

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

Danielli Batista Bezerra Cajueiro

**Repressão pelo Metabólito de Nitrogênio na levedura
*Dekkera bruxellensis***

**Recife
2015**

Danielli Batista Bezerra Cajueiro

Repressão pelo Metabólito de Nitrogênio em *Dekkera bruxellensis*

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: Marcos Antônio de Moraes Júnior

Co-orientador: Will de Barros Pita

Recife
2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Cajueiro, Danielli Batista Bezerra
Repressão pelo metabólito de Nitrogênio na levedura *Dekkera
bruxellensis*/ Danielli Batista Bezerra Cajueiro – Recife: O Autor, 2015.

69 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Júnior

Coorientador: Will de Barros Pita

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Biociências. Genética, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Regulação de expressão gênica 2. Leveduras 3. Nitrogênio
I. Moraes Júnior, Marcos Antonio de (orientador) II. Pita, Will
de Barros (coorientador) III. Título

572.865

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-125

Danielli Batista Bezerra Cajueiro

Repressão pelo Metabólito de Nitrogênio na levedura *Dekkera bruxellensis*

Aprovado em 12/06/2015

Banca Examinadora:

Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Will de Barros Pita
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Fernanda Cristina Bezerra Leite
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr^a. Elaine Malosso
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2015

A minha família por serem meu suporte em cada etapa desta jornada. A meu esposo por cada incentivo prestado. E ao sol por iluminar meu dia quando precisava despertar.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior pela oportunidade de desenvolver uma pesquisa aplicada de grande interesse científico.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Will de Barros Pita pela orientação prestada em cada etapa deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco pelo bom andamento do Mestrado.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco pelos ensinamentos.

Aos colegas do Mestrado em Genética da Universidade Federal de Pernambuco pela troca de conhecimentos em aula.

Aos integrantes dos laboratórios de Genética Molecular do Departamento de Genética e de Bioquímica do Departamento de Bioquímica da UFPE. Em especial para as amigadas construídas ao longo deste ano.

A meu orientador de Iniciação Científica José Roberto Tavares por cada ensinamento, palavra e presença na minha formação acadêmica.

A minha mãe Djane Batista Bezerra e meu pai Roberto Bezerra por ser o pedestal e rocha firme da minha formação e, por compreender cada decisão tomada e alegrar-se junto comigo.

Aos meus irmãos André e Patrícia, pelo apoio, carinho e alegria nas horas que mais precisava.

Ao meu marido Roberto Dantas Cajueiro pelo amor, carinho e compreensão de cada etapa enfrentada e por me ajudar a vencer cada barreira.

A minha sobrinha Maria Letícia pelo sorriso no momento que mais precisava.

Aos amigos verdadeiros que me deram coragem de enfrentar a rotina de um laboratório, sem vocês este trabalho não seria o mesmo. Obrigada por cada sorriso e abraço nas horas certas e erradas também.

Resumo

As fontes de nitrogênio do meio são classificadas como preferenciais e não-preferenciais, de maneira que as primeiras inibem a expressão dos genes responsáveis pela metabolização das segundas por um mecanismo chamado de Repressão Catabólica do Nitrogênio (*Nitrogen Catabolic Repression* - NCR). No presente estudo avaliamos o padrão de regulação dos genes do metabolismo central do nitrogênio na levedura *Dekkera bruxellensis*. Foram definidos quatro grupos de fontes de nitrogênio baseados no crescimento celular. Em seguida, o padrão de expressão dos genes do metabolismo central do nitrogênio mostrou que fenilalanina, embora do grupo quatro, é o maior indutor das permeases Gap1p e Put4p, resultando em sua elevada taxa de consumo. Já a histidina, indutora da permease Put4p, promove maior indução dos genes que codificam as enzimas de assimilação de amônia. Quando o mecanismo NCR é inibido pela presença de metionina sulfoximina no meio, ocorre a desrepressão dos genes que codificam as permeases. E finalmente, os resultados mostram que nitrato, definido no grupo dois induz o mecanismo de sinalização intracelular de regulação gênica semelhante ao que se observa quando as células estão no estado de privação de nitrogênio no meio. Isto complementa os estudos anteriores nos quais mostramos que a assimilação de nitrato altera o estado fisiológico da célula para respiração mesmo na presença de alta concentração de glicose no meio.

Palavras-chave: Assimilação de nitrogênio; Metionina sufoximina; Regulação gênica; Repressão catabólica.

Abstract

The nitrogen sources in the medium are classified as preferential or non-preferential, so that the first inhibit expression of genes responsible for metabolism of the latter by a mechanism called Nitrogen Catabolic Repression (NCR). In the present study we evaluated the pattern of gene regulation of the central nitrogen metabolism in yeast *Dekkera bruxellensis*. It was defined four groups of nitrogen sources based on cell growth. Then, the expression pattern of the central nitrogen metabolism genes showed that phenylalanine, though belonging to group four, is the biggest inducer of genes of permeases Gap1p Put4p, resulting in its high consumption rate. Moreover, histidine induces the gene encoding permease Put4p and promoted the highest induction of the genes encoding the enzymes of ammonia assimilation. When the NCR mechanism was inhibited by the presence of methionine sulfoximine in the medium there was derepression of the genes encoding for permeases. Finally, the results showed that nitrate, defined in the group two, induced the intracellular signaling pathway gene regulation similar to that seen when cells are in a state of nitrogen deprivation in the middle. This complements our previous studies that showed that the nitrate assimilation alter the physiological state of the cell to respiration even in presence of high glucose concentration in medium.

Keywords: Nitrogen assimilation; Sufoximina methionine; Gene regulation; Catabolic repression

Lista de Ilustrações

Figura 1	Representação esquemática do metabolismo de aminoácidos	Pág. 5
Figura 2	Representação esquemática da via global GAAC dependente de transcrição de Gcn4.	Pág. 10
Figura 3	Representação esquemática dos genes envolvidos no metabolismo do Nitrato.	Pág. 12
Figura 4	Representação esquemática da ativação da via TOR na presença de glutamato ou outra fonte de nitrogênio.	Pág. 15
Figura 5	Representação de uma amplificação de PCR em Tempo Real.	Pág. 17
Figura 6	Taxa de crescimento de <i>Dekkera bruxellensis</i> em meio mínimo contendo os aminoácidos.	Pág. 26
Figura 7	Perfil médio do crescimento de <i>Dekkera bruxellensis</i> em meio mínimo contendo os aminoácidos.	Pág. 26
Figura 8	Expressão relativa dos genes <i>PUT4</i> e <i>MEP1</i> que codificam para permeases de prolina e amônia em <i>Dekkera bruxellensis</i> .	Pág. 28
Figura 9	Expressão relativa do gene <i>GAP1</i> que codificam para permease geral de aminoácido em <i>Dekkera bruxellensis</i> .	Pág. 29
Figura 10	Expressão relativa dos genes <i>GDH1</i> , <i>GDH2</i> e <i>GLT1</i> que codificam para a regulação de glutamato e glutamina em <i>Dekkera bruxellensis</i> .	Pág. 29
Figura 11	Gráficos mostrando o efeito da inibição no crescimento por Metionina Sufoxamina.	Pág. 31
Figura 12	Expressão gênica das permeases, <i>MEP1</i> , <i>GAP1</i> e <i>PUT4</i> utilizando a amônia como referência.	Pág. 32
Figura 13	Expressão gênica dos reguladores de glutamato, <i>GLT1</i> , <i>GDH1</i> e <i>GDH2</i> utilizando a amônia como referência.	Pág. 33
Figura 14	Expressão gênica das permeases, <i>MEP1</i> , <i>GAP1</i> e <i>PUT4</i> utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima <i>GLN1</i>	Pág. 34
Figura 15	Expressão gênica do transportador de nitrato <i>YNT1</i> utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima <i>GLN1</i> .	Pág. 35
Figura 16	Expressão gênica do regulador <i>GAT1</i> utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima <i>GLN1</i> .	Pág. 36
Figura 17	Expressão gênica do regulador <i>YNA2</i> utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima <i>GLN1</i> .	Pág. 36
Figura 18	Expressão gênica dos reguladores <i>YNR1</i> e <i>YNI1</i> utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima <i>GLN1</i> .	Pág. 37
Figura 19	Expressão gênica das permeases, <i>MEP1</i> , <i>GAP1</i> e <i>PUT4</i> utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima <i>GLN1</i> . Amônia como referência.	Pág. 38
Figura 20	Expressão gênica de <i>YNT1</i> utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima <i>GLN1</i> . A amônia foi usada como referência.	Pág. 39

- Figura 21 Expressão gênica de GAT1 utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. A amônia foi usada como referência. Pág. 39
- Figura 22 Expressão gênica dos reguladores de glutamato (*GDH1*, *GDH2* e *GLT1*) utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. A amônia foi usada como referência. Pág. 40
- Figura 23 Expressão gênica dos reguladores de nitrato (*YNA1*, *YNR1* e *YNI1*) utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. A amônia foi usada como referência. Pág. 40

Lista de Tabelas

Tabela 1	Relação dos genes de permeases encontrados em <i>Sacharomyces cerevisiae</i> com a sua utilização e regulação.	Pág. 7
Tabela 2	Descrição das concentrações de cada fonte de nitrogênio utilizada no trabalho.	Pág. 19
Tabela 3	Consumo de nitrogênio medido através do método de ninidrina.	Pág. 27

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
ADP	Adenina difosfato
Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Asparagina
ATP	Adenina trifosfato
cDNA	DNA complementar
Cys	Cisteína
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etileno diamina tetra-acético
GAAC	Controle geral dos aminoácidos
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GS	Glutamato sintetase
Ile	Isoleucina
Leu	Lecina
Leu	Leucina
Met	Metionina
MIC	Concentração mínima inibitória
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MSX	Metionina Sufoxamina

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCR	Repressão Catabólica do Nitrogênio
NH_4^+	Íon amônia
NO_2^+	Íon nitrito
NO_3^+	Íon nitrato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucleotídeo
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	PCR quantitativa por transcrição reversa
Ser	Serina
Thr	Treonina
TOR	Regulação global do crescimento celular
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

Sumário

1 Introdução	14
2 Revisão da Literatura	15
2.1 <i>Dekkera bruxellensis</i>	15
2.2 Metabolismo do nitrogênio	16
2.3 Permease para fontes nitrogenadas	19
2.4 Catabolismo das fontes de nitrogênio e a Via de Erlich	21
2.5 Controle geral do metabolismo dos aminoácidos	22
2.6 Regulação do metabolismo do nitrogênio pela via TOR	23
2.7 Efeito da Metionina Sufoxamina no crescimento celular em levedura	25
2.8 Assimilação de nitrato	26
2.9 Método de análise de expressão gênica	28
3 Objetivos	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos	31
4 Material e Métodos	32
4.1 Análises fisiológicas para fontes de nitrogênio	32
4.1.1 Linhagens e meios de cultivo	32
4.1.2 Ensaio de crescimento celular	32
4.1.3 Teste com Ninidrina para consumo de nitrogênio livre	33
4.2 Análises da regulação do metabolismo dos aminoácidos	34
4.2.1 Inibição por Metionina Sufoxamina (MSX)	34
4.3 Análise de expressão gênica	34
4.3.1 Extração de RNA	34
4.3.2 Quantificação e avaliação de integridade de RNA total	35
4.3.3 Síntese de cDNA	35
4.3.4 RT-PCR Quantitativa (RT-qPCR)	36
4.3.5 Sequência gênica e condições de amplificação	36
4.3.6 Método de quantificação e controle endógeno	36
4.3.7 Análise dos resultados	37
5 Resultados	38
5.1 Avaliação da velocidade de crescimento celular em presença de aminoácidos	38

5.2 Assimilação das fontes de nitrogênio	38
5.3 Expressão gênica das permeases de aminoácidos	41
5.4 Expressão dos genes que codificam enzimas do metabolismo de aminoácidos.	42
5.5 Avaliação da velocidade de crescimento celular em presença de metionina sufoxamina	43
5.6 Expressão gênica para o crescimento celular em presença de metionina sufoxamina	45
5.6.1 Permeases	46
5.6.2 Enzimas	50
5.6.3 Reguladores	51
6 Discussão	55
7 Conclusões	60
Referências	61
9 Anexos	68

1 Introdução

O nitrogênio é um nutriente essencial para todas as formas de vida. Para isto, as células são capazes de transportar e utilizar uma grande variedade de compostos nitrogenados, bem como para sintetizar todas as moléculas que são essenciais para o desenvolvimento celular. As leveduras, assim como a *Dekkera bruxellensis*, podem usar quase 30 compostos contendo nitrogênio, estas moléculas entram nas células através de permeases e são utilizadas em reações de biossíntese ou liberando nitrogênio na forma de amônia, glutamato ou ambos. Para isto a célula possui um controle transcricional de genes envolvidos no catabolismo e transporte dos compostos nitrogenados, a repressão catabólica do nitrogênio (NCR) é um desses fatores que regula a maioria dos genes envolvidos no transporte e metabolismos das fontes secundárias de nitrogênio. Esta regulação é determinada pela “qualidade” ou preferência de utilização dos nutrientes a serem metabolizados. Para isto estudos são realizados para definir quais os tipos de compostos nitrogenados estão classificados, a exemplo dos aminoácidos que possuem formas diferenciadas de serem metabolizados e, desta forma, respondem de forma diferente ao controle do nitrogênio. Além do NCR, existe também o regulador global do crescimento celular a partir do nitrogênio, a via TOR. Este também participa da regulação de compostos nitrogenados, pois responde ao crescimento na presença de glutamina, esta é sintetizada através de uma enzima chamada glutamina sintetase (*GLN1*), esta quando está inibida, deixa de produzir a glutamina diminuindo, assim, o crescimento celular. A Metionina Sufoxamina (MSX) é um desses inibidores desta enzima e, desta forma, ajuda a definir de que forma a inibição influencia na expressão gênica de outras proteínas. Por esta razão, o presente trabalho demonstra como as permeases de aminoácidos e da repressão catabólica responde à presença de diferentes compostos nitrogenados em *Dekkera bruxellensis*, bem como, define o comportamento desta levedura na presença do inibidor da enzima *GLN1*, a Metionina Sufoxamina.

2 Revisão da Literatura

2.1 *Dekkera bruxellensis*

A levedura *Dekkera bruxellensis* é uma das principais causas da deterioração do vinho em todo o mundo (BOULTON et al., 1996; FUGELSANG, 1996; DELFINI e FORMICA, 2001; LOUREIRO e MALFEITO-FERREIRA, 2003). Também é freqüentemente associada com ambientes com altas concentrações de etanol e, por isso, considerada uma contaminante neste processo (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; PASSOTH et al., 2007) que pode causar diminuição da produtividade volumétrica do etanol e, conseqüentemente prejuízo econômico para as indústrias (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007). Apesar desta aparente contribuição negativa para os processos industriais, dados vem mostrando que esta levedura é capaz de produzir etanol em rendimentos muito próximos aos apresentados por *Sacharomyces cerevisiae* e, esta grande adaptação a torna um excelente candidato alternativo a produção industrial de etanol (DE SOUZA LIBERAL et al 2007; BLOMQVIST et al 2010; ROZPEDOWSKA et al 2011), principalmente a partir de hidrolisados de biomassa lignocelulósica (GALAFASSI et al 2011), mostrando que esta levedura possui uma vantagem adaptativa em relação a *S. cerevisiae* no ambiente industrial.

Para isto *D. bruxellensis* deve apresentar taxa de crescimento diferencial mais alta do que a levedura principal nas mesmas condições (DE SOUZA LIBERAL et al 2007), e isto ocorre pelo fato desta levedura possuir maior resistência a etanol, superando a população de *S. cerevisiae* nas fases finais da fermentação (RENOUF et al., 2006). Embora os rendimentos sejam muito próximos àqueles calculados para *S. cerevisiae*, o maior problema está na baixa produtividade decorrente de lenta assimilação de açúcares (BASÍLIO et al 2008; PEREIRA et al 2012). Apesar disto a levedura *D. bruxellensis* adaptou-se a condições ambientais limitantes, tais como altas concentrações de etanol, os valores de pH baixos (FUGELSANG, 1996) e assimilação de fontes pobres de nitrogênio (ROZPEDOWSKA et al. 2011), por exemplo, *D. bruxellensis* preferencialmente usa íons de amônia, mas também pode usar o nitrato (DE BARROS et al, 2013; GALAFASSI et al, 2011). Este composto é encontrado no caldo de cana pelo processo de adubação do campo por fertilizantes a base de nitrato. Por esta razão, o nitrato pode ser utilizado como fonte de nitrogênio para o

crescimento celular de *D. bruxellensis* (DE BARROS PITA et al, 2013). Isto pode explicar a diferença na velocidade de crescimento desta levedura em relação à *S. cerevisiae* no processo industrial (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007).

Na literatura atual usam-se os gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* praticamente como sinônimos. Isto porque *Bretanomyces* refere-se a forma anamorfa (assexuada) e *Dekkera* ao teleomorfo (sexuado). As espécies *Brettanomyces/Dekkera anomala*, *B./D. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* e *B. nanus* compõem atualmente este complexo. A primeira referência ao gênero *Brettanomyces* remonta no ano de 1904, quando Hjelte Claussen isolou a levedura de cerveja britânica. Em 1960 foi relatada a formação de ascósporos em *B. bruxellensis*, o que levou à reclassificação do gênero *Brettanomyces* (VAN DER WALT e VAN KERKEN, 1960). Portanto o novo gênero *Dekkera* foi proposto para acomodar as formas ascosporas (VAN DER WALT, 1964). A primeira tentativa para determinar a sequência do genoma de *D. bruxellensis* foi em 2007 (WOOLFIT et al., 2007). Em 2012, todo o genoma de duas diferentes linhagens de *D. bruxellensis* foi determinado e estão agora disponíveis ao público ([http://genome.jgi.doe.gov / Dekbr2 / Dekbr2.home.html](http://genome.jgi.doe.gov/Dekbr2/Dekbr2.home.html) por Piskur et al., 2012; e GenBank: AHQ01000137.1 por Curtin et al., 2012). Piskur et al. (2012) determinou toda a sequência do genoma da linhagem Y879 (CBS2499) o qual é atualmente usado como genoma de referência para esta levedura. Até o momento existem 5636 genes seqüenciados na linhagem CBS2499 (Y879) (DOE Joint Genome Institute), e até agora, a base de dados compreende 4929 sequências de proteína.

2.2 Metabolismo do nitrogênio

As vias metabólicas em levedura estão em sintonia com a disponibilidade de nutrientes. A utilização de aminoácidos e de vias biossintéticas conta com vários modos de regulação para coordenar eventos metabólicos. Nestes caminhos, mecanismos gerais e específicos (GAAC e NCR) atuam no controle da transcrição dos genes relacionados com o metabolismo desses compostos, percebendo a disponibilidade de nitrogênio no ambiente, controlando a absorção desta fonte e coordenando os processos catabólicos e anabólicos. Como revisado por Cooper (1982) e esquematicamente representado na Figura 1, a levedura pode usar uma variedade de compostos nitrogenados como única fontes de

nitrogênio para o crescimento. No entanto, cada aminoácido suporta uma taxa distinta de crescimento. A capacidade de usar ácidos aminados e outros compostos nitrogenados requer sua internalização e, para isto, as células de levedura possuem múltiplas permeases para facilitar o seu transporte através da membrana plasmática, no qual será abordado com mais detalhe no decorrer deste trabalho (MAGASANIK et al, 2002; GODARD et al, 2007).

