

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
TESE DE DOUTORADO**

**IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES DE  
RESISTÊNCIA AO POLIHEXAMETILENO BIGUANIDA NA  
LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**CAROLINA ELSZTEIN**

**VIRTUS IMPAVIDA**

**RECIFE  
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES  
DE RESISTÊNCIA AO POLHEXAMETILENO BIGUANIDA  
NA LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**CAROLINA ELSZTEIN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do grau de doutor em Genética pela UFPE

**Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior**

**RECIFE  
2010**

**Elsztein, Carolina**

**Identificação dos mecanismos moleculares de resistência ao polhexametileno biguanida na levedura *Saccharomyces cerevisiae*/ Carolina Elsztein. – Recife: O Autor, 2011.**

**85 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Marcos Antonio de Morais Junior**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2011.**

**Inclui bibliografia e anexos**

**1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Genética de microorganismos 3. Fermentação I. Título.**

**579.563**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2011-239**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**Parecer da comissão examinadora da tese de:  
Carolina Elsztein  
intitulada:**

**Identificação dos mecanismos moleculares de resistência ao polihexametileno  
biguanida na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.**

**A comissão examinadora considera o presente trabalho**

**1º Examinador: Prof<sup>o</sup> Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior  
Departamento de Genética - UFPE**

**2º Examinador: Prof Dr Osvaldo Pompílio de Melo Neto  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ**

**3º Examinador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tercílio Calsa Junior  
Departamento de Genética - UFPE**

**4º Examinador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Monica Monteiro Lomeli  
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ**

**5º Examinador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Thalles Barbosa Grangeiro  
Departamento de Biologia - UFC**

**Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior  
Departamento de Genética - UFPE**

**Coordenador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Valdir de Queiroz Balbino  
Departamento de Genética -UFPE**

## **Agradecimentos**

A meu orientador, o Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior, por seu entusiasmo inquebrantável, por sua dedicação ao laboratório e aos nossos trabalhos, por tudo o que tenho aprendido com ele, por me dar uma segunda oportunidade, por levar com humor a difícil tarefa de me agüentar, pela confiança e a vontade de seguir trabalhando comigo.

A meus queridos amigos Meiriana e Neto que levo no coração, por tudo o carinho, amizade e lealdade.

A meus colegas de laboratório, por seus conselhos e companheirismo, Fernanda, Will, Teresa, Brígida, Rodrigo, André, Billy, Giordani, Luciana, Raquel, Rute, Carolina e Filipe.

A meus professores Dr. Maurício, Dra Ana Benko, Dra Rosilda, Dra María José, Dra Neide, Dr Paulo Andrade e Dr. Kido.

A Dona Zezé e Dona Helena, por seu carinho e por sempre estarem dispostas a nos ajudar.

A Janeth e Alejandra, por tantas horas compartilhadas nas alegrias e nas tristezas.

A Margarita e José, minha família que entendeu minha decisão apesar da saudade.

A Rodrigo, porque mis dias son mucho mas hermosos.

## Sumário

<b>1. Revisão da Literatura.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. O processo de fermentação alcoólica na indústria.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Leveduras do processo fermentativo.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. O cloridrato de polihexametileno biguanida (PHMB) como antifúngico.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. O fator de transcrição YAP1 e o mecanismo de resposta a estresse oxidativo.</b>	<b>11</b>
<b>1.5. A parede celular.....</b>	<b>14</b>
<b>1.6. Manutenção da integridade da parede celular (CWI) e a via de resposta a alta osmolaridade.....</b>	<b>18</b>
<b>1.7. Considerações.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Linhagens, meio de cultura e antifúngico.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Determinação de susceptibilidade celular ao antifúngico.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3. Testes de citotoxicidade .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4. Determinação quantitativa de grupos sulfeto livres. Método do DTNB.....</b>	<b>28</b>
<b>3.5. Análise da expressão gênica .....</b>	<b>29</b>
3.5.1. Tratamentos.....	29
3.5.2. Extração de RNA.....	29
3.5.3. Síntese de cDNA.....	30
3.5.4. RT-PCR quantitativa (RT-qPCR).....	30
<b>4. Resultados.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1. <i>S. cerevisiae</i> é mais resistente ao PHMB durante fase exponencial.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2. A resistência a PHMB é dependente de YAP1 e não estaria envolvida com resposta a estresse oxidativo .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3. Resistência de linhagens de <i>S. cerevisiae</i> a diferentes formas de estresse.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4. Expressão de genes relacionados com a integridade da parede celular nas</b>	

<b>linhagens industriais JP1 e PE-2.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5. YAP1 regula positivamente alguns genes envolvidos em CWI.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6. Genes pertencentes a CWI e HOG estão envolvidos com a resistência a PHMB.....</b>	<b>43</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>47</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>55</b>
<b>7. Bibliografia.....</b>	<b>56</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>68</b>
<b>9. Memorial.....</b>	<b>85</b>

**Lista de abreviaturas**

ASL	Ligação sensível a álcali
bZip	<i>Basic domain/leucine zipper</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
CWI	<i>Cell wall integrity</i> -Integridade da parede celular
CWP	Proteínas da parede celular
DPEC	Dietil pirocarbonato
DTNB	Ácido 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GHS	$\delta$ -L-glutamil-L-cistinilglicina
GLcNAc	N-acetil glicosaminas
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSSG	Glutathiona oxidada
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol Response</i> -Resposta à alta osmolaridade
MAPK	Proteína quinase ativada por mitose
MAPKK	MAPK quinase
MAPKKK	MAPK quinase quinase
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
PVC	Cloreto de polivinila
PHMB	Polihexametileno biguanida
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Revoluções por minuto
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> - RNA ribossômico
RT-qPCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> -PCR em tempo real
STRE	<i>Stress response element</i> - Elemento de resposta general a estresse
TCA	Ácido tricloroacético
T <sub>m</sub>	Temperatura de <i>melting</i> -Temperatura de desnaturamento
TR	Tioredoxina redutase
TRx	Tiorredoxina peroxidase
UFC	Unidades formadoras de colônias
$\delta$	Erro padrão

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Frequência da linhagem JP1 na população de leveduras. ....	<b>6</b>
<b>Figura 2</b>	Determinação do MIC para PHMB de células das linhagens PE-2 e JP-1.....	<b>6</b>
<b>Figura 3</b>	Estrutura molecular do Polihexametileno Biguanida (PHMB).....	<b>7</b>
<b>Figura 4</b>	Representação gráfica do mecanismo de ação do PHMB.....	<b>9</b>
<b>Figura 5</b>	Efeito do PHMB em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> apresentando mutações em genes que codificam proteínas regulatórias de efeito pleiotrópico.....	<b>11</b>
<b>Figura 6</b>	Os genes de levedura se encontram em associação simultânea com diversos fatores de transcrição.....	<b>13</b>
<b>Figura 7</b>	Arquitetura molecular da parede de leveduras.....	<b>15</b>
<b>Figura 8</b>	Análise de sensibilidade ao vermelho Congo.....	<b>18</b>
<b>Figura 9</b>	Vias de transdução de sinais que contém o módulo MAPK.....	<b>19</b>
<b>Figura 10</b>	A via de sinalização CWI.....	<b>20</b>
<b>Figura 11</b>	A via HOG.....	<b>23</b>
<b>Figura 12</b>	Ensaio de citotoxicidade do PHMB em leveduras.....	<b>33</b>
<b>Figura 13</b>	Concentração relativa de grupos tióis livres .....	<b>34</b>
<b>Figura 14</b>	Ensaio de sensibilidade de linhagens parentais e mutantes <i>S. cerevisiae</i> ao PHMB.....	<b>35</b>
<b>Figura 15</b>	Ensaio de sensibilidade celular ao PHMB de diferentes linhagens cultivadas até fase exponencial em YPD.....	<b>36</b>
<b>Figura 16</b>	Ensaio em placa da sensibilidade ao peróxido de hidrogênio das linhagens JP1, PE-2, BY4741 e o mutante <i>yap1</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 17</b>	Ensaio de sensibilidade celular em placa.....	<b>38</b>
<b>Figura 18</b>	Ensaio de sensibilidade ao Vermelho Congo.....	<b>39</b>
<b>Figura 19</b>	Perfil de expressão de genes envolvidos com a via de integridade da parede celular nas linhagens JP1 e PE-2 em resposta ao PHMB.....	<b>41</b>
<b>Figura 20</b>	Perfil de expressão de genes envolvidos com a via de integridade da parede em <i>S. cerevisiae</i> após incubação com PHMB.....	<b>42</b>

<b>Figura 21</b>	Perfil de expressão de genes envolvidos com a via de integridade da parede em <i>S. cerevisiae</i> após incubação a 42°C por uma hora.....	<b>44</b>
<b>Figura 22</b>	Ensaio de sensibilidade em placa dos mutantes da via CWI e HOG.....	<b>45</b>
<b>Figura 23</b>	Ensaio de citotoxicidade do PHMB nos mutantes da via CWI.....	<b>46</b>
<b>Figura 24</b>	Modelo de resposta biológica de <i>S. cerevisiae</i> ao PHMB .....	<b>54</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Linhagens haplóides utilizadas.....	<b>27</b>
<b>Tabela 2</b>	Sensibilidade de linhagens com deleções em genes envolvidos com a resposta a estresse oxidativo em <i>S. cerevisiae</i> .....	<b>36</b>
<b>Tabela 3</b>	Genes de <i>S. cerevisiae</i> testados para a expressão na presença de PHMB.....	<b>40</b>
<b>Tabela 4</b>	Genes envolvidos na manutenção e na integridade do envelope celular cujos mutantes foram testados para a sensibilidade ao PHMB.....	<b>44</b>

## Resumo

Quando submetidas a condições de estresse as células respondem a partir da indução de genes e ativação de proteínas em mecanismos regulados por cascatas de eventos metabólicos. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* muitos desses sinais externos são recebidos e amplificados por vias das chamadas MAP quinases. Em estudos anteriores mostramos a eficácia do biocida catiônico polihexametileno biguanida (PHMB) no combate a leveduras que contaminam o processo de fermentação alcoólica industrial. Entretanto, foi observado que certas linhagens de *S. cerevisiae* são sensíveis a esse biocida. Portanto, para que se possa propor o uso deste composto no controle de contaminações industriais é necessário que conheçam os mecanismos moleculares envolvidos na resposta à ação biológica do PHMB e dos mecanismos de resistência celular a este composto. Trabalhos da literatura mostraram que células de *E. coli* respondem a este composto a partir da expressão de genes envolvidos na manutenção da integridade da parede celular (CWI). A partir da identificação desses homólogos em *Saccharomyces cerevisiae* realizamos uma série de experimentos de análise da expressão gênica e da avaliação de linhagens mutantes dessa levedura. Os experimentos mostraram que a cascata regulatória da via da proteína quinase C (PKC) regula a expressão dos genes do mecanismo CWI que respondem às lesões na parede celular induzidas pelo PHMB, causando um estresse osmótico que é sentido e restaurado pelos genes da via HOG. O efeito protetor da trealose, a geração de desequilíbrio redox e a natureza do efeito tóxico sugerem que PHMB dispara o mesmo sinal molecular que é sentido pelas células quando submetidas a estresse etanólico. Além disso, a proteína Yap1, principal regulador da transcrição dos genes de resposta a estresse oxidativo, parece ser crucial para a resistência ao PHMB, embora neste caso a função desse fator de transcrição estaria relacionada com um efeito protetor sobre a parede celular. Com isso, estamos propondo uma nova função biológica para a proteína Yap1 na resposta a estresse industrial em *Saccharomyces cerevisiae*

**Palavras chave:** expressão gênica, MAP quinase, parede celular, PHMB, *Saccharomyces cerevisiae*, YAP1

**Abstract**

Stressing conditions induce cascades of events that terminate with a cellular response based on genomic expression. On the yeast *Saccharomyces cerevisiae* many of these external inputs are mediated by the MAP kinases pathways, which have been extensively studied. Polyhexametil bisguanide (PHMB), a cationic biocide that acts perturbing the cell envelope, was recognized as possessing superior antimicrobial effect to anyone. Global gene expression analysis revealed that exposure of *E. coli* cells to PHMB induced the expression of genes involved in cell wall maintenance. On this work, we investigate genes in *Saccharomyces cerevisiae* involved on the resistance to PHMB. The level of gene expression of some genes involved on maintenance of cell wall integrity (CWI) and further assays with mutants revealed that the toxic effect of PHMB is a combination of osmotic stress (HOG pathway) and cell wall stress. Is noteworthy that genes related with tolerance at ethanol stress, results of protective effect of trehalose and generation of redox imbalance, and the nature of the toxic effect suggest that PHMB and ethanol activate the same pathways to resist both compounds. Finally, the major regulator of oxidative stress YAP1 seems to be crucial on the PHMB resistance, although in the case seems that the function of this transcriptional factor is related with a protective effect on the cell wall.

