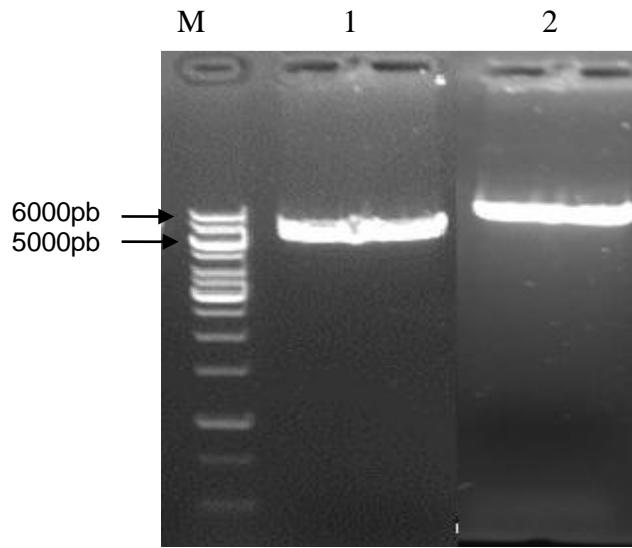


Figura 10- Gel em gel de agarose 1% dos vetores (1) pBTM (tamanho 5512pb), (2) pGADC2 (tamanho 6665pb), M: marcador generuler 1kb DNA ladder.

Os fragmentos amplificados contendo seus respectivos sítios de restrição foram克lonados no vetor pGADC2 de maneira a se obter fusões entre o domínio de Gal4p (AD) de ativação da transcrição, com as proteínas em estudo, o qual foi confirmado por PCR e digestão (Figuras 11, 12, 13 e 14).

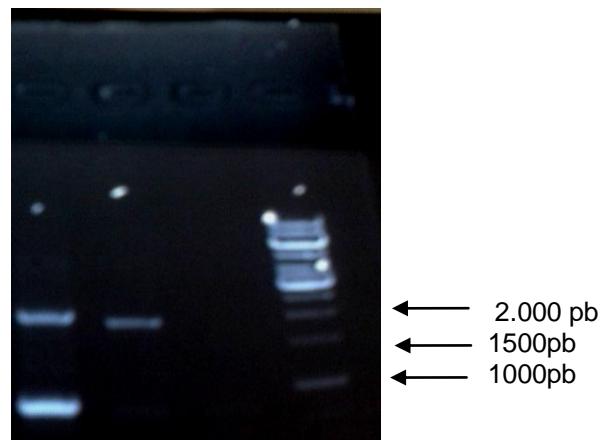


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene YAP1 (tamanho 1.953 pb)克lonado no vetor pGADC2 (1), YAP1 controle positivo produto de PCR (usando DNA genômico) (2) e controle negativo (sem DNA) (3), M: marcador generuler 1kb DNA ladder.

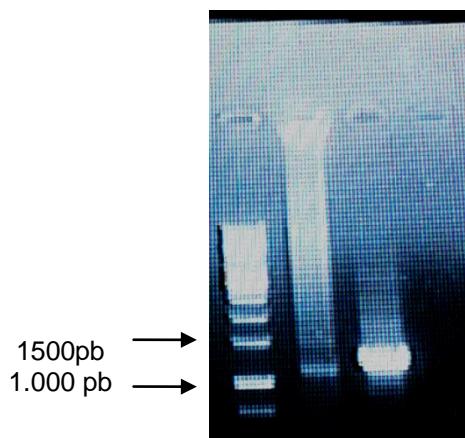


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene *HOG1*(tamanho 1.308 pb) clonado no vetor pGADC2 (1), *HOG1* controle positivo produto de PCR (usando DNA genômico) (2) e controle negativo (sem DNA) (3), M: marcador generuler 1kb DNA ladder.

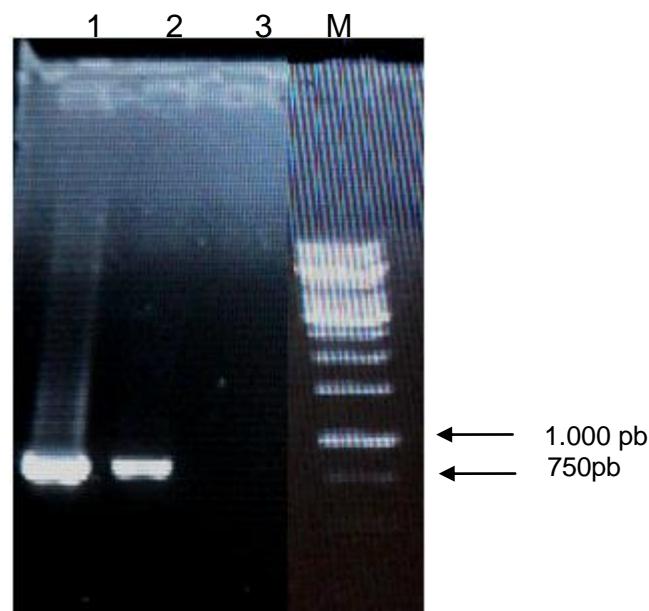


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene *YLR194C* (tamanho 765 pb) clonado no vetor pGADC2 (1), *YLR194C* controle positivo produto de PCR (usando DNA genômico) (2) e controle negativo (sem DNA) (3), M: marcador generuler 1kb DNA ladder.

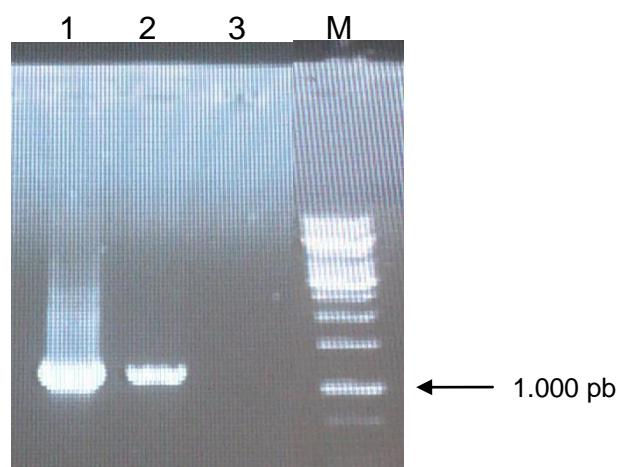


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene *SLG1*(tamanho 1.137 pb) clonado no vetor pGADC2 (1), *SLG1* controle positivo produto de PCR (usando DNA genômico) (2) e controle negativo (sem DNA) (3), M: marcador generuler 1kb DNA ladder.

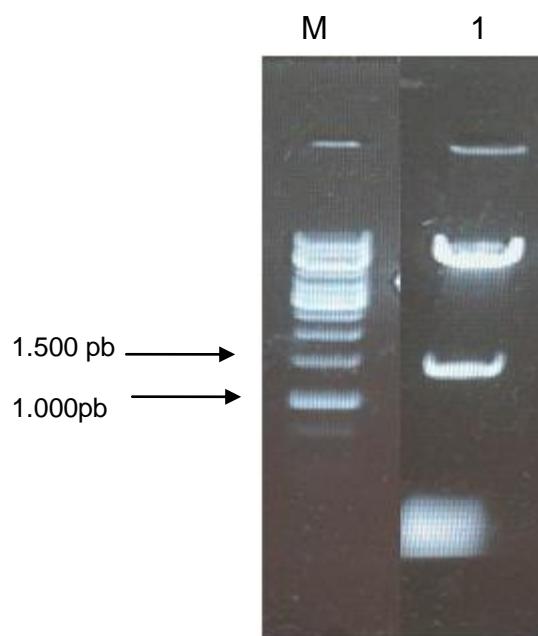


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de restrição com as enzimas *SmaI* e *BamHI* do gene *SLT2* (tamanho 1.455 pb) clonado no vetor pGADC2 (1), M: marcador generuler 1kb DNA ladder

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pBTM, desta maneira, foram obtidas fusões entre o domínio de ligação ao DNA da proteína LexA (BD) com as proteínas em estudo, o que foi confirmado por PCR (Figuras 16 e 17).

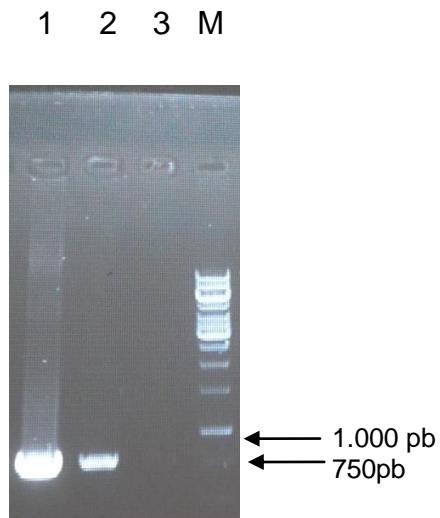


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene *YLR194* (tamanho 765 pb) clonado no vetor pBTM (1), *YLR194C* controle positivo produto de PCR (usando DNA genômico) (2) e controle negativo (sem DNA) (3), M: marcador generuler 1kb DNA ladder.

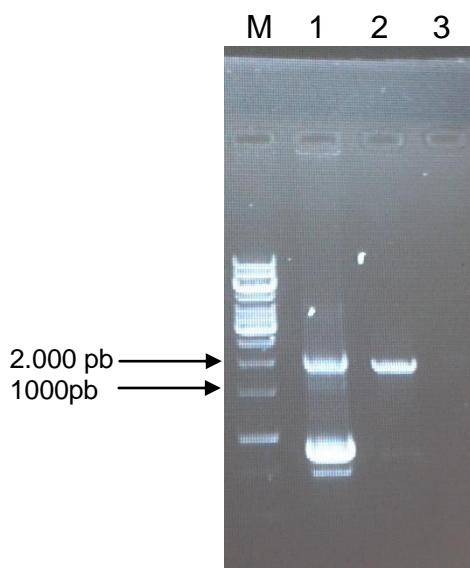


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR do gene *YAP1* (tamanho 1.953 pb) clonado no vetor pBTM (1), *YAP1* controle positivo produto de PCR (usando DNA genômico) (2) e controle negativo (sem DNA) (3), M: marcador generuler 1kb DNA ladder.

5.2 Interações entre as proteínas na ausência de agentes estressores

Os diferentes plasmídeos obtidos foram transformados dois a dois na cepa de levedura L40, testando todas as possíveis interações.(Figuras 18, 19, 20 e 21).Os resultados encontrados mostram a interação entre as proteínas Ylr194c e Yap1 (Figura 18) e Ylr194c e Slt2 (Figura 20).

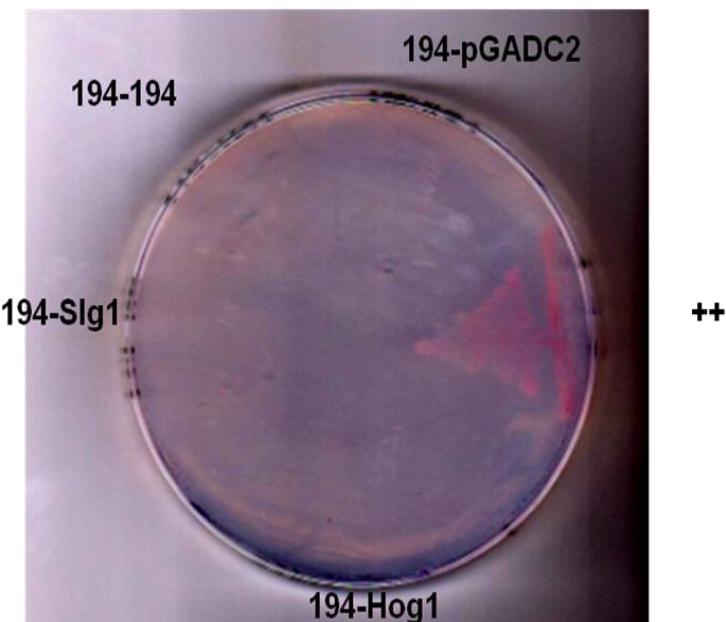


Figura 18 :Análise das possíveis interações entre a proteína Ylr194cp, Slg1p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, adeninae sem histidina indicando que não houve interações entre as proteínas quando Ylr194cp estava fusionada ao BD, controle positivo ++ (BD-Nip7p e AD-Nop8p) e controle negativo Ylr194cp com pGADC2 .