Notavelmente, a presença de aminoácidos externos induz a expressão de várias permeases de alta especificidade e, assim, os aminoácidos induzem a sua própria absorção. Esta resposta transcricional é mediada pelo sensor Ssy1-Ptr3-Ssy5 (SPS) localizado na membrana plasmática (LJUNGDAHL 2012). Uma vez internalizado, compostos nitrogenados podem ser utilizados diretamente em processos biossintéticos, desaminados para gerar amônia, ou servir como substratos de transaminases, transferindo os grupos amina para um α -cetoglutarato para formar glutamato (COOPER 1982; MAGASANIK 1992; MAGASANIK e KAISER, 2002). Em células cultivadas em glicose, a amônia pode ser assimilada por duas reações, por exemplo, a síntese de glutamato a partir de amônia e α -cetoglutarato catalisada pela glutamato desidrogenase dependente de NADPH (GDH1) (reação 1) (Figura 1), e a síntese de glutamina a partir de glutamato e de amônia por glutamina sintetase (GLN1) (reação 2).

As várias fontes de nitrogênio utilizadas pelas leveduras são frequentemente classificadas como sendo preferencial ou não preferencial (pobres). Esta classificação tem como base dois critérios. O primeiro critério é quão bem os compostos individuais ajudam no crescimento quando estão presentes como única fonte de nitrogênio. O segundo critério reflete a constatação de que as fontes preferidas de nitrogênio geralmente reprimem os processos necessários para a utilização das fontes de nitrogênio não preferenciais (COOPER 1982; MAGASANIK 1992; MAGASANIK e KAISER, 2002).

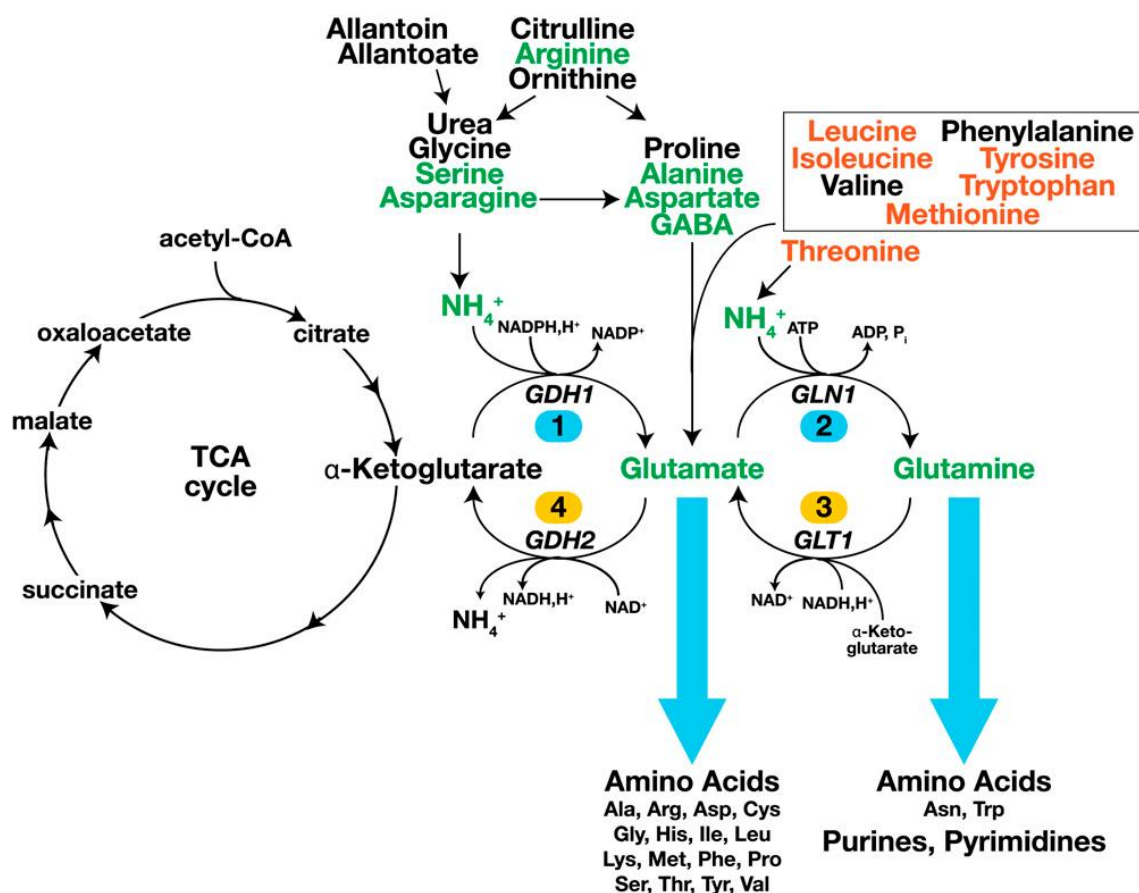


Figura 1: Representação esquemática do metabolismo de aminoácidos, mostrando as fontes preferenciais (em verde) e não preferenciais (vermelho). As fontes de nitrogênio oriundas de aminoácidos preferenciais são convertidas a glutamato, e os esqueletos de carbono são desviados em piruvato e α -cetoglutarato. Aminoácidos de cadeia ramificada, os aromáticos e a metionina (dentro da caixa) é transformado em α -cetoglutarato por transaminases formando glutamato. Os compostos nitrogenados são sintetizados a partir do glutamato ou da glutamina, como indicado nas setas azuis. Reações anabólicas (1 e 2) são catalisadas pela glutamato desidrogenase (GDH1) dependente de NAPH e glutamina sintetase (GLN1). As reações catabólicas (3 e 4) são catalisadas pela glutamato sintetase (GLT1) dependente de NADH e glutamato desidrogenase 2 (GDH2) dependente de NAD^+ (DAIGNAN-FORNIER et al, 2012).

Esta resposta ao controle das fontes nitrogenadas ocorre através da regulação transcricional do nitrogênio que é comumente referida como repressão catabólica do nitrogênio (NCR). Este mecanismo NCR tem como função assegurar que as células utilizem seletivamente fontes de nitrogênio preferidas quando eles estão disponíveis, e na ausência de uma fonte de nitrogênio preferencial, cause a desrepressão geral de genes regulados por NCR permitindo que as células passem a usar as fontes alternativas de nitrogênio, ou seja, os não preferenciais (DE BARROS PITA, et al., 2013).

A classificação de fontes de nitrogênio não é absoluta, e seus efeitos repressivos podem variar significativamente entre diferentes linhagens de

levedura. Godard et al. (2007) analisou cuidadosamente os padrões de expressão do gene em células de tipo selvagem (S1278b) crescendo em meios contendo glicose como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio, incluindo 16 aminoácidos individuais. Os resultados revelaram que as culturas de leveduras cresceram a taxas variáveis para a fonte de nitrogênio, no entanto, nas comparações nos padrões de expressão gênica, não foi possível observar variações significativas nos níveis de genes de resposta ao estresse geral. Consequentemente, as células se adaptaram a qualidade da fonte de nitrogênio para atingir um estado de equilíbrio de crescimento e para isto, é necessário um conjunto de respostas via membrana plasmática para cada fonte de nitrogênio.

2.3 Permeases para fontes nitrogenadas

A resposta estabelecida pela célula parte de proteínas altamente específicas ou gerais, como é o caso da resposta mediada pela amônia. A amônia é considerada a fonte preferencial de nitrogênio por células de *Sacharomyces cerevisiae*. A entrada de amônia na célula é facilitada por três permeases codificadas pelos genes *MEP1*, *MEP2* e *MEP3*, sendo a proteína Mep1p considerada uma permease de média afinidade a íons amônia, Mep3p de menor afinidade, mas com alta capacidade de transporte e Mep2p é considerada uma permease de alta afinidade, podendo agir como sensor de íons amônia.

As células de levedura usam aminoácidos externos para síntese protéica e, em alguns casos, como fonte de nitrogênio alternativa. Diferentes permeases, sujeitas a diferentes processos regulatórios, regulam a captação de aminoácidos para dois fins diferentes. A permease de alta capacidade para aminoácido, Gap1p, e a permease prolina-específica, Put4p, fornece a principal via de absorção de aminoácidos para o metabolismo catabólico e, como tal, estão sujeitas a repressão da transcrição através da via NCR. A proteína Gap1 é uma permease com baixa especificidade que é capaz de transportar diferentes aminoácidos para o interior das células, e está sujeita à inativação alostérica pela presença de nitrogênio amoniacal no meio (DEBAILLEUL et al, 2013). Portanto, no mecanismo NCR ocorre não apenas a repressão ou dos genes como a inativação das proteínas já formadas pela presença de amônia no meio.

Uma coleção de permeases de aminoácidos com especificidades relativamente restritas fornece absorção de aminoácidos. Estas permeases de aminoácidos são induzidas em conjunto pelo sistema SPS (ver abaixo) na presença de aminoácidos (CHEN et al, 2002). Várias permeases específicas a diferentes tipos de fonte de nitrogênio foram relatadas em *S. cerevisiae*. Por exemplo, Agp1p é uma permease geral para a maioria dos aminoácidos enquanto que Gnp1p transporta apenas Leu, Ser, Thr, Cys, Met, Gln e Asn. As permease Bap2p e Bap3p são capazes de transportar Ile, Leu, Val, Cys, Met, Phe, Tyr e Trp. A permease Dip5p transporta Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala e Gly, enquanto que Tat2p transporta Phe, Trp e Tyr. A permease Put4 transporta Ala, Gly e Pro, enquanto que Can1p, Lyp1p e Alp1p são transportadores específicos para aminoácidos catiônicos (CONRAD et al, 2014).

Na tabela 1 estão classificados todos os principais genes responsáveis pelo transporte de compostos nitrogenados, destacando os que foram usados neste trabalho, além do tipo de regulação no qual está sendo submetida.

Tabela 1: Relação dos genes de permeases encontrados em *Sacharomyces sereviseae* com a sua utilização e regulação. Em negrito os genes estudados neste trabalho.

Família de permeases dos aminoácidos			
Genes	Substrato específico	Regulação	Referência
AGP1	Permease de capacidade média. (Val, Ile, Phe, Met, Ser, Leu, Thr, Cys, Asn, Tyr, Ala, Gly, Gln, Pro)	Sensor-SPS, NCR, GAAC	Andréasson et al. (2004); Iraqui et al. (1999); Schreve et al. (1998)
GAP1	Controle geral dos aminoácidos (todos os aminoácidos, GABA, peptídeos, poliaminas)	NCR, GAAC	André et al. (1993); Jauniaux and Grenson (1990); van Zeebroeck et al. (2009)
PUT4	Permease de alta afinidade para prolina (Val, Ala, Pro, GABA)		André et al. (1993); Jauniaux et al. (1987)
Família das permeases de Amônia			
MEP1	Média afinidade	NCR	Marini et al. (1994)
MEP2	Alta afinidade, sensor de amônia	NCR	Lorenz and Heitman (1998); Marini et al. (1997)
MEP3	Baixa afinidade	NCR	Marini et al. (1997)

Uma vez dentro da célula, a amônia reage com α -cetoglutarato (ou 2-oxoglutarato), intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico, ou ciclo de Krebs, produzindo glutamato, com gasto de um mol de NADPH por mol de amônia assimilada. Essa é a via principal de assimilação de amônia em *S. cerevisiae* a qual é catalisada pela enzima glutamato desidrogenase 1 codificada pelo gene *GDH1* (MARINI et al, 1997). Existe um parálogo deste gene chamado *GDH3* que codifica uma isoforma alternativa para esta reação. Dependendo do estado energético e da disponibilidade de amônia no meio, a reversão desta reação da degradação de glutamato de volta a amônia e α -cetoglutarato, gerando NADH, é catalisada pela enzima glutamato desidrogenase 2 codificada pelo gene *GDH2*. Em seguida o glutamato é aminado às custas de ATP para a produção de glutamina pela glutamina sintase, ou GS, codificada pelo gene *GLT1* (MAGASANIK et al, 2003). Alternativamente a glutamina pode ser reconvertida a glutamato com a transaminação de um de seus grupos amina para uma molécula de α -cetoglutarato, gerando dois glutamatos e consumindo NADH. Esta reação é catalisada pela enzima Glutamato-OxoGlutarato AminoTransferase, ou GOGAT (LORENZ et al, 1998). Essa via GS-GOGAT é alternativa em *S. cerevisiae*, só utilizada em condições específicas de desbalanço energético, limitação de nitrogênio e outras, mas pode se constituir na via principal de assimilação de amônia como nas leveduras *Kluyveromyces lactis* e *K. marxianus* (DE MORAIS JR 2003). A importância das vias GDH e GS-GOGAT em *D. bruxellensis* ainda é desconhecida.

2.4 Repressão catabólica do nitrogênio (NCR)

Os genes que compõem o NCR são controlados por um conjunto de componentes de regulação, incluindo Ure2p e os quatro fatores GATA de transcrição Dal80p, Gzf3p, Gln3p, e Gat1p. As proteínas Dal80 e Gzf3 atuam como repressores que constitutivamente localizam para o núcleo para a repressão dos genes submetidos ao NCR. Por outro lado, as proteínas Gln3 e Gat1 são encaminhadas para o núcleo sob condições de escassez de fontes preferenciais de nitrogênio para desreprimir a expressão de genes sensíveis ao NCR. Todos os quatro fatores de transcrição possuem motivos do tipo *zinc-finger* que reconhece e se liga à sequência consenso GATAAG presentes nos promotores dos genes submetidos ao NCR (GEORIS 2009 et al., 2011).

Análises de microscópicas e estudos de fracionamento subcelular sugerem que uma porção significativa de Gln3p está associada à membrana em células cultivadas na presença de fonte preferencial de nitrogênio a partir da interação Ure2p-Gln3p (COX et al 2002; PURIA et al. 2008). Em escassez de nitrogênio essa interação é desfeita e Gln3p migra para o núcleo para induzir a expressão dos genes alvo. A proteína Gat1 também migra para o núcleo em células cultivadas em fontes não preferenciais de nitrogênio (KULKARNI et al., 2006). No entanto, em contraste com Gln3p, Gat1p aparece em grande parte independente de Ure2p (GEORIS et al. de 2008, 2009b).

2.5 Controle geral do metabolismo dos aminoácidos

Tal como referido por Jones e Fink (1982), muitas enzimas de vias biossintéticas de aminoácidos são induzidas em resposta a falta de qualquer aminoácido. Esta regulação é denominada de controle geral de aminoácido ou GAAC (HINNEBUSCH E NATARAJAN 2002; HINNEBUSCH 2005). O mecanismo GAAC é necessário para a sobrevivência de células cultivadas em meios com escassez de aminoácidos ou em fontes não preferenciais de nitrogênio. Nessa condição o gene *GCN4* é então induzido como sinal da indução do mecanismo GAAC e a consequência fisiológica da produção da proteína Gcn4 está representada na Figura 2.

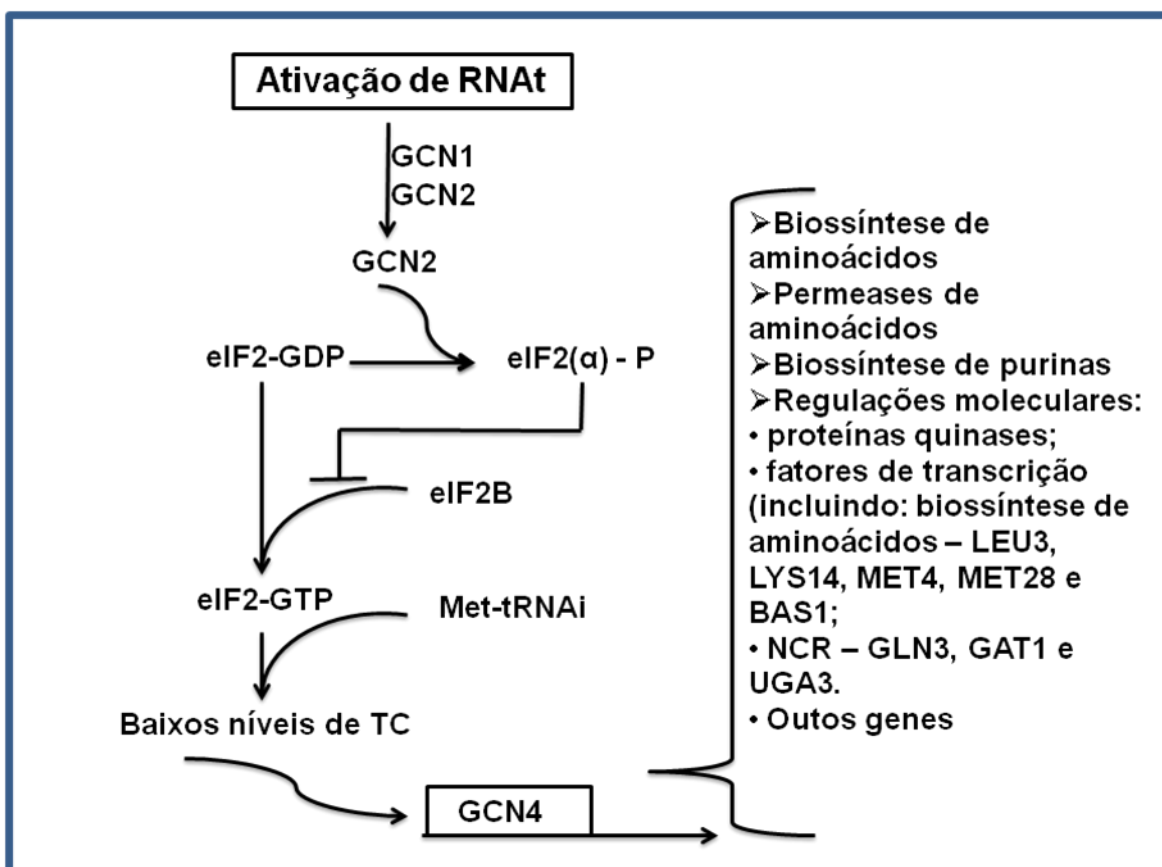


Figura 2: Representação esquemática da via global GAAC dependente de transcrição de Gcn4. GAAC é ativada quando os níveis de qualquer aminoácido tornar-se limitante, levando a alterações nas concentrações de tRNAs (ZABORSKE 2009 et al., 2010). tRNAs se ligam e ativam a quinase GCN2, que fosforila Ser-51 da subunidade α do fator de iniciação da tradução eIF2 (WEK et al. 1989; DONG et al. 2000; QIU et al. 2001). O eIF2 α fosforilado exibe uma maior afinidade para a troca de GTP a GDP fator eIF2B (GEF), inibindo competitivamente a taxa de troca de nucleotídeos, resultando numa redução na taxa de TC e formação de eIF2-GTP-Met-tRNAi. O gene codifica o fator de transcrição Gcn4. Uma variedade de estímulos resulta em níveis aumentados de Gcn4 (HINNEBUSCH e NATARAJAN 2002). Algumas dessas respostas atingem diretamente GCN2 (CHERKASOVA et al 2010; ZABORSKE 2009 et al, 2010) e algumas funções de forma dependente, aparentemente em paralelo. Notavelmente, a estabilidade de Gcn4 é aumentada sob escassez de aminoácido (KORNITZER et al 1994; SHEMER et al 2002; BOMEKE et al 2006; AVIRAM et al 2008; STRECKFUSS-BOMEKE et al 2009).