**Words key:** gene expression, MAP Kinase, cell wall, PHMB, *Saccharomyces cerevisiae*, YAP1

## Introdução

No processo de produção de álcool combustível no Brasil, o caldo de cana cru ou o melão são fermentadas pelas células de *Saccharomyces cerevisiae* ao longo de toda a safra.. No Brasil, a linhagem mais comercializada para a produção de álcool combustível é a PE-2, isolada da Usina da Pedra, São Paulo, descrita como alta produtora de etanol, resistente à temperatura e dominante nos processos que utilizam melão como substrato. Outras linhagens têm sido isoladas em outras partes do país, como é o caso da linhagem JP1, isolado na destilaria Japungu, Paraíba. Contaminações por leveduras nativas de baixa capacidade fermentativa ocorrem com muita frequência, trazendo elevados prejuízos por provocarem expressivas quedas de rendimento na produção de álcool e atrasos no cronograma de moagem. O laboratório de Genética de Microorganismos do Departamento de Genética da UFPE tem identificado a espécie *Dekkera bruxellensis* como a levedura nativa que provoca os eventos mais severos de contaminação. Também analisou o efeito biocida do polihexametileno biguanida (PHMB) com o objetivo de encontrar um antifúngico que atue de forma seletiva sobre as leveduras contaminantes. O PHMB é um agente antibacteriano de amplo espectro que tem sido usado por muitos anos como um anti-séptico. Em trabalhos recentes, nosso grupo verificou que a linhagem comercial *Saccharomyces cerevisiae* JP1 é muito mais resistente do que *Dekkera bruxellensis* e que esta resistência é dependente de Yap1p, um fator de transcrição envolvido com a manutenção da parede celular. A ação letal envolve interações com a membrana citoplasmática, e o envelope celular não produz proteção completa, mas atua razoavelmente como barreira de exclusão. A porosidade relativa, a espessura e a composição de glucanos da parede celular de *S. cerevisiae* determinam a sensibilidade frente à Clorhexidina, uma biguanida com estrutura e efeitos similares ao PHMB. Este trabalho determina quais são os genes e as vias de sinalização que disparam a resposta ao PHMB, relacionando-a com outros tipos de estresses; e analisa as possíveis mudanças fisiológicas com o objetivo de aportar um melhor entendimento das cascatas de sinalização e das causas das diferentes resistências observadas nas leveduras industriais. Os dados gerados neste trabalho forneceram informação para desenvolver possibilidades de uso de fungicidas no contexto industrial do processo fermentativo.

## 1. Revisão da Literatura

### 1.1 O processo de fermentação alcoólica na indústria

A transformação da matéria-prima em álcool é efetuada por microrganismos, usualmente leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, por meio da fermentação alcoólica. Para que a fermentação tenha sucesso, dentro de especificações técnicas, é muito importante que se misture ao mosto uma quantidade de leveduras capaz de converter os açúcares em álcool e gás carbônico, dentro de determinadas condições. Este conjunto de microrganismos recebe o nome de pé-de-cuba ou simplesmente fermento (<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>)

A atividade fermentativa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada em processos para produção de bebidas fermentadas (vinhos, cerveja, uísque, rum, etc.), bioetanol e pão. O processo de fermentação no Brasil usa leveduras em muito alta concentração que fermentam caldo de cana de açúcar ou melaço em processo semi-contínuo de alimentação chamado batelada. O melaço ou caldo contem entre 150 e 200 gramas de açúcar, que as leveduras transformam em 9 a 12 % de etanol com um alto rendimento em torno de 90 a 92% da quantidade máxima estimada e produtividade de 6 a 10 horas por cada ciclo de fermentação, permitindo duas a três fermentações por dia (Andrietta e col, 2007).

Especialmente na fermentação para produção de bioetanol, as células de leveduras são utilizadas até três vezes por dia, em um período de aproximadamente 200 dias de atividade fermentativa. Após cada batelada de fermentação ou durante o processo de fermentação contínua, as células são separadas de meio fermentado por centrifugação (processo Melle-Boinot) ou decantação e reutilizadas no processo. No processo de Melle-Boinot, o vinho é bombeado da dorna para a centrífuga separadora assim que os açúcares do mosto em fermentação se esgotam, separando desta forma as leveduras (leite), do vinho delevedurado (<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>).

A velocidade de fermentação é determinada pela quantidade de açúcar fermentado por uma quantidade de leveduras durante certo tempo. O ganho em produtividade por meio de fermentações rápidas aumenta a produção diária e reduz, conseqüentemente, o custo de produção e o risco de contaminação por microrganismos prejudiciais. O rendimento, quantificado como a

relação entre açúcar consumido e álcool produzido, deve ser elevado, sendo essa condição essencial para uma levedura industrial (<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>).

As fermentações industriais de álcool combustível utilizam substratos não esterilizados, o que tem como consequência problemas com relação à presença de microorganismos contaminantes indesejáveis. O constante monitoramento da população microbiana do processo constitui um elemento importante na obtenção de bons rendimentos industriais. A falta de esterilidade do processo, aliada aos constantes ciclos, favorece o aparecimento de espécies de leveduras nativas de diferentes espécies que possuem capacidade fermentativa menor do que *S. cerevisiae* (Araújo e col, 2005; Basílio e col, 2008; Silva-Filho e col, 2005 a,b). Estas contaminações podem trazer prejuízos econômicos significativos diretos (desvio de açúcar para a produção indesejável de biomassa) e indiretos (retardo no tempo da fermentação e atrasos no cronograma de moagem).

## 1.2 Leveduras do processo fermentativo

A produção global de etanol no ano 2006 foi de 40 bilhões de litros. 90% do total foram produzidos pelo Brasil e Estados Unidos, sendo Brasil considerado o país mais competitivo e com a mais longa história dentre os países produtores de etanol (<http://econ.worldbank.org>).

No ano 2008, foram gerados 17.335,2 milhões de galões no mundo, dos quais 6472,2 foram produzidos no Brasil, colocando-se dessa forma no segundo maior produtor de etanol nesse ano (<http://www.ethanolrfa.org>).

O processo completo de fermentação alcoólica é baseado na atividade fermentativa de células *Saccharomyces cerevisiae* sobre o melaço de cana de açúcar ou mosto. As linhagens industriais de *S. cerevisiae* são organismos altamente especializados que tem evoluído para utilizar todo seu potencial fermentativo, este processo de seleção é denominado domesticação e envolve várias características genéticas especiais (Basílio e col 2008). Estudos de dinâmica microbiológica em fermentadores industriais revelaram uma rápida sucessão de linhagens de leveduras durante fermentações de álcool combustível, e em consequência a levedura original usada como “*starter*” (usualmente linhagens comerciais usadas para iniciar o processo fermentativo industrial) é completamente substituída por outras em poucas semanas (Silva-Filho e col, 2005 b, Basso e col, 2008).

Estados de diploidia, aneuploidia e poliploidia podem conferir vantagens para adaptaçao àqueles ambientes variáveis, bem como o aumento na dosagem de alguns genes importantes para a fermentação (Querol e col, 2003). Existe varias evidencias de que CNVs (variações em número de cópias) e amplificações de genes específicos são formas importantes de conferir variabilidade genômica que permite a adaptaçao a pressões seletivas de mudançãs no ambiente e em novos nichos ecológicos (Hastings, 2009). *S.cerevisiae* passou por varias passos de duplicações evolutivas, duplicando seu genoma completo originalmente há 100 milhões de anos aproximadamente, num antecessor pertencente ao complexo *Saccharomyces sensu strictu*, gerando uma linhagem fermentativa eficiente (Conant e Wolfe 2007; Merico e col. 2007). Seguidamente, houve uma ronda de amplificações localizadas, incluindo regiões contendo genes específicos que permitiriam uma fermentação bem sucedida de açúcares derivados de frutas, num evento evolutivo que aconteceu provavelmente 80 milhões de anos, quando aparecem os primeiros frutos carnosos (Thomson e col. 2005). Tem sido observadas variações no numero de copias de genes importantes, re-arranjos cromossômicos tais como traslocações intra e inter cromossomais, mudançãs no numero de cromossomos específicos ou ao nível de ploidias tanto em isolados naturais de *S. cerevisiae*, (Dunn e col. 2005; Carreto e col. 2008), como em condições de laboratório controladas (Brown e col. 1998; Dunham e col. 2002; Kao e Sherlock 2008). Stambuk e col (2009) determinaram a variaçao no numero de copias de genes (CNVs) de 5 leveduras comerciais comumente usadas na indústria de álcool no Brasil: BG-1, C AT-1, PE-2, SA-1, e VR-1 por micro-arranjos baseados na hibridizaçao comparativa de genomas. A análise revelou que os genomas apresentam uma amplificaçao significativa nos pares de genes teloméricos *SNO2/SNZ* e *SNO3/SNZ3*, ambos envolvidos sequencialmente na síntese de duas vitaminas importantes para leveduras: piridoxina (vitamina B6) e tiamina (vitamina B1), indicando que o entorno de fermentaçao industrial impõe uma alta demanda por estes co-fatores. As leveduras industriais produtoras de etanol que carregam amplificações dos genes telomericos *SNO/SNZ* foram testadas em meios com alta concentraçao de açúcares e concentraçoes variaveis de conteudo de vitaminas. Estas leveduras apresentam uma clara vantagem competitiva durante a fermentaçao e quando sao re-utilizadas em varias fermentaçoes sucesivas. Lucena e col (2007) identificaram re-arranjos na linhagem comercial JP1, usando como amostras 3 isolados coletados em diferentes etapas do processo fermentativo. Ocorre uma enorme variaçao nos perfis cromossômicos da populaçao em relaçao a número e tamanho de cromossomos a

medida que as gerações celulares se sucedem. O polimorfismo afeta principalmente a cromossomos de tamanho medio e pequeno. Outra caracterisitica detectada foi a presença de um jogo de cromossomos a mas comparado com as linhagens de laboratório. Estes cromossomos adicionais geram eventos de recombinação desiguais.

No Brasil, a linhagem mais comercializada para a produção de álcool combustível é a PE-2, isolada da Usina da Pedra, São Paulo. Esta linhagem é descrita como alta produtora de etanol, resistente à temperatura e dominante nos processos que utilizam melação como substrato. PE-2 é utilizada na maioria das indústrias do sudeste do Brasil, porém, não esta adaptada às condições do nordeste (Silva Filho e col, 2005a).

A linhagem comercial JP1, isolada na destilaria Japungu, Paraíba, apresenta alta dominância em processos que utilizam caldo de cana como substrato e tolerância a estresse semelhante à linhagem PE-2 (Silva-Filho e col, 2005b). Todavia, JP1 resulta mais resistente quando é submetida a baixo pH combinado com alta temperatura. Esta característica é especialmente importante nas zonas de mais altas temperaturas como o nordeste do Brasil e America Central. Outra grande vantagem desta linhagem é sua alta eficiência de transformação com plasmídeos episomais e DNA integrativo com relação a outras linhagens comerciais, o que confere possibilidade de manipular, entre outras vias, a rota de assimilação de nitrogênio para incrementar a produção de etanol e reduzir a formação de glicerol (Silva-Filho e col 2005b). Como as diferentes linhagens parecem apresentar características industriais complementares, e levando em consideração as diferenças nos processos industriais, a percepção atual é o do uso de um coquetel de linhagens no início da safra para assegurar bom desempenho no processo (Silva-Filho e col, 2005b).