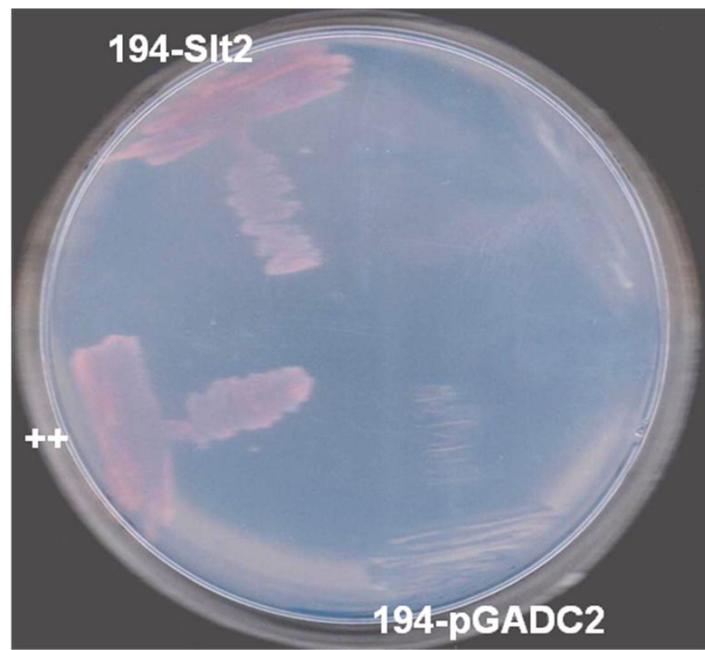


Figura 19: Análise das interações entre a proteína Ylr194cp e Slt2p. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, adenina e sem histidina indicando que houve interações entre as proteínas Ylr194cp e Slt2p, controle positivo ++(BD-Nip7p e AD-Nop8p) e controle negativo Ylr194cp com pGADC2 (3).

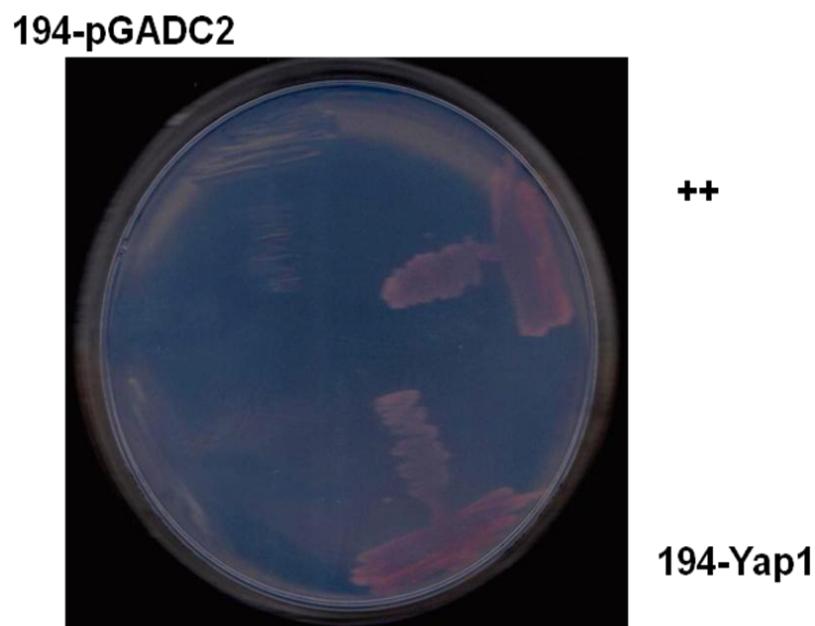


Figura 20: Análise das interações entre a proteína Ylr194cp e Yap1p. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, adenina e sem histidina indicando que houve interações entre as proteínas. Ylr194cp e Yap1p, controle positivo ++(BD-Nip7p e AD-Nop8p) e controle negativo Ylr194cp com pGADC2 (3).

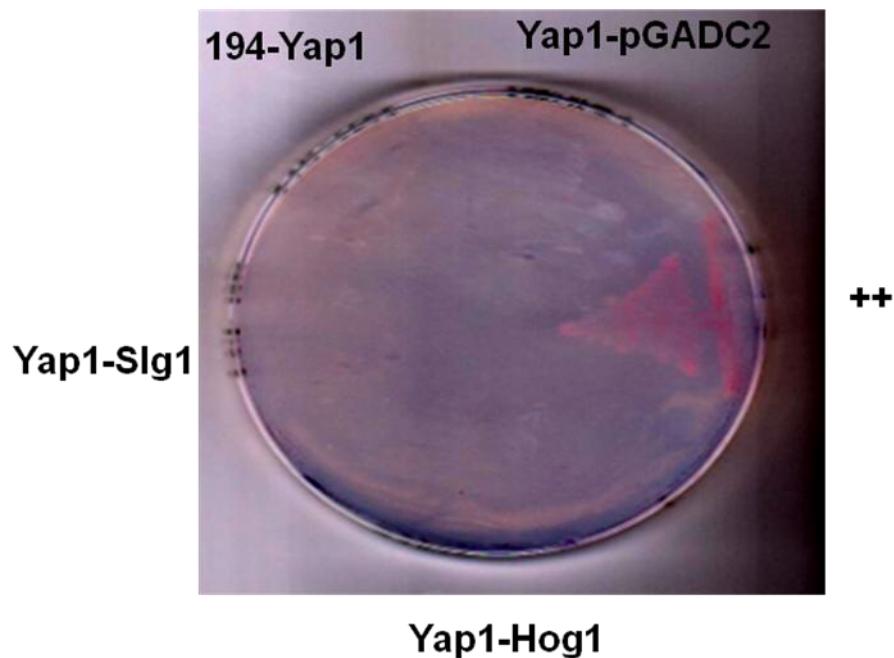


Figura 21: Interações entre as proteínas Ylr194cp,Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, adenina e sem histidina indicando que não houve interações entre as proteínas quando Yap1p estava fusionada ao BD. Controle positivo ++ (BD-Nip7p e AD-Nop8p) e controle negativo Yap1p com pGADC2 (5).

5.3 Interações entre as proteínas com tratamento com branco calcoflúor

As respostas das interações entre as proteínas: Ylr194c e Slg1, Ylr194c e Slt2, Ylr194c e Yap1, Ylr194c e Ylr194c, Ylr194c e Yap1, Yap1 e Slg1, Yap1 e Hog1, Yap1 e Ylr194c foram testadas com o tratamento com branco calcoflúor (Figuras 22 e 23). Os resultados foram positivos para as interações entre as proteínas Ylr194c e Slt2 (Figura 22) e entre as proteínas Ylr194c e Yap1 (Figura 23).

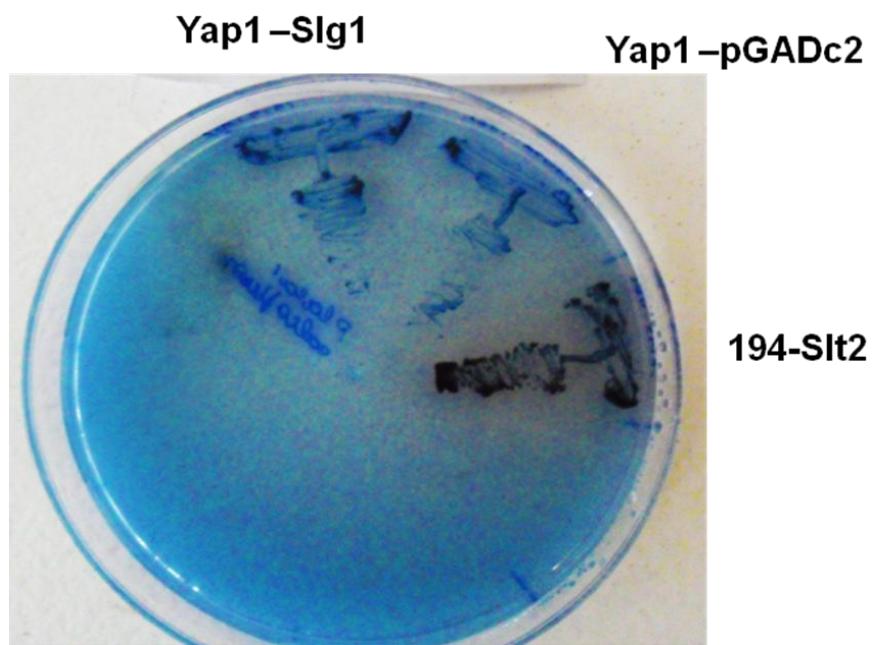


Figura 22: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, branco calcoflúor 2mg/ml, adenina e sem (1), Yap1p e Slg1cp(2) controle negativo, Yap1p com pGADC2(3) Ylr194cp com Slt2p.

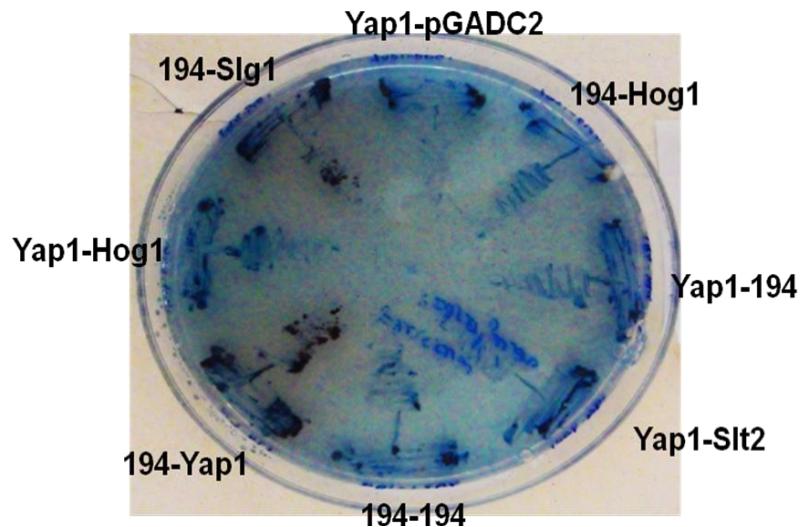


Figura 23: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, branco calcoflúor 2mg/ml, adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slg1p e entre 194cp e Yap1p.

5.4 Interações entre as proteínas diante do tratamento com etanol

As respostas das interações entre as proteínas: Ylr194c e Slg1, Ylr194c e Slt2, Ylr194c e Yap1, Ylr194c e Ylr194c, Ylr194c e Yap1, Yap1 e Slg1, Yap1 e Hog1, Yap1 e Ylr194c foram testadas após o tratamento com etanol. Os resultados encontrados foram positivos para as proteínas: Ylr194c e Slg1, Ylr194c e Slt2, Ylr194c e Yap1 na concentração de 4% e 6% (Figuras 24, 25, 26 e 27).

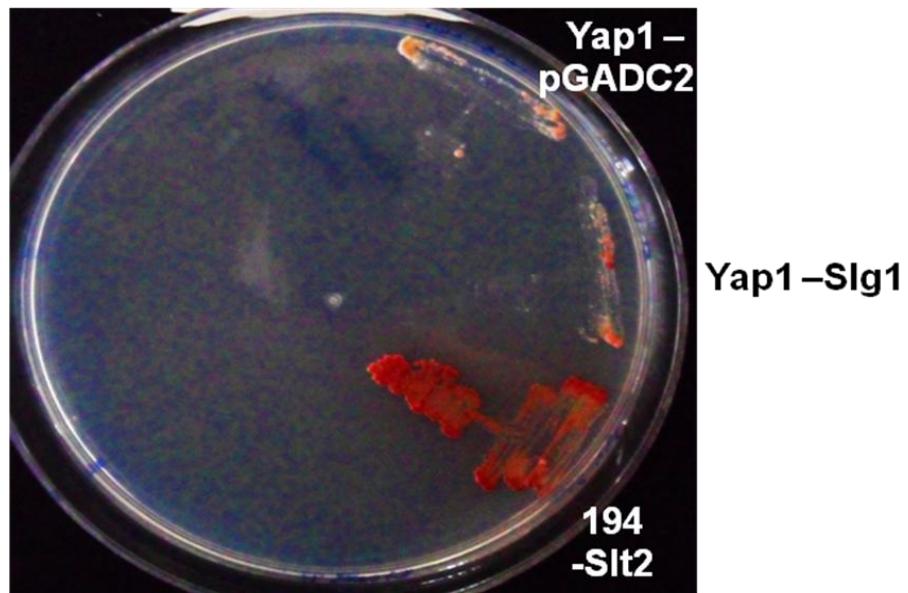


Figura 24: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, etanol 4%, adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slt2p.