2.6 Regulação do metabolismo do nitrogênio pela Via TOR

A via TOR é a responsável pela regulação do crescimento celular em função da disponibilidade e da metabolização das fontes de nitrogênio do meio. A presença no meio de cultura de amônio, ou outras fontes preferenciais de nitrogênio como glutamato, glutamina ou asparagina, é transduzida por meio de sensores de membrana para os componentes desta via, que por sua vez induz a expressão dos genes relacionados com o crescimento celular. A via de sinalização TOR é, portanto um regulador global que controla o crescimento

celular. Os componentes centrais desta cascata de sinalização são as proteínas quinases Tor, que foram identificadas primeiro em leveduras como alvos do agente antifúngico rapamicina, que também possui atividade imunossupressora em humanos (LOEWITH et al., 2002). O tratamento de células com rapamicina tem mostrado alterações fisiológicas que incluem parada do ciclo celular, inibição da síntese de proteínas, acúmulo de glicogênio e indução do mecanismo de autofagia, que se assemelham aos observados em células privadas de nutrientes. Estes e outros resultados suportam a visão de que Tor é ativado por sinais derivados de aminoácidos de forma positiva e rege a uma infinidade de processos anabólicos, incluindo a tradução, transcrição, biogênese e deposição de actina em locais de crescimento celular, enquanto que regula negativamente processos catabólicos, tais como a degradação de proteínas, a desestabilização do RNAm e autofagia. A versatilidade das quinases Tor para regular esta vasta gama de respostas celulares deriva da sua capacidade de associar fisicamente com outras proteínas e, assim, coordenar funcionalmente diversas vias de sinalização (ARONOVA et al., 2007).

Entre a ampla variedade de compostos nitrogenados utilizados pelas células de levedura, a glutamina é a fonte preferida de nitrogênio (Magasanik, 1992). A glutamina é um intermediário chave no metabolismo do nitrogênio, necessária para a biossíntese de purina e pirimidina e outras moléculas contendo nitrogênio, tais como NAD^+ (MAGASANIK, 1992). Em células de levedura, a síntese de glutamina é catalisada exclusivamente por glutamina sintetase (GS) codificada pelo o gene *GLN1* (BENJAMIN et al, 1989).

Os genes regulados pelo mecanismo NCR são expressos sobre limitação de nitrogênio ou através de tratamento com rapamicina. A via TOR inibe a expressão desses genes sequestrando os fatores GATA envolvidos na transcrição de *GLN3* e *GAT1*, mantendo-os no citoplasma (BECK et al, 1999). Na presença de uma fonte preferencial de nitrogênio, Gln3p é fosforilada e é mantida no citoplasma pela interação com Ure2p. Em limitação de nitrogênio ou tratamento de rapamicina, Gln3p é desfosforilada pela fosfatase Sit4p, deliga-se de Ure2p e é translocada para o núcleo onde ativa os genes alvo. Magasanik e colaboradores (1992) propuseram que Gln3p é inibida por glutamina, que, por sua vez, sugere que TOR pode perceber a presença de glutamina. Portanto, este aminoácido é um dos elementos chave, senão o mais importante, na regulação do metabolismo

do nitrogênio em *S. cerevisiae* e a sua produção via atividade GS está diretamente relacionada com a ativação de TOR e do NCR.

2.7 Efeito da Metionina Sulfoxamina no crescimento celular em levedura

Em condições de presença de fonte rica em nitrogênio, tais como glutamina ou um de seus derivados, o complexo quinase TOR1 (TORC1) é ativado (CRESPO et al., 2002). TORC1, por sua vez, fosforila Tap42p e isto potencializa a formação do complexo Tap42p-Sit4p-TORC1 (DI COMO, et al., 1996). Isto sequestra a fosfatase Sit4p e a impede de desfosforilar Gln3p, mantendo assim Gln3 no itoplasma em associação com Ure2 (Beck e Hall, 1999). Como resultado, os genes sensíveis a NCR são reprimidos (COX, et al., 2000, GEORIS et al., 2008). Em limitação de nitrogênio ou no tratamento das células com um composto chamado rapamicina ocorre a dissociação Tap42p-Sit4p e Tap42-PP2A do complexo TORC1, com ativação de Sit4 e PP2A (YAN, et al., 2006). Com isso Gln3p é defosforilado, entra no núcleo, liga-se a os elementos GATA e ativa a transcrição do genes submetidos ao NCR. O regulador Gat1p parece ser regulado de forma semelhante ao Gln3 (BECK e HALL, 1999) (Fig. 4).

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima que desempenha um papel essencial no metabolismo de nitrogênio por catalisar a condensação de glutamato com amônia para formar glutamina (Fig. 3). Esta enzima é inibida pelo composto metionina sulfoximina (MSX) e com isso a produção de glutamina é bloqueada.

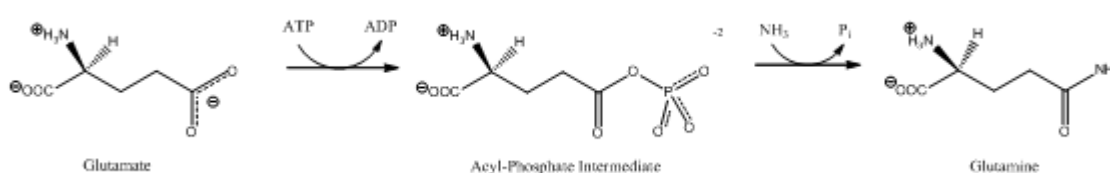


Figura 3: reação da glutamina sintetase para formar glutamina.

O tratamento de células com rapamicina ou com MSX mimetiza os efeitos de limitação de nitrogênio no meio, que resulta na translocação de Gln3p para o núcleo e consequente desrepressão dos genes controlados pelo NCR (BERTRAM et al., 2000, HARDWICK et al., 1999, CRESPO et al., 2002). Portanto, MSX pode ser usado para a indução de limitação de nitrogênio.

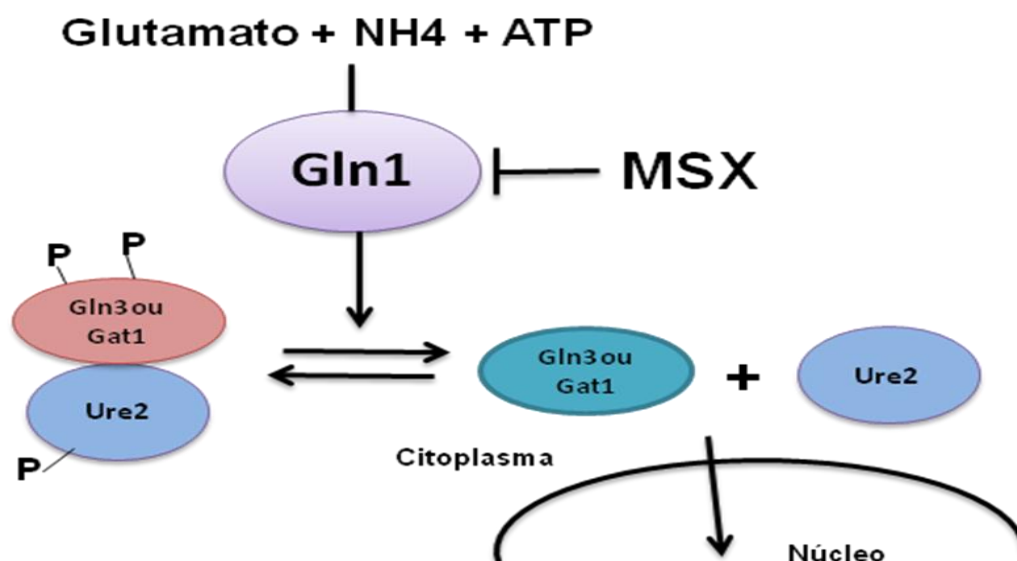


Figura 4: representação esquemática da ativação da via TOR na presença de glutamato ou outra fonte de nitrogênio. A figura também mostra onde a metionina Sufoxamina funciona, inibindo o gene GLN1. A figura com coloração vermelha representa que estão inativos.

2.8 Assimilação de Nitrato

De maneira geral, as fontes de nitrogênio quando assimiladas devem gerar amônia intracelular para a produção de glutamato e glutamina. Os aminoácidos assimilados servem em parte diretamente para a síntese proteica e em parte como doadores de nitrogênio para os compostos nitrogenados da célula a partir da atividade das aminotransferases (aminoácido + α -cetoglutarato = glutamato + α -cetoácido) (MAGASANIK, 1992). Este mecanismo também foi estudado em outros organismos, já que se trata do metabolismo essencial para a manutenção celular (MAGASANIK, 2002; MAGASANIK, 2003; MARZLUF, 1997).

Apesar da capacidade das leveduras utilizarem uma grande variedade de compostos nitrogenados, a assimilação de nitrato e nitrito é restrita a algumas poucas espécies (SIVERIO, 2002). Ávia et al (1995) iniciou os estudos moleculares sobre os mecanismos da assimilação de nitrato em *Hansenula polymorpha*, clonando o gene de YNR1 codificante da enzima nitrato redutase. O processo de assimilação de nitrato ocorre na entrada de NO₃⁻ através de transportador de alta afinidade codificado pelo gene *YNT1* (ÁVILA et al., 1995, ÁVILA et al., 2002). Uma vez assimilado o nitrato é metabolizado a amônia via duas reduções consecutivas catalisadas pela nitrato redutase, codificada pelo

gene *YNR1*, que reduz NO_3^- a NO_2^- usando uma molécula de NADPH e pela nitrito redutase, codificada pelo gene *YNI1*, que reduz NO_2^- a NH_4^+ com uso de três moléculas de NADPH (SIVERIO, 2002).

A levedura *D. bruxellensis* é também capaz assimilar nitrato e a identificação destes genes foi possível com o primeiro sequenciamento do genoma da levedura (WOOLFIT *et al.*, 2007). Esses três genes estruturais estão localizados em um cluster que contém também os genes *YNA1* e *YNA2* codificantes de fatores de transcrição do tipo Zn(II)2Cys6 nas duas espécies de levedura (ÁVILA *et al.*, 1998; ÁVILA *et al.*, 2002; WOOLFIT *et al.* 2007) (Fig. 5).

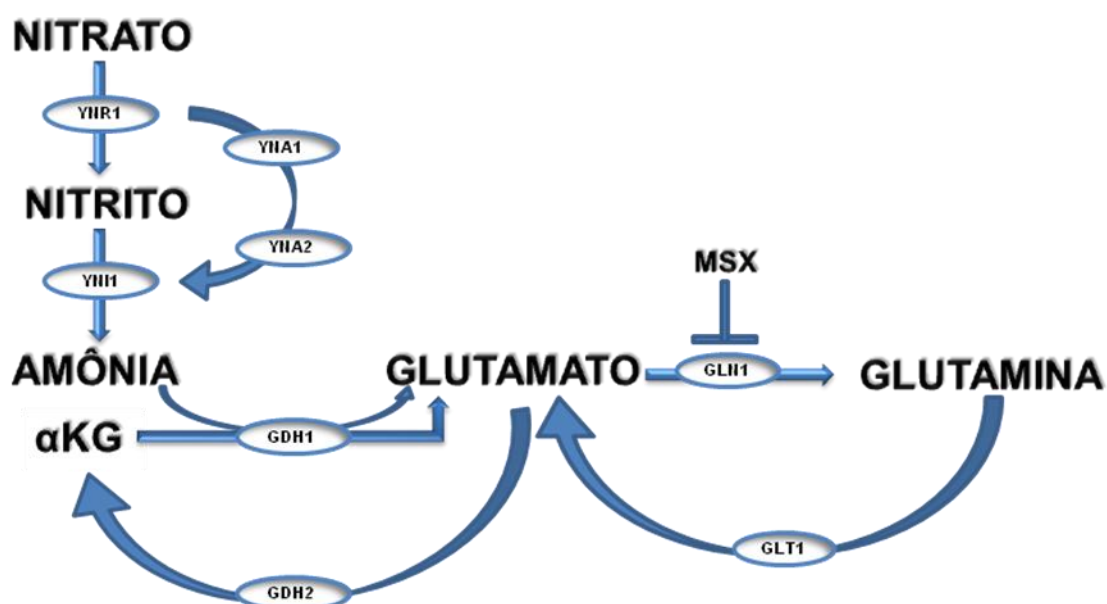


Figura 5: Representação esquemática dos genes envolvidos no metabolismo do Nitrato, fazendo uma junção com a via de síntese de glutamato e glutamina. A figura mostra a inibição por Metionina Sufoxamina (MSX), que inibe a expressão de *GLN1*, que codifica a glutamina sintetase.

Além disso, estudos já foram realizados para comprovar o efeito do nitrato na fisiologia da levedura, observando que a assimilação deste causa a diminuição do crescimento das células, o consumo de açúcar e a produção de etanol (BARROS PITA, 2013). Portanto, a compreensão da influência do metabolismo de nitrato em *D. bruxellensis*, pode ser importante para trazer novas informações deste mecanismo.

2.9 Método de análise de expressão gênica

A técnica de PCR quantitativa (qPCR) ou em Tempo Real tornou-se um padrão para a quantificação da expressão gênica. Desde o seu surgimento em 1992 (HIGUCHI et al., 1992) tem sido utilizada permitindo uma quantificação rápida, precisa e sensível dos níveis de RNA mensageiro (SCHEF et al., 2006). PCR em Tempo Real refere ao processo onde é possível monitorar a produção de amplicons durante cada ciclo da PCR (HIGUCH et al., 1993). Antes da utilização desta técnica, a RT-PCR convencional era utilizada para a quantificação de RNA mensageiros específica. Entretanto, este método não é capaz de determinar a quantidade inicial de moléculas alvo, porque no final dos ciclos de amplificação a quantidade amplicon depende não apenas da quantidade inicial, mas também de variações técnicas que ocorrem durante a reação (LIU e SAINT, 2002).

As reações de PCR em Tempo Real são realizadas em termocicladores que permitem a detecção de uma molécula repórter fluorescente. Existem várias técnicas para a detecção desta fluorescência, incluindo sondas fluorescentes por hidrólise do tipo TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e corantes intercalantes do tipo SYBR Green®. O SYBR Green® é um exemplo de um corante intercalante que floresce após sua ligação a uma dupla fita de DNA. No decorrer da reação a quantidade de molécula de SYBR Green® vai sendo intercaladas, produzindo uma maior fluorescência à medida que os ciclos vão sendo gerados. Contudo SYBR Green® liga-se indiscriminadamente a qualquer dupla fita de DNA, e artefatos como dímeros de primer e erros de amplificação contribuem para a fluorescência detectada (ZIPPER et al, 2004).

Geralmente a PCR consiste de três diferentes estágios cinéticos (FREEMAN et al., 1999, WILHELM e PINGOUD, 2003). Na primeira fase, de amplificação exponencial, o crescimento dos produtos de PCR é detectável como sinal fluorescente (nesta etapa ocorre a duplicação dos produtos de PCR a cada ciclo). A fase linear é caracterizada por um aumento linear dos produtos, à medida que os reagentes vão tornando-se limitantes. Na fase estacionária ou *plateau*, nenhum amplicon adicional é produzido, devido à escassez de alguns reagentes (FREEMAN et al., 1999, PANNETIER et al., 2003). Para a análise de dados da

PCR em Tempo Real a fase exponencial é crucial. Na figura 6 estão representadas as fases mencionadas.

Dois conceitos precisam ser determinados em uma reação de qPCR. O “Ct” (*Cycle threshold*) e a eficiência da reação. O valor de Ct é definido como um número fracionário de ciclos onde a curva cinética da PCR alcança uma quantidade de fluorescência limiar definida pelo pesquisador, ou automaticamente pelo programa do termociclador. Este ponto deve ser posicionado na fase exponencial da curva, isto é, acima do background e abaixo da fase estacionária. A eficiência da reação é o ponto principal em uma análise de qPCR. Em uma situação ideal, a quantidade de amplicons deve teoricamente dobrar de um ciclo para o outro, o que seria equivalente a uma eficiência de 100% (*Applied Biosystems, User Bulletin #2*).

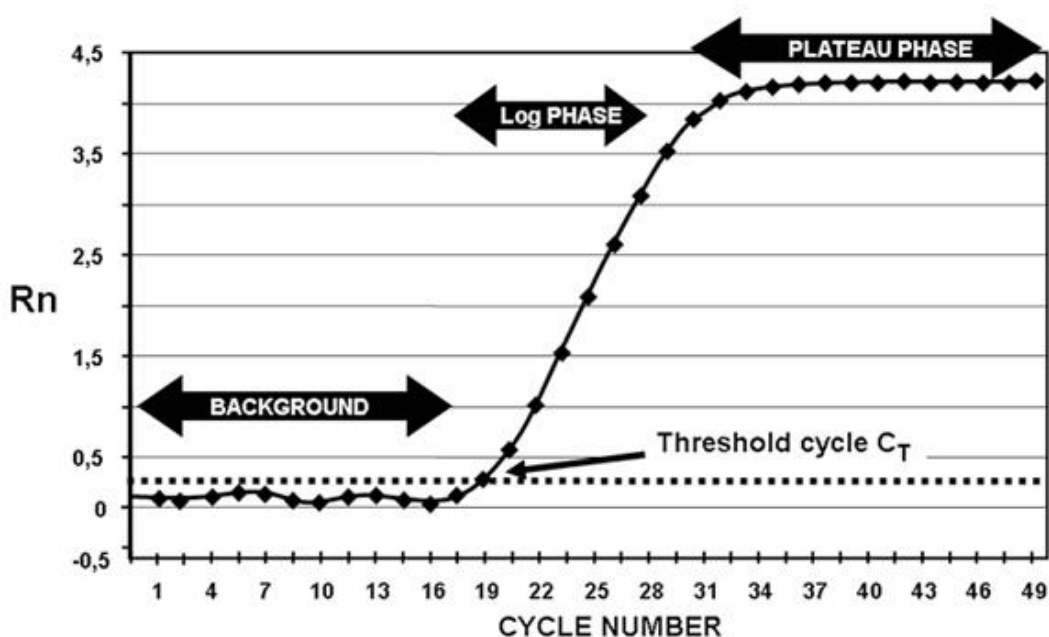


Figura 6: representação de uma amplificação de PCR em Tempo Real. O eixo Y corresponde a fluorescência emitida pela molécula repórter fluorescente (Rn), e o eixo X representa o número de ciclos gerados.

A análise de quantificação por qPCR pode ser realizada em níveis absolutos (número de cópias de um DNA/RNA específico, quantificação absoluta) ou níveis relativos (amostra 1 possui duas vezes mais RNA que a amostra 2, quantificação relativa). Para a quantificação relativa, o método mais utilizado é o $2^{-\Delta\Delta C_t}$, este consiste na relação entre duas amostras (controle e teste), gene alvo e

gene endógeno. Para cada amostra, a diferença de valores de Ct entre o gene alvo e o controle endógeno é calculado (ΔCt). A seguir, subtrai-se o valor de ΔCt da condição controle do valor de ΔCt condição teste ($\Delta\Delta Ct$). O valor negativo desta subtração é utilizado como expoente de “2” na equação. O valor obtido é normalmente referido como RQ (Relative Quantity ou Quantidade Relativa) (VANGUILDER et al., 2008).

Desta forma, é possível utilizar esta técnica para definir o nível de expressão relativa das permeases de nitrogênio, sabendo o quanto a qPCR é bastante sensível, capaz de determinar a variação de níveis de expressão gênica em diversas condições. Isto servirá para conduzir os estudos referentes à repressão catabólica exercida pelo nitrogênio.

3 Objetivos

3.1 Geral

Determinar a expressão relativa dos genes envolvidos no metabolismo central de assimilação de nitrogênio em função do tipo e a disponibilidade dessas diferentes fontes no meio de cultura

3.2 Específicos

- Determinar a capacidade de utilização de cada um dos vinte aminoácidos por *Dekkera bruxellensis* para crescimento celular;
- Determinar a regulação da expressão dos genes do metabolismo central da amônia e do nitrato sob efeito do inibidor Metionina Sufoxamina

4 Material e Métodos

4.1. Análises fisiológicas para fontes de nitrogênio

4.1.1. Linhagens e meios de cultivo celular

O laboratório de Genética de Microrganismo da Universidade Federal de Pernambuco possui mais de 30 isolados de *D. bruxellensis* coletados de diversas destilarias de álcool espalhadas pelo Nordeste do Brasil. A linhagem utilizada para este estudo foi a GDB 248 cujas características fisiológicas para o metabolismo do carbono (LEITE et al 2012) e nitrato (DE BARROS PITA et al 2011) tem sido estudadas. As células foram mantidas em meio YPD sólido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) e cultivados em meio sintético definido YNB (Yeast Nitrogen Base) sem aminoácidos e sem amônio, suplementados com glicose para 20 g/L e com as diferentes fontes de nitrogênio (Tabela 2), de forma que a na concentração final de nitrogênio no meio seja 75 mM.