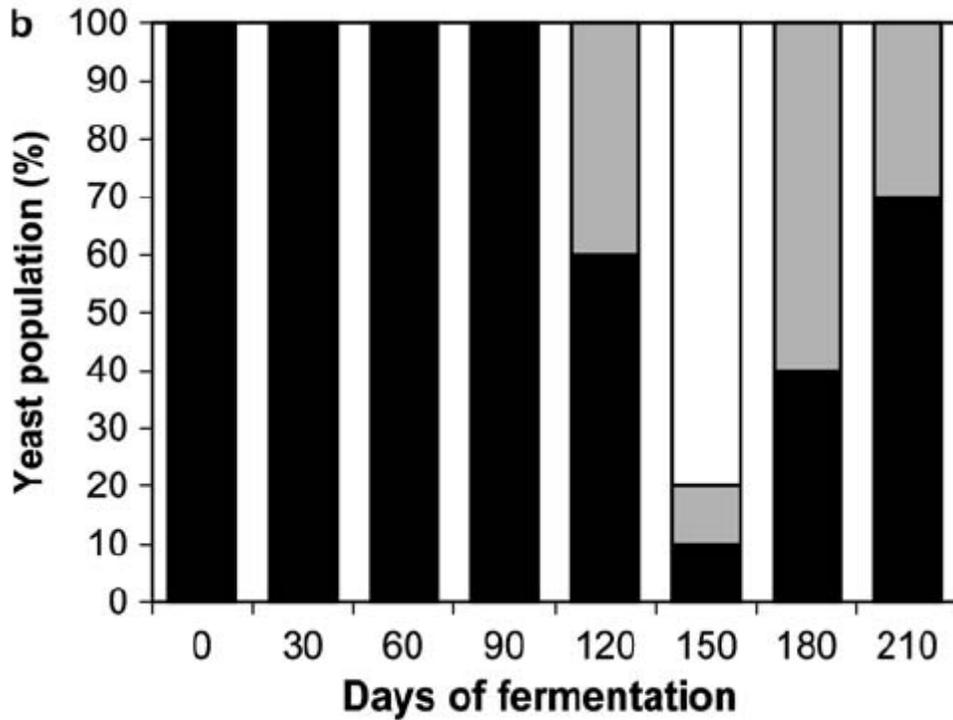
Recentemente, Basílio e col. (2008) descreveram a constituição das espécies de levedura que podem ser encontradas no processo fermentativo industrial a partir do uso de técnicas de análise de DNA baseados na amplificação por PCR com iniciador único (GTG)<sub>5</sub> e no seqüenciamento dos domínios D1/D2 do locus rDNA-26S. Dentre as identificadas se encontram *Dekkera bruxellensis*, *Pichia anomala*, *P. caribbica*, *P. fermentans*, *P. galeiformis*, *P. guilliermondii*, *P. fabianii*, *P. ohmeri*, *Candida intermédia*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. pararugosa*, *C. parapsilosi*, *C. xylopsoci*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygoascus ellenicus*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Issatchenkia orientalis* e *Exophiala dermatitides*. As espécies *D. bruxellensis*, *P. galeiformes* e *C. tropicalis* estiveram

envolvidas nos episódios mas severos de contaminação, atingindo um 30% da população de leveduras nos tanques de fermentação (Basílio e col, 2008). Dentre essas, a espécie *D. bruxellensis* foi identificada como a levedura contaminante mais importante em destilarias fermentadoras de cana de açúcar do Brasil (De Souza Liberal e col, 2007), como já havia sido relatado em processos fermentativos no Canada e Estados Unidos (Abbott e col, 2005). Silva-Filho e col (2005,a) analisaram a dinâmica populacional de duas destilarias do Nordeste que utilizam a levedura JP1 como “*starter*” durante o período de safra 2002-2003 e 2003-2004. JP1 mostrou-se a levedura dominante no processo tanto na destilaria Miriri como Japungu, mesmo ocorrendo eventos severos de contaminação, recuperando sua dominância ao longo do processo (Figura 1). O crescimento de células de *D. bruxellensis* é muito mais lento do que o de *S. cerevisiae* quando cultivadas em meio de laboratório com nutrientes em excesso, seja em condições aeróbicas ou anaeróbicas. Contrariamente, os dados de dinâmica populacional mostram que *D. bruxellensis* pode crescer muito mais rápido que *S. cerevisiae* em condições industriais, embora ambas cresçam em velocidades muito pequenas nessas condições. Essa maior velocidade de crescimento que apresenta *D. bruxellensis* no ambiente industrial poderia estar relacionada com fatores nutricionais (maior afinidade pelo substrato) ou uma maior tolerância a algum composto inibidor presente no substrato de fermentação (de Souza Liberal e col, 2007). Atualmente não se conhecem fungicidas que possam atuar de forma seletiva sobre as leveduras indesejáveis, nem procedimentos rápidos e eficientes para resolver este tipo de contaminação.

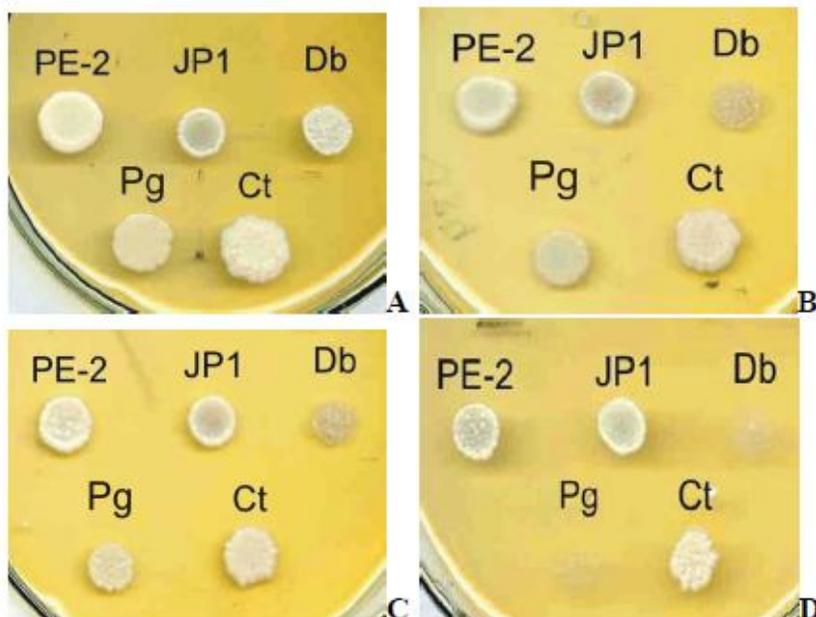
### **1.3 O Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB) como antifúngico.**

Para evitar a contaminação por leveduras, o processo fermentativo poderia se valer do uso de antifúngicos que combateriam seletivamente as linhagens selvagens. Se as linhagens industriais e contaminantes apresentarem sensibilidades diferenciais frente ao biocida, poder-se-ia desenvolver o uso industrial de compostos que inibam com maior intensidade as linhagens indesejáveis. Recentemente, analisamos o efeito biocida de vários compostos em linhagens industriais de *S. cerevisiae* e em espécies contaminantes mais frequentes do processo fermentativo. Dentre esses, o composto cloridrato de polihexametileno biguanida (PHMB), um biocida catiônico, apresentou um intenso efeito inibitório sobre *D. bruxellensis* mesmo em concentrações tão baixas como

0.0002%, enquanto *S. cerevisiae* JP1 não foi afetada pelo composto nesta concentração (Figura 2, Elsztein e col, 2008).

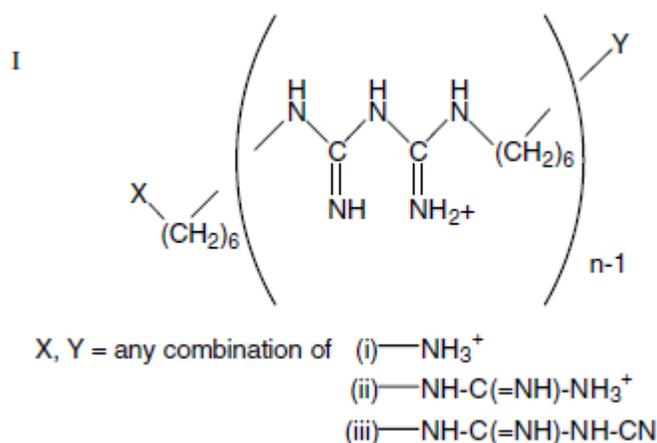


**Figura 1:** Freqüência da linhagem JP1 na população de leveduras durante o processo fermentativo do período de safra 2002-2003 na destilaria Miriri. Colunas pretas: *Saccharomyces cerevisiae* JP1, colunas cinza: outras *Saccharomyces cerevisiae*, colunas brancas: espécies não *Saccharomyces cerevisiae* (Silva Filho e col, 2005 a).



**Figura 2:** Determinação do MIC para PHMB de células das linhagens PE-2 e JP-1 de *S. cerevisiae* e para as leveduras *D. bruxellensis* (Db), *P. galeiformes* (Pg) e *C. tropicalis* (Ct) semeadas em placas contendo o antibiótico nas concentrações de 0% (painel A), 0,0002% (painel B), 0,0008% (painel C) e 0,0016% (painel D) (Elsztein, 2006).

PHMB é vendido como um agente antimicrobiano de amplo espectro e é utilizado em diversas aplicações: como um anti-séptico na indústria alimentícia e na clínica médica, para impregnar materiais (telas) com objetivo de inibir o crescimento microbiano, tratamento de água de piscinas, como desinfetante em sistemas de esfriamento por água (Kusnetsov e col. 1997), desinfecção de superfícies sólidas como lentes de contacto, anti-séptico bucal, preventivo de crescimento em materiais de cloreto de polivinila (PVC), e no tratamento de ovos para prevenir infecção por *Salmonella* (Van de Boscche, 2003). Também é utilizado tratamento contra fungos (Messick e col., 1999) e no tratamento da queratitite infectiva causada por *Acanthamoeba* sp. (Donoso e col., 2002; Narasimhan e col., 2002). As preparações comerciais são misturas de biguanidas poliméricas contendo de 2 a 40 monômeros de estrutura primária do tipo  $[-(\text{CH}_2)_6\text{NH.C(=NH).NH.C(=NH).NH-}]_n$  (Figura 1), com um tamanho médio de  $n=11$  e massa molecular entre 400 e 8000 Daltons. Esta estrutura possui varias combinações no grupo terminal que pode apresentar amidas ( $-\text{NH}_2$ ), guanidas  $[-\text{H.C(=NH).NH}_2]$  ou cianoguanidas  $[-\text{NH.C(=NH).NH.CN}]$  (White e col, 2006).

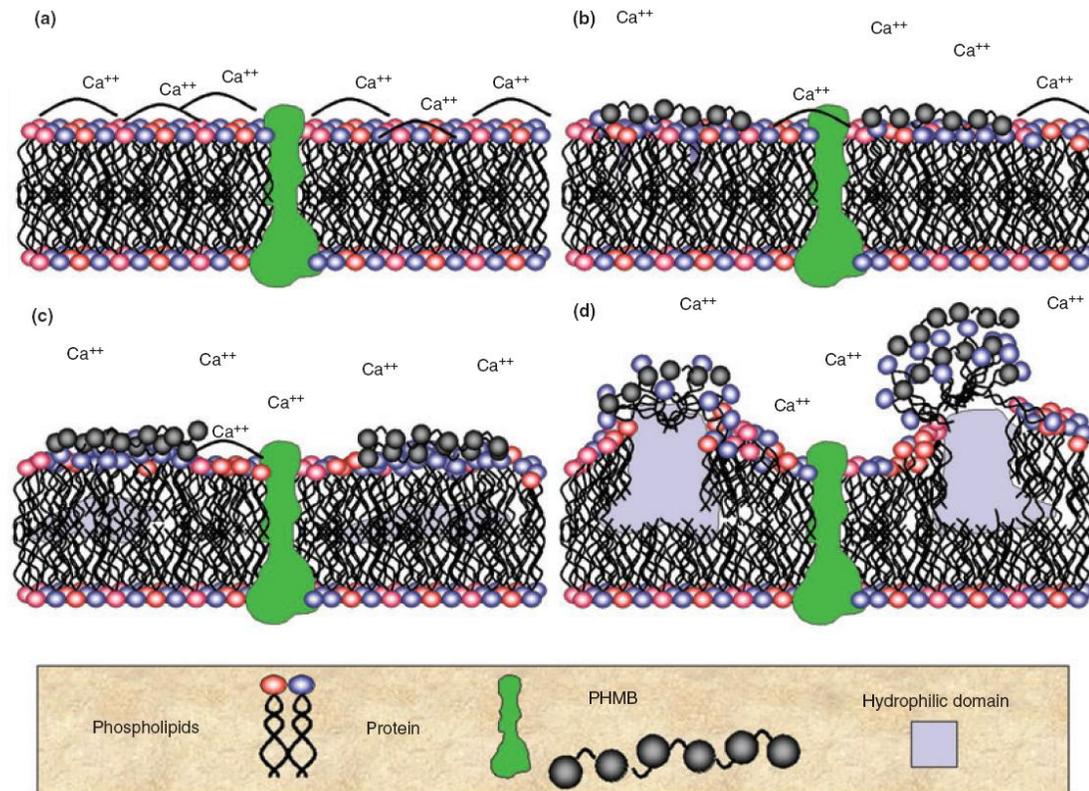


**Figura 3.** Estrutura molecular do polihexametileno biguanida (PHMB) e seus componentes. I: Polihexametileno biguanida (PHMB), indicando os grupos X e Y como uma possível combinação de (i), amidas; (ii), guanidas; (iii), cianoguanidas (White e col, 2006).