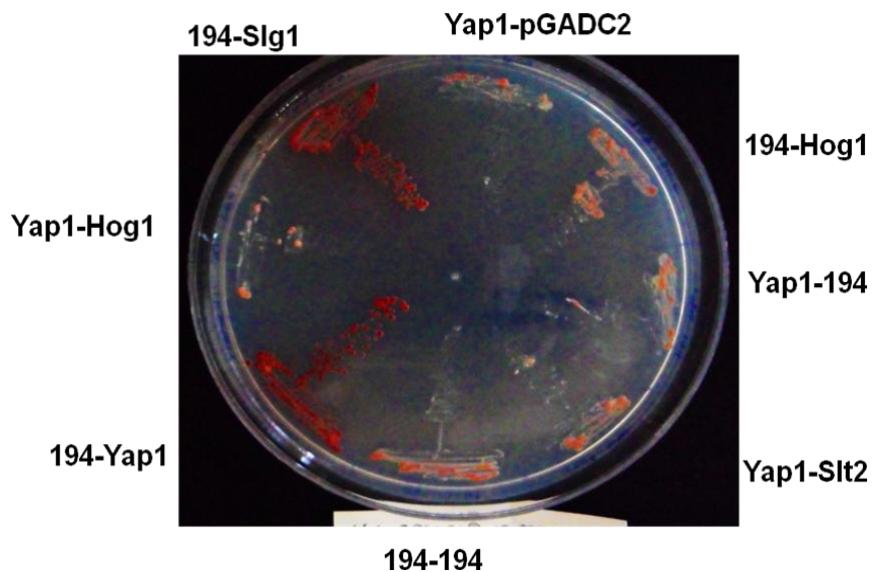


Figura 25: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, etanol 4%, adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slg1p e entre 194cp e Yap1p.

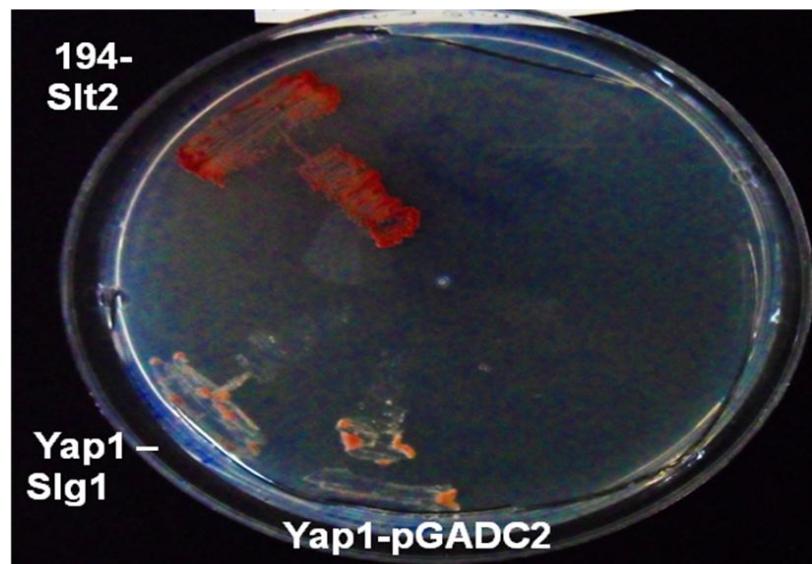


Figura 26: Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, etanol 6%, adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slt2p.

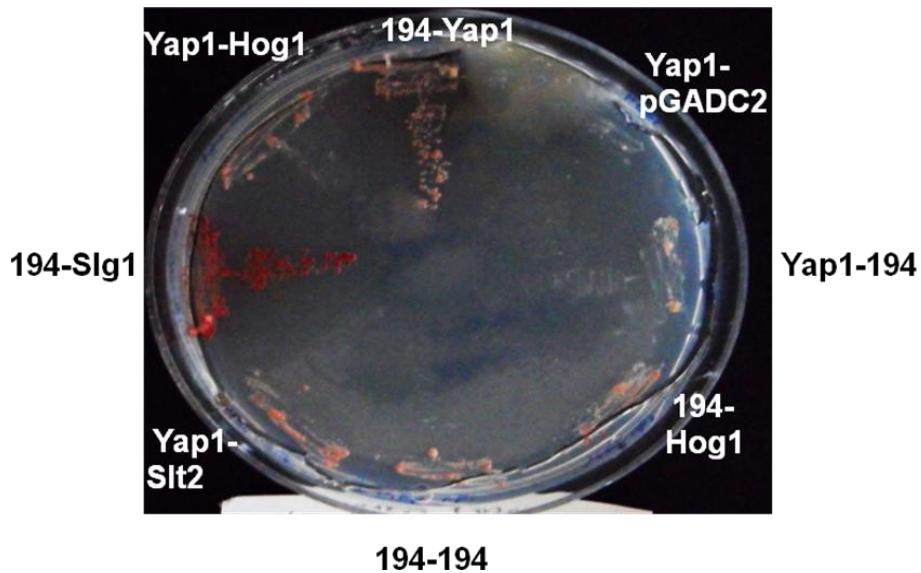


Figura 27: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, etanol 6%, adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slg1p e entre 194cp e Yap1p.

5.5 Interações entre as proteínas diante do tratamento com PHMB

As respostas das interações entre as proteínas: Ylr194c e Slg1, Ylr194c e Slt2, Ylr194c e Yap1, Ylr194c e Ylr194c, Ylr194c e Yap1, Yap1 e Slg1, Yap1 e Hog1, Yap1 e Ylr194c foram testadas após o tratamento com PHMB. Os resultados encontrados foram positivos para as proteínas: Ylr194c e Slg1, Yap1 e Slt2, Yap1 e Slg1, Ylr194c e Slt2 e Ylr194c e Yap1 na concentração de 0,00025% (Figuras 28 e 29) e para as proteínas Ylr194c e Slg1, Ylr194c e Slt2 (Figuras 30 e 31).

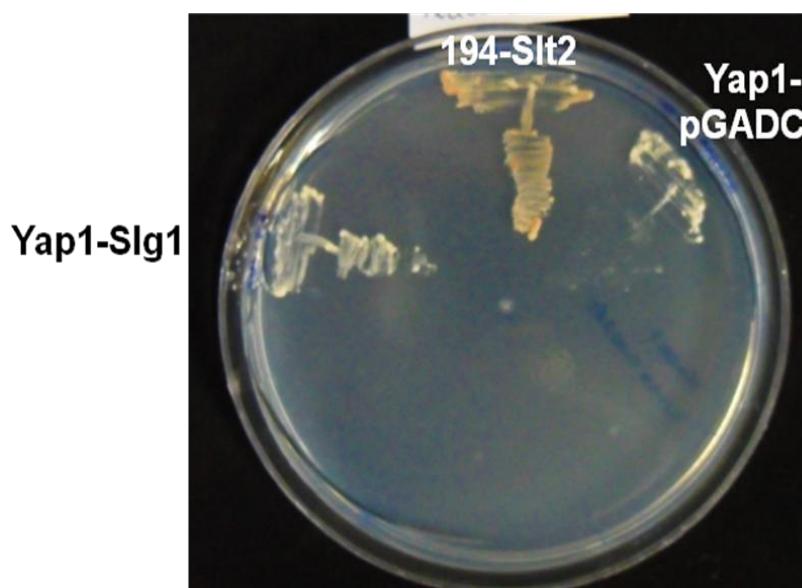


Figura 28: Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, PHMB 0,00025%,adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slt2p e entre 194cp e Slg1p.

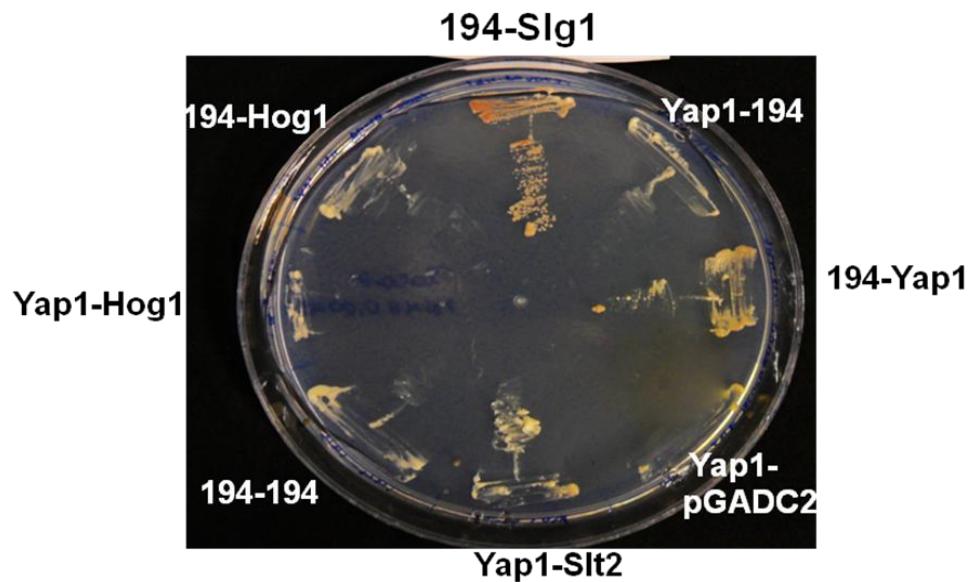


Figura 29: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, PHMB 0,00025%, adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slg1p e entre 194cp e Yap1p.

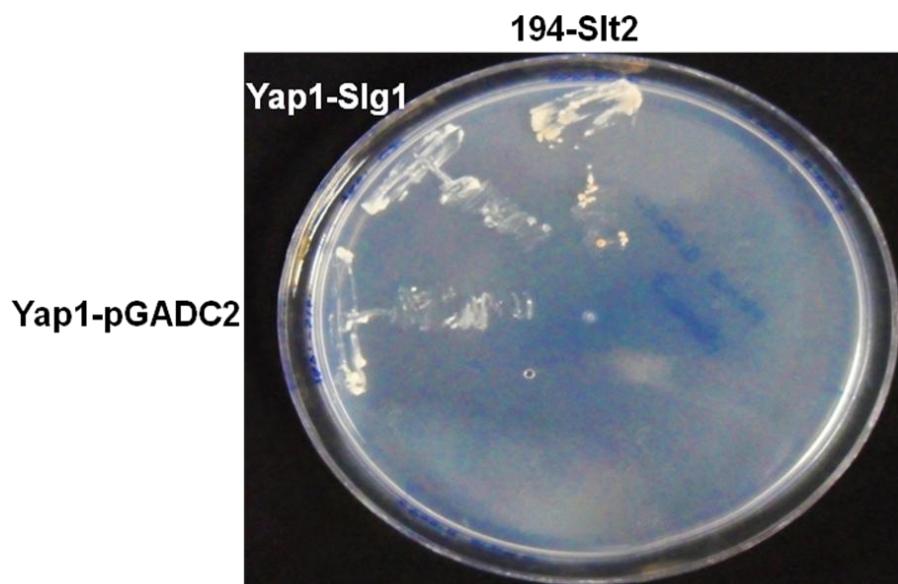


Figura 30: Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, PHMB 0,005%, adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slt2p.

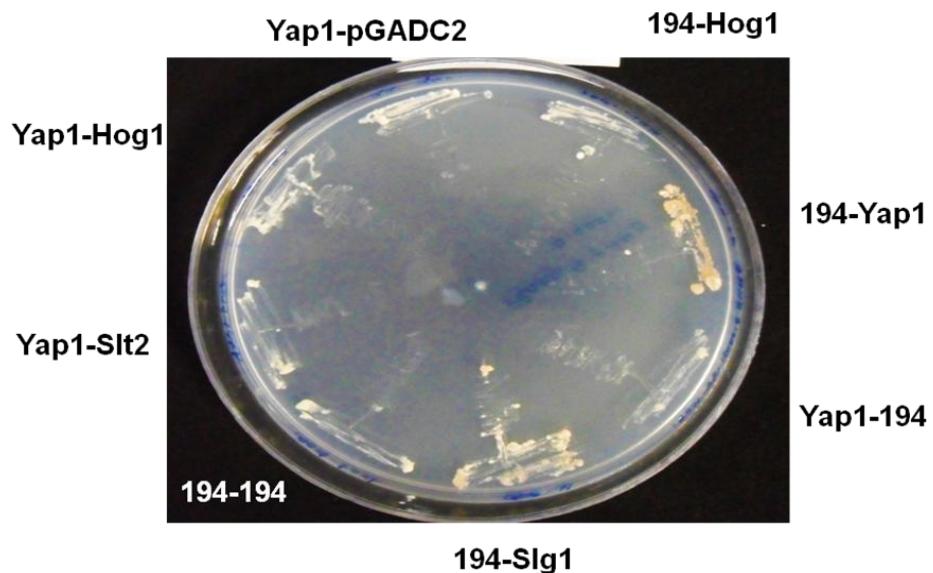


Figura 31: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, PHMB 0,005%, adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slg1p.