4.1.2. Ensaios de crescimento celular

As células de *D. bruxellensis* GDB248 foram pre-cultivadas em meios sintéticos contendo diferentes fontes de nitrogênio e utilizadas para inocular o mesmo meio (10 ml de pré-inóculo e 200 µl de volume final) em placas de microdiluição estéreis para a densidade óptica inicial de 0,1 a 600 nm. Os cultivos foram realizados no equipamento Multi-Mode Microplate Reader, Synergy™ HT, Biotek (Suiça) nas condições 30 °C a uma agitação constante. Cada condição testada em triplicata de forma que os resultados foram apresentados como média e desvio padrão para cada ponto da curva de crescimento. Essas curvas foram utilizadas para determinação da velocidade específica de crescimento (μ , h⁻¹) a partir da inclinação da fase logarítmica segundo a equação: $Bd = \ln_2 / G_{rate}$; sendo Bd = tempo de duplicação da biomassa, $\ln_2$ =logaritmo natural do número 2 e G_{rate} = taxa de crescimento celular.

Esses valores foram utilizados para se estabelecer uma classificação das diferentes fontes de nitrogênio segundo a capacidade de metabolização pelas células da levedura.

Tabela 2: descrição das concentrações de cada fonte de nitrogênio utilizada no trabalho.

Fonte de Nitrogênio	Concentração de Trabalho (g/L)
Glicina	5,63
Serina	7,88
Cisteína	9,08
Tirosina	13,59
Ácido aspártico	10
Ácido glutâmico	11,03
Arginina	3,26
Histidina	3,88
Asparagina	5
Prolina	8,63
Fenilalanina	12,39
Valina	8,78
Triptofano	7,65
Treonina	9
Lisina	5,48
Leucina	9,83
Isoleucina	9,83
Metionina	11,19
Alanina	6,68
Glutamina	55,24
Nitrato de sódio	6,4
Ureia	2,25
Sulfato de amônia	4,9

4.1.3. Teste com Ninidrina para consumo de nitrogênio livre

O consumo de nitrogênio durante o cultivo celular foi determinado pelo teste com Ninidrina, a qual reage com o grupamento amina dos aminoácidos gerando uma coloração púrpura, cuja intensidade varia com a concentração do aminoácido no meio. A solução de ninidrina (sol. A) foi preparada dissolvendo-se 8 g de Ninidrina em 400 ml do diluente composto por 300 ml de solução de etileno glicol (1%) e 100 ml de solução de acetato de sódio 4 M a pH 4,5. Esta solução é estável à temperatura ambiente durante pelo menos 6 meses. A segunda solução

é feita dissolvendo 500 mg de Cloreto Estanho (SnCl_2) em 5ml de etileno glicol (1%) (sol. B). A solução de reação foi preparada na hora do ensaio misturando-se 25 μl da solução B com 1 ml da solução A. A concentração de nitrogênio da amostra foi medida misturando-se 20 μl da amostra da cultura com 200 μl da solução de reação. A mistura foi incubada a 100°C por 10 minutos, seguindo de incubação a 4°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2.8 ml de água ultra-pura e a absorbância em 575 nm. As determinações foram realizadas em duplicata para cada amostra. Foram realizadas curvas dose-resposta de calibração com soluções de glicina, alanina, fenilalanina, histidina, isoleucina e amônio. Este último serviu como referência já que não reage com a ninidrina.

4.2. Análises da regulação do metabolismo dos aminoácidos

4.2.1. Inibição por Metionina Sulfoximina (MSX)

A regulação do metabolismo dos aminoácidos em *D. bruxellensis* foi avaliada a partir da inibição da enzima glutamina sintase pelo composto metionina Sulfoximina (MSX), o que foi descrito, inativa a via de sinalização TOR em *S. cerevisiae*. Inicialmente concentração mínima inibitória (MIC) de MSX foi determinada em meio sintético definido YNB contendo glicose a 20 g/l e as principais fontes de nitrogênio (amônia, nitrato, glutamato e glutamina) na concentração de 75 mM de nitrogênio final.

4.3. Análise de expressão gênica

4.3.1. Extração de RNA

Para realizar os ensaios de quantificação relativa da expressão gênica as células de *D. bruxellensis* foram cultivadas em meio mínimo (YNB) em diferentes fontes de nitrogênio até as culturas alcançarem a OD de 0,5 a 600nm. Após isso as células foram coletadas em tubos cônicos de 15 ml, imediatamente congeladas e armazenadas em freezer -80°C até o momento da extração. Para o isolamento do RNA, as células armazenadas foram descongeladas e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C . O Sobrenadante foi descartado e ao sedimento celular foi suspenso em 250 μl de solução AE (Acetato de sódio 50 mM e EDTA 10 mM pH5,3) e 60 μl de solução de SDS a 10%. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo vortex e incubada em banho-maria a 65°C por 10 minutos. O lisado

foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um microtubo de 1,5 ml. O RNA total foi purificado com auxílio do kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Após a extração as amostras de RNA foram congeladas em freezer - 20°C.

Para as análises referentes à inibição com MSX, as células de *D. bruxellensis* foram cultivadas em meio sintético definido (YNB) contendo glicose a 20 g/l e em uma das diferentes fontes de nitrogênio testadas (Glutamato, Glutamina, Amônia e Nitrato) na concentração de 75 mM de nitrogênio. As células foram cultivadas até a cultura alcançar OD de 1,0 a 600nm, coletadas, centrifugadas e ressuspensas no mesmo volume do meio de crescimento adicionado de MSX para 20 mM. As células foram incubadas por uma hora e processadas como acima.

4.3.2. Quantificação e avaliação de integridade de RNA total

As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop (GE Health Care, EUA), segundo as instruções do fabricante. Para a determinação da concentração e pureza, as absorbâncias de 260nm e 280nm foram observadas. A relação Abs260/Abs280 ideal deve ser próxima de dois para o RNA puro, sendo aceitáveis valores entre 1,9 e 2,1. A quantificação foi realizada utilizando-se a seguinte conversão: uma unidade de absorbância a 260nm representa 40 µg de RNA por /ml. Para a determinação da integridade das amostras de RNA, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se tampão de corrida apropriado (TAE) tratado com DEPC. Para a corrida, foram utilizados 4 µl da amostra de RNA e 1 µl de tampão de amostra. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador UV.

4.3.3. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado usando-se o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System Promega II (Promega, USA), seguindo instruções do fabricante. A quantidade inicial de RNA utilizada foi de 1 µg para cada tubo de 40 µl de reação de transcrição reversa.

4.3.4. Sequências gênicas e condições de amplificação

As sequências de nucleotídeos dos genes *MEP1*, *GAP1*, *PUT4*, *GDH1*, *GDH2*, *GLT1*, *YNR1*, *YNT1*, *YNI1*, *YNA1*, *GAT1* e *EFA1* foram obtidas do banco de dados do NCBI. Os primers foram desenhados com o auxílio do software *Primer Express®* da *Applied Biosystems* (<http://www.appliedbiosystems.com/support/apptech/>), obedecidos os seguintes critérios: tamanho do amplicon entre 70 e 150pb; tamanho do oligo entre 19 e 21 nucleotídeos; conteúdo GC entre 20 e 80% e T_m média de 60°C (DE BARROS PITA et al 2011, 2012, 2013).

4.3.5. RT-PCR Quantitativa (RT-qPCR)

Os ensaio de PCR em Tempo Real foram realizados no sistema de detecção ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando o kit SYBR Green PCR /master Mix seguindo instruções do fabricante (Applied Biosystems). Os parâmetros utilizados para a amplificação dos genes em todos os ensaios realizados foram: 95°C por 10min, para a ativação da Taq polimerase e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

4.3.6. Método de quantificação e controle endógeno

O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado para a quantificação relativa da expressão gênica. Este método relaciona a expressão do gene alvo com a de um controle endógeno, normalmente um gene constitutivo, em diferentes condições e momentos. O controle endógeno é utilizado para corrigir variações relacionadas a diversos passos anteriores à reação de qPCR, como extração e quantificação de RNA, transcrição reversa, entre outras variações, ou seja, são genes que representam expressão considerada uniforme em todas as amostras estudadas. Para esta função, foi escolhido o gene *EFA1* de *D. bruxellensis*, codificante da cadeia alfa do fator de alongação de tradução nesta levedura. Este gene foi amplificado utilizando-se o cDNA de todas as amostras e observado quanto à uniformidade de sua expressão.

4.3.7. Análise dos resultados

Ao final da amplificação, os dados gerados foram analisados no *software* SDS v.2.0 da *Applied Biosystems*. O cálculo de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi realizado em planilhas do *software* Microsoft® Office Excel® 2007.

5 Resultados

5.1. Avaliação da velocidade de crescimento celular em presença de aminoácidos

A levedura *D. bruxellensis* foi cultivada em cada um dos meios de cultura contendo cada um dos 20 aminoácidos como fonte de nitrogênio, além de amônio, ureia e nitrato, como definido na tabela 2. A taxa específica de crescimento foi calculada a partir da fase de crescimento exponencial das curvas de crescimento e serviram para classificar quatro grupos de fontes de Nitrogênio: Grupo 1 ou fonte preferencial, grupo 2 ou fonte secundária, grupo 3 ou fonte não-preferencial e grupo 4 ou fonte de baixa metabolização (Fig. 7).

O grupo 1 foi composto por amônio e pelos aminoácidos Arginina, Peptona, Glutamina, Lisina e Treonina. Em média, essas fontes promovem crescimento das células de *D. bruxellensis* em velocidades próximas àquelas observada em meio com peptona (Fig. 8A). Já o grupo 2 foi composto pelos aminoácidos Ácido glutâmico, Glicina, Alanina e Ácido aspártico, além de Nitrato e Urea (Fig. 8B). O grupo 3 foi composto por Valina, Serina, Histidina, Asparagina, Isoleucina e Leucina (Fig. 8C). Por fim o grupo 4 foi composto por Tirosina, Metionina, Triptofano, Fenilalanina, Prolina e Cisteína (Fig. 8D).

5.2. Assimilação das fontes de nitrogênio

Os ensaios realizados para definir o consumo de nitrogênio a partir do método de ninidrina mostraram consumo semelhante em torno de 90% dos aminoácidos Alanina e Glicina, classificados como fontes preferencial e secundárias, respectivamente, e para Isoleucina e Fenilalanina, classificados como fontes não-preferenciais e fonte de baixa metabolização, respectivamente, mostraram as maiores taxas de consumo (Tabela 3).

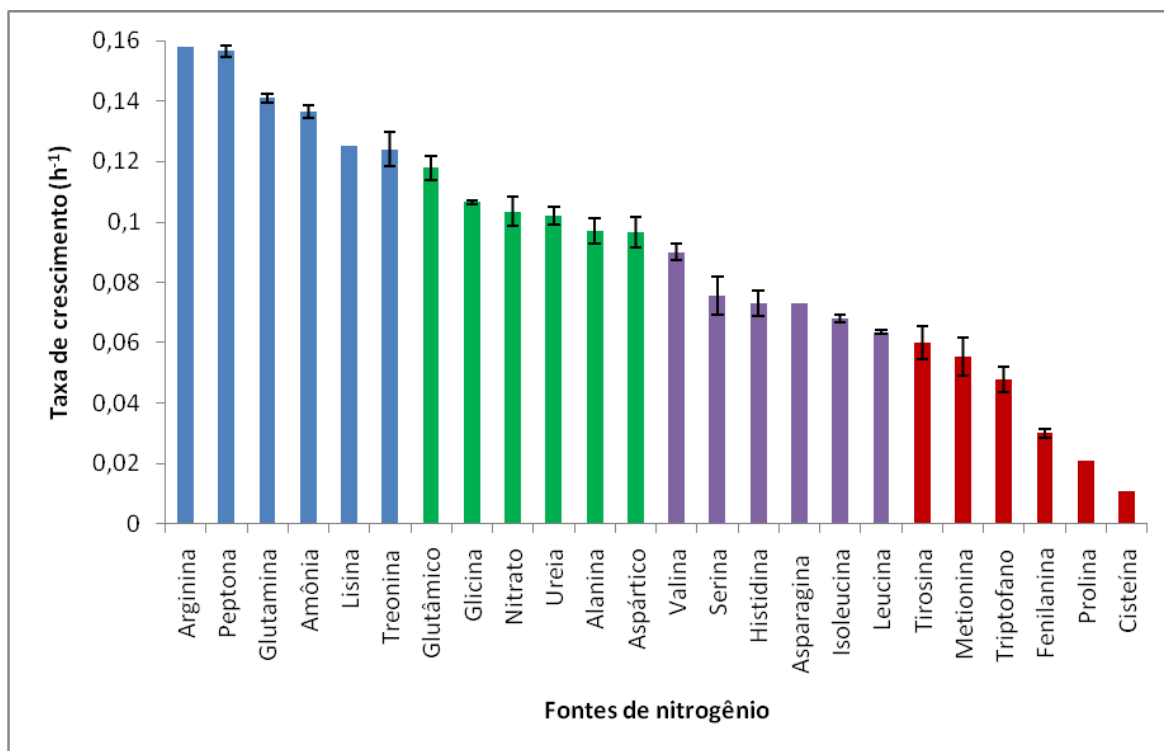


Figura 7: Taxa específica de crescimento de *Dekkera bruxellensis* em meio sintético contendo glicose a 20 g/L e um dos 20 aminoácidos como fonte de nitrogênio adicionados de forma a representarem 75 mM de nitrogênio no meio. Os aminoácidos foram separados em quatro grupos de acordo com o crescimento celular apresentado: Grupo 1 ou grupo preferencial (colunas em azul), Grupo 2 ou grupo secundário (colunas em verde), Grupo 3 ou grupo não-preferencial (colunas em violeta) e Grupo 4 ou grupo de baixa metabolização (colunas em cinza).

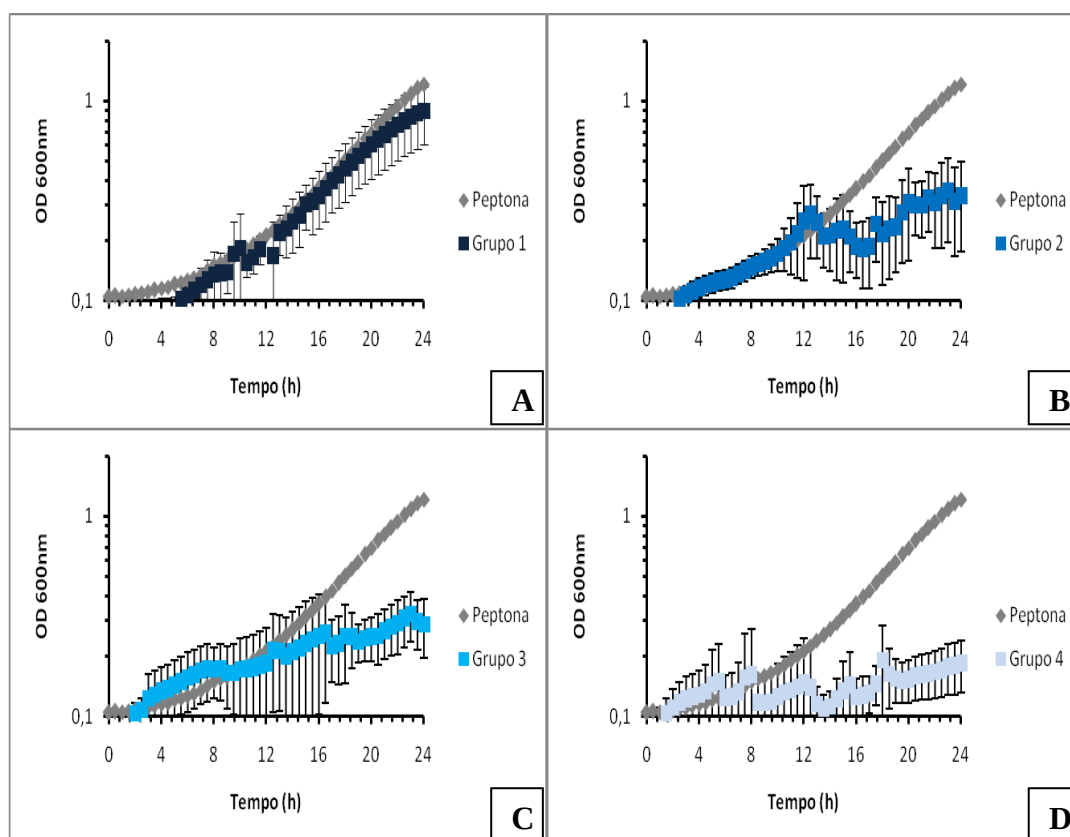


Figura 8: Perfil médio do crescimento de *Dekkera bruxellensis* em meio mínimo contendo as fontes de nitrogênio classificadas como Grupo 1 (Arginina, Peptona, Glutamina, Amônia, Lisina e Treonina como fonte de nitrogênio) (painel A), Grupo 2 (Ácido glutâmico, Glicina, Nitrato, Ureia, Alanina e Ácido aspártico) (painel B), Grupo 3 (Valina, Serina, Histidina, Asparagina, Isoleucina e Leucina) (painel C) e Grupo 4 (Tirosina, Metionina, Triptofano, Fenilalanina, Prolina e Cisteína) (painel D). O meio contendo peptona foi usado como referência.

As maiores taxas de consumo foram observadas para os aminoácidos Isoleucina e Fenilalanina, classificadas nos grupos 3 e 4, respectivamente, maiores até do que as observadas para o aminoácido alanina classificado como preferencial, ou do grupo 1, e glicina classificada como secundária, ou do grupo 2. Portanto, a velocidade de consumo do aminoácido não parece estar diretamente relacionada com a velocidade específica de crescimento das células.

Tabela 3: Consumo das fontes de nitrogênio medido através do método de ninidrina no meio sintético contando aminoácidos de cada um dos grupos de metabolização.

Aminoácido	Grupo	Nitrogênio consumido		Taxa de consumo (mg/l.h)
		(mg/l)	(%)	
Alanina	1	9359,60	93,59	382,02
Glicina	2	8557,61	85,57	222,27
Histidina	3	3594,01	35,94	194,27
Isoleucina	3	8107,49	81,07	463,28
Fenilalanina	4	8350,97	83,50	417,54

5.3. Expressão gênica das permeases de aminoácidos

Em função das diferenças observadas tanto no crescimento celular quanto na assimilação dos aminoácidos, avaliamos a expressão dos genes de permeases durante o cultivo das células de *D. bruxellensis* em meio sintético definido (YNB) contendo glicina, alanina, fenilalanina, histidina ou isoleucina como fonte de nitrogênio. O cultivo em amônia foi utilizado como condição de referência para a análise de expressão gênica. Os dados de quantificação relativa indicaram que os genes *MEP1*, *GAP1* e *PUT4* apresentaram diferentes padrões de expressão. O gene *MEP1*, que codifica o transportador de baixa afinidade para amônia, não apresentou sobre-expressão em nenhum dos aminoácidos testados. No entanto, este gene apresentou valores de expressão gênica menores do que a referência para a maioria desses aminoácidos (Figura 9). Já o gene *PUT4* apresentou padrão de sobre-expressão para todos os aminoácidos testados, com menor destaque para a glicina que induziu em duas vezes a expressão do gene em relação a condição de referência (Figura 9). Isto mostra que em *D. bruxellensis* o gene *PUT4* está sob forte repressão catabólica pelo amônio, e sugere que nesta levedura o produto do gene *PUT4* está relacionado não só com a assimilação da prolina, mas com o de outras fontes de nitrogênio consideradas deficientes (Figura 9 e 10).