Os agentes antimicrobianos catiônicos têm sido usados ao longo de 40 anos. A necessidade de um antimicrobiano efetivo para ser utilizado na indústria de processamento de alimentos e hospitais tem sido altamente importante e extensivamente estudada. Seguindo esta linha, o grupo das biguanidas vem sendo estudado como um potencial e versátil antimicrobiano desde 1879. (Franzin, 2005). O Cloridrato de Polihexametileno Biguanida é utilizado em diversas aplicações antimicrobianas devido ao seu amplo espectro de atuação no controle de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, vírus, microrganismos resistentes a antibióticos, mesmo em condições adversas como presença de matéria orgânica e água dura. O amplo espectro de ação do PHMB aliado à sua boa estabilidade térmica, baixa formação de espuma, alta solubilidade em água, baixa volatilidade e corrosividade somados aos estudos de toxicidade em mamíferos e ao meio ambiente, caracterizam o PHMB como um antimicrobiano de última geração, seguro, eficiente e versátil para formulação de desinfetantes de uso industrial, institucional e doméstico tornando-o uma opção de melhor custo benefício aos tradicionais antimicrobianos (Franzin, 2005).

Santos e Fernandes (2010) compararam a eficiência do processo de sanitização de todos os equipamentos envolvidos na fabricação/transporte de mosto/cerveja, mediante utilização do Biguatin 400, composto que possui como princípio ativo o PHMB. Os resultados demonstram que o PHMB é muito mais eficiente e abrange um maior espectro que os princípios ativos convencionais na desinfecção dos sistemas *clean-in-place* (CIP) de indústrias cervejeiras (Santos e Fernandes, 2010).

As biguanidas são compostos relativamente hidrofóbicos mais interatuam inicialmente com a parede e a membrana substituindo cátions divalentes que estabilizam a bi-capa lipídica dos microorganismos tais como  $\text{Ca}^{+2}$  (Gilbert e Moore, 2005) (Figura 4). PHMB é bacteriostático a baixas concentrações, mas é bactericida em altas concentrações, e sua ação inibitória aumenta com o incremento do grau de polimerização (Broxton e col., 1984; Gilbert e col., 1990).



**Figura 4.** Representação gráfica do mecanismo de ação do PHMB na membrana plasmática bacteriana. O diagrama ilustra a interação progressiva do PHMB com os componentes ácidos da membrana levando a perda de fluidez e a separação de fases de lipídeos individuais. Os domínios produzidos pelos fosfolípidios e o PHMB conduzem à dissolução da estrutura fluida da membrana (Gilbert e Moore, 2005).

A ação letal envolve interações com a membrana citoplasmática, mais especificamente com lipídeos ácidos de membrana, causando a formação de agregados de fosfolípidios. Moléculas maiores produzem agregados maiores e conseqüentemente a desestabilização da membrana é maior (Broxton e col, 1984; Ikeda e col, 1984). A comparação dos efeitos de PHMB em células intactas e em esferoplastos demonstra que o envelope celular não produz proteção completa, mas atua razoavelmente como barreira de exclusão (Gilbert e col, 1990).

A remoção de lipopolissacarídeos da membrana externa incrementa significativamente a atividade biocida das frações de alto peso molecular de PHMB, porém as frações menores não mostram diferenças (Gilbert e col, 1990). A porosidade relativa das paredes celulares, a composição de glucanos e a espessura da parede celular de *S. cerevisiae* determinam a sensibilidade frente à

biguanida Clorohexidina (Hiom e col, 1996). Ensaios realizados com *Acanthamoeba castellanii* mostraram um incremento de grupos fosfato e cloro em trofozoitos e cistos tratados com PHMB. O incremento de cloro depois do tratamento indica entrada do biocida, e o aumento de fósforo se concentra nos fosfolipídios, parede celular e núcleo (Khunkitti e col, 1998), apoiando a teoria da interação do PHMB com fosfolipídios. O PHMB interage forte e cooperativamente com ácidos nucléicos *in vitro* e o estado estrutural do ácido nucléico afeta a natureza da interação (Allen e col., 2004). Vários genes associados com a membrana externa são induzidos quando *E.coli* é submetida a PHMB: Antígeno O, elementos Rhs, flagelos e fimbrias. OsmB é uma lipoproteína que responde a múltiplos estresses, osmoticamente induzível e é uma componente fundamental do sistema regulatório Independiente RscCDB. Este sistema é ativado por diferentes condições ambientais e produz uma alteração na composição ou topologia do envelope celular. Em concordância com a estrutura química e o alvo do PHMB, este sistema também é disparado por clorpromazina, que também é uma molécula anfipática catiônica que danifica a membrana bacteriana (Allen e col, 2006).

Recentemente o uso do PHMB foi proposto para combater os episódios de contaminação dos processos fermentativos causados pelas espécies *D. bruxellensis*, *P. galeiformes* e *C. tropicalis* (Figura 2, Elsztein e col, 2008). Quando se compara a atividade biocida nas duas linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* verifica-se que JP1 é mais resistente ao PHMB, enquanto que PE-2 apresenta praticamente a mesma sensibilidade que *D. bruxellensis*, e estas são mais resistentes do que *P. galeiformes* (Elsztein e col, 2008). Estas diferenças entre as linhagens fermentadoras deve limitar o uso do PHMB aquelas destilarias que utilizam JP1 como linhagem do processo. Com o objetivo de determinar quais são os mecanismos genéticos que estão envolvidos na resposta a estresse por PHMB, realizou-se uma triagem com alguns mutantes para identificar possíveis genes associados com a resistência ao composto. Estes testes revelaram que mutantes que carecem do gene *YAPI* são mais sensível frente ao biocida (Figura 5), sendo este gene chave para enfrentar os danos causados pelo PHMB (Elsztein, 2006). Esta constatação foi o ponto de partida para a realização do presente trabalho de tese.



**Figura 5** : Efeito do PHMB em linhagens de *S. cerevisiae* apresentando mutações em genes que codificam proteínas regulatórias de efeito pleiotrópico. Células da linhagem parental BY4741 (wt) e das linhagens mutantes  $\Delta pdr1$ ,  $\Delta pdr5$ ,  $\Delta pdr12$ ,  $\Delta atr1$  e  $\Delta YAP1$  foram semeadas em meio de cultura sem PHMB (0%) ou suplementado com 0,003% (m/v) de PHMB (Elsztein, 2006).

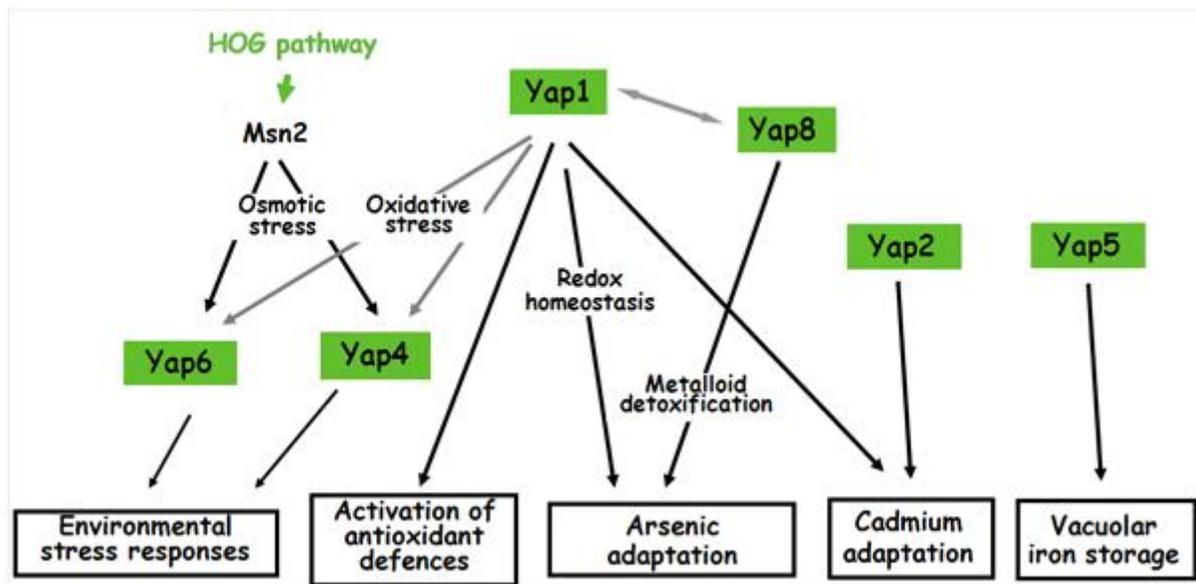
#### 1.4 O fator de transcrição *YAP1* e o mecanismo de resposta a estresse oxidativo.

As células estão continuamente expostas a espécies reativas de oxigênio (ROS) como consequência do crescimento aeróbico, e os organismos desde bactérias até humanos têm desenvolvido mecanismos para manter a homeostasia celular. Esta proteção limita o acúmulo de formas oxidantes derivadas de oxigênio, controlando o metabolismo de ferro e cobre, ativando rotas para balancear o estado redox e ativando as vias de reparação (Scandalios, 2005). Estes mecanismos envolvem resíduos de cisteína sensível ao estado redox que rapidamente traduzem os sinais de estresse a proteínas regulatórias. Esta transdução de sinais frequentemente envolve mudanças na conformação protéica devido à formação reversível de pontes dissulfeto (Herrero e col, 2008). As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos para proteger os constituintes celulares e manter os estado redox. As defesas não enzimáticas consistem em pequenas moléculas que atuam como quelantes e reduzem ROS neutralizando os oxidantes do entorno. O mais importante é a glutathione, o tripéptido  $\delta$ -L-glutamil-L-cistinilglicine (GHS). Esta molécula atua como quelante usando seu grupo sulfidrilo como grupo reativo redutor contra os oxidantes dando como resultado glutathione oxidada (GSSG). Os genes envolvidos na síntese desta molécula são *GHS1* e *GHS2* que codificam as enzimas  $\gamma$ -glutamilcisteine sintetase e glutathione sintetase, respectivamente. Outra molécula pequena importante é tiorredoxina, composto rico em sulfidrilos, codificado pelos genes *TRX1* e *TRX2*, que pode ser usado como cofator redutor pela tiorredoxina peroxidase (Tsa1p) e ribonucleotídeo peroxidase. Tsa1p reduz

peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e alquil-hidroperóxidos numa reação dependente de tiorredoxina redutase, NADPH e tiorredoxina (Jamieson, 1998).

O produto do gene *YAP1* é um fator de transcrição do tipo bZip (*basic domain/leucine zipper*) que atua na ativação da transcrição de um grupo de genes que respondem ao estresse oxidativo. Pertence a família YAP, que esta constituída por *YAP1*, *YAP2*, *YAP3*, *YAP4* (*CIN5*), *YAP5*, *YAP6*, *YAP7* e *YAP8* (Fernandes e col, 1997; Figura 6). *YAP1*, *YAP2*, *YAP4*, e *YAP5* não são essenciais, as linhagens com uma mutação simples o múltipla são viáveis, capazes de crescerem em alta temperatura, com meio carente de inositol, o contendo galactose, sacarose, rafinose, o glicerol com única fonte de carbono (Fernandes e col, 1997). A mutação de *yap4* produz aumento de instabilidade cromossômica e é a única linhagem que apresenta sensibilidade ao nocodazol e suprime a sensibilidade ao congelamento do mutante *yap1* (Fernandes e col, 1997). A sobre-expressão de *YAP4* e *YAP6* confere resistência às drogas cloriquina, quinina e mefloquina. Estudos de genoma tem revelado que *YAP4* e *YAP6* são induzidos sob vários tipos de estresses, incluindo oxidativo, osmótico, choque térmico e fase estacionaria. A regulação de *YAP4* sob condições de alta osmolaridade é mediada pelo fator de transcrição Msn2p por uma via dependente de Hog1p, que se une a dois sítios STRE (*Stress Responsive Elements*) no promotor. Sob estresse oxidativo, *YAP4* é co-regulada por Msn2p e Yap1p através dos sítios STRE e YRE respectivamente (Rodrigues-Posada e col, 2010; Figura 6)

A via regulatória mediada por Yap1p controla esta resposta adaptativa que é ativada por mecanismos que captam o estado redox intracelular não balanceado causado por espécies reativas de oxigênio e grupamentos tioles oxidados. O fator de transcrição Yap1p é regulado por proteínas que se encontram a montante na via dos mecanismos de proteção à ROS: Gpx3p (glutathione peroxidase), Ybp1p (proteína requerida para a oxidação e localização nuclear de *YAP1p*) Tsa1p (tiorredoxina peroxidase) (Tachibana e col, 2009). Este fator de transcrição é ativado por agentes como diamida, dietilmaleato, metil metano sulfonato, menadiona, benomil, cádmio, mercúrio, selênio, N-etilmaleimide, metilglioxal e radiação ionizante (Herrero e col, 2008).



**Figura 6:** Os genes de levedura se encontram em associação simultânea com diversos factores de transcrição. *YAP4* é regulado por Msn2p sob condições de estresse osmótico ou por Msn2p e Yap1p sob estresse oxidativo. As redes reguladoras da transcrição mostraram que o controle de vários processos celulares, tais como o ciclo celular, o estresse ambiental, desenvolvimento e metabolismo estão reguladas pela família YAP (<http://www.itqb.unl.pt>).