5.6 Interações entre as proteínas diante do tratamento com vermelho congo

As respostas das interações entre as proteínas: Ylr194c e Slg1, Ylr194c e Slt2, Ylr194c e Yap1, Ylr194c e Ylr194c, Ylr194c e Yap1, Yap1 e Slg1, Yap1 e Hog1, Yap1 e Ylr194c foram testadas após o tratamento com vermelho congo. Foram encontradas interações entre as proteínas Ylr194c e Slg1, Ylr194c e Slt2, Ylr194c e Yap1, Ylr194c e Hog1(Figuras 32, 33, 34 e 35).

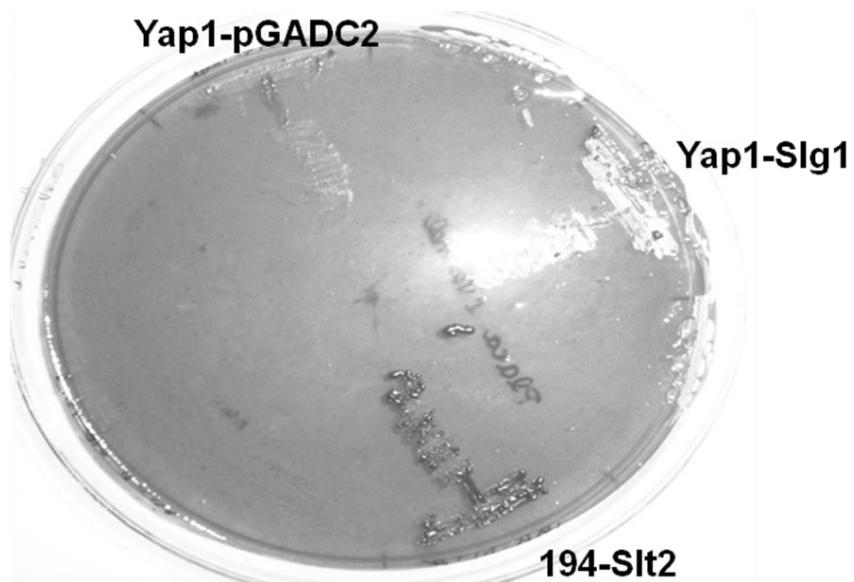


Figura 32: Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, vermelho congo 0,5mg/ml com adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slt2p.

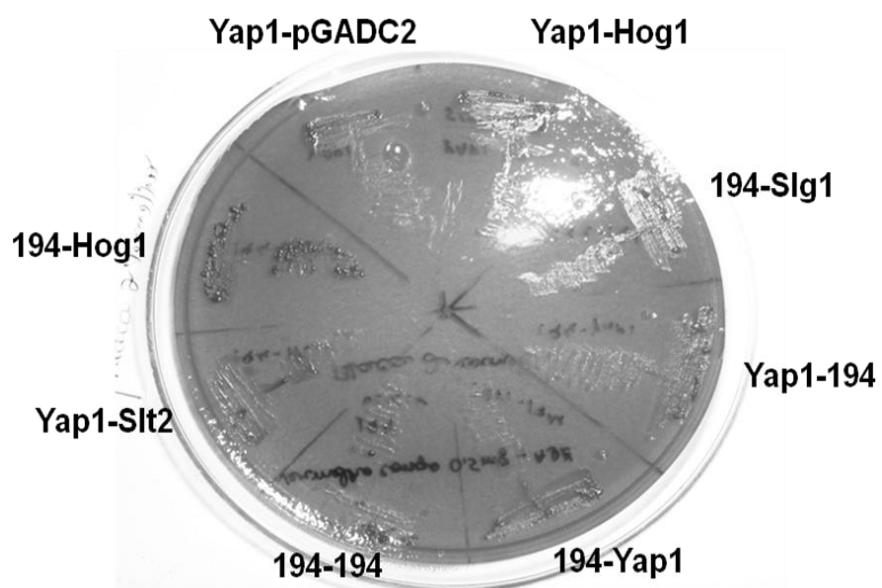


Figura 33: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, vermelho congo 0,5mg/ml , adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slg1p e entre 194cp e Hog1p.

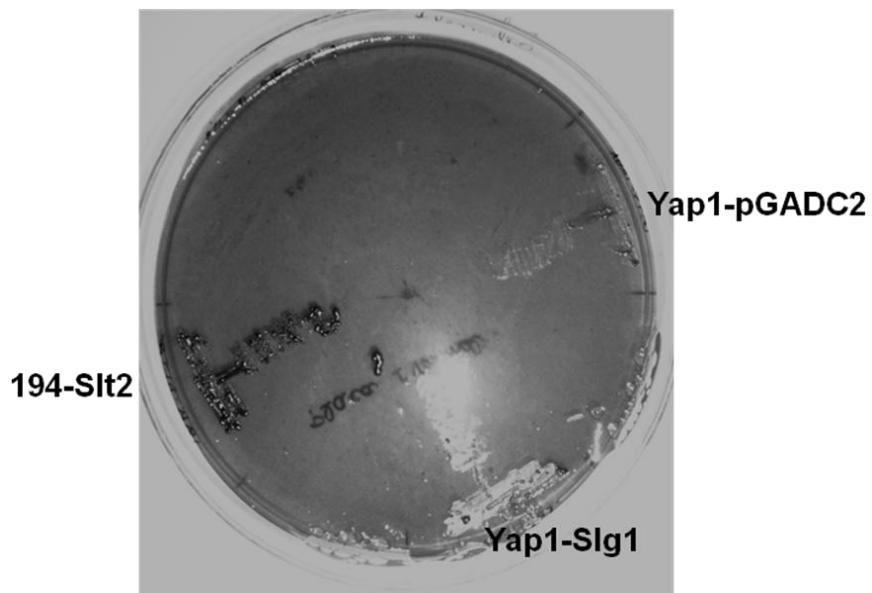


Figura 34: Interações entre as proteínas Ylr194cp, Slg1p, Hog1p e Yap1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, vermelho congo 1mg/ml com adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slt2p.

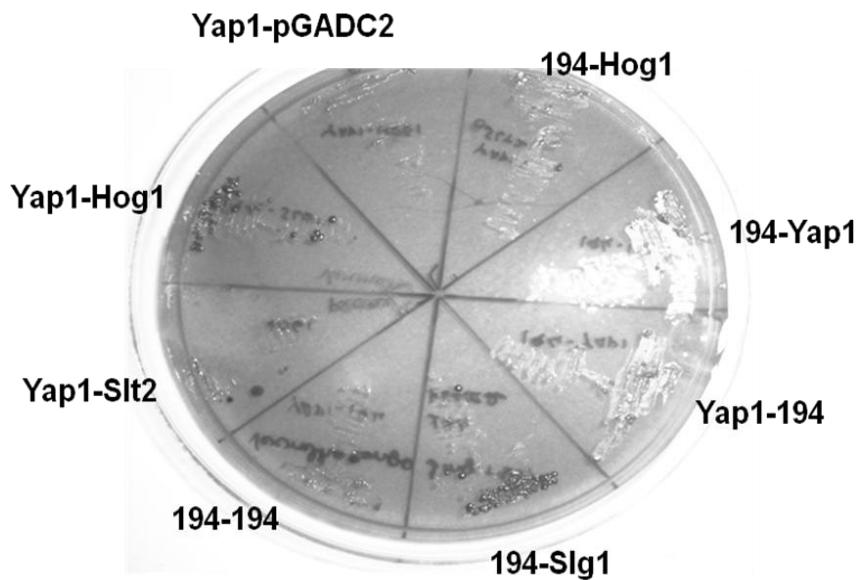


Figura 35: Interações entre as proteínas Yap1p, Slg1p, Ylr194cp, Slt2p e Hog1p envolvidas em diferentes vias de resposta a agentes estressores em *S. cerevisiae*. As amostras foram crescidas em placa com YNB com Glicose, vermelho congo 1mg/ml, adenina e sem histidina, indicando que houve interação apenas entre 194cp e Slg1p e entre 194cp e Hog1p.

Os resultados encontrados neste estudo estão resumidos na tabela 7.

Tabela 7: Resumos das interações encontradas neste estudo diante de um agente estressor.

	Calcoflúor		Etanol		PHMB		Vermelho congo		Ausência de agente estressor	
	Yap1	Ylr194c	Yap1	Ylr194c	Yap1	Ylr194c	Yap1	Ylr194c	Yap1	Ylr194c
Ylr194c		X								
Yap1				X		X		X		X
Slt2		X		X	X	X		X		X
Slg1		X		X	X	X		X		
Hog1								X		

6. Discussão

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é importante na manutenção da forma e integridade, permitindo que a célula promova seu remodelamento durante o crescimento vegetativo e morfogênese induzida por ferormônios (Cid *et al.*, 1995; Kuranda *et al.*, 2006; Truman, Kin e Levin, 2009). A biogênese da parede celular é um processo complexo e regulado tanto em níveis transcricionais como também pós traducionais (Basmaji *et al.*, 2006). O remodelamento da parede é realizado pela via de manutenção da integridade da parede celular (CWI) controlada pela GTPase Rho1p. Esta via pode ativar Fks1p, responsável pela síntese β- 1,3 glicanos, ou ativar Pkc1p, a qual ativará a via MAPK, responsável pela fosforilação de Slt2p. Este promove a fosforilação e ativação dos fatores transcricionais Rlm1p e o complexo SBF (Swi4p/Swi6p), induzindo genes envolvidos no reparo da parede (Jung *et al.*, 2002; Fuchs e Mylonakis 2009; Elsztein *et al.*, 2011; Lucena *et al.*, 2012).

Estudos realizados no nosso laboratório por Lucena *et al.* (2012) demonstraram que os genes envolvidos na via de manutenção da integridade celular são essenciais para o crescimento da levedura em ambientes ácidos, impostos pela prática do reciclo das leveduras durante o processo de fermentação. Estudos realizados por Elsztein *et al.*, (2011) demonstraram a regulação de genes necessários ao remodelamento da parede celular durante o tratamento com o biocida polihexametileno biguanida (PHMB) que possui ação biocida contra leveduras contaminantes do processo fermentativo, indicando o envolvimento dos genes da via CWI na tolerância ao estresse causado por esse polímero. Ainda naquele estudo, foram realizados ensaios de citotoxicidade com mutantes que apresentam deleções nos genes das vias CWI, *HOG1* e *YAP1*,

além de outros genes responsivos ao estresse oxidativo, apontando *HOG1* como um dos moduladores da via CWI. Também foi indicada a ligação entre *YAP1* e via CWI diante da presença do PHMB independente da participação da via de resposta ao estresse oxidativo.

A sequência YLR194c codifica uma proteína com função biológica ainda desconhecida, mas que possui um motivo teórico de uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI). Isto sugere sua localização associada à membrana plasmática. Sua expressão é regulada positivamente em resposta ao estresse de parede ou através da mutação no gene *FKS1*(Terashima *et al.*, 2000), em resposta ao PHMB (Elsztein *et al.*, 2011) e a pH ácido (Lucena *et al.*, 2012). Desta forma, caracterizar seu papel, apontando seus parceiros de interação, durante a presença de agentes estressores na fermentação é de grande importância.

Estudo realizados por Terashima *et al.* (2000) identificaram o aumento de expressão em 22 genes de *S. cerevisiae* quando o gene *FKS1* foi deletado, em comparação com a linhagem parental. Dentre esses, foram encontrados *YLR121C*, *YGR189C*, *YDR055W*, *YKL096W/CWPI* e *YLR194C*, todos sugeridos como codificadores de proteínas que contêm uma âncora GPI em sua região C terminal (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998). Entretanto, experimentos utilizando fusões das proteínas alvo com o marcador *Tag HA* mostraram que menos de 1% da proteína codificada pela ORF YLR194c estava fisicamente ligado à parede celular(Terashima *et al.*, 2000). Num segundo experimento, frações da membrana plasmática foram purificadas e identificadas, confirmando a presença da proteína codificada pelo YLR194c na membrana celular (Terashima *et al.*, 2000). De acordo com o banco de dados EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk) a proteína Ylr194c apresenta motivos de miristoilação, no qual um ácido graxo de

14 carbonos é ligado a um resíduo de glicina na porção amino terminal, conferindo um caráter hidrofóbico à proteína, além dos motivos de fosforilação e glicosilação (Figura 35). Isto corrobora a ligação dessa proteína na membrana celular.