O gene *GAP1* apresentou sobre-expressão quando as células foram cultivadas em meio contendo Alanina, Prolina, Isoleucina ou Fenilalanina, com destaque para o crescimento em Fenilalanina com 884 vezes mais transcritos do que em amônio. Foi observada uma pequena diminuição na expressão deste gene quando as células foram cultivada com glicina (Figura 10).

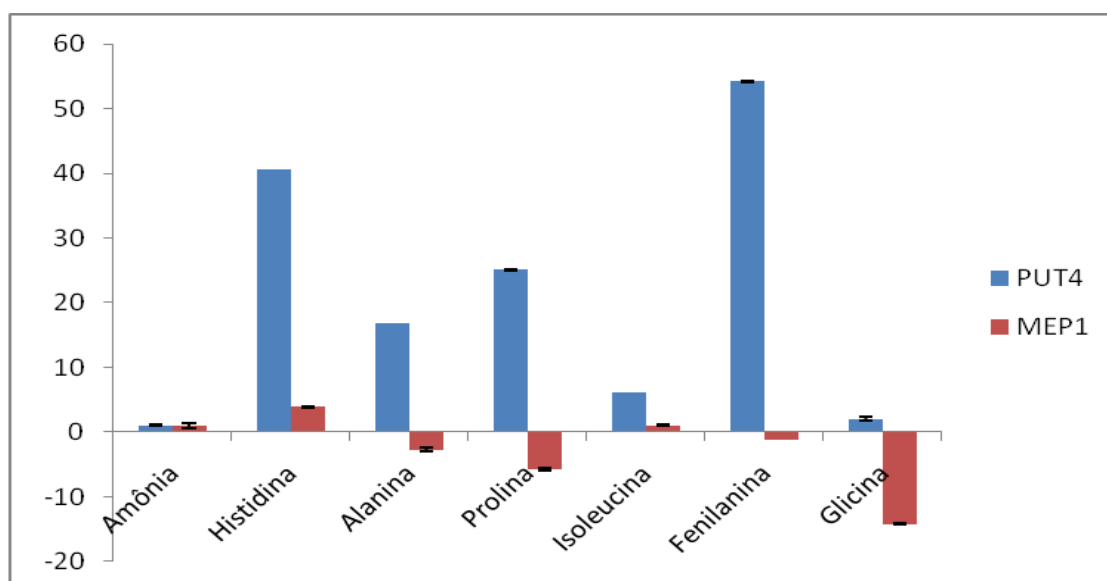


Figura 9: Expressão relativa dos genes *PUT4* e *MEP1* que codificam para permeases de prolina e amônia em *Dekkera bruxellensis* após cultivo em meio sintético contendo representantes de cada um dos quatro grupos de aminoácidos. Neste gráfico o meio com amônia está sendo utilizada com referência.

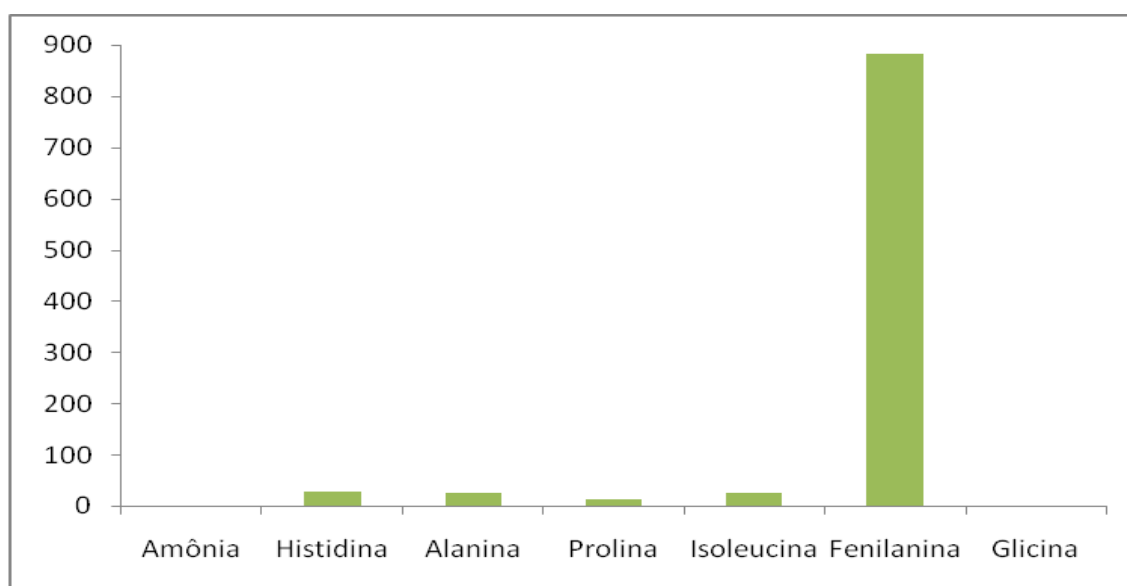


Figura 10: Expressão relativa do gene *GAP1* que codificam para permease geral de aminoácido em *Dekkera bruxellensis* após cultivo em meio sintético contendo representantes de cada um dos quatro grupos de aminoácidos. Neste gráfico o meio com amônia está sendo utilizada com referência.

5.4. Expressão dos genes que codificam enzimas do metabolismo de aminoácidos

Os genes *GDH1*, *GDH2* e *GLT1* que participam do metabolismo central do nitrogênio, na assimilação de amônio, foram analisados quanto ao padrão de expressão no crescimento em diferentes fontes de nitrogênio. Pode-se observar que não há indução dos três em prolina, mas em isoleucina e fenilalanina há uma

indução de *GDH1*. Já glicina e histidina induzem os três genes. É possível observar uma relação entre o grupo não-preferencial (histina) com as permeases, pois neste caso elas estão sobre-expresso causando assim um descontrole nas expressões dos genes de regulação da glutamina, é relevante esta hipótese quando comparamos com o nível de expressão da Alanina, que, ao contrário da Histina, os três genes não estão expressos (Fig 11).

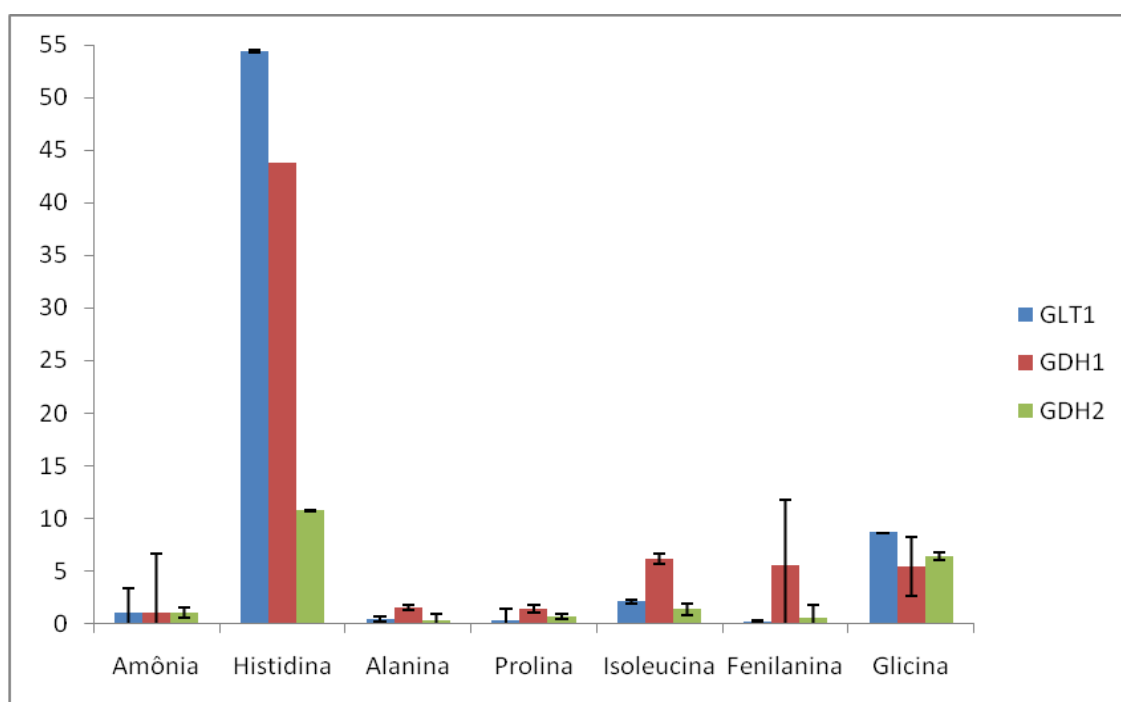


Figura 11: Expressão relativa dos genes *GDH1*, *GDH2* e *GLT1* que codificam para a regulação de glutamato e glutamina em *Dekkera bruxellensis* após cultivo em meio sintético contendo representantes de cada um dos quatro grupos de aminoácidos. Neste gráfico o meio com amônia está sendo utilizada com referência.

5.5. Avaliação da velocidade de crescimento celular em presença de Metionina Sulfoximina

A regulação do metabolismo do nitrogênio foi analisado com o uso do composto metionina Sulfoximina (MSX), o qual é usado como inibidor do mecanismo de repressão catabólica do nitrogênio (NCR) mediado pela via regulatória TOR em *S. cerevisiae* e mimetiza a condição de limitação de nitrogênio no meio. As células foram cultivadas em meio sintético contendo glutamato, glutamina, nitrato e amônia. Inicialmente foram testadas as condições utilizadas para *S. cerevisiae*. Vale salientar que no meio com Nitrato observamos a inibição do crescimento com apenas 2mM de MSX, como ocorre para os testes de inibição em *Saccharomyces cerevisiae*, isto pode ser explicado pelo fluxo

menor de amônia em relação aos outros meios, fazendo com que a inibição seja mais severa. Já para amônia e glutamato foi necessário uma concentração de 20mM de MSX para obter uma inibição da enzima. Os resultados comprovaram que MSX inibe o crescimento celular quando a fonte de nitrogênio é o amônio (Figura 12A) e diminui o crescimento celular quando em glutamato e nitrato como fonte de nitrogênio (Figura 12B, 12C). Por outro lado, não interfere no crescimento celular quando a fonte é glutamina (Figura 12D). Isto indica que a inibição metabólica promovida pela MSX ocorre na reação catalisada pela glutamina sintetase e que, portanto, o mecanismo NCR em *D. bruxellensis* é similar ao de *S. cerevisiae*.

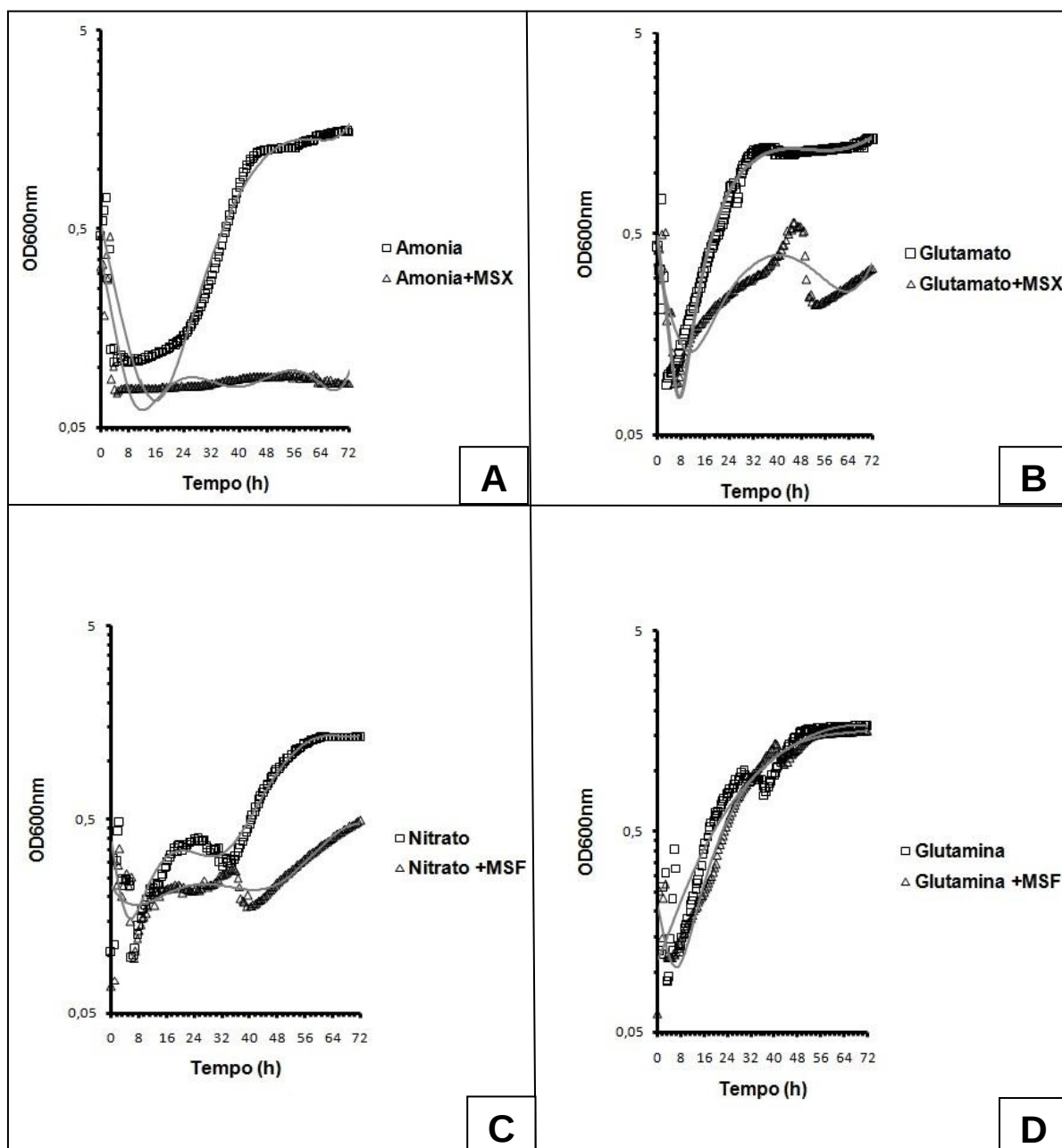


Figura 12: gráficos mostrando o efeito da inibição no crescimento por Metionina Sulfoximina para os crescimentos com Amônia (A), Glutamato (B) e Nitrato (C), pois estes não produzem ao final do seu metabolismo a glutamina, gerando assim o déficit de crescimento em relação ao crescimento sem o inibidor. Já o crescimento com glutamina (D) não houve nenhuma diferença, pois este já é o produto final do metabolismo.

5.6. Expressão gênica para o crescimento celular em presença de Metionina Sulfoximina

5.6.1. Permeases

Após os testes de crescimento, a levedura foi submetida a crescimento nos meios com glutamato, amônia e nitrato (descritos em materiais e métodos) para poder extrair o RNA e, posteriormente aos testes de expressão gênica. Os resultados obtidos para a expressão gênica das permeases nos meios com glutamato e nitrato mostraram que todos os genes estão expressos, principalmente para o meio com Nitrato, já que no nosso estudo ele é considerado um meio fraco para o crescimento. O gene *GAP1*, que codifica a permease geral de aminoácidos está expressa nos dois meios (amônia e nitrato), já *PUT4* está 4 vezes mais expresso em nitrato em relação à amônia, novamente confirmando que *PUT4* é uma permease para fontes de nitrogênio não-preferenciais (Figura 13).

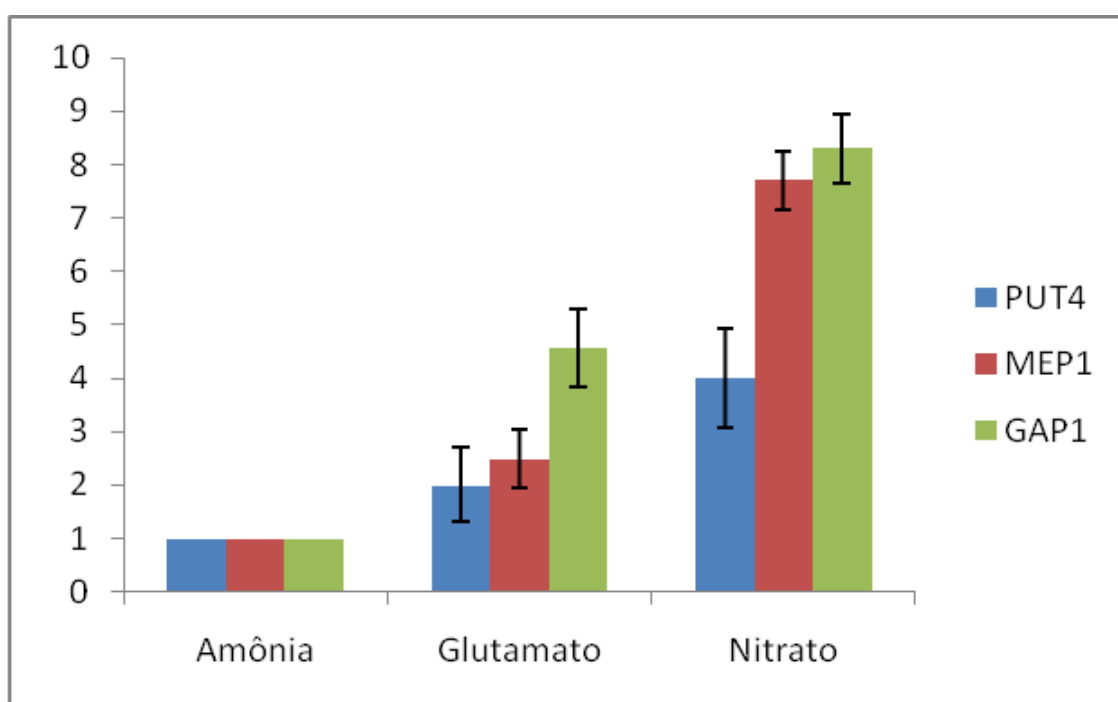


Figura 13: Expressão gênica das permeases, *MEP1*, *GAP1* e *PUT4* utilizando a amônia como referência, nos meios com glutamato e nitrato.

Para as expressões em meio com MSX, analisamos primeiramente par a par, ou seja, o meio sem o inibidor será o controle em relação ao meio com MSX. Neste caso observamos um aumento na expressão gênica de todas as permeases nos meios com Amônia+MSX e Glutamato+MSX, mostrando que nestes meios o inibidor está agindo na GS, desreprimindo os genes de regulação de NCR, permitindo, assim, a ativação das permeases pela falta de glutamina no meio intracelular. Para o meio com Nitrato só há

expressão de *PUT4*, isto pode ser explicado pelo fato de que o nitrato sem o inibidor de GS está sendo utilizada como referência e, por esta razão os genes *MEP1* e *GAP1*, que já estariam expressos nesta condição, não é observada de forma significativa quando MSX é colocado no meio de crescimento (Fig. 14).