Yap1 se une especificamente a elementos de reconhecimento par Yap1 (YRE), porém têm sido identificados genes alvo que não contém os sítios YRE, indicando a existência de sítios de reconhecimento adicionais (Herrero e col, 2008).

O gene *YAP1* esta envolvido em outras respostas, porem não muito exploradas na literatura atual. A proteína Yap1 está envolvida na regulação da expressão de genes que apresentam motivos STRE (*Stress Responsive Elements*) em suas regiões promotoras, porém o fator de transcrição não se une diretamente à STRE, sugerindo que *YAP1* poderia ter um papel fundamental na regulação da expressão dos componentes da maquinaria de ativação de STRE (Gounalaki e Thireos, 1994). A proteína Yap1p é normalmente citoplasmática e migra para o núcleo em resposta a estresse oxidativo (Toone e Jonnes, 1998). Por outro lado, Bourdineaud e col (2000) mostraram que o fator de transcrição Yap1p teria alguma função na manutenção da parede celular. Yap1p regula a expressão do gene *SRP1* que codifica para uma manno-proteína de parede, que se encontra induzido por anaerobioses e necessária para a integridade da parede celular. Esta relação é apoiada no fato de que o mutante  $\Delta yap1$  apresenta fenótipo de

sensibilidade ao corante Vermelho Congo, agente que perturba a montagem das microfibras  $\beta$ -1,3-glucano.

### 1.5 A parede celular

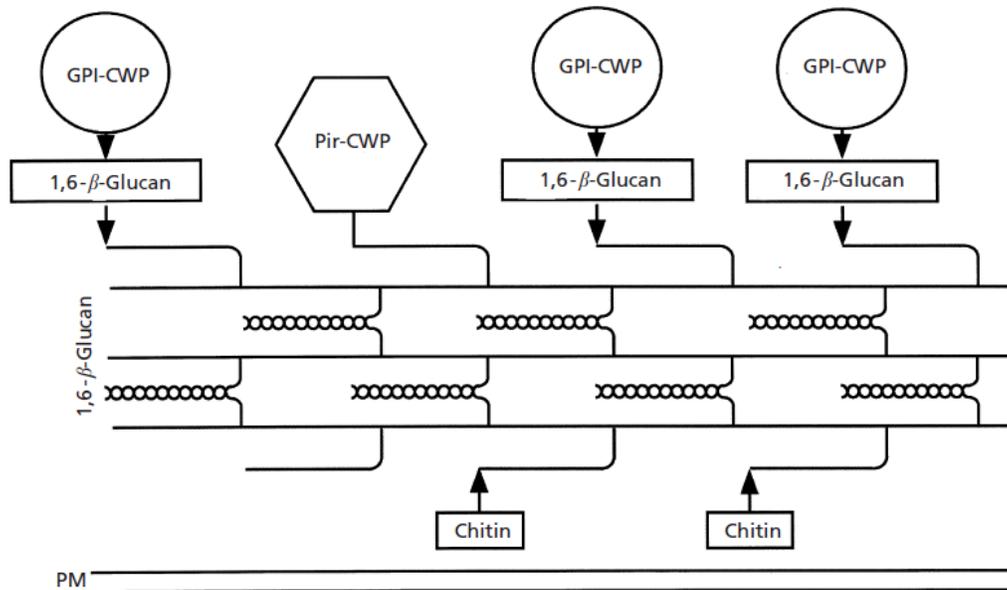
A parede celular representa cerca de 30% do peso seco das células de *S. cerevisiae* e é composta majoritariamente por polissacarídeos (85%) e proteínas (CWP, proteínas da parede celular) (15%). Glicose (80-90%), N-acetil glicosaminas (GLcNAc) (1-2%) e resíduos de manose (10-20%) representam o total de polissacarídeos. Os resíduos de glicose estão unidos mediante ligações do tipo  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 e são unidos a GLcNAc mediante ligações  $\beta$ -1,4. As manno-proteínas podem estar unidas a cadeias  $\beta$ -1,6-glicose através de um conector glicosilfosfatidilinositol (GPI) ou por meio de  $\beta$ -1,3-glucanos numa ligação sensível a álcali (Lesage e Bussey, 2006). A segunda classe de proteínas são as chamadas PIR (Proteínas com repetições internas): Pir1p, Pir2p (Hsp150p), Pir3p e Pir4p, que se unem diretamente a capa de  $\beta$ -1,3-glucanos (Levin, 2005). As cadeias de  $\beta$ -1,3-glucanos estão ramificadas por uniões  $\beta$ -1,6-glicose, formando fibras que servem de esqueleto para unir quitina,  $\beta$ -1,6-glucanos e manno-proteínas. Os  $\beta$ -1,6-glucanos e as manno-proteínas estão unidas pelos GPI (Lesage e Bussey, 2006; Figura 7).

Klis e colaboradores (2006) determinaram cinco complexos diferentes entre polissacarídeos e proteínas da parede:

- 1) complexo CWP-GPI- unido a  $\beta$ -1,6-glucano e este a sua vez unido a  $\beta$ -1,3-glucanos, que é normalmente o mais abundante;
- 2) Os segundos mais abundantes são os complexos CWP unidos a polissacarídeos  $\beta$ -1,3-glucano numa ligação sensível a álcali (ASL);
- 3) CWP unidas por GPI a  $\beta$ -1,6-glucanos e estes unidos a quitina, união esta que é incrementada em resposta a estresse na parede celular;
- 4) CWP unido através de GPI a  $\beta$ -1,6-glucanos e a  $\beta$ -1,3-glucanos através de ASL;
- 5) Ligação CWP-ASL- $\beta$ -1,3-glucanos.

A parede celular de leveduras é uma estrutura multifuncional cujas principais funções biológicas são:

1) Estabilização de condições osmóticas internas. A osmolaridade do citoplasma é usualmente mais alto dentro das células que fora. Para limitar o influxo de água resultante, os fungos constroem uma parede elástica e resistente. A parede cria uma pressão que freia a entrada de água na célula.



**Figura 7:** Arquitetura molecular da parede celular de leveduras. O esqueleto interno consiste em moléculas de  $\beta$ -1,3 glucanos que formam uma rede tridimensional rodeando toda a célula. Esta rede é reforçada por pontes de hidrogênio formadas entre moléculas de  $\beta$ -1,3-glucanos alinhadas. A parte externa da parede possui proteínas ligadas a moléculas  $\beta$ -1,3-glucanos (Pir-CWPs), ou indiretamente através de uma interconexão entre  $\beta$ -1,6-glucanos e GPI ligados a CWPs. Depois da citocinese, a capa resulta fortalecida pelo acoplamento de cadeias de quitina unidas a  $\beta$ -1,3-glucanos na parte interna do esqueleto. (Smits e col, 2001)

2) Proteção contra estresse físico. A parede celular mantém homeostase e funciona como um envelope protetivo. A combinação de força mecânica e grande elasticidade permitem que a parede possa transmitir e redistribuir o estresse físico, oferecendo eficiente proteção contra danos mecânicos; 3) Manutenção da forma celular, que é uma pré-condição da morfogênese. As leveduras podem crescer como células ovais, como forma alongada durante limitação de nitrogênio, ou crescer como pseudo-hifas e formar estruturas de acasalamento em resposta a feromônios; 4) A parede celular atua de suporte para proteínas. Os polissacarídeos das paredes das leveduras servem de suporte para as glicoproteínas. Estas proteínas, e particularmente suas cadeias laterais de carboidratos, limitam a permeabilidade da parede celular e servem de escudo

para o acesso de proteínas alheias, para não deixar sair macromoléculas intermediárias da construção da parede, criar um microambiente entre a parede e a membrana plasmática. O alto grau de glicosilação e os grupos fosfato dos carboidratos das cadeias laterais provavelmente ajudam a reter água (Klis e col, 2006).

A capa externa protéica da parede celular esta formada por pelo menos 20 glico-proteínas diferentes e sua composição muda dependendo das condições de crescimento. Assim as leveduras têm a capacidade de se adaptarem a uma ampla variedade de ambientes. As proteínas da parede permitem que as células consigam flocular, formar biofilmes, crescer como pseudo-hifas ou em forma invasiva, ajudam a reter ferro, facilitam a entrada de esteróis e são necessárias para crescer em condições anaeróbicas. Tem sido estimado que cerca de 1.200 genes estão relacionados com a parede celular, suportando a idéia de que a construção da parede é uma parte fundamental da fisiologia celular. Esta que pode variar em composição e em espessura, dependendo do meio de crescimento, temperatura, pH, ou níveis de oxigênio. Pouco se conhece acerca das mudanças que acontecem no grau de ramificação dos polissacarídeos estruturais e do grau de fosforilação e glicosilação das proteínas. Tem sido reportado que a quantidade de complexos formados por proteínas de parede (CWP) unidas por GPI a  $\beta$ -1,6-glucanos da malha unidas a quitina se incrementa intensamente em condições de estresse da parede celular. As células crescendo em fase exponencial cultivadas em meio rico contém ao menos 20 proteínas da parede celular diferentes em relação à fase estacionária (Klis e col, 2006). As modificações que sofre a parede celular das leveduras quando atravessam a fase diáuxica de crescimento incrementa a resistência a glucanasas e zimoliase (Klis, 2006). Na fase estacionária de crescimento, as células apresentam uma parede celular mais estreita e resistente a digestão por glusulase. Parte desta resistência se deve a mudanças na estrutura das mannoproteínas, as quais se localizam ao redor da matriz de glucanos. O numero de pontes disulfeto na parede celular incrementa seis vezes e acontece uma mudança radical nos perfis protéicos. Estas características da fase estacionária de crescimento fazem com que o acesso das enzimas aos polissacarídeos seja menos efetiva (Werner-Washburne, 1993).

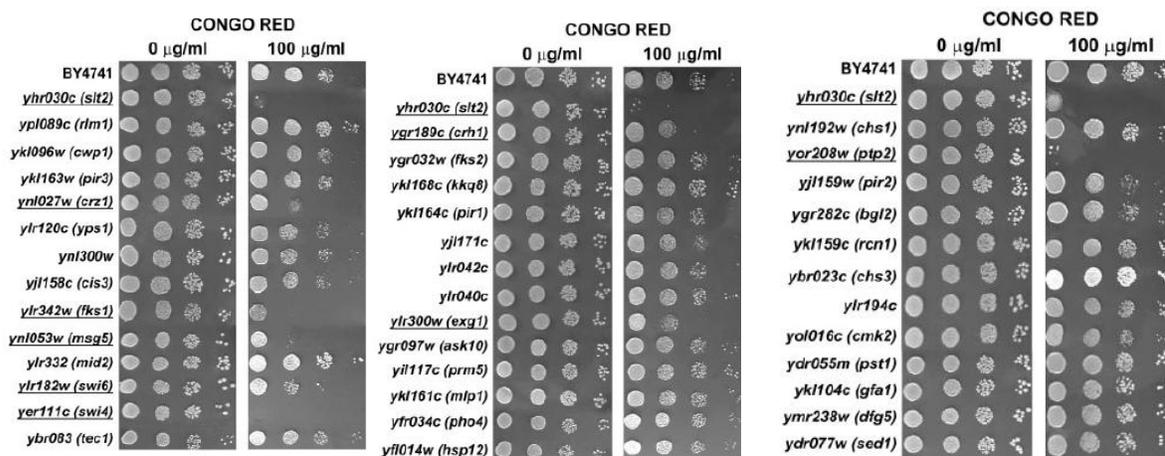
A dinâmica da parede celular pode ser explicada em grande parte pelo mecanismo compensatório que se dispara quando a parede é submetida a condições de estresse. Sob estas circunstancias, o envelope responde incrementando o conteúdo de quitina, muda a associação entre os polímeros que conformam a parede (2% das CWPs estão o ligadas diretamente a quitina na linhagem

selvagem, no mutante *gas1* estas ligações são 20 vezes mais abundantes), incrementa-se o número de CWPs, e ocorre uma re-distribuição temporária do complexo  $\beta$ 1,3 glicano sintase (García e col, 2004).