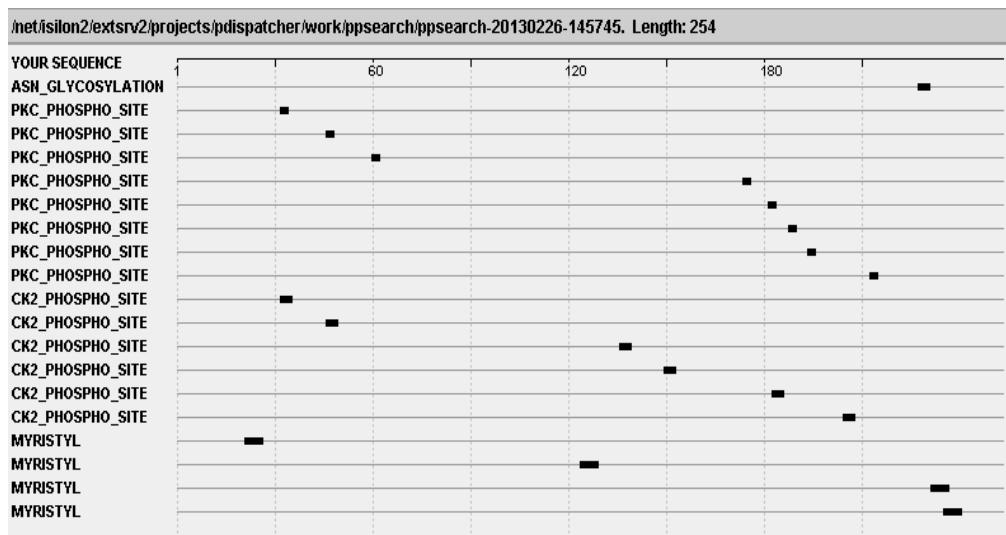


Figura 36: Motivos apresentados pela proteína Ylr194c. Fonte: <http://www.ebi.ac.uk>.

Estudos realizados por Elsztein *et al.* (2011) mostraram que o gene *YLR194C*, juntamente com os genes *CHS1*, *FKS1*, *GAS1*, *HSP150*, *KRE6*, *MSN2*, *MSN4*, *PKH1* foram superexpressos na linhagem industrial JP1 exposta ao PHMB, mas não apresentaram variação no padrão de expressão na linhagem industrial PE-2. Vale ressaltar que a linhagem JP1 é resistente ao PHMB, enquanto a linhagem PE-2 é sensível, indicando a participação daqueles genes no mecanismo de tolerância ao biocida. Ainda naquele estudo foi investigado o envolvimento do gene *YAP1* na regulação da via CWI, através da sua deleção em comparação com a linhagem parental. Os resultados demonstraram que os genes *YLR194Ce* *KRE6* (gene envolvido na síntese de β-1,6 glicanos) foram

ligeiramente mais expressos pelo tratamento com PHMB na linhagem parental, explicando a alta sensibilidade desta em relação à cepa JP1.

Como visto, o ponto chave da via de resposta ao estresse é a fosforilação de Slt2p, a qual promove a fosforilação e ativação dos fatores transpcionais Rlm1p e o complexo SBF (Swi4p/Swi6p). Slt2p pode ser ativado em resposta a estresse osmótico, oxidativo e variações no pH (Davenport *et al.*, 1995; Hahn e Thiele, 2002; Vilella *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006; Lucena *et al.*, 2012) e tolerância a ácido clorídrico (Claret *et al.*, 2005). Estudos demonstram que os genes envolvidos na biogênese (*FKS1*, *GAS1*, *KRE6* e *CHS1*) e estrutura da parede celular (*HSP150* e *YLR194C*) podem ser induzidos pelo tratamento com ácido sulfúrico, tendo sua indução reduzida no mutante de *SLT2*, seguido pela sua própria indução endógena (Lucena *et al.*, 2012). Segundo Lucena *et al.* (2012), uma cascata de amplificação de sinal pode ser criada diante do estresse ácido a partir da ativação de Slt2p que por sua vez fosforila e ativa Rlm1p, e esta juntamente com Hog1p irá aumentar novamente a expressão de *SLT2*, garantindo a expressão dos genes envolvidos na via CWI. Os dados obtidos no presente estudo mostram a existência da interação entre as proteínas Ylr194cp e Slt2p em todas as condições testadas, caracterizando-se como um resultado ainda não relatado nos bancos de dados de interação de proteínas thebiogrid.org e yeastgenome.org, embora alguns experimentos de co-expressão desses genes realizados em nosso laboratório apontassem essa possível interação (Elsztein *et al.*, 2011; Lucena *et al.*, 2012). Estudos realizados até o momento relatam a interação de Ylr194c com a proteína Ynl050cp (proteína com função desconhecida) (Krogan *et al.*, 2006), Hek2p (proteína de ligação a RNA envolvida na localização assimétrica do RNAm *ASH1*) (Hasegawa, Irie e Gerber, 2008),

Nrd1p (proteína de ligação a RNA, subunidade do complexo Nrd1)(Creamer et al., 2011), todas estas interações foram confirmadas por métodos físicos, a exemplo da cromatografia de afinidade. Também foram relatadas interações genéticas entre *YLR194C* e o *NPL3* (codifica proteína de ligação ao RNA o qual promove o alongamento, regula a terminação, cauda poliA e o deslocamento do RNAm do núcleo para o citoplasma) (Moehle et al., 2012), *SIP1*(relacionado com a subunidade beta do complexo quinase Snf1p o qual confere especificidade ao substrato) (Costazo et al., 2010), *SHS1*(componente do anel de septina necessária a citocinese)(Costazo et al., 2010), *PMA1*(relacionado com ATPase presente na membrana plasmática)(Schuldiner et al., 2005); *RAD61*(subunidade do complexo Scc3p, Pds5p, Rad61p que inibe a coesão das cromátides irmãs) (Costazo et al., 2010). A funcionalidade dessas interações ainda é pouco compreendida, mas apontam para uma função de transdução de sinal da proteína *Ylr194c* para diferentes vias metabólicas.

Em relação ao gene *SLT2*, foram descritas até o momento 1044 interações genéticas e proteicas de acordo com o banco de dados yeastgenome.org, confirmadas por diferentes métodos físicos: cromatografia de afinidade, duplo híbrido, atividade bioquímica; e por métodos genéticos. As interações mais conhecidas para Slt2p estão relacionadas com os demais integrantes da via CWI: Swi4p, Swi6p, RIm1p, Fks1p, Pkc1p, Mkk1p, Mkk2p, Bck1p, Rom2p, Mid2p, Slg1p, Rom1p, além de Skn7p integrante da via de estresse oxidativo e responsável aos danos de parede e Hog1p. Estudos realizados por Martin-Yken et al.(2003) apontaram a proteína Knr4p/Smi1p como um elemento adicional na via de sinalização relacionada com Slt2p, sendo responsável pelo correto direcionamento de Slt2p para atuar em seus alvos no

núcleo. Esta interação foi encontrada através do duplo híbrido, imunoprecipitação *in vitro* e purificação por afinidade em *tandem*. Mutação no gene *KNR4/SMI1* aumenta a sensibilidade da levedura ao PHMB (Elsztein *et al.*, 2011). Acredita-se que Knr4p/Smi1p deva estar relacionada com a progressão do ciclo celular ligado a síntese de parede, mostrando-se essencial para a viabilidade celular na ausência da via PKC1/Slt2 funcional (Durand *et al.*, 2008). É muito provável que a interação entre Ylr194c e Slt2p auxilie na atividade biológica do complexo Slt2p-Smi1p.

A proteína Yap1 controla a resposta ao estresse oxidativo ativado pela presença de espécies reativas de oxigênio, tióis oxidados, a exemplo da glutationa e tioredoxina, etambém participa na regulação de genes de resistência a várias drogas (Alarco *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1993; Herrero *et al.*, 2008). Mutantes de *YAP1* e *CTT1* apresentam uma elevada sensibilidade ao PHMB, sugerindo possíveis danos oxidativos na membrana celular. *CTT1* codifica a catalase citosólica envolvida na quebra do peróxido de hidrogênio em hidrogênio e água, regulado por Yap1p e Skn7p, embora os genes *YAP1* e *CTT1* possam estar envolvidos na resistênciacao PHMB de uma maneira que não está ligada ao estresse oxidativo(Toone e Jones, 1998; Elsztein *et al.*, 2011). Evidências apontam a participação dos elementos da via PKC na resposta a agentes oxidantes como diamida e peróxido de hidrogênio (Vilella *et al.*, 2005). Yap1p pode está relacionada com a ativação do gene *SRP1* que codifica uma proteína da parede celular (Bourdineaud, Sampaio e Lauquin, 2000). O mutante de *YAP1* é sensível a vermelho congo (Bourdineaud, Sampaio e Lauquin, *op. cit.*; Elsztein *et al.*, 2011) apontando para a cooperação entre a via CWI e o elemento Yap1p (Elsztein *op. cit.*). Estudos realizados por Elsztein *et al.*,(2011) testaram a

regulação dos genes da via CWI medindo a expressão na cepa parental e no mutante de *YAP1* os quais foram superexpressos pelo PHMB na linhagem JP1. Os resultados mostraram que *KRE6* e *YLR194C* foram ligeiramente regulados na cepa parental. Os resultados do mutante *YAP1* demonstraram a expressão regulada de *SLT2* e a ausência de expressão de *YLR194C*. Tendo em vista esses resultados, Yap1p pode estar envolvida na regulação de Rlm1p e Slt2p, dado este reforçado pela expressão reduzida de *SLT2* e superexpressão de *RLM1* no mutante *yap1* após tratamento com choque térmico. Elsztein *et al.*(2011) sugerem que Yap1p co-regula a expressão de *SLT2* em resposta a danos no envelope celular, a exemplo do dano induzido por PHMB, e que esta co-regulação amplifica o sinal para a expressão dos genes da via CWI, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo. A ativação de Slt2p por choque térmico pode ser realizada por uma via independente de PKC (Harrison e Zyla, 2004).

Dados obtidos em nosso estudo mostram a existência da interação entre as proteínas Ylr194c e Yap1 (Figura 20), apresentando-se como um novo resultado. Estudos realizados até o momento relatam 124 interações físicas para *YAP1*, de acordo com o banco de dados biogrid.org. Entre as interações descritas para *YAP1* citam-se *SKN7* encontrado por cromatografia de afinidade (Mulford e Fassler, 2011), *HOG1*(Thorsen *et al.*, 2006) encontrada através de interações genéticas. Outras interações importantes foram descritas para algumas proteínas de membrana que poderiam ser similares a Ylr194c como documentado em nossos resultados. Entre as proteínas de membrana que interagem com Yap1p citam-se Frt1p (gene que codifica uma proteína da membrana ancorada ao retículo endoplasmático, funciona como um substrato para a calcineurina fosfatase, promovendo o crescimento das células em condições de estresse),

essa interação foi encontrada através da técnica do duplo híbrido (Wang *et al.*, 2012), Yck1p (proteína palmitoilada presente na membrana plasmática) (Ptacek *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos até agora foram obtidos na ausência de agentes estressores, porém tornou-se importante verificar o que acontece com as interações encontradas diante de um dado agente estressor, haja vista que determinadas proteínas só podem interagir em sua forma ativa ou inativa e que só poderia ser modificada diante de um agente indutor. No presente trabalho, foram testadas as respostas diante de um agente estressor. As interações entre as proteínas testadas foram: Ylr194c e Slg1, Ylr194c e Slt2, Ylr194c e Yap1, Ylr194c e Ylr194c, Ylr194c e Yap1, Yap1 e Slg1, Yap1 e Hog1, Yap1 e Ylr194c. Novas interações ainda não descritas na literatura foram encontradas entre Ylr194cp e Slg1p (Figura 27) utilizando-se uma concentração de etanol 4% e 6%, e a interação entre Ylr194cp e Slt2p, Ylr194cp e Yap1p (Figuras 24 e 26, 27) foram encontradas em ambas as concentrações de etanol.