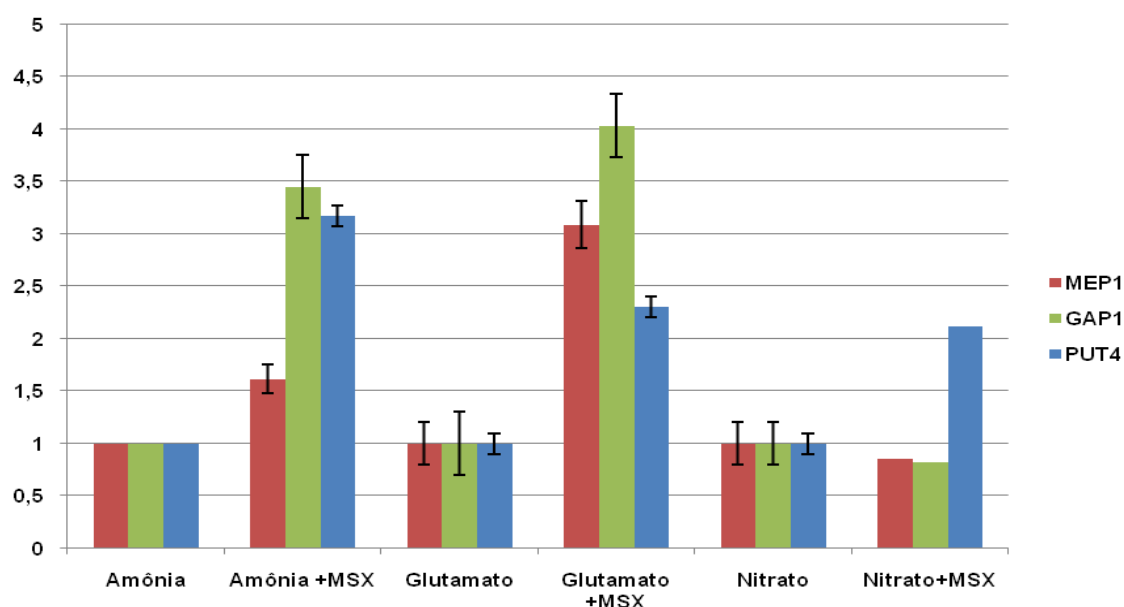


Figura 14: Expressão gênica das permeases, *MEP1*, *GAP1* e *PUT4* utilizando a Metionina Sulfoximina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. As referências foram feitas entre os meios sem e com a MSX, mostrando a regulação das permeases na presença do inibidor.

A partir das observações realizadas até o momento em relação ao uso da MSX como inibidor da via TOR, pode-se notar que existe uma relação entre as permeases, pois é possível notar um aumento na expressão gênica quando comparamos com o meio sem o inibidor. Mas para que seja observado de maneira semelhante aos testes com os aminoácidos e, também para poder analisar melhor os níveis de expressão, analisamos os mesmos resultados agora com a amônia como referência.

A figura 15 mostra esta relação. Observando as permeases (*MEP1*, *GAP1* e *PUT4*) pode-se perceber que os maiores níveis de expressão estão nos meios que contém a MSX, já que na presença deste composto a enzima *GLN1* está inibida e, consequentemente não permitindo a síntese de glutamina, desta forma a célula comporta-se como se estivesse no meio deficiente e, por isso, ativa as permeases para poder conseguir adquirir outro tipo de fonte de nitrogênio. Dando destaque para este experimento a expressão da permease *GAP1* em glutamato com a MSX, que está a quase 20 vezes mais expresso do que em amônia.

Sabendo que este gene codifica para uma permease geral de aminoácidos, explica o fato de está tão expresso quanto o normal, pois, como já foi mencionada, a célula está respondendo à falta de nitrogênio (Fig. 15).

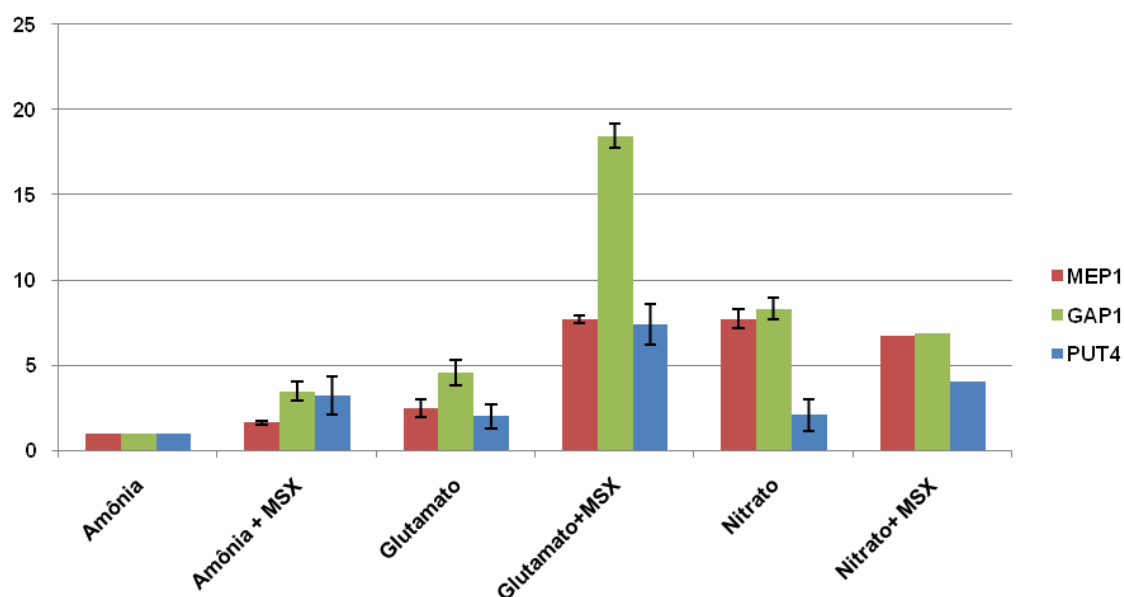


Figura 15: Expressão gênica das permeases, *MEP1*, *GAP1* e *PUT4* utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. A amônia foi usada como referência para esta análise, mostrando a regulação das permeases na presença do inibidor.

Em relação ao transportador de nitrato (*YNT1*), com o mesmo tipo de análise feito anteriormente, pode-se observar que existe um aumento significativo no meio com glutamato+MSX, em amônia é possível perceber um aumento de 10x em relação ao meio sem o inibidor. Já em nitrato é possível notar que não existe expressão, este fato pode ser explicado novamente, pois a expressão do transportador já está muito expressa sem a MSX, fazendo com que a relação seja praticamente a mesma no meio com a MSX (Fig. 16). Também é possível notar que o nível de expressão é maior para os meios que contém a MSX. Curiosamente nos meios com glutamato e amônia com o inibidor de GS o gene *YNT1* é expresso, apesar do fato de que este gene somente é expresso na presença de nitrato (Fig. 17).

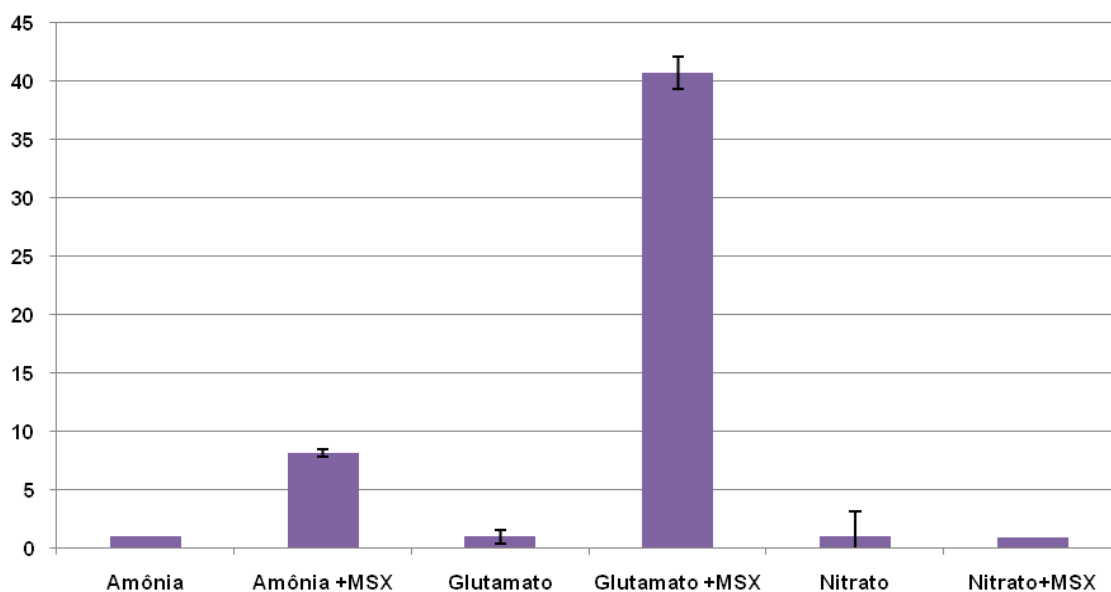


Figura 16: Expressão gênica do transportador de nitrato *YNT1* utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. As referências foram feitas entre os meios sem e com a MSX, mostrando a regulação do transportador na presença do inibidor.

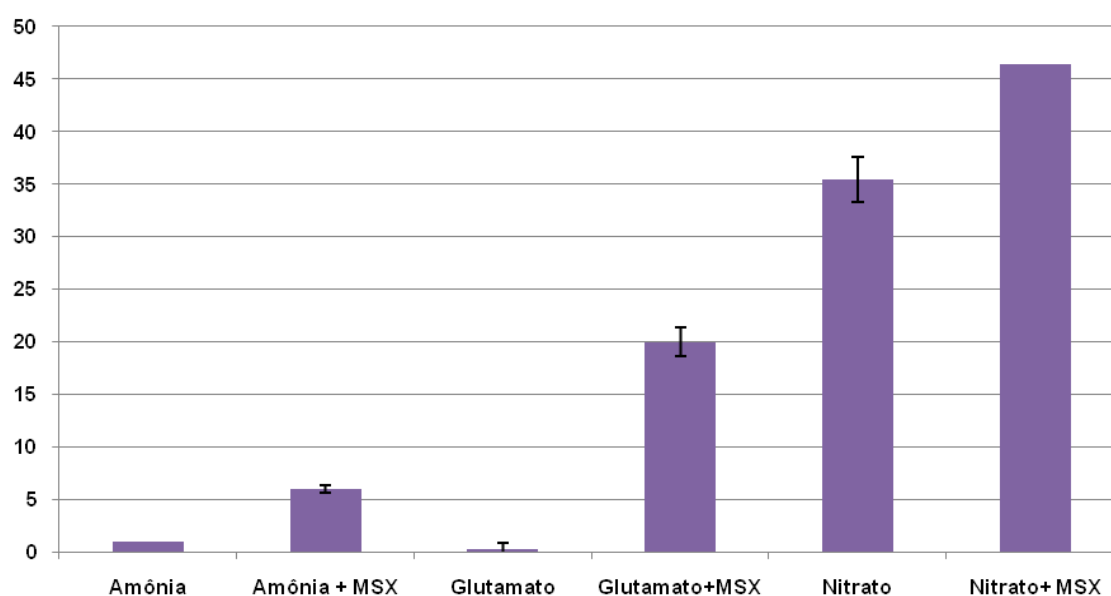


Figura 17: Expressão gênica de *YNT1* utilizando a Metionina Sulfoximina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. A amônia foi usada como referência para esta análise, mostrando a regulação do transportador de nitrato na presença do inibidor.

5.6.2. Enzimas

Observando as expressões gênicas das enzimas da via de glutamato (*GDH1*, *GDH2* e *GLT1*) para os meios com glutamato e nitrato, sendo a amônia o referencial, pode-se perceber que para o meio com glutamato o gene *GLT1* é o mais expresso em relação à amônia, já que neste meio o *GLT1* não é tão expresso e, por isso, aparece com uma expressão de 4 vezes mais em relação à amônia. O contrário ocorre para os genes *GDH1* e *GDH2* que não possuem uma expressão tão significativa. Já o meio com nitrato, pode-se notar que os três genes possuem praticamente o mesmo nível de expressão (Fig. 18).

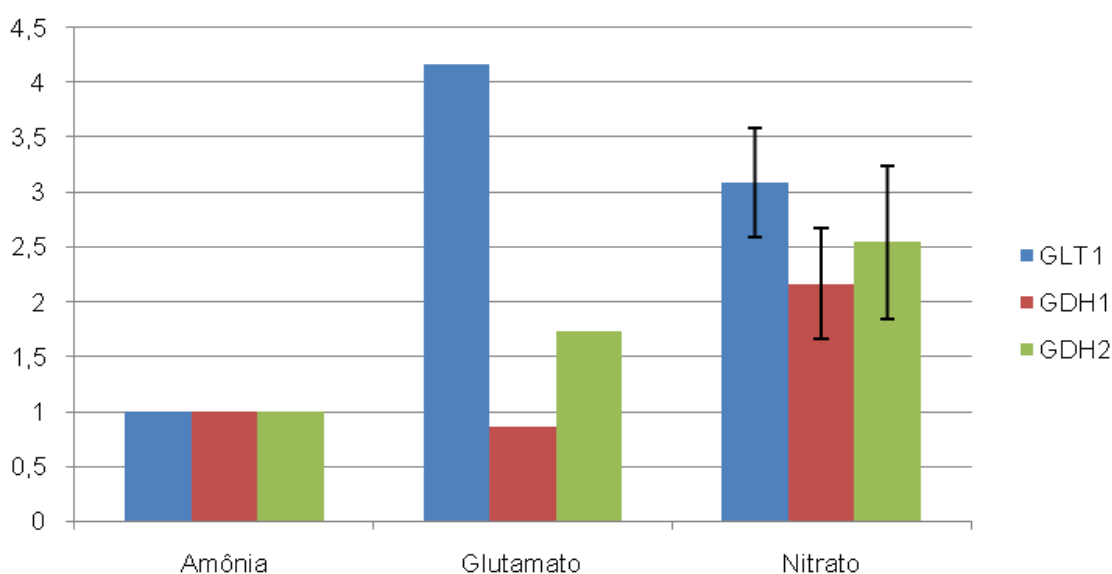


Figura 18: Expressão gênica dos reguladores de glutamato, *GLT1*, *GDH1* e *GDH2* utilizando a amônia como referência, nos meios com glutamato e nitrato.

Para os experimentos com a expressão gênica dos reguladores de glutamato, o gene *GLT1* está expresso em todas as condições, com exceção de nitrato+MSX, sendo nesta condição o gene *GDH2* o mais expresso do que todos os outros meios, isto pode ser explicado pela falta da enzima *GLN1*, fazendo com que ocorra a degradação do glutamato a amônia e α -cetoglutarato. Esta expressão é sensível a repressão catabólica do nitrogênio e aos níveis de amônia intracelular (Fig. 19).

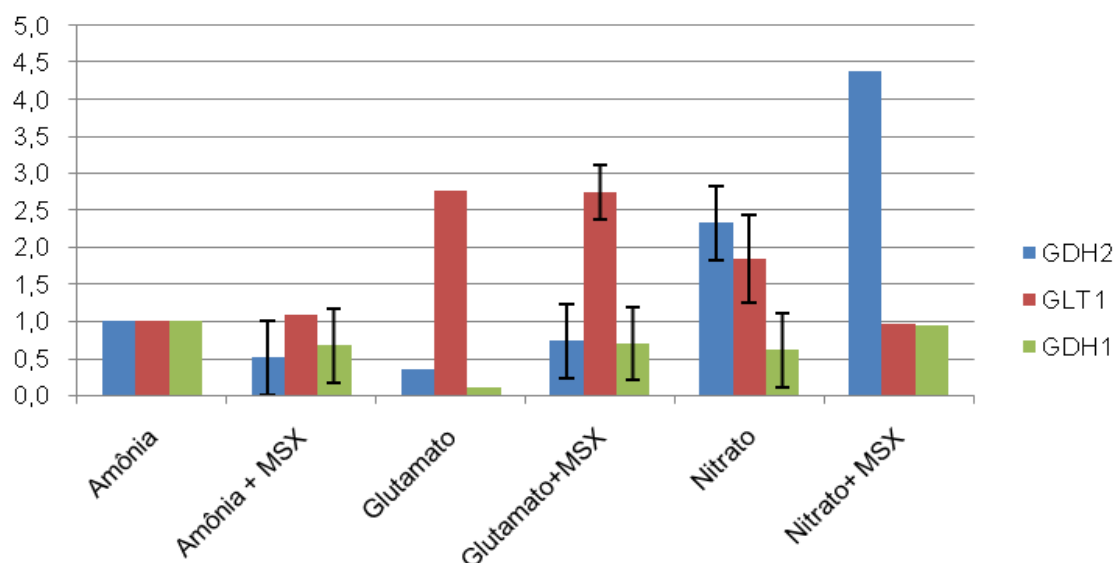


Figura 19: Expressão gênica dos reguladores de glutamato (*GDH1*, *GDH2* e *GLT1*) utilizando a Metionina Sulfoximina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. A amônia foi usada como referência para esta análise, mostrando a regulação do transportador de nitrato na presença do inibidor.

5.6.3. Reguladores

Para a expressão gênica dos reguladores *GAT1* que expressa um fator de transcrição da via TOR, pode-se observar um aumento de mais de 20 vezes no meio com amônia+MSX em relação ao meio sem o inibidor, isto pode ser explicado pelo fato da regulação deste fator ser mais necessário nesta condição do que nas demais, fazendo com que a diminuição de glutamina para esta condição seja mais evidente (Fig. 20). Já para o regulador da via de nitrato *YNA1*, não obteve nenhum nível de expressão significativo quando se compara por esta metodologia (Fig. 21). Observando as expressões gênicas que codificam as enzimas do metabolismo de nitrato (*YNR1* e *YNI1*), percebe-se que existe um aumento no nível de expressão em ambos os genes para o meio com Glutamato+MSX (Fig. 22), quando comparado ao meio sem o inibidor. Isto demonstra que o crescimento com glutamato adicionado ao inibidor, desregula os genes desta via, pois este mesmo resultado aparece para a expressão gênica do transportador de nitrato (Fig. 16).

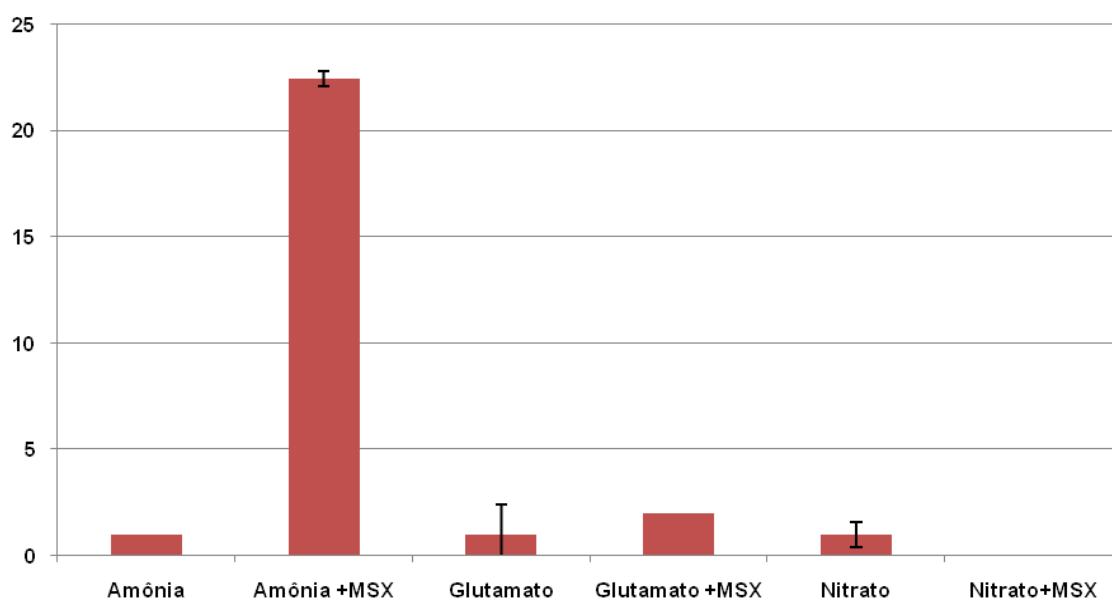


Figura 20: Expressão gênica do regulador *GAT1* utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. As referências foram feitas entre os meios sem e com a MSX.