A trealose, um dissacarídeo não redutor no qual duas unidades de glicose estão unidas pela ligação  $\alpha, \alpha$ -1,1 glicosídeo, aumenta a integridade do envelope e a viabilidade celular quando as células são submetidas a choque térmico, desidratação e tratamento com solventes orgânicos (Thevelein, 1984). O mutante de gene *ath1*, que codifica para a enzima trealase vacuolar, acumula grandes quantidades de trealose e sua tolerância a desidratação, congelamento e estresse etanólico, está incrementada com relação ao parental (Kim e col, 1996). Não existem dados concretos na literatura que expliquem a forma em que esta molécula protege as membranas, mas existem evidências que sugerem que a trealose diminui a temperatura de transição de fases de lipídeos, fazendo que se mantenham em fase cristalina mesmo em ausência de água, e que sua estrutura molecular e estequiométrica fazem possível este efeito (Crowe e Crowe, 1998). Estudos de difração de raios X mostram que a trealose se encaixa corretamente entre os grupos polares dos fosfolipídeos (Rudolph e col, 1990). Trealose reduz a permeabilidade da membrana e incrementa a tolerância a etanol, (Mansure e col, 1994; Sharma 1997) e previne a inibição de endocitose nas células de levedura expostas a concentrações tóxicas de etanol (Lucero e col, 2000). O processo fermentativo estimula a produção de trealose nas linhagens industriais PE-2 e M-26: as leveduras respondem acumulando altas quantidades de trealose, e este acúmulo apresenta alta correlação com o aumento da viabilidade (Dorta e col, 2006). O efeito da trealose em linhagens PE-2, JP1 e *D. bruxellensis* foi analisado pré-incubando as células com o dissacarídeo e posteriormente submetidas a PHMB, comprovando-se o incremento na sobrevivência celular tanto em células crescidas em etanol ou glicose como fonte de carbono (Elsztein e col, 2008).

O composto Vermelho Congo é um corante que perturba a parede celular e é amplamente usado para estudar as vias comprometidas na resposta a estresse na parede celular. O vermelho Congo degrada o polímero  $\beta$ -1,3 glucano da parede celular (García e col, 2004). A expressão gênica em resposta ao dano da parede celular imposto pelo Vermelho Congo demonstra que a grande maioria dos genes induzidos estão relacionados com o remodelamento da parede celular como o objetivo de manter a integridade da parede celular (García e col, 2004). Linhagens mutantes crescidas em presença de Vermelho Congo confirmam os genes que estão envolvidos na resposta

ao estresse. Os mutantes *slt2*, *ptp2* ou *swi4* foram incapazes de crescer na presença de Vermelho Congo, enquanto *msg5*, *crz1*, e *swi6* foram sensíveis à droga. Dentre os genes envolvidos na construção da parede celular, o fenótipo mais grave deveu-se à ausência de *fks1*, que codifica para uma  $\beta$ -1,3 glucano sintase. O mutante que carece do gene *crh1* (uma possível GPI-CWP transglicosidase) e o mutante *exg1* (que codifica para um exo-glucanase) são sensíveis ao Vermelho Congo, enquanto *pir2* e *bgl2* foram ligeiramente sensíveis (García e col, 2004, figura 8).



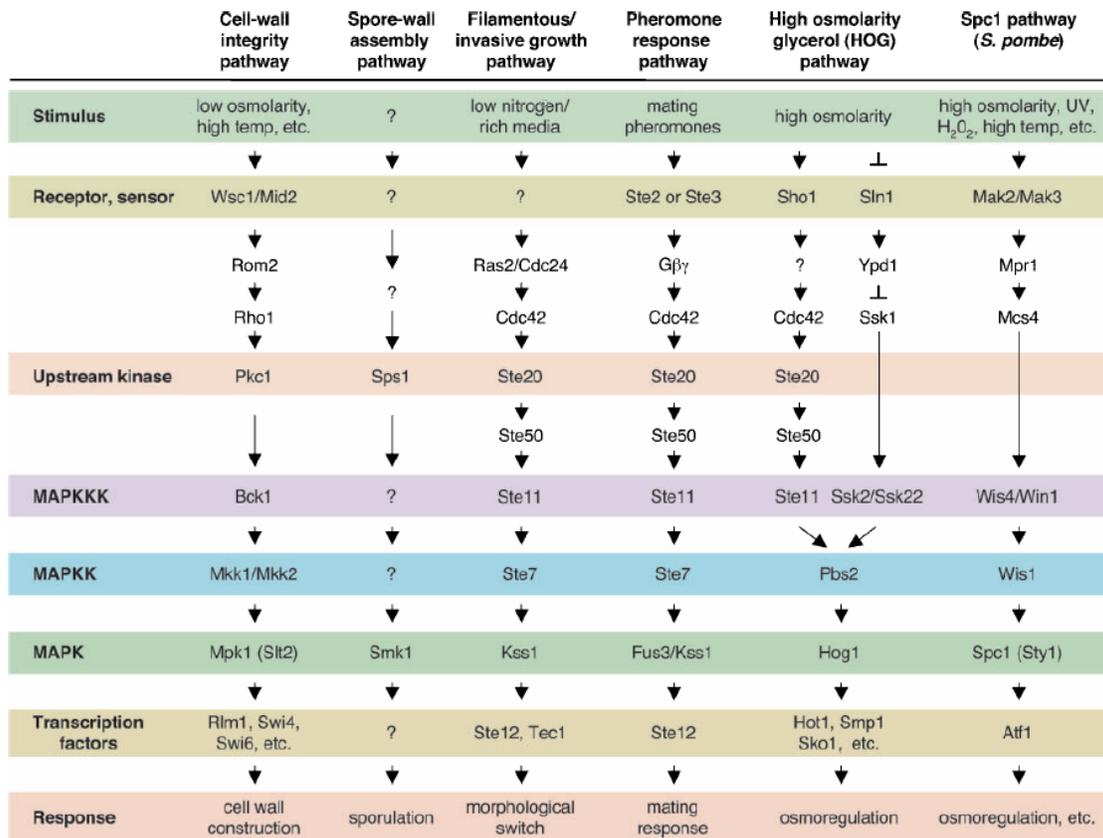
**Figura 8:** Análise de sensibilidade ao vermelho Congo. Várias cepas mutantes foram testadas por sua capacidade de crescer em meio sólido na presença de 100 µg/ml de vermelho Congo. BY4741 é o parental haploide e as cepas sensíveis à droga estão sublinhadas (García e col, 2004).

## 1.6 Manutenção da integridade da parede celular (CWI) e via de resposta a alta osmolaridade (HOG).

As células constantemente avaliam e respondem ao meio externo. Os organismos respondem a mudanças em condições ambientais adversas disparando mecanismos que reparam os danos causados e estabelecem um estado de tolerância que ajuda a prevenir danos futuros. Para perceber as alterações do ambiente os sinais têm que ser transmitidos desde a superfície celular até o núcleo. A percepção do sinal e a tradução são cruciais para comunicar-se ao núcleo e disparar as mudanças na expressão dos genes (Saito e Tatebayashi, 2004).

A rota de manutenção da parede celular (CWI) é uma via de sinalização importante não apenas para manter a morfologia celular como também para proteger as células de condições

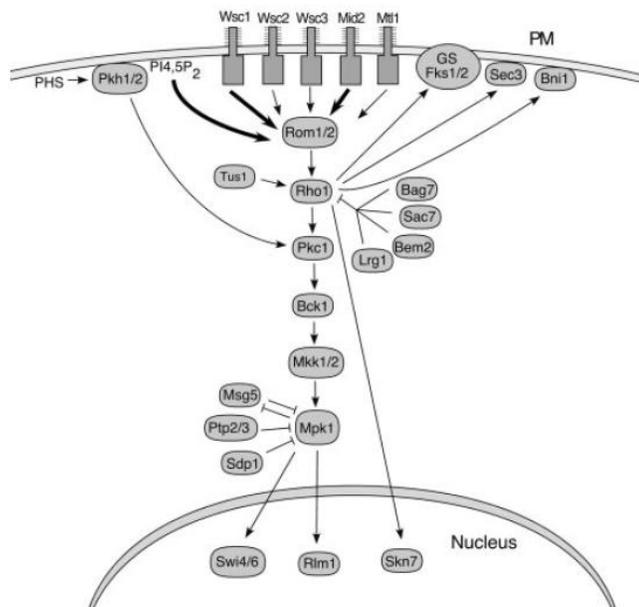
extremas. A via de manutenção da integridade celular pertence ao grupo das vias MAP quinase, vias de proteínas quinases ativadas por mitose (MAPK), a partir das quais os sinais externos são traduzidos e amplificados para adaptar as células as condições particulares do entorno. Cada cascata MAPK esta composta por três quinases sequencialmente ativadas: A MAP quinase quinase (MAPKKK) fosforila e ativa a MAP quinase quinase (MAPKK), que fosforila a MAP quinase (MAPK). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui ao menos cinco vias de sinalização do tipo MAPK: a via de formação da parede dos esporos, a via de crescimento invasivo ou filamentoso, a via de resposta a feromônios, o mecanismo de manutenção de integridade da parede celular (CWI) e a via de resposta a alta osmolaridade (HOG) (Figura 9) (Saito e Tatebayashi, 2004).



**Figura 9.** Vias de transdução de sinais que contém o módulo MAPK. As leveduras que esporulam tem ao menos 5 vias diferentes de MAPK, algumas delas compartilham seus componentes (retirado de Saito and Tatebayashi, 2004).

A via CWI é ativada em resposta a agentes perturbadores da parede como vermelho Congo, branco calcofluor, zimoliase, neumocandinas e cafeína. A zimoliase (enzima com

atividade  $\beta$ -1,3-glucanase) causa danos na rede de  $\beta$ -1,3-glucanos da parede celular e induz uma resposta ao nível de transcrição que envolve um grupo de genes relacionados com a remodelação e reestruturação da parede. A resposta à zimoliase depende de componentes de duas vias de sinalização diferentes: Sho1p, proteína receptora do sinal pertencente a via HOG; e de Slt2p, MAPK pertencente a CWI. A via CWI pode ser ativada por vários estresses como térmico, choque hipo-osmótico, perturbação na rede de actina, (Saito and Tatebayashi, 2004), estresse oxidativo e morfogênese induzida por feromônios (Chen e Thorner, 2007), estresse alcalino e do retículo endoplasmico (agentes que disparam a resposta a proteínas desnaturadas como  $\beta$ -mercaptoetanol, ditioneitol e tunicamicina) (Nunez e col, 2008), cafeína, vanadato (Martin e col, 2000) e rapamicina (de La Torre-Ruiz e col, 2002). A forma de perceber a perturbação gerada parece provir do alongamento da membrana celular o/e da alteração de suas ligações com parede celular (Chen e Thorner, 2007).



**Figura 10:** A via de sinalização CWI. Os sinais são percebidos na membrana plasmática através dos sensores de superfície celular Wsc1p, Wsc2p, Wsc3p, Mid2p e Mtl1p. Os domínios extracelulares destas proteínas são altamente manossilados. Rho1 ativa cinco efetores, incluindo a cascata PKC, a  $\beta$ 1,3-glucano sintase (GS), a proteína Bni1p, e do fator de transcrição Skn7. Pkh1p e Pkh2p são ativados por esfingosina. A cascata MAP quinase é composta por Bck1p, Mkk1p / Mkk2p, e Mpk1p (Slt2p) é ativada por Pkc1p. Várias fosfatases regulam Mpk1p (Slt2p). Os fatores de transcrição Rlm1p e o complexo SBF (Swi4p/Swi6p) são alvos da MAP quinase Slt2p (Levin, 2005).

Cinco proteínas de membrana têm sido identificadas como os sensores de superfície. A via CWI: Slg1p, Wsc2p, Wsc3p, Mid2p e Mtl1p. A porção C-terminal citoplasmática destes receptores interatua com Rom2p, que é um fator que intercambia GTP (Gef) que se une a membrana de uma forma estável. Rom2p atua sobre Rho1p, uma GTPase homologa a Ras ancorada na membrana mediante a porção C-terminal geranyl-geranilado e interatua com os fosfolipídios da membrana mediante uma sequência aminoácidos com resíduos básicos. Um dos efetores de Rho1p-GTP é a proteína quinase C Pkc1p, que é um ativador essencial da cascata MAPK requerida para a sinalização de CWI: Bck1p, uma MAPKKK que ativa o par semi-redundante Mkk1p/Mkk2p (MAPKKs), que a sua vez ativa a MAPK Slt2p (também chamada Mpk1p). Slt2p é responsável pelo estímulo da expressão de genes que codificam para enzimas e outros fatores envolvidos com a biosíntese e remodelamento da parede celular. Slt2p ativa fosforilando o fator de transcrição Rlm1p e o complexo de transcrição SBF, formado pelas subunidades Swi4p e Swi6p.

Adicionalmente, a forma fosforilada de Slt2p é necessária para o influxo de cálcio através da membrana plasmática, que ativa o complexo calcineurina a partir da desfosforilação do fator de transcrição Crz1p. Nesta forma, Crz1p ativa a expressão de genes envolvidos com estresse na parede celular e no retículo endoplasmático (Levin, 2005; Figura 10).