O etanol age como um inibidor do crescimento de leveduras em baixas concentrações, atuando na membrana plasmática através do aumento da fluidez reduzindo sua integridade (Mishra e Prasad, 1989). Também influencia o metabolismo e a biossíntese de macromoléculas por indução de proteínas de choque térmico (HSPs) (Hu *et al.*, 2007). As células de leveduras expostas ao etanol sintetizam uma série de HSPs: Hsp 104, 82, 70, 30 e 12 (Stanley *et al.*, 2009). A perda do receptor Wsc1p/Slg1p provoca sensibilidade a condições de estresse como, por exemplo, choque térmico, oxidativo, etanólico, alcalino e anti fúngicos (Zu *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2006).

Quando o agente estressor utilizado foi o PHMB foram encontradas novas interações entre Ylr194cp e Slg1p, Yap1 e Slt2p, Yap1 e Slg1p (Figura 29 e 30) além das interações entre Ylr194cp e Slt2p (Figura 28), Ylr194cp e Yap1p (Figura 29), todas obtidos na concentração de 0,00025%, entretanto quando a concentração testada foi de 0,005% apenas as interações entre Ylr194cp e Slt2p (Figura 30), Ylr194cp e Slg1p (Figura 31) foram mantidas. O papel do PHMB como agente estressor já foi discutido anteriormente, e apesar das interações entre Ylr194cp e Slg1p ainda não terem sido descritas na literatura, este resultado poderia ser esperado já que Slg1p/Wsc1p é o principal receptor induzido pelos danos à parede celular causado pelo PHMB. Mutantes *HOG1* mostaram sensibilidade intermediária sugerindo que existe uma ligação entre as vias PKC e HOG, indicando que este atua como um amplificador na detecção dos danos do envelope celular causado pelo PHMB (Casagrande *et al.*, 2009; Rodríguez-Peña *et al.*, 2010; García *et al.*, 2009; Elsztein *et al.*, 2011).

Quando o agente estressor utilizado foi o branco calcoflúor apenas a interação entre Ylr194c e Slg1p, Ylr194c e Slt2p, Ylr194c e Yap1p foi detectada. Este agente induz afalhas no processo de montagem adequada do envelope celular (Ketela *et al.*, 1999; De Nobel *et al.*, 2000). Mutantes de *SWI4* e 6 são hipersensível a este agente, apoiando um papel para o complexo SBF na resposta a este agente (Kim *et al.*, 2010).

O teste realizado com o estressor vermelho congo mostrou interações entre Ylr194c e Slg1p, Ylr194c e Slt2p, Ylr194c e Yap1p, Ylr194c e Hog1p apenas na contração de 0,5mg. O vermelho congo, assim como o branco calcoflúor, induz a desorganização do envoltório celular, atuando na perturbação da rede formada pelos polímeros de β-1,3 glicanos, levando a ativação MAP quinase Slt2p (Ketela

et al., 1999; De Nobel *et al.*, 2000). Estudos realizados por García *et al.*, (2004) utilizando microarranjos investigaram a base molecular da resposta a este agente. Foi verificado o aumento na expressão 132 genes envolvidos na construção e metabolismo da parede celular entre eles Rlm1p, Crz1p, SBF (Swi4p /Swi6p), Msn2p/Msn4p, Ste12p, e Tec1p.

Diante do exposto, sugerimos pela primeira vez uma função biológica para a proteína Ylr194c como transdutora de sinal de estresse na superfície celular, interagindo com as proteínas Yap1, Slt2p e Hog1p em resposta a diferentes tipos de danos. Os dados obtidos nos permitem também propor dois possíveis modelos de como as proteínas Ylr194c e Slt2 se comportam diante de diferentes agentes estressores. Um deles seria o deslocamento de Slt2 para a membrana plasmática onde seria ativada por Ylr194c e retornaria para o núcleo para atuar em seus alvos. O outro modelo seria a fosforilação realizada por PKC1 em Ylr194c, a qual seria deslocada da membrana e iria interagir com seus alvos em outros pontos da célula.

Os dados obtidos também apontam a nova função para a proteína Yap1 e Ylr194c como integrante do complexo proteico que regula a manutenção da integridade da parede celular de *S. cerevisiae*.

7. Conclusões

Em nosso estudo encontramos que as proteínas Ylr194c e Slt2, Ylr194c e Yap1 interagem em condições normais de crescimento e que a interação entre as proteínas Ylr194c e Slg1, Yap1 e Slt2, Yap1 e Slg1, Ylr194c e Hog1 é induzida em condições de estresse na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A proteína Ylr194c está presente na membrana em condições normais de crescimento, podendo ser alvo de fosforilações como, por exemplo, por Slt2. As interações encontradas entre Ylr194c e o receptor Slg1, com Slt2 e Yap1 apontam a participação desta proteína na via de manutenção da integridade da parede celular.

8. Referências Bibliográficas

- Adams DJ (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150(Pt 7):2029-35.
- Aguilera J, Rodriguez-Vargas S, Prieto JA (2005) The HOG MAP kinase pathway is required for the induction of methylglyoxal-responsive genes and determines methylglyoxal resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 56: 228–239.
- Aguilera F, Peinado RA, Millan C, Ortega JM, Mauricio JC (2006) Relationship between ethanoltolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol*. 110:34–42.
- Alarco AM, Balan I, Talibi D, Mainville N, Raymond M (1997) Ap-1 mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J Biol Chem*. 272:19304-19313.
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, and Prior BA (1994) GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4135-4144.
- Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin, Sand Blondin B(2001) Expressão génica global durante o stress de curto prazo de etanol em *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 498, 98 -103.
- Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Roman E, Negredo AI, Eisman B, Nombela Cand Pla J(2003) The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 2:351–361.
- Arroyo J, Bermejo C, García R, Rodríguez-Peña JM (2009) Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. *Microbiol Clin Infect*. 15 Suppl 1:44-6.
- Baba M and Osumi M (1987) Transmission and scanning electron microscopic examination of intracellular organelles in freeze-substituted Kloeckera and *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. *J. Electron Microsc. Tech.* 5, 249-261.
- Bahn YS, Geunes-Boyer S and Heitman J (2007) Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase governs divergent patterns of the stress-activated Hog1 signaling pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 6:2278–2289.

- Barker MG, Brimage LJE and Smart KA (1999) Effect of Cu,Znsuperoxide dismutase disruption mutation on replicativesenescence in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett177: 199–204.
- Bartel P, Chien C, Sternglanz R, Fields S (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. Biotechniques, 14, 920–924.
- Basmaji F, Martin-Yken H, Durand F, Dagkessamanskaia A, Pichereaux C, Rossignol Mand Francois J (2006) The 'interactome' of the Knr4/Smi1, a protein implicated in coordinating cell wall synthesis with bud emergence in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Genet Genomics 275(3):217-30.
- Basílio AC, de Araújo PR, de Moraes JO, da Silva Filho EA, de Moraes MA Jr and Simões DA (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. Curr Microbiol. 56(4):322-6.
- Basso LC, de Amorim HV, de Oliveira AJ, Lopes ML (2008) Yeast selection for fuel ethanolproduction in Brazil. FEMS Yeast Research 8(7):1155-1163.
- Basso LC, Olitta Basso T and Saul Nitsche-Rocha S (2011)Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. Biofuel Production – Recent Developments and Prospects. P. 85-100.
- Bauer FF and Pretorius IS (2000) Yeast stress response andfermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review.South African Journal of Enology and Viticulture 21, 27–51.
- Bilsland E, Molin C, Swaminathan S, Ramne A and Sunnerhagen P (2004) Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. Mol Microbiol 53: 1743–1756.
- Birch RM and Walker GM (2000) Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb Technol 26: 678–687.
- Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. Nov 24; 7(6): 1513-1523.
- Blomberg A (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. FEMS Microbiol.Lett. 182, 1–8.
- Blomberg A and Adler L (1992) Physiology of osmotolerance in fungi.Adv. Microb. Physiol.33, 145–212.
- Boisnard S, Ruprich-Robert G, Florent M, Da Silva B, Chapelard-Leclerc F andPapon N(2008) Insight into the role of HOG pathway components Ssk2p, Pbs2p, and Hog1p in the opportunistic yeast *Candida lusitaniae*.Eukaryot. Cell 7:2179–2183.

Boulton C and Quain D (2001) Brewing Yeast and Fermentation. Blackwell Science, Oxford, UK.

Bourdineaud JP, De Sampaio G, Lauquin GJ (2000) A Rox1-independent hypoxic pathway in yeast. Antagonistic action of the repressor Ord1 and activator Yap1 for hypoxic expression of the SRP1/TIR1 gene. Mol Microbiol. 38:879-90.

Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. Science 259, 1760–1763.

Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA and Stevens R (2004) Brewing: Science and Practice. Woodhead, Cambridge, UK.

Brown JL, North S and Bussey H (1993) SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. J. Bacteriol. 175: 6908-6915.

Brown JL, Bussey H, and Stewart RC (1994) Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. EMBO J. 13, 5186–5194.

Cabib E, (2009) Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both β (1-6)- and β (1-3)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Eukaryot. Cell 8: 1626–1636.

Cabib E, Blanco N, Grau C, Rodriguez-Peña JM, and Arroyo J (2007) Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to β (1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Mol. Microbiol. 63: 921–935.

Cabib E, Farkas V, Kosik O, Blanko N, Arroyo J, McPhie P (2008) Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. J. Biol. Chem. 283:29859–29872.

Cappelaro C, Balderman C, Rachel R and Tanner W (1994) Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and alpha-agglutinin. EMBO J. 13, 4737-744.

Carmello V, Bogaerts P and Sá-Correia I (1996). Activity of the plasma membrane H1-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at optimal and low pH. Arch Microbiol 166: 315–320.

Caro L H, Tettelin H, Vossen JH, Ram A F, van den Ende H and Klis F M (1997). In silicio identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 13, 1477–1489.

Casagrande V, Del Vescovo V, Militi C, Mangiapelo E, Frontali L, Negri R, Bianchi MM (2009). Cesium chloride sensing and signaling in *Saccharomyces*

cerevisiae: an interplay among the HOG and CWI MAPK pathways and the transcription factor Yaf9. FEMS Yeast Res. 9:400-410.

Chen DC, Yang BC and Kuo TT (1992) One transformation of yeast in stacionary phase.Curr Genet. 21,83-4.

Cho S, Parque SG, Lee DH, Parque BC (2004) Proteína-proteína redes de interação: a partir das interações em redes.Biochem J Mol Biol. 37 (1): 45-52.

Cid VJ, Duran A, Rey F, Snyder MP, Nombela C, Sanchez M (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol.Rev. 59:345–386.

Claret, S., Gatti, X., Doignon, F., Thoraval, D. and Crouzet,M. (2005) The Rgd1p Rho GTPase activating proteinand the Mid2p cell wall sensor are required at low pHfor protein kinase C pathway activation and cellsurvival in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell 4,1375–1386.

Cleves AE, Cooper DNW, Barondes SH, Kelly RB (1996)Anew pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*.J Cell Biol 133: 1017–1026.

Coote H and Kirsop BH (1976) Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. J Inst Brew 82: 149–153.

Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JL, Toufighi K, Mostafavi S, Prinz J, St Onge RP, VanderSluis B, Makhnevych T, Vizeacoumar FJ, Alizadeh S, Bahr S, Brost RL, Chen Y, Cokol M, Deshpande R, Li Z, Lin ZY, Liang W, Marback M, Paw J, San Luis BJ, Shuteriqi E, Tong AH, van Dyk N, Wallace IM, Whitney JA, Weirauch MT, Zhong G, Zhu H, Houry WA, Brudno M, Ragibizadeh S, Papp B, Pál C, Roth FP, Giaever G, Nislow C, Troyanskaya OG, Bussey H, Bader GD, Gingras AC, Morris QD, Kim PM, Kaiser CA, Myers CL, Andrews BJ, Boone C. (2010)The genetic landscape of a cell.Science. 327(5964):425-31. doi: 10.1126/science.1180823.

Creamer TJ, Darby MM, Jamonnak N, Schaughency P, Hao H, Wheelan SJ, Corden JL. (2011)Transcriptome-wide binding sites for components of the *Saccharomyces cerevisiae* non-poly(A) termination pathway: Nrd1, Nab3, and Sen1.PLoS Genet. (10):e1002329. doi: 10.1371/journal.pgen.1002329.

Cunningham S and Stewart GG (1998) Effects of high-gravity brewing and acid washing on brewers' yeast. J Am Soc Brew Chem 56: 12–18.

Cyert MS(2003) Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress.Biochem Biophys Res Commun. 311(4):1143-50.