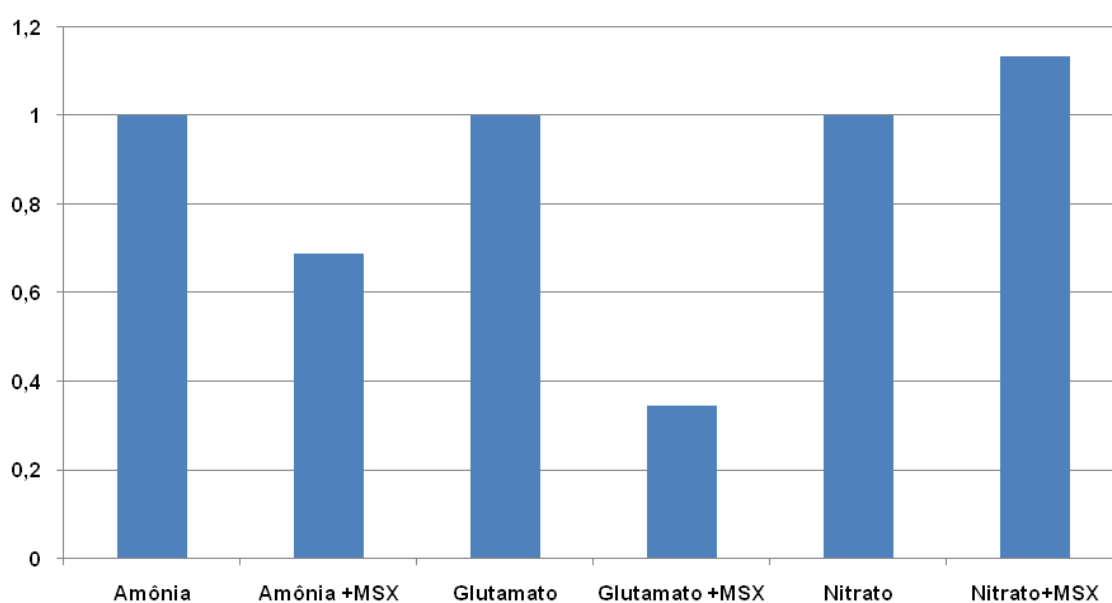


Figura 21: Expressão gênica do regulador *YNA1* utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. As referências foram feitas entre os meios sem e com a MSX.

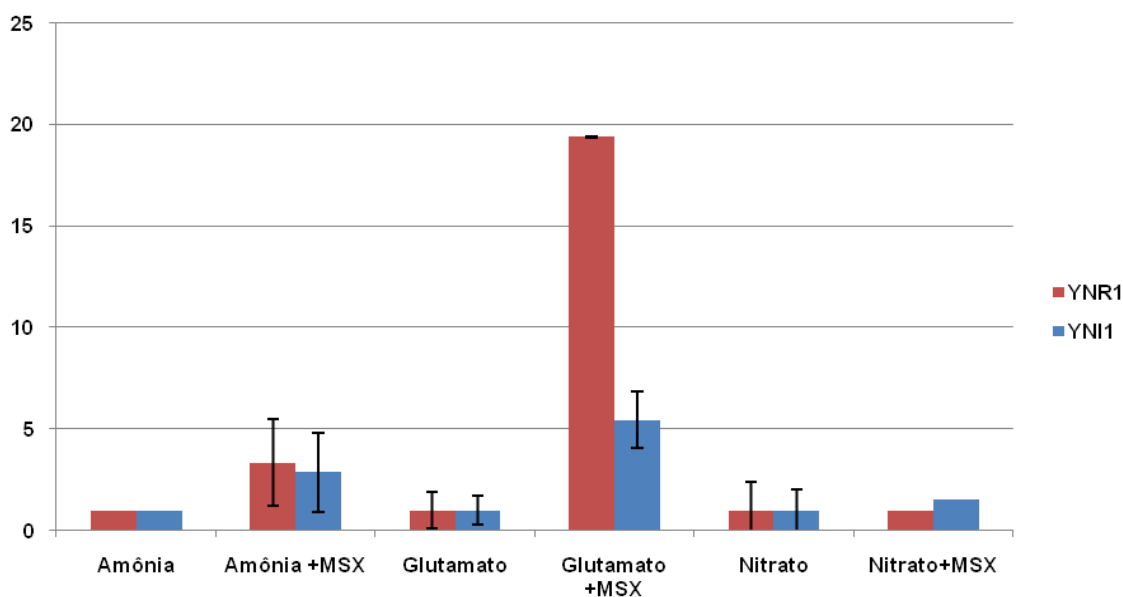


Figura 22: Expressão gênica dos reguladores *YNR1* e *YNI1* utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. As referências foram feitas entre os meios sem e com a MSX.

Já na análise de expressão gênica de *GAT1*, este sendo um fator de transcrição da via TOR, apenas o meio com amônia com a MSX teve um aumento significativo na expressão de quase 25 vezes em relação à amônia, fortalecendo a hipótese de que esta via está sendo necessária nestas condições de falta de nitrogênio (Fig. 23).

Por fim analisamos os genes que regulam o metabolismo do nitrato, e foi observado que os genes que codificam as enzimas nitrato redutase e nitrito redutase (*YNR1* e *YNI1*, respectivamente) estão expressos no meio com glutamato+MSX, corroborando o fato de que os genes ligados ao nitrato podem ser expressos em condições escassas de nitrogênio (Fig. 24).

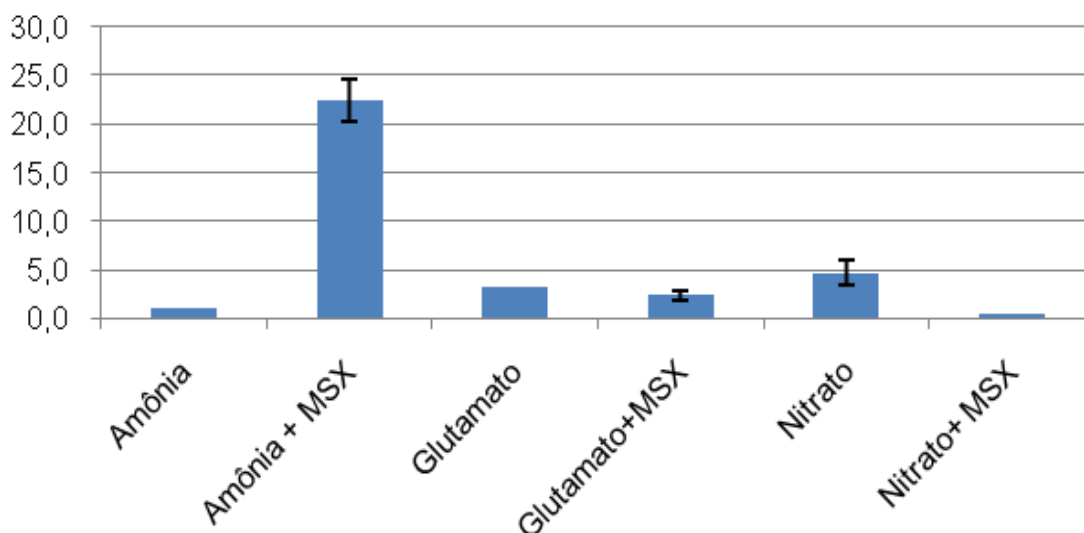


Figura 23: Expressão gênica de GAT1 utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. A amônia foi usada como referência para esta análise, mostrando a regulação do transportador de nitrato na presença do inibidor.

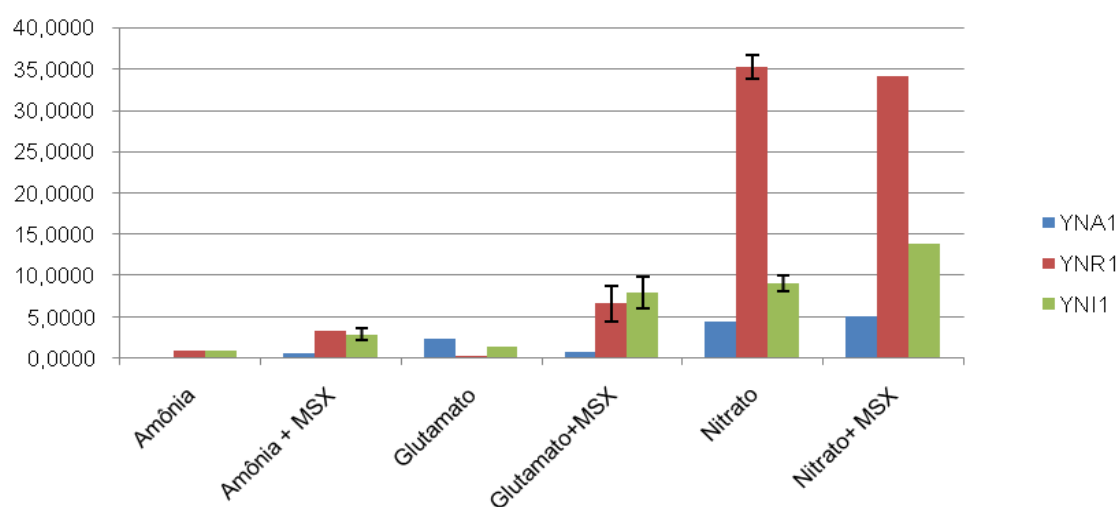


Figura 24: Expressão gênica das enzimas de nitrato (*YNA1*, *YNR1* e *YNI1*) utilizando a Metionina Sufoxamina (20mM) como inibidor da enzima *GLN1*. A amônia foi usada como referência para esta análise, mostrando a regulação do transportador de nitrato na presença do inibidor.

6 Discussão

Os experimentos designados para a elaboração das curvas de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio mostraram que *D. bruxellensis* demonstra um perfil diferenciado, em relação à *S. cerevisiae*, pois neste trabalho a levedura estudada cresce muito bem em Arginina, Peptona, Glutamina, Amônia, Lisina e Treonina, e cresce de forma não eficiente aos aminoácidos: Tirosina, Metionina, Triptofano, Fenilalanina, Prolina e Cisteína. As fontes de nitrogênio que permitem um crescimento mais rápido são glutamina e asparagina, que servem como fontes excelentes de glutamina e glutamato intracelular. Células crescem um tanto mais lento em amônia como fonte de nitrogênio, pois as células são um tanto deficientes em glutamato, mas não em glutamina (HOFMAN-BANG, 1999). Estes dados corroboram com os experimentos mostrados, pois a amônia, como fonte de nitrogênio, pertence ao grupo de crescimento fraco.

Ao contrário do que demonstra o trabalho de Godard, et al. (2007), no qual os grupos divididos entre preferencial e não preferencial para o crescimento em *S. cerevisiae* foi diferente para os crescimentos estudados. Isto pode revelar o quanto a levedura *D. bruxellensis* é diferente em relação à absorção e percepção dos aminoácidos. Isto já foi mostrado por de Barros Pita et, al. (2013), no qual caracteriza a assimilação de determinados aminoácidos e o papel da expressão gênica das permeases na sua assimilação. Este papel é importante principalmente para os aminoácidos observados neste estudo, no caso da fenilalanina a taxa de consumo foi o mais alto, sugerindo que as permeases estivessem ativas, como foi demonstrado, além disso, estudos estabelecidos pelo grupo identificaram dois genes que codificam para Metionina fenilpiruvato (PHE-Pdc) na levedura *D. bruxellensis*. A atividade de PHE-Pdc é atribuída a descarboxilação de fenilpiruvato a fenil-acetaldeído durante o catabolismo de fenilalanina. Neste mesmo trabalho a indução do gene ARO10 foi maior do que em *S. cerevisiae* (DE SOUZA LIBERAL, 2012). Isto fortalece a hipótese de que *D. bruxellensis* assimila muito bem a fenilalanina, apesar de produzir alcoóis superiores derivados de aminoácidos aromáticos ou de cadeia ramificada a partir da via de Erlich (PARENTE et al, 2015).

Em relação à expressão gênica, observamos que o crescimento com a Alanina, Prolina, Isoleucina e Fenilalanina tiveram um nível de expressão equivalente, pois obtiveram uma alta expressão na permease GAP1, dando destaque no crescimento em Fenilalanina, esta obtendo uma expressão de quase 884 vezes mais em relação à amônia. Este nível de expressão é explicado pelo fato de que o gene *GAP1* está relacionado com o controle geral dos aminoácidos e, neste caso, está expresso para os aminoácidos não preferenciais, pois segundo Jauniaux et al. (1999), o papel deste gene é de “limpar” os aminoácidos externos, a fim de ser utilizado como fonte de nitrogênio e, portanto, é mais ativo em condições de pouca disponibilidade de nitrogênio. Já em Glicina obteve-se uma inibição do mesmo gene, isto corrobora com a hipótese de que este gene está relacionado com a percepção de aminoácidos não preferenciais. Uma das razões que a atividade Gap1 é tão fortemente regulada é que a falta de sua atividade resulta em efeitos de regulação secundária devido à exclusão de indutor, evitando assim a indução das vias catabólicas necessárias para utilizar fontes de nitrogênio pobre (STANBROUGH et al, 1995).

Tratando-se da expressão de MEP1 não foi observado nenhum nível de expressão significativa, já que este gene está relacionado com a amônia. Já em PUT4 observamos uma alta expressão nos crescimentos em Histina, Alanina, Prolina, Isoleucina e Fenilalanina, dando a entender que este gene pode estar relacionado não só com a prolina, mas com outras fontes deficientes. Resultados revelaram que em *D. bruxellensis* a codificação do gene *MEP1* e *PUT4* estão controlados pelo NCR, mostrando um aumento de sua expressão em meios pobres, assim, a co-expressão de genes *GAP1* e *PUT4* no meio com prolina pode conceder uma baixa ou alta afinidade de transporte para este aminoácido (DE BARROS PITA et al, 2013).

Para os experimentos de crescimento com a Metionina Sufoxamina como um inibidor da via TOR, foi possível observar que de fato inibe de forma indireta o crescimento celular e, por isso, reduz a velocidade de crescimento. Estes resultados estão em de acordo com os mostrados em Crespo et al. (2002), pois mostra que este inibidor imita os efeitos de limitação de nitrogênio, fazendo com que o gene *GLN3* permaneça no núcleo e obtendo uma alta expressão dos genes responsáveis pela repressão catabólica do nitrogênio. Para efeito metabólico, esta

inibição impede a produção de glutamina, principal fonte de resposta da via TOR e, por esta razão, é observado o déficit de crescimento em presença da Metionina Sufoxamina.

Para definir esta atividade de inibição de *GLN1* e consequentemente a desrepressão de genes regulados pela repressão catabólica do nitrogênio, submetemos a levedura nos meios com glutamato, amônia e nitrato adicionando a MSX para cada um deles. A assimilação deste conjunto (fonte de nitrogênio+MSX) resulta na acumulação intracelular de glutamato e na desativação de genes sensíveis a NCR (CRÉPIN et al, 2012). Por exemplo, a permease *GAP1* é regulada em resposta à fonte de nitrogênio disponível, na presença de uma fonte pobre, mutação de *gln1* e no tratamento com MSX ou Rapamicina, a captação dessa permease é alta. A via TOR parece regular também esta permease em resposta à disponibilidade de nitrogênio (CRESPO e HALL, 2002). Para este estudo as permeases estudadas (*GAP1*, *MEP1* e *PUT4*) obtiveram um nível de expressão significativo, em destaque para o meio com glutamato+MSX, este obteve quase 20 vezes mais expressão do que em amônia. Isto se refere à falta de glutamina intracelular fazendo com que desempenhe um papel de ativação da transcrição de *GAP1* e *GDH2* por *GLN3*. A glutamina então é o sinal mediador na função de inibição de *GLN3*, como a GS está inativa ocorre a desrepressão de *GLN3* (HOFMAN-BANG, 1999).

Os resultados que envolvem a expressão dos reguladores de glutamato corrobora com os resultados de Gonzales et al, 1998, indicando que a expressão de *GLT1* aumentou durante privação de aminoácidos e que este aumento era dependente Gcn4p. Uma vez que o glutamato é um precursor na biossíntese da maioria dos aminoácidos, os genes que codificam para as enzimas envolvidas em sua biossíntese provavelmente teriam de ser sensível à fome de um número de ácidos aminados. Ao contrário do que ocorreu para o meio com glutamato, onde *GLT1* é ativo, pois estudos sugerem que transcrição de *GLT1* de células de levedura cultivadas em fontes de nitrogênio rico em glutamato é reprimido (DE BARROS PITA et al, 2013).

Já para o transportador de nitrato (*YNT1*) pode-se observar uma expressão em glutamato+MSX e amônia+MSX, apesar de ser um transportador de nitrato e nitrito, este gene também é fosforilado quando as células são privadas

de nitrogênio e que a presença da maioria das fontes de nitrogênio torna *YNT1* desfosforilado. A presença de transportador na membrana plasmática permite que a levedura utilize de forma eficiente traços de nitrato no meio (NAVARRO et al, 2008; Martín et al, 2011). Por esta razão, é válido dizer que *YNT1*, o único transportador de alta afinidade de nitrato e nitrito na levedura *D. bruxellensis* e *Hansenula polymorpha*, é regulada pela qualidade das fontes de nitrogênio e, neste caso, na privação da enzima GS que, por sua vez, imita a privação de nitrogênio. Este mesmo fato ocorre nas expressões de *YNR1* e *YNI1* que também estão ativas no meio com inibição da glutamina sintetase.

Por fim, o nível de expressão de *GAT1* é importante, pois exerce a ativação da transcrição adicional na ausência de fontes de nitrogênio preferencial ou mediante a inibição de *TORC1*, este mecanismo de regulação pode permitir a expressão de genes principalmente dependendo da disponibilidade de substrato para a via catabólica (LEE e HAHN, 2013). Desta forma o nível de expressão em amônia+MSX pode ser explicado pela falta de glutamina, ativando assim os genes de expressão sensíveis a NCR, como mostrado nas figuras 19 e 20, no qual o meio com amônia com o inibidor, possui um nível de expressão tanto nas permeases quanto nos reguladores do glutamato.

Vale ressaltar que a função da localização do fator GATA, no entanto, não são os únicos processos de resposta ao nitrogênio. Outros incluem a esporulação, autofagia e a formação de pseudohifas em condições adversas de nitrogênio (GIMENO, 1992). Em condições ricas, células diplóides são elipsoidais, já em condições pobres resulta na formação de pseudohifas. Tem sido sugerido que a formação destas estruturas pode facilitar a eliminação de fontes adicionais de nitrogênio no ambiente (TATE et al, 2014) (ver anexos).

O controle da expressão do gene ao nível da transcrição representa um ramo importante da sinalização TOR. A análise de expressão de células de levedura tratadas com Metionina Sufoxamina ou de células deslocadas a partir de uma fonte rica para uma fonte pobre de nitrogênio ou de carbono pobre revelou um papel proeminente da coordenação de transcrição de genes regulados por nutrientes pela via TOR (CARDENAS et al, 1999; HARDWICK et al, 1999; KOMEILI et al, 2000; SHAMJI et al, 2000). O conjunto mais impressionante de genes afetados por tratamento de MSX, no entanto, são aqueles que estão envolvidos na absorção e assimilação de diferentes fontes de nitrogênio.

Especificamente, MSX provoca um decréscimo na expressão de genes que participa na absorção e metabolismo de fontes de nitrogênio preferidos (glutamina e amônia) e um pronunciado aumento na expressão de genes envolvidos na absorção e uso de fontes de nitrogênio pobres (ureia e prolina). Assim, a MSX induz uma resposta de privação de nitrogênio.