Knr4p é uma proteína envolvida na síntese da parede celular, proposta como um elemento coordenador entre a progressão do ciclo celular e a integridade da parede celular (Martin-Yken e col, 2003). Vários estudos de genômica a grande escala, tais como arranjos genéticos sintéticos (*synthetic genetic arrays*, SGA) que detectam combinações letais entre genes, tipagem duplo híbrido, e captura de afinidade acoplada a espectrometria de massas, revelam que KNR4 relaciona-se geneticamente com mais de 100 genes e interatua fisicamente com 20 proteínas diferentes (Stark e col, 2006). Knr4p regula a atividade quinase da MAPK Slt2p, que ativa o fatores de transcrição Rlm1p, SBF, e outros, mantendo desta forma a viabilidade celular (Durand e col, 2008).

O fator de transcrição Rlm1p regula a expressão de ao menos 25 genes, a maioria codificadores de proteínas de parede celular ou implicados na biogênese da parede (Levin, 2005). Entre eles se encontram induzidos *PIR1*, *PIR2* (*HSP150*), *PIR3*, *YLR194C* e *SLT2* (Levin e Jung, 1999). A regulação da expressão de *SLT2* por Rlm1p sugere a existência de um circuito auto-regulatório de amplificação da resposta a estresse (Levin, 2005). Entre os genes reprimidos se encontram *FIT2*,

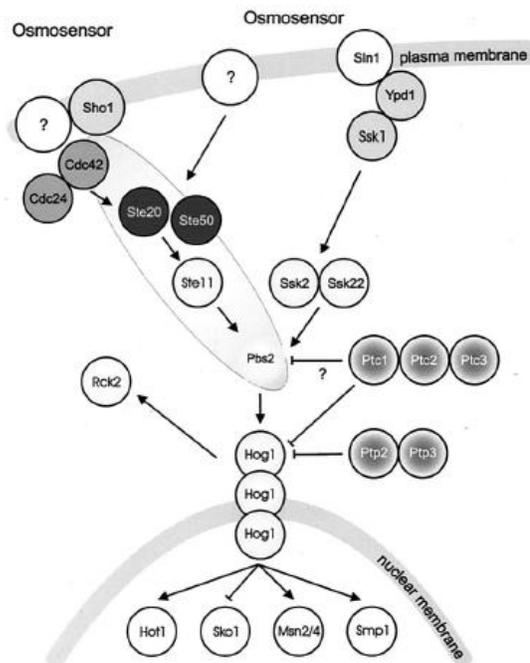
que codifica para uma manno-proteína de parede celular, e *CTT1*, que codifica a catalase I citoplasmática. Um dado muito interessante é que *CTT1* é reprimido pela via CWI e induzido pela via HOG (Levin e Jung, 1999). Dentre os genes cuja expressão é controlada por Rlm1p podemos destacar: *KRE6*, que codifica uma proteína requerida para a síntese de  $\beta$ -1,3-glucano, e *CHS1*, que codifica uma sintase de quitina (Lesage e Bussey, 2006). Já *FKS1*, gene que codifica um componente do complexo  $\beta$ -1,3-glucano sintase, é induzido debilmente por Rlm1p (Levin e Jung, 1999). Dentre os genes positivamente regulados por SBF podem ser citados *FKS1* e *GAS1*, que codifica uma  $\beta$ -1,3-glucanosil transferase localizada na superfície celular (Lesage e Bussey, 2006; Figura 10).

As proteínas Pkh1 e Pkh2 possuem uma função essencial e superposta na manutenção de CWI. São proteínas quinases ativadas por fitoesfingosina, o principal esfingosídeo produzido por leveduras, e fosforilam Pkc1p em resposta a estresse térmico. Linhagens mutantes para seus genes mostram defeitos na polarização de actina e lise celular osmo-remediável a temperaturas restritivas, e este fenótipo pode ser parcialmente restaurado quando *PKC1*, *BCK1* ou *MKK1* são transcritos constitutivamente (Levin, 2005).

As proteínas Ptp2 e Ptp3 são duas fosfatases envolvidas com regulação de varias vias MAPK. Em relação à resposta a choque osmótico, Ptp2p desfosforila Hog1p (MAPK da via HOG) e Slt2p, inibindo desta forma as duas vias. Além disso, existe uma retroalimentação negativa entre as MAPK envolvidas e as fosfatases, já que Hog1p fosforilado (ativo) potencia a atividade de Ptp2p e induz a expressão de *PTP3*, enquanto Slt2p ativado por choque térmico induz a expressão de *PTP2* (Lesage e Bussey, 2006; Hohmann 2002).

Recentes trabalhos demonstraram que as rotas CWI e HOG estão coordenadas para regular a resposta de vários estresses (Rodriguez-Peña e col, 2010). A principal função da via HOG é a regulação da resposta a estresse por hiper-osmolaridade. A célula responde fazendo ajustes internos para se adaptar ao incremento externo de osmolaridade sintetizando e retendo osmolitos compatíveis tais como glicerol, modificando o influxo de água e ajustando a progressão do ciclo celular (Saito e Tatebayashi, 2004). A via HOG também é ativada em resposta a outros estresses tais como oxidativo, acido, metilglioxal, Cloreto de Césio, mudança de temperatura, arsenito, choque término e zimoliase (Rodriguez-Peña e col, 2010). A MAPK Hog1p é um elemento chave na via HOG, e é ativada a jusante pela MAPKK Pbs2p. A proteína Hog1p ativada se acumula rapida e transitoriamente no núcleo, onde participa na modificação do padrão

transcricional em resposta a estresse osmótico (Saito e Tatebayashi, 2004). Hog1p é ativada pela MAPKK Pbs2 a partir de dois mecanismos independentes que convergem exatamente nesta proteína: dois osmo-sensores transmembrana Sln1p e Sho1p podem, de forma independente, ativar a via HOG, e são referidas como o ramo SLN1 e o ramo SHO1. Sln1p é fosforilado e transmite seu fosfato para Ssk1p através do intermediário Ypd1p. Ssk1p é defosforilado por um mecanismo desconhecido e ativa as MAPKKK redundantes Ssk2p e Ssk22p, que disparam o MAPK Box. Já o ramo SHO1 compreende Cdc42p, Ste50p, a PAK-like quinase Ste20p e a MAPKKK Ste11p para transmitir o sinal até Pbs2p (Saito e Tatebashi, 2004, figura 11). As interconexões, a coordenação da expressão de vários genes e as semelhanças fenotípicas entre linhagens mutantes para esses genes indicam que enquanto a especificidade de cada rota é necessária, as vias HOG e CWI devem estar positivamente coordenadas para uma ação biológica conjunta e complementar (Rodriguez-Peña e col, 2010).



**Figura 11:** A via HOG. Esquema dos componentes das duas vias que compõem a cascata HOG: SHO1 e SLN1 (Hohmann, 2002).

## 1.7. Considerações

Em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa foi observado que o PHMB mostrou-se eficiente no combate as principais leveduras contaminantes do processo fermentativo industrial para a produção de etanol combustível, adicionalmente ao que já tinha sido relatado para o combate a bactérias patogênicas e protozoários parasitas. Entretanto, sua ação observada para algumas linhagens industriais de *S. cerevisiae* deve limitar seu uso àquelas destilarias que utilizam apenas linhagens resistentes ao biocida. Diante disso, consideramos relevante a continuidade do trabalho iniciado, agora tentando desvendar os mecanismos de ação do biocida e a resposta celular a sua presença. Os resultados anteriores apontavam para a sua ação no envelope celular, seja parede ou membrana, o que foi também apresentado por relatos na literatura utilizando *E. coli* e *Acantamoeba*. Além disso, nossos dados mostraram a importância da proteína Yap1, um fator regulatório importante para a indução de genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo em levedura. A partir desses fatos, o presente trabalho pretende contribuir para o conhecimento a cerca do mecanismo de ação do PHMB e do papel das principais vias de sinalização celular que respondem aos danos causados pelo biocida no intuito de racionalizar o uso industrial deste composto ou mesmo de se pensar na construção de uma levedura recombinante que fosse mais resistente ao mesmo.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral:**

Este trabalho tem como objetivo geral determinar o modo de ação do biocida PHMB e estudar os mecanismos de resistência em leveduras que estão envolvidos na proteção contra os danos induzidos por este composto.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Identificar os genes de *S. cerevisiae* envolvidos na resistência a PHMB;
- Determinar a participação dos diferentes mecanismos de sinalização celular no mecanismo de resistência ao PHMB;
- Identificar mecanismos de cooperação entre as diferentes vias de sinalização na resistência ao PHMB;
- Definir o papel da proteína Yap1 na resistência celular ao PHMB.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Linhagens, meios de cultura e antifúngicos

Foram utilizadas as linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* JP1 e PE-2 e as linhagens de laboratório BY4741 (*MATa his3-1 leu2-0 met15-0 ura3-0*) e YSH6.127.1C (*MATa leu2-3/112 ura3-1 trp1-1 his3-11/35 ade2-1 cad-100 GAL SUC2*). Linhagens mutantes derivadas de BY4741 com deleções para diferentes genes foram adquiridas da coleção EUROSCARF (Instituto de Microbiologia da Universidade de Frankfurt, Alemanha) (Tabela 1). O meio de cultura YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose) foi utilizado nos experimentos de crescimento celular, sendo acrescido de Agar na concentração final de 2% para preparação do meio sólido. Os compostos antifúngicos nas preparações comerciais foram cedidos pela empresa AEB Bioquímica Latino Americanas S/A (Brasil).

#### 3.2 Determinação de susceptibilidade celular aos antifúngicos

Células das leveduras testadas foram cultivadas por 18 horas com agitação (180 rpm) a 30°C em meio YPD e utilizadas para inocular frascos contendo meio YPD novo. O crescimento celular foi estendido por mais 5 horas para atingirem a fase exponencial de crescimento e a concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. As culturas em fase exponencial de crescimento como descrito acima foram centrifugadas e as células lavadas com solução salina 0,85%. Suspensões de  $2 \times 10^6$  e  $2 \times 10^7$  células/ml diluídas em fosfato de potássio 0,1 M (pH7) foram preparadas e alíquotas de 5  $\mu$ l foram gotejadas em placas de YPD em ausência ou presença de 0.002%, 0.0025% e 0.003% PHMB, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.2 M KCl, 12% etanol e 1,5 mg/ml vermelho congo. Placas controle sem PHMB foram preparadas. A inibição do crescimento foi avaliada após incubação das placas por 72 horas a 30°C.

**Tabela.1.** Linhagens haplóides utilizados. As linhas em negrito indicam o genótipo dos parentais haplóides das linhagens mutantes.

Gene mutado	ORF	Função da proteína
<i>HOG1</i>	YLR113W	Proteína quinase (MAPK) ativada por alta osmolaridade
<i>SLG1</i>	YOR008C	Sensor da via de sinalização PKC, envolvido em manutenção da integridade celular.
<i>MKK2</i>	YPL140C	MAPKK envolvida na via PKC que controla a integridade da parede e funcionalmente redundante a Mkk1p.
<i>SLT2</i>	YHR030C	Proteína quinase (MAPK) envolvida na manutenção da integridade da parede celular
<i>SWI6</i>	YLR182W	Cofator de transcrição que forma complexos com as proteínas de união a DNA <i>SWI4p</i> e <i>Mbp1p</i> .
<i>HSP150</i>	YJL159W	Proteína de choque térmico requerida para a estabilidade celular e induzida baixo estresse
<i>ROM2</i>	YLR371W	Proteína de intercambio GDP/GTP (GEP) que regula Rho1p e Rho2p
<i>RLM1</i>	YPL089C	Fator de transcrição tipo MADS-box e componente da via PKC.
<i>SWI4</i>	YER111C	Subunidade de união a DNA dos fatores SBF e MBF
<i>YAP1</i>	YML007W	Fator de transcrição tipo <i>basic leucine zipper</i> requerido na tolerância a estresse oxidativo.
<i>TSA1</i>	YML028W	Tiorredoxina peroxidase que atua como anti-oxidante e forma complexo com chaperona baixo estresse oxidativo.
<i>CTA1</i>	YDR256C	Catalase A que atua quebrando o peróxido de hidrogênio na matriz peroxisomal.
<i>CTT1</i>	YGR088W	Catalase T citosólica protetora de dano oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio.
<i>TPS1</i>	YBR126C	Subunidade sintase do complexo trehalose-6-fosfato sintase/fosfatase que sintetiza o carboidrato trehalose.
<i>TPS2</i>	YDR074W	Subunidade fosfatase do complexo trehalose-6-fosfato sintase/fosfatase que sintetiza o carboidrato trealose.
<i>GSH1</i>	YJL101C	Gamma glutamilcisteine sintetase que catalisa o primeiro passo na biosíntese de glutatona
<i>ERG6</i>	YML008C	Delta(24)-esterol C-metiltransferase, enzima envolvida na via da síntese de ergosterol.
<i>TRX1</i>	YLR043C	Tiorredoxina citoplasmática que protege a célula contra estresse redutivo e oxidativo.
<i>GPX2</i>	YBR244W	Glutatona peroxidase que protege a célula quando se formam hidroperoxidos de fosfolipídios.