- Cyert MS and Thorner J (1992) Regulatory subunit (CNB1 gene product) of yeast Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. Mol. Cell. Biol. 12: 3460–3469.
- Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E. and Gustin, M.C. (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. J. Biol. Chem. 270, 30157–30161.
- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, and Toledano MB (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox transducer in gene activation. Cell 111, 471–481.
- De Lucena RM, Elsztein C, Simões DA, de Moraes JR MA Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid. J Appl Microbiol. 2012 Sep;113(3):629-40.
- Demain AL (2009) Biosolutions to the energy problem. J. Ind. Microbiol Biotechnol. 36, 319–332.
- De Nobel JG, Klis FM, Priem J, Munnik T and van Den Ende H. (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 6:491–499.
- De Nobel JG and Barnett JA (1991) Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. Yeast 7:313–323, 1991.
- De Nobel H, Ruiz C, Martin H, Morris W, Brul S, Molina M, and Klis FM. (2000) Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. Microbiology 146: 2121–2132.
- De Melo HF, Bonini BM, Thevelein J, Simões DA, Morais MA Jr. (2009) Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations. J Appl Microbiol. 2010 Jul;109(1):116-27.
- Dohlman HG, Thorner JW (2001) Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. Annu Rev Biochem 70: 703–754.
- Douglas LM, Li L, Yang Y and Dranginis AM (2007). Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion. Eukaryot. Cell 6: 2214–2221.
- Durand F, Dagkessamanskaia A, Martin-Yken H, Graille M, Van Tilbeurgh H, Uversky VN, François JM (2008): Structure-function analysis of Knr4/Smil, a newly member of intrinsically disordered proteins family, indispensable in

the absence of a functional PKC1-SLT2 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 25:563-576.

Elsztein C, de Lucena RM, de Moraes MA Jr. (2011) The resistance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the biocide polyhexamethylene biguanide: involvement of cell wall integrity pathway and emerging role for YAP1. *BMC Mol Biol*. Aug 19;12:38.

Fassler JS, West AH (2011) Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence. *Eukaryot Cell*;10(2):156-67.

Ferreira LV, Amorim HV, Basso LC (1999) Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 19, n. 1, p. 29-32.

Fields, S. (2005) High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril. *Febs J*, 272:5391-5399.

Fields, S.; Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-6.

Fuchs BB and Mylonakis E (2009) Our Paths Might Cross: the Role of the Fungal Cell Wall Integrity Pathway in Stress Response and Cross Talk with Other Stress Response Pathways. *Eukaryotic Cell*, 8:1616-1625.

Fujii T, Shimoi Hand Limura Y (1999) Structure of the glucanbindingsugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1427, 133-144.

García-Rodríguez LJ, Durán A, and Roncero C (2000) Calcofluorantifungal action depends on chitin and a functional highosmolarityglycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J. Bacteriol.* 182: 2428–2437.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 11(12):4241-57.

Gemmill TR and Trimble RB (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim.Biophys.Acta* 1426:227–237.

Gibson BR, Smith JM, Lawrence SJ, Shelton N, Smith JM and Smart KA (2006) Oxygen as toxin: oxidative stress and brewing yeast physiology. *Cerevisiae* 31: 25–36.

Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JPR, Powell CD, Smart KA (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev*. 31:535-569.

Gulshan K, Rovinsky SA and Moye-Rowley WS (2004) YBP1 and its homologue YBP2/YBH1 influence oxidative-stress tolerance by nonidentical mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 3: 318-330.

Gulshan K, Rovinsky SA, Coleman ST and Moye-Rowley WS (2005) Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *J Biol Chem* 280: 40524-40533.

Gulshan K, Lee SS and Moye-Rowley WS (2011) Differential oxidant tolerance determined by the key transcription factor Yap1 is controlled by levels of the Yap1-binding protein, Ybp1. *J. Biol. Chem.*, 286: 34071–34081.

Gustin MC, Albertyn J, Alexander M and Davenport K (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 62: 1264–1300.

Hahn JS and Thiele DJ(2002) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J. Biol. Chem.* 277:21278–21284.

Halliwell B and Gutteridge JMC (1999) Free Radicals in Biology and Medicine.Oxford University Press, Oxford, UK.

Hallsworth JE (1998) Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering* [S.I.], v. 85, n. 2, p. 125-137.

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.J. Mol. Biol. 166:557-580.

Hamada K, Fukuchi S, Arisawa M, Baba M, Kitada K.(1998) Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.*Mol Gen. Genet.* 258(1-2):53-9.

Hammond JRM (2000) Yeast growth and nutrition.Brewing yeast fermentation performance. 1st edn (Smart KA, ed), pp. 77–85.Blackwell Science, Oxford, UK.

Harrison JC, Zyla TR, Bardes ESG (2004) Stress-specific Activation Mechanisms forthe “Cell Integrity” MAPK Pathway. *J Biol Chem.* 279(4):2616-2622

Harold FM (2002)Force and compliance: rethinking morphogenesis in walled cells. *Fungal Genet. Biol.* 37:271–282.

Harshman KD, Moye-Rowley WSand Parker CS(1988) Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell* 53: 321-330.

Hasegawa Y, Irie K, Gerber AP (2008)Distinct roles for Khd1p in the localization and expression of bud-localized mRNAs in yeast.*RNA.* (11):2333-47. doi: 10.1261/rna.1016508.

- Heggart HM, Margaritis A, Pilkington H, Stewart RJ, Dowhanick TM and Russell I (1999) Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. *MBAATQ* 36: 383–406.
- Heinisch JJ, Lorberg A, Schmitz HP e Jacoby JJ (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 32, 671-680.
- Herrero E, Ros J, Belli G, Cabiscool E: Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1780:1217-1235.
- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 300–372.
- Hohmann S and Mager WH (2003) Yeast Stress Response. Topics in Current Genetics, Vol. 1 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Hohmann S (2009) Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 583: 4025–4029
- Hong Z, Mann P, Brown NH, Tran LE, Shaw KJ, Hare RS and Didomenico B (1994) Cloning and characterization of KNR4, a yeast gene involved in (1,3)-betaglucansynthesis. *Mol Cell Biol* 14: 1017–1025.
- Hu XH, Wang MH, Tan T, Li JR, Yang H, Leach L, Zhang RM, Luo ZW (2007) Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175(3):1479-1487.
- Hulse GA (2003) Yeast propagation. Brewing Yeast Fermentation Performance. 2nd edn (Smart KA, ed), pp. 249–256. Blackwell Science Publishers, Oxford, UK.
- Iwahashi H, Odani M, Ishidou E, Kitagawa E (2005) Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. *FEBS Lett.*; 579(13):2847-52.
- James P, Halladay J, Craig EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144(4):1425-36.
- Jones RH, Moreno S, Nurse P and Jones NC (1988) Expression of the SV40 promoter in fission yeast: identification and characterization of an AP-1-like factor. *Cell* 53: 659-667.
- Kamada Y, Jung US, Piotrowski J and Levin DE (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* 9: 1559–1571.

Kapteyn JC, Ram AF, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, Van Den Ende H, Llobell A, Cabib E and Klis FM(1997) Altered extent of crosslinking of b1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall b1,3-glucan content. *J. Bacteriol.* 179:6279–6284.

Kapteyn JC, van den Ende H and Klis FM(1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim.Biophys.Acta* 1426:373–383.

Kapteyn JC, ter Riet B, Vink E, Blad S, De Nobel H, Van Den Ende H and Klis FM (2001) Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organisation of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* 39: 469–479.

Klebl F and Tanner W(1989) Molecular cloning of a cell wall exo-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171:6259–6264.

Ketela T, Brown JL, Stewart RC and Bussey H (1998) Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. *Mol. Gen. Genet.* 259: 372–278.

Kim KY, Truman AW, Caesar S, Schlenstedt G, Levin DE (2010) Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol Biol Cell.* 21(9):1609–19.

Ketela T, Green R, and Bussey H(1999) *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1–MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* 181: 3330–3340.

Klis FM (1994) Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10:851–869.

Klis FM, Mol P, Hellingwerf K and Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems.Microbiol.Rev.* 26:239–256.

Klis FM, Boorsma A and de Groot PW (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3):185-202.

Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJ, Ashwell G, Dragonova J, Kapteyn JC, Klis FM and Cabib E (1997) Architecture of the yeast cell wall. Beta(1C6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1C)3-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* 272, 17762-17775.

Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, Li J, Pu S, Datta N, Tikuisis AP, Punna T, Peregrín-Alvarez JM, Shales M, Zhang X, Davey M, Robinson MD, Paccanaro A, Bray JE, Sheung A, Beattie B, Richards DP, Canadian V, Lalev A, Mena F, Wong P, Starostine A, Canete MM, Vlasblom J, Wu S, Orsi C, Collins SR, Chandran S, Haw R, Rilstone JJ, Gandhi K, Thompson NJ, Musso G, St Onge P, Ghanny S, Lam MH, Butland G, Altaf-Ul AM, Kanaya S, Shilatifard A, O'Shea E, Weissman JS, Ingles CJ, Hughes TR, Parkinson J, Gerstein M, Wodak SJ, Emili

A, Greenblatt JF (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 440(7084):637-43.

Kuge S and Jones N (1994) YAP1-dependent activation of TRX2 is essential for the response of *S.cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* 13: 655-664

Kuge S, Jones N and Nomoto A (1997) Regulation of Yap-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* 16: 1710-1720.

Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, Nomoto A (2001) Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6139–6150.doi: 10.1128/MCB.21.18.6139-6150.

Kurien BT and Scofield RH (1995) Polyethylene glycolmediated bacterial colony transformation. *Biotechniques*, vol. 18, no. 6, p. 1023-1026.

Kuranda KV, Leberra S, Sokol G, Palamarczyk and J. Francois. (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insight into the connection between TOR, PKC, and Ras/cAMP signaling pathways. *Mol. Microbiol.* 61:1147–1166.

Lesage G and Bussey H (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 317–343.

Levin DE (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 262–291.

Levin DE (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway genetics, Vol. 189, 1145–1175.

Levin DE and Bartlett-Heubusch E (1992) Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell Biol.* 116: 1221–1229.

Liberal ATS, Basílio ACM, Brasileiro BTRV, Silva-Filho EA, Simões DA and de Morais-Jr MA (2007) Identification of the yeast *Dekkera bruxellensis* as major contaminant in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 538-547.

Li S, Ault A, Malone CL, Raitt D, Dean S, Johnston LH, Deschenes RJ and JS (1998) The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* 17(23): 6952–6962.

Lipke PN and Kurjan J (1992) Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol. Rev.* 56, 180-194.

Lipke PN and Ovalle R (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol.* 180:3735–3740.

Logothetis S, Walker GM, Nerantzis ET (2007) Effect of salt hyperosmotic stress on yeast cell viability Proceedings for Natural Sciences of Matica Srpska Novi Sad. 113: pp.271-284.

Lu JM, Deschenes RJ and Fassler JS (2003) *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryot. Cell* 2:1304–1314

Lucena BT, dos Santos BM, Moreira JL, Moreira AP, Nunes AC, Azevedo V, Miyoshi A, Thompson FL and de Morais MA Jr (2010) Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol.* Nov 23; 10:298.

Maeda T, Wurgler-Murphy SM and Saito H (1994) A two-componentsystem that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242–245

Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, Basmaji F, Lagorce A and Francois J (2003) The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 49(1): 23-35.

Mrsa V, Ecker M, Strahl-Bolsinger S, Nimtz M, Lehle Land Tanner W (1999) Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181:3076–3086.

Martín H, Dagkessamanskaia A, Satchanska G, Dallies N and Francois J (1999) KNR4, a suppressor of *Saccharomyces cerevisiae* cwh mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes. *Microbiology* 145: 249–258.

Martín H, Rodriguez-Pachon JM, Ruiz C, Nombela C and Molina M (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275: 1511–1519.

Martín H, Flández M, Nombela C and Molina M (2005) Proteinphosphatases in MAPK signaling: we keep learning from yeast. *Mol. Microbiol.* 58: 6–16.

Maskell D (2003) Influence of stress on replicative longevity in *Saccharomyces cerevisiae* (syn. *pastorianus*). PhD thesis, Oxford Brookes University, Oxford.

Maskell DL, Kennedy AI, Hodgson JA and Smart KA (2001) Impact of carbohydrate composition of media on lager yeast replicative lifespan. *J Am Soc Brew Chem* 59: 111–116.