7 Conclusões

- A levedura *D. bruxellensis* assimila de forma diferente os compostos nitrogenados, determinando assim as fontes que são boas, regulares, fracas e deficientes.
- A expressão gênica das permeases para os diferentes grupos afirma a separação dos grupos, mostrando que a Repressão Catabólica do Nitrogênio está relacionada com a disponibilidade e qualidade do nitrogênio no meio.
- O estudo com a Metionina Sufoxamina mostrou que esta pode ser utilizada para a levedura *D. bruxellensis* para estudos de expressão gênica da via de crescimento celular.
- Portanto, a disponibilidade de fontes de nitrogênio interfere no crescimento celular da levedura, podendo ser importante nos estudos relacionados ao aumento ou decréscimo da massa celular desta levedura. Além de inferir novas discussões a respeito da expressão de outras permeases e genes responsáveis pela sua repressão.

Referências

- André B, Hein C, Grenson M and Jauniaux JC (1993). Cloning and expression of the UGA4 gene coding for the inducible GABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 237: 17–25.
- Andréasson C and Ljungdahl PO (2004). The N-terminal regulatory domain of Stp1p is modular and, fused to an artificial transcription factor, confers full Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor control. *Mol. Cell. Biol.* 24: 7503–7513.
- Aronova S, Wedaman K, Anderson S, Yates J and Powers T (2007). Probing the Membrane Environment of the TOR Kinases Reveals Functional Interactions between TORC1, Actin, and Membrane Trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18(8):2779-94.
- Ávila J, Gonzales C, Brito N, Manchin F, Pérez MD and Siverio JM (2002). A second Zn(II)2Cys6 transcriptional factor encoded by the YNA2 gene is indispensable for the transcriptional activation of the genes involved in nitrate assimilation in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 19, p. 537-544.
- Ávila J, Pérez MD, Brito N, Gonzales C and Siverio JM (1995). Cloning and description of YNR1 gene encoding the nitrate reductase apoenzyme of the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett.*, p. 137-142.
- Aviram S, Simon E, Gildor T, Glaser F and Kornitzer D (2008). Autophosphorylation-induced degradation of the Pho85 cyclin Pcl5 is essential for response to amino acid limitation. *Mol. Cell. Biol.* 28: 6858–6869.
- Basílio AC, de Araújo PR, de Moraes JO, da Silva Filho EA, Moraes Jr MA and Simões DA (2008). Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr Microbiol. Apr*;56(4):322-6.
- Beck T and Hall MN (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402: 689–692.
- Becker ES, Strohbach D and Rinck M (1999). A specific attentional bias in suicide attempters. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 18, 730– 735.
- Benjamin PM, Wu JI, Mitchell AP and Magasanik B (1989). Three regulatory systems control expression of glutamine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* at the level of transcription. *Mol Gen Genet* 217(2-3):370-7.
- Bertram PG, Choi JH, Carvalho J, Ai W, Zeng C, Chan TF and Zheng XF (2000). Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *J Biol Chem* 275(46):35727-33.
- Blomqvist J, Eberhard T, Schnürer J and Passoth V (2010). Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(4):1487-97.
- Bomeke K, Pries R, Korte V, Scholz E and Herzog B (2006). Yeast Gcn4p stabilization is initiated by the dissociation of the nuclear Pho85p/Pcl5p complex. *Mol. Biol. Cell* 17: 2952– 2962.
- Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF and Kunkel RE (1996). Principles and practices of winemaking. Chapman & Hall, New York. Fugelsang, K.C. Wine Microbiology. Chapman & Hall Pub. Co. New York, N.Y.

- Brito N, Avila J, Pérez MD, Gonzalez C and Siverio JM (1996). The genes YNI1 and YNR1, encoding nitrite reductase and nitrate reductase, respectively, in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochem. J.* 317, 89-95.
- Cardenas ME, Cutler NS, Lorenz MC, Di Como CJ and Heitman J (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 13:3271–3279.
- Chen EJ and Kaiser CA (2002). Amino acids regulate the intracellular trafficking of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology*, vol. 99, n°. 23; 14837–14842.
- Cherkasova V, Qiu H and Hinnebusch AG (2010). Snf1 promotes phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 by activating Gcn2 and inhibiting phosphatases Glc7 and Sit4. *Mol. Cell. Biol.* 30: 2862–2873.
- Conrad M, Schothorst J, Kankipati HN, Zeebroeck GV, Rubio-Texeira M and Thevelein JM (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 38; 254–299.
- Cooper TG (1982). Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, p. 39–99. In J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: metabolism and gene expression*, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Cox KH, Tate JJ and Cooper TG (2002). Cytoplasmic compartmentation of Gln3 during nitrogen catabolite repression and the mechanism of its nuclear localization during carbon starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277: 37559–37566.
- Cox KH, Rai R, Distler M, Daugherty JR, Coffman JA and Cooper TG (2000). *Saccharomyces cerevisiae* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p. *J Biol Chem* 275 (23):17611-8.
- Crépin L, Nidelet T, Sanchez I, Dequin S and Camarasa C (2012). Sequential Use of Nitrogen Compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation: a Model Based on Kinetic and Regulation Characteristics of Nitrogen Permeases. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(22):8102.
- Crespo JL and Hall MN (2002). Elucidating TOR Signaling and Rapamycin Action: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(4):579.
- Crespo JL, Powers T, Fowler B and Hall MN (2002). The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10):6784-9.
- de Barros Pita W, Leite FC, de Souza Liberal AT, Simões DA and de Moraes MA (2011). The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100:99–107.
- de Barros Pita W, Tiukova L, Leite FCB, Passoth V, Simões DA and Moraes MAM (2013). The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. *Yeast* 2013; 30: 111–117.
- de Souza Liberal AT, Basílio ACM, Resende AM, Brasileiro BTV, da Silva-Filho EA, de Moraes JOF, Simões DA and de Moraes Jr MA (2007). Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 102: 538–547.

- de Souza Liberal AT, Carazzolle MF, Pereira GA, Simões DA and de Moraes Jr MA (2012). The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the ARO10 gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. *World J Microbiol Biotechnol* 28:2473–2478.
- Debailleul F, Trubbia C, Frederickx N, Lauwers E, Merhi A, Ruyschaert JM, André B and Govaerts C (2013). Nitrogen catabolite repressible GAP1 promoter, a new tool for efficient recombinant protein production in *S. cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 12:129.
- Delfini C and Formica JV (2001). *Wine Microbiology. Science and Technology*. Marcel Dekker, New York, NY.
- Di Como CJ and Arndt KT (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.*10:1904–1916.
- Dong JHQ, Garcia-Barrio Anderson MJ and Hinnebusch AG (2000). Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol. Cell* 6: 269–279.
- Ehrlich F (1907). Ueber die Bedingungen der Fuselölbildung und uüber ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 40:1027–1047.
- Freeman WN, Walker SJ and Vrana KE (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112 – 125.
- Fugelsang KC (1996). *Wine Microbiology*. Chapman & Hall Pub. Co. New York, N.Y.
- Galafassi S, Merico A, Pizza F, Hellborg L, Molinari F, Piškur J and Compagno C (2011). *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano*, 38(8):1079-88.
- Georis I, Feller A, Tate JJ, Cooper TG and Dubois E (2009a). Nitrogen catabolite repression-sensitive transcription as a readout of Tor pathway regulation: the genetic background, reporter gene and GATA factor assayed determine the outcomes. *Genetics* 181: 861–874.
- Georis I, Feller A, Vierendeels F and Dubois E (2009). The yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 29: 3803–3815.
- Georis I, Feller A, Vierendeels F and Dubois E (2009b). The yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 29: 3803–3815.
- Georis I, Tate JJ, Cooper TG and Dubois E (2008). Tor pathway control of the nitrogen-responsive DAL5 gene bifurcates at the level of Gln3 and Gat1 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 283: 8919–8929.
- Georis I, Tate JJ, Feller A, Cooper TG and Dubois E (2011). Intranuclear function for protein phosphatase 2A: Pph21 and Pph22 are required for rapamycin-induced GATA factor binding to the DAL5 promoter in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 31: 92–104.
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA and Fink GR (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077–1090.
- Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, van Helden J and Andre B (2007). Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene

- Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Molecular and Cellular Biology, p. 3065–3086.
- Hardwick JS, Kuruvilla FG, Tong JK, Shamji AF and Schreiber SL (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14866–14870.
- Hazelwood LA, Daran JM, Maris AJA, Pronk JT and Dickinson JR (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2259–2266.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS and Griffith R (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10:413 – 417.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G and Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. *Biotechnology (NY)* 11:1026 – 1030.
- Hinnebusch AG (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 407–450.
- Hinnebusch AG and Natarajan K (2002). Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot. Cell* 1: 22–32.
- Hofman-Bang J (1999). Nitrogen Catabolite Repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biotechnology* 1073–6085 12:2/35–73.
- Iraqui I, Vissers S, Bernard F, de Craene JO and Boles E (1999). Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Mol. Cell. Biol.* 19: 989–1001.
- Jauniaux JC and Grenson M (1990). GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur. J. Biochem.* 190: 39–44.
- Jauniaux JC, Vandenbol M, Vissers S, Broman K and Grenson M (1987). Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the PUT4 gene and study of PUT4 RNA levels in wild-type and mutant strains. *Eur. J. Biochem.* 164: 601–606.
- Jones EW and Fink GR (1982). Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast, pp. 181–299 in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, edited by J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Jones M and Pierce JS (1964). Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J. Inst. Brew.* 70:307–315.
- Komeili A, Wedaman KP, O'Shea EK and Powers T (2000). Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J. Cell Biol.* 151:863–878.
- Kornitzer D, Raboy B, Kulka RG and Fink GR (1994) Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *EMBO J.* 13:6021–6030.
- Kulkarni A, Buford TD, Rai R and Cooper TG (2006) Differing responses of Gat1 and Gln3 phosphorylation and localization to rapamycin and methionine

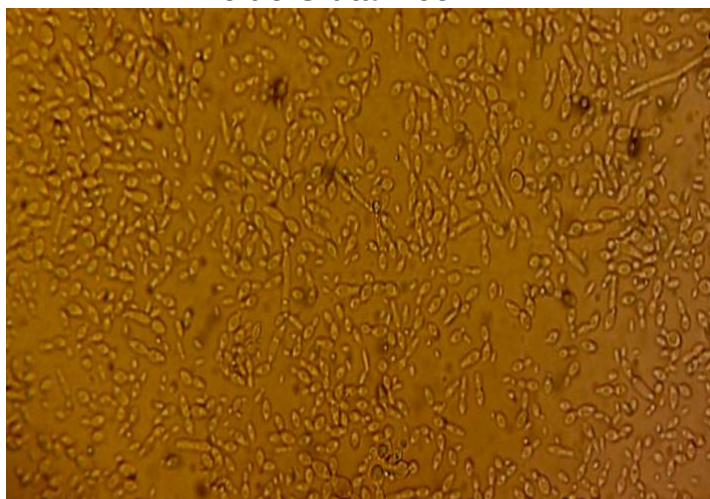
- sulfoximine treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6: 218–229.
- Lee K and Hahn J (2013). Interplay of Aro80 and GATA activators in regulation of genes for catabolism of aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 88(6), 1120–1134.
- Leite FCB, Basso TO, WdB P, Gombert AK, Simões DA and Morais MA (2013). Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Res.* 13(1):34–43. doi: 10.1111/1567-1364.12007.
- Liu W and Saint DA (2002). Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 347 – 353.
- Ljungdahl PO and Daignan-Fornier B (2012). Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene Expression & Metabolism. Genetics*, Vol. 190, 885–929.
- Loewith R, Jacinto E, Wulschleger S, Lorberg A and Crespo JL (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* 10:457–468.
- Lorenz MC and Heitman J (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 1236–1247.
- Loureiro, V and Malfeito-Ferreira M (2003). Yeasts in Spoilage. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd ed.). Caballero, B., Trugo, L. e Finglas, P. (eds.). pp 5530-5536.
- Magasanik B (1992). Regulation of nitrogen utilization, p. 238–317. *In* J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces—metabolism and gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Magasanik B and Kaiser CA (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290:1–18.
- Magasanik B and Kaiser CA (2003). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290: 1–18.
- Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S and André B (1997). A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4282–4293.
- Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A and André B (1994). Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 13: 3456–3463.
- Martín Y, González YV, Cabrera E, Rodríguez C and Siverio JM (2011). Npr1 Ser/Thr Protein Kinase Links Nitrogen Source Quality and Carbon Availability with the Yeast Nitrate Transporter (Ynt1) Levels. *The Journal of Biological Chemistry* VOL. 286, NO. 31, pp. 27225–27235.
- Marzluf GA (1997). Genetic Regulation of Nitrogen Metabolism in the Fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* p. 17–32. Vol. 61, No. 1, 2002.
- Navarro FJ, Martín Y and Siverio JM (2008). Phosphorylation of the Yeast Nitrate Transporter Ynt1 Is Essential for Delivery to the Plasma Membrane during Nitrogen Limitation. *The Journal of Biological Chemistry* VOL. 283, NO. 45, pp. 31208–31217.
- Pannetier C, Dellasus S, Darche S, Saucier C and Kourilsky P (1993). Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res.* 21:577 – 583.

- Parente DC, Vidal EE, Leite FCB, de Barros Pita W and de Morais Jr MA (2014). Production of sensory compounds by means of the yeast *Dekkera bruxellensis* in different nitrogen sources with the prospect of producing cachaça. *Yeast* 10.1002/yea.3051.
- Passoth V, Blomqvist J and Schnürer J (2007). *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Appl Environ Microbiol.* 73:4354–4356.
- Pereira LF, Bassi AP, Avansini SH, Neto AG, Brasileiro BT, Ceccato-Antonini SR and de Morais MA JR (2012). The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Interdepartmental Research Group in Metabolic Engineering, Federal University of Pernambuco, Recife, PE*, 101(3):529-39.
- Pérez MD, González C, Ávila J, Brito N and Siverio JM (1997). The YNT1 gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes YNI1 and YNR1 encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. *Biochem. J.* 321, 397±403.
- Piškur J, Ling Z, Marcet-Houben M, Marcet-Houben M, Ishchuk OP, Aerts A, LaButti K, Copeland A, Lindquist E, Barry K, Compagno C, Bisson L, Grigoriev IV, Gabaldón T and Phister T (2012). The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *Int J Food Microbiol.* 157:202–209.
- Puria R and Cardenas ME (2008). Rapamycin bypasses vesiclemediated signaling events to activate Gln3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Commun. Integr. Biol.* 1: 23–25.
- Qiu H, Dong J, Hu C, Francklyn CS and Hinnebusch AG (2001). The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation. *EMBO J.* 20: 1425–1438.
- Renouf V, Falcou M, Miot-sertier C, Perello MC, de Revel G and Lonvaud-Funel A (1999). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast 54 in *Biotechnology*. 17(12):482-487.
- Rozpędowska E, Hellborg L, Ishchuk OP, Orhan F, Galafassi S, Merico A, Woolfit M, Compagno C and Piskur J (2011). Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Department of Biology, Lund University*.
- Scheffe JH, Lehman KE, Buschmann IR, Unger T and Funke-Kaiser H (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. *Journal of molecular medicine.* Nov; 84(11):901-10.
- Schreve JL, Sin JK and Garrett JM (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* YCC5 (YCL025c) gene encodes an amino acid permease, Agp1, which transports asparagine and glutamine. *J. Bacteriol.* 180: 2556–2559.
- Shamji AF, Kuruvilla FG and Schreiber SL (2000). Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Curr. Biol.* 10:1574–1581.

- Shemer R, Meimoun A, Holtzman T and Kornitzer D (2002). Regulation of the transcription factor Gcn4 by Pho85 cyclin PCL5. *Mol. Cell. Biol.* 22: 5395–5404.
- Siverio JM (2002). Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 26, p. 277-284.
- Stanbrough M, Rowen DW and Magasanik B (1995). Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogenregulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9450-9454.
- Streckfuss-Bomeke, K, Schulze F, Herzog B, Scholz E and Braus GH (2009). Degradation of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor Gcn4 requires a C-terminal nuclear localization signal in the cyclin Pcl5. *Eukaryot. Cell* 8: 496–510.
- Tate JJ, Rai R and Cooper TG (2014). Nitrogen Starvation and TorC1 Inhibition Differentially Affect Nuclear Localization of the Gln3 and Gat1 Transcription Factors Through the Rare Glutamine tRNACUG in *S. cerevisiae*. *Genetics*: Early Online 0.1534/genetics.114.173831.
- van Zeebroeck G, Bonini BM, Versele M and Thevelein JM (2009). Transport and signaling via the amino acid binding site of the yeast Gap1 amino acid transceptor. *Nat. Chem. Biol.* 5: 45–52.
- VanGuilder HD, Vrana KE and Freeman WN (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44:619 – 626.
- Wek RC, Jackson BM and Hinnebusch AG (1989) Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl-tRNA synthetases in GCN2 protein suggests a mechanism for coupling GCN4 expression to amino acid availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4579–4583.
- Wilhelm J and Pingoud A (2003). Real-time polymerase chain rection. *Chembiochem* 4:1120 – 1128.
- Woolfit M, Rozpedowska E, Piskur J and Wolfe KH (2007). Genome Survey Sequencing of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. *Eukaryotic Cell*, Vol. 6, No. 4, p. 721–733.
- Yan G, Shen X and Jiang Y (2006). Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *EMBO J.* 25, 3546-3555.
- Zaborske JM, Narasimhan J, Jiang L, Wek SA and Dittmar KA (2009). Genome-wide analysis of tRNA charging and activation of the eIF2 kinase Gcn2p. *J. Biol. Chem.* 284: 25254–25267.
- Zaborske JM, Narasimhan J, Jiang L, Wek SA and Dittmar KA (2009). Genome-wide analysis of tRNA charging and activationof the eIF2 kinase Gcn2p. *J. Biol. Chem.* 284: 25254–25267.
- Zaborske JM, Wu X, Wek RC and Pan T (2010). Selective control of amino acid metabolism by the GCN2 eIF2 kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochem.* 11: 29.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J and Vitzthum F (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBER Green its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32:e103.

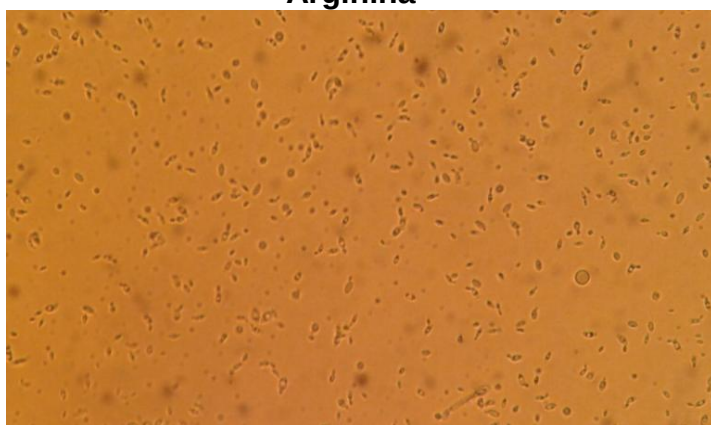
9. Anexos

Ácido Glutâmico



Crescimento de *Dekkera bruxellensis* em meio mínimo, 20g de glicose por litro e Ácido Glutâmico e Arginina como fonte de nitrogênio.

Arginina



Cisteína**Triptofano**

Crescimento de *Dekkera bruxellensis* em meio mínimo, 20g de glicose por litro, Cisteína e Triptofano como fonte de nitrogênio. É possível observar a formação de pseudohifas nos dois crescimentos.