### 3.3 Testes de toxicidade (ação fungicida)

As células foram cultivadas em YPD até atingir fase exponencial (5 horas) ou fase estacionária (24 h), coletadas, lavadas com NaCl 0.85% e re-suspensas em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7 para concentração de  $2 \times 10^7$  cél/ml. As suspensões celulares foram incubadas por 30 minutos na presença de diferentes concentrações de PHMB com uma agitação de 180 rpm. Imediatamente, 100 µl de cada condição foram diluídos 1/10000 vezes e semeados em placas com YPD. Depois de incubação por 5 dias as colônias formadas foram contadas para a determinação do percentual de células resistentes em cada uma das doses utilizadas, utilizando-se as placas controle como referência de 100% de células viáveis.

### 3.4 Determinação quantitativa de grupos sulfeto livres pelo Método do DTNB

O ácido 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) determina a quantidade proteínas com grupos tióis livres e os compostos não protéicos com grupos tióis livres. Células de *S.cerevisiae* foram crescidas em placas de YPD na ausência ou presença de 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou 0.0005% PHMB por 48 horas. Logo foram coletadas, lavadas em NaCl 0,85% e analisadas pelo método do DTNB. Um total de  $10^9$  células foram coletadas, suspensas em 600 µl de tampão EDTA 0,02 M (pH4,7) e quebradas com 0,5 mg de pérolas de vidro com três ciclos de agitação com vórtex por 30 segundos na máxima velocidade, intercalados por incubação de 30 segundos em gelo. Depois de centrifugadas a 14000 rpm por 20 min, o sobrenadante foi coletado e diluído com mais 600 µl de tampão EDTA 0.02 M (pH4.7). As etapas de quebra e centrifugação foram repetidas e o sobrenadante coletado foi dividido em dois grupos. Para avaliação da quantidade total de grupos tióis livres, alíquotas de 200 µl do sobrenadante foram misturadas com 780 µl de Tris-HCl 0,2 M (pH 8,2) e 20 µl de DTNB (solução a 5 mM em etanol). Depois da incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, a mistura foi avaliada em espectrofotômetro a 412 nm (DO). Em paralelo, 500 µl do sobrenadante foram misturados com 26,3 µl de TCA 10% gelado, incubados por 10 minutos em gelo e centrifugados a 14000 rpm por 5 min. Cerca de 450 µl desse sobrenadante foi coletado e misturado com 900 µl de Tris-HCl 0,4M (pH 8,9) e 26,3 µl de DTNB, incubado por 5 min a temperatura ambiente e avaliado em espectrofotômetro a 412 nm (DO) para determinação

da concentração de grupos tióis não-proteicos. Os valores de absorvância foram relacionados com o fator de correção determinado a partir de curvas dose-resposta construídas com soluções puras de glutathione reduzida. Os resultados relativos a quantidade de grupos tióis de resíduos proteicos foram calculados pela diferença entre a concentração de grupos tióis totais e a concentração de grupos tióis não-proteicos de cada amostra.

### 3.5 Análise da expressão gênica

#### 3.5.1 Tratamentos:

PHMB: Duas culturas independentes de cada linhagem de *S.cerevisiae* foram cultivadas em YPD até atingir a fase estacionária. As culturas foram re-inoculadas em meio fresco para obter uma cultura de 300 ml de  $DO_{600} = 0,5$ . Os inóculos foram divididos em dois erlenmeyeres: ausência ou presença de PHMB (0.01% para JP1 e PE-2 e 0.005% PHMB para BY4741 e  $\Delta YAPI$ ) e incubados a 30°C em agitação por uma hora. Posteriormente as amostras foram coletadas por centrifugação 6000 rpm por 10 min e imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Choque térmico: Duas culturas independentes das linhagens *S.cerevisiae* BY4741 e o mutante  $\Delta yap1$  foram cultivadas em YPD até atingir a fase estacionária. As culturas foram re-inoculadas em meio fresco para obter uma cultura de 300 ml de  $DO_{600} = 0,5$ . Os inóculos foram divididos em dois erlenmeyeres para incubação a 42°C (condição teste) ou 30°C (condição de referência) com agitação por uma hora. Posteriormente as amostras foram coletadas por centrifugação 6000 rpm por 10 min e imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

#### 3.5.2 Extração de RNA

O isolamento de RNA foi realizado por meio do método ácido quente de extração por Fenol-cloroformio. As amostras foram retiradas do freezer e imediatamente misturadas com 600  $\mu$ l de solução AE (Acetato de sódio 50 mM, EDTA 10 mM, Ac Acético pH 5,3), 40  $\mu$ l de SDS 10% e 600  $\mu$ l de Fenol equilibrado em tampão AE. Logo foram homogeneizadas por 15 segundos em vórtex e incubadas a 65°C por 10 minutos, agitando-se a cada dois minutos. Posteriormente foram esfriadas por 5 minutos a 4°C e logo centrifugadas a 10000 rpm por 5 min. A fase aquosa

foi transferida para novo tubo para segunda extração com igual volume da mistura fenol-clorofórmio [5:1] (pH 5,3) a partir de homogeneização em *vortex* por 1 minuto. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 2 minutos e a fase aquosa foi recuperada e transferida para novo tubo. A terceira extração foi realizada com igual volume de clorofórmio a partir de mistura por inversão e os tubos foram centrifugados como acima. Por fim, a fase aquosa foi transferida para novo tubo e misturado com cloreto de lítio 7,5 M para a concentração final de 2,5 M. Depois de incubados por 30 minutos a -20°C, os tubos foram centrifugados 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de RNA foi lavado pela adição de etanol 70% gelado, agitação rápida por *vórtex* e centrifugação a 14000 rpm por 5 min. O líquido foi retirado por aspiração e o sedimento seco a temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente resuspendido em 25 µl de água bidestilada pré-tratada com dietil pirocarbonate (DPEC) e armazenadas a -80°C até seu uso. A quantificação de RNA foi realizada por determinação em espectrofotômetro a 260 nm, considerando-se que uma unidade de absorbância corresponde a solução de RNA a 40 µg/ml. O grau de pureza foi analisado pela razão das absorbâncias 260nm/280nm, na qual uma amostra foi considerada pura para análise quando esta razão ficou entre 1,9 a 2,1. A integridade do RNA foi constatada por eletroforese em gel de agarose usando como parâmetro a nitidez e a intensidade das bandas correspondentes às frações 26S e 18S do RNA ribossomal.

### 3.5.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total extraído com o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System Promega II (Promega, USA), seguindo instruções do fabricante. A quantidade de RNA utilizada foi de 1 µg final para cada 40 µl de reação de transcrição reversa.

### 3.5.4 RT-PCR Quantitativa (RT-qPCR)

Os iniciadores foram desenhados para a amplificação de regiões codificantes de seqüências de genes depositados em Yeast genome database (<http://www.yeastgenome.org>). O gene *ADKI* foi utilizado como gene de referência para normalizar os níveis de transcrição basal. Para o desenho de iniciadores foi utilizada a ferramenta on line *Genscript Primer design* no modo

avanzado ([WWW.genscript.com/cgi-bin/tools](http://WWW.genscript.com/cgi-bin/tools)) empregando os seguintes parâmetros: os tamanhos dos iniciadores entre 17 e 25 bases, valor de  $T_m$  59°C e tamanho dos amplicons entre 70 e 110 pb. Os pares de iniciadores foram analisados com a ferramenta *NetPrimer* para a determinação da formação de auto-híbridos, duplex, hairpins e loops ([WWW.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html](http://WWW.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html)). Foram selecionados os que apresentam classificação maior do que 90%. Os pares de iniciadores foram submetidos a análise de *match* com regiões codificantes dos genes alvo ([WWW.blast.org](http://WWW.blast.org)) e finalmente os iniciadores foram submetidos a uma PCR in silico (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) empregando como molde o genoma de *S.cerevisiae*. As seqüências dos iniciadores foram sintetizados pela IDT Technologies (USA).

Os ensaios 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 (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. As condições de amplificação utilizadas foram: etapa inicial a 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 seg, e 60°C por 1 min. Para a determinação de contaminação por DNA genômico, as reações de PCR foram realizadas com amostras de RNA para cada condição. Os resultados não amostraram amplificação detectável em nenhuma condição. Os valores de Ct (*Ciclo threshold*) foram manualmente determinados para cada amplificação. A análise dos dados de quantificação foi feita segundo o método de quantificação relativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgem 2001), nos quais os níveis de transcrição gênica foram normalizados contra o gene de referência, e comparados em função da condição calibradora; sendo em nossos testes as condições aonde as células não são submetidas a PHMB ou Choque térmico. Os dados foram expressos em vezes de indução/repressão em relação ao gene de referência (*ADKI*) na condição calibradora (valor 1). Os valores entre 0 e 1 (genes reprimidos) foram transformados para  $-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Para a determinação do erro padrão ( $\delta$ ) do controle endógeno como do gene de interesse empregou-se a fórmula:  $\delta = \sigma / \sqrt{N}$ , na qual  $\sigma$  é a variância dos diferentes valores de Ct obtidos, e N é o número de valores de Ct usados no cálculo. Para a determinação do erro de  $\Delta\Delta Ct$  foi empregada a fórmula para a propagação do erro padrão do tipo  $\delta^{\Delta\Delta Ct} = \sqrt{(\delta_1)^2 + (\delta_2)^2}$ , na qual  $\delta_1$  é o erro padrão do gene de interesse e  $\delta_2$  é o erro padrão da referência.

## 4. Resultados

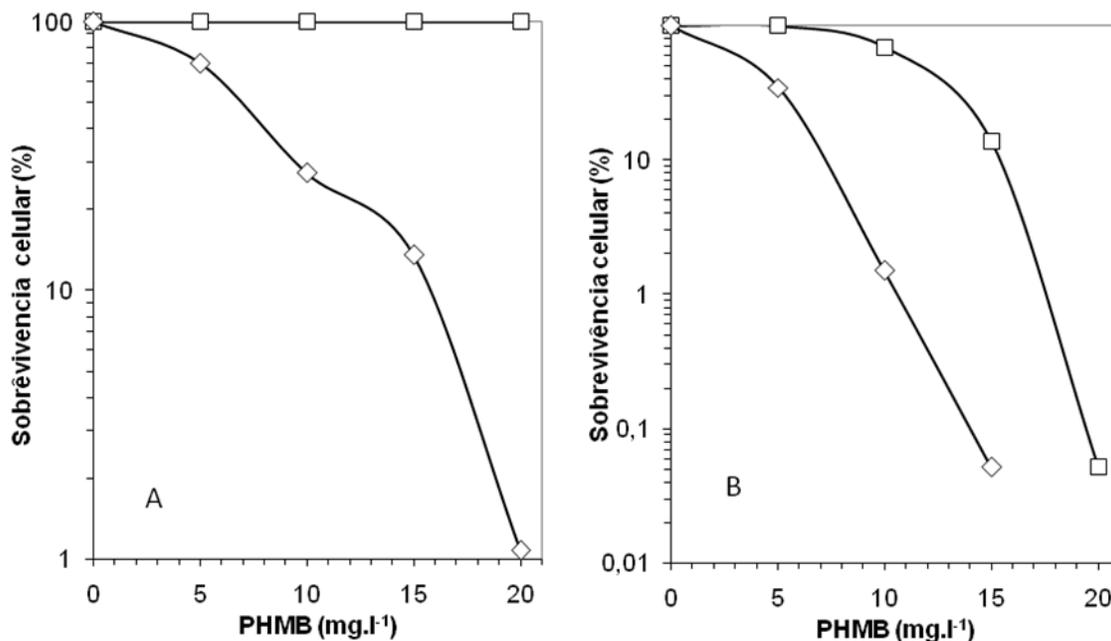
### 4.1 *S. cerevisiae* é mais resistente ao PHMB durante a fase exponencial.

O mutante *yap1* apresentou alta sensibilidade a PHMB (Elsztein, 2006), o que sugeriu que este composto causasse estresse oxidativo nas células de levedura. Em fase estacionária de crescimento não há glicose e o metabolismo é inteiramente oxidativo, o que gera produção de ROS (espécies reativas de oxigênio)(Jamieson, 1998) . A mudança de condições anaeróbicas a aeróbicas indica que as células estão expostas a agentes oxidantes que causam danos e podem afetar a viabilidade celular e a cinética de crescimento. As células também se adaptam a estresse oxidativo exógeno causado por  $H_2O_2$  , e este reajuste acontece quando a cultura é exposta a quantidades sub-letais de um oxidante, induzindo uma resposta protetiva transiente e conferindo resistência