- Melo HF, Bonini BM, Thevelein J, Simões DA, Morais MA Jr (2010) Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations. *J Appl Microbiol.* 109(1):116-27.
- Mishra P, Prasad R (1989) Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* [S.I.] 30, p. 294–298.
- Moehle EA, Ryan CJ, Krogan NJ, Kress TL, Guthrie C (2012) The yeast SR-like protein Npl3 links chromatin modification to mRNA processing. *PLoS Genet.* 8(11):e1003101. doi: 10.1371.
- Molina M, Gil C, Pla J, Arroyo J, Nombela C (2000) Proteinlocalization approaches for understanding yeast cell wallbiogenesis. *Microsc Res Tech* 51: 601–612.
- Molina M, Cid VJ, Martín H (2010) Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. *Yeast.* 27(8):503-11.
- Mollapour M, Piper PW (2006) Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6: 1274–1280
- Montijn RC, Van Wolven P, De Hoog Sand Klis FM (1997) b-Glucosylatedproteins in the cell wall of the black yeast *Exophiala (Wangiella)dermatitidis*. *Microbiology* 143:1673–1680.
- Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast, *Mol. Microbiol.* 19(1996) 651–658.
- Morano KA, Grant CM and Moye-Rowley WS (2011) The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics: Published Articles Ahead of Print*, published on December 29, 2011 as 10.1534/genetics.111.128033
- Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 190(4):1157-95.
- Morgan BA, Bouquin N, Merrill GF and Johnston LH (1995) A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signaltransduction proteins. *EMBO J.* 14,5679–5689.
- Moye-Rowley WS (2003) Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell.* 2(3):381-9.
- Mulford KE, Fassler JS (2011) Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryot Cell.* 10(6):761-9.

- Nonaka H, Tanaka K, Hirano H, Fujiwara T, Kohno H, Umikawa M, Mino A and Takai Y (1995) A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 14, 5931-5938.
- O'Rourke SM, Herskowitz I (2004) Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. Mol Biol Cell 15: 532-542
- Orlean P (1997) Biogenesis of yeast wall and surface components. In The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, pp. 229-362
- Ozaki K, Tanaka K, Imamura H, Hihara T, Kameyama T, Nonaka H, Hirano H, Matsuura Y and Takai Y (1996) Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 15(9): 2196-2207.
- Panadero J, Pallotti C, Rodriguez-Vargas S, Randez-Gil F, Prieto JA (2006) A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 281: 4638-4645.
- Paravicini G, Cooper M, Friedli L, Smith DJ, Carpentier JL, Klig LS, Payton MA (1992) The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. Mol. Cell. Biol. 12: 4896-4905.
- Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJ, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Schweitzer B, Predki PF, Snyder M (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. Nature. 1;438(7068):679-84.
- Philip B and Levin DE (2001) Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. Mol. Cell. Biol. 21: 271-280.
- Popolo L, Gilardelli D, Bonfante P and Vai M (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1D mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 179:463-469.
- Posas F, Saito H (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. EMBO J 17: 1385-1394
- Powell CD, Van Zandycke SM, Quain DE and Smart KA (2000) Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. Microbiology 146:1023-1034.
- Qi M, Elion EA (2005) Formin-induced actin cables are required for polarized recruitment of the Ste5 scaffold and high level activation of MAPK Fus3. J Cell Sci. 118(Pt 13):2837-48.

- Raitt DC, Johnson AL, Erkine AM, Makino K, Morgan B, Gross DS and Johnston LH (2000) The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol. Biol. Cell.* 11(7):2335-47.
- Rajavel M, Philip B, Buehrer BM, Errede B, Levin DE (1999) Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19: 3969–3976.
- Reynolds TB and Fink GR (2001) Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291, 878-881.
- Rodicio R, and Heinisch JJ (2010) Together we are strong: cell wall integrity sensors in yeast. *Yeast* 27: 531–540.
- Rodríguez-Peña JM, García R, Nombela C, Arroyo J (2010) The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast*. 27(8):495-502.
- Rodrigues-Pousada C, Menezes RA, Pimentel C (2010) The Yap family and its role in stress response. *Yeast*. 27(5):245-58.
- Rodrigues-Pousada C, Nevitt T and Menezes R (2005) The yeast stress responseRole of the Yap family of b-ZIP transcription factors. *FEBS Journal* 272 (2005) 2639–2647
- Rowe SM, Simpson WJ and Hammond JRM (1994) Intracellular pH of yeast during brewery fermentation. *Lett Appl Microbiol* 18: 135–137.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook J and Russel DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Saito H and Posas F (2012) Response to Hyperosmotic Stress. *Genetics*, Vol. 192, 289–318
- Sherman F, Fink GR and Hicks JB (1986) Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schmitz HP, Lorberg A and Heinisch JJ (2002) Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol. Microbiol.* 44: 829–840.
- Serrano, R., Martín, H., Casamayor, A. and Arino, J. (2006) Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J Biol Chem* 281, 39785–39795.

Schuldiner M, Collins SR, Thompson NJ, Denic V, Bhamidipati A, Punna T, Ihmels J, Andrews B, Boone C, Greenblatt JF, Weissman JS, Krogan NJ (2005) Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell*. 4;123(3):507-19.

Tatebayashi K, Tanaka K, Yang HY, Katsuyoshi Y, Matsushita Y, Tomida T, Imai M and Saito H (2007) Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* 26: 3521–3533.

Terashima H, Yabuki N, Arisawa M, Hamada K, Kitada K(2000) Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 264:64-74.

Toh-e A, Yasunaga S, Nisogi H, Tanaka K, Oguchi T, and Matsui Y (1993) Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast*. 9:481–494.

Toone WM, Jones N: Stress-activated signaling pathways in yeast. *GenesCells* 1998, 3:485-498.

Thorsen M, Di Y, Tängemo C, Morillas M, Ahmadpour D, Van der Does C, Wagner A, Johansson E, Boman J, Posas F, Wysocki R, Tamás MJ (2006) The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol Biol Cell*. 17(10):4400-10.

Trott A and Morano KA(2003)The yeast response to heat shock. *Yeast Stress Responses* 1: 71-119.

Truman AW, Kim KY, Levin DE.(2009) Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 29(24):6449-61.

Uchida E Ohsumi Y and Anraku Y (1988) Purification of yeast vacuolar membrane H1-ATPase and enzymological discrimination of three ATP-driven proton pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 157: 544–562.

Valdivieso MH, Ferrario L, Vai M, Duran A, and Popolo L (2000) Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*. 182: 4752–4757.

Van Zandycke SM, Sohier PJ and Smart KA (2002) The impact of catalase expression on the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech Ageing Dev* 123: 365–373.

Veal EA, Ross SJ, Malakasi P, Peacock E and Morgan, BA (2003) Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J. Biol.Chem*. 278, 30896–30904.

Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A and Ballester R (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 94: 13804–13809.

Vilella F, Herrero E, Torres J, Torre-Ruiz MA (2005) Pkc1 and the upstream element of the Cell Integrity Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. J Biol Chem. 280:9149-9159.

Vilella, F., Herrero, E., Torres, J. and de la Torre-Ruiz, M.A.(2005) Pkc1 and the upstream elements of the cellintegrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 andMtl1, are required for cellular responses to oxidativestress. J Biol Chem 280, 9149–9159.

Vojtek AB and Hollenberg SM (1995) Ras–Raf interaction: two-hybrid analysis. Methods Enzymol, 255:331–342.

Wallis J, Chrebet G, Brodsky G, Rolfe M and Rothstein R (1989) A hyper-recombination mutation in *S.cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. Cell, 58, 409–419.

Wang Y, Zhang X, Zhang H, Lu Y, Huang H, Dong X, Chen J, Dong J, Yang X, Hang H, Jiang T (2012)Coiled-coil networking shapes cell molecular machinery. Mol Biol Cell. 23(19):3911-22. doi: 10.1091.

Wu A and Moye-Rowley WS(1994) GSH1, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for γ AP-1 transcriptional regulation. Mol. Cell. Biol. 14: 5832-5839.

Wu A, Wemmie JA, Edgington NP, Goebel M, Guevara JL, Moye-Rowley WS (1993) Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. J BiolChem. 268:18850-19958

Wheals AE, Basso LC, Alves DMG, Amorim HV (1999) Fuel ethanol after 25 years. Trends in Biotechnology 17(12):482-487.

Xin-Jian He and Jan S. Fassler (2005) Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol. 58(5): 1454–1467.

Yan C, Lee LHand Davis LI(1998) Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. EMBO J. 17: 7416-7429.

Yamamoto N, Maeda Y, Ikeda A and Sakurai H (2008) Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell.

Yin QY, de Groot PW, Dekker HL, de Jong L Klis FM andde Koster CG (2005) Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls:

identification of proteins covalently attached via glycosyl phosphatidyl inositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. J. Biol. Chem. 280: 20894–20901.

Zhao H, Shen Z-M, Kahn PC and Lipke PN (2001) Interaction of alpha-agglutinin and a-agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* sexual cell adhesion molecules. J. Bacteriol. 183: 2874–2880.

Zlotnik H, Fernandez MP, Bowers B and Cabib E (1984) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. J. Bacteriol. 181:1018–1026.

Zu, T., Verna, J. and Ballester, R. (2001) Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of RIM1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Genet Genomics 266, 142–155.

9. Curriculum vitae (Lattes)

RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

9.1 Internacionais

10.1.1 AMORIM, T.P.L ; SIMÕES, C.R. ; SOUZA, G.P.S ; LIMA, R. C. P. ; COSTA, C.F ; SASSI, R. **Zooxantelas associadas à zoantídeos dos recifes costeiros do Cabo Branco, João Pessoa-PB.** (Resumo apresentado no COLACMAR). In: XIV Congresso Latino Americano de Ciências do Mar- COLACMAR- 2011, Balneário Camboriú, Santa Catarina-Brasil, realizado de 31 de outubro a 4 de novembro de 2011.

9.1.2 AMORIM, T.P.L ; LIMA, R. C. P. ; SIMÕES, C.R. ; COSTA, C.F SASSI, R **Monitoramento do coral *Siderastrea stellata* (Cnidaria, Escleractinia) em dois recifes costeiros de João Pessoa- PB.** (Resumo apresentado no COLACMAR). In: XIV Congresso Latino Americano de Ciências do Mar- COLACMAR- 2011, Balneário Camboriú, Santa Catarina-Brasil, realizado de 31 de outubro a 4 de novembro de 2011.

9.1.3 LIMA, R.C.P.; TAVARES, J.R.; MORAIS JÚNIOR, M.A.***Saccharomyces cerevisiae* stress-associated proteins interaction study**(Resumo apresentado no 4th International Symposium in Biochemistry of

Macromolecules and Biotechnology, realizado em Recife, Pernambuco, no período de 5 a 7 de dezembro de 2012.

9.2 Nacionais

9.2.1.LIMA, R. C. P; AMORIM, T.P.L ; COSTA, C.F ; GORLACH-LIRA, K ; SASSI, R.**Zooxantelas associadas ao coral *Siderastrea stellata* (Cnidaria, Escleractinia) nos recifes costeiros de João Pessoa- PB.** (Resumo apresentado no CBBM). In:III Congresso Brasileiro de Biologia Marinha-CBBM, Natal, Rio Grande do Norte, realizado de 15 a 19 de maio de 2011.

9.2.2AMORIM, T.P.L ; COSTA, C.F ; SANTANA, J.K.S ; LIMA, R. C. P. ; SASSI, R. **Microalgas epibiontes do coral *Siderastrea stellatae* do hidróide calcáreo *Millepora Alcicornis*de recifes costeiros de João Pessoa, PB.** (Resumo apresentado no CBO). In:III Congresso Brasileiro de Oceanografia-CBO-Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, realizado de 13 a 16 de novembro de 2012.

9.2.3 LIMA, R.C.P.; TAVARES, J.R.; MORAIS JÚNIOR, M.A.**Saccharomyces cerevisiae stress-associated proteins interaction study**(Resumo apresentado no a XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, realizado em Recife, Pernambuco, no período de 5 a 7 de dezembro de 2012.

9.3 Regionais e locais

9.3.1. LIMA, R.C.P.; TAVARES, J.R.; MORAIS JÚNIOR, M.A.;**Identificação das interações entre as Proteínas Envolvidas em Estresse em *Saccharomyces***

***cerevisiae*.** In:I Jornada de Pós Graduação em Genética Da UFPE Recife - PE, 2011.

9.3.2LIMA, R.C.P.; TAVARES, J.R.; MORAIS JÚNIOR, M.A.;**Estudo das interações entre as Proteínas Envolvidas em Estresse em *Saccharomyces cerevisiae*.** In:II Jornada de Pós Graduação em Genética Da UFPE Recife - PE,

2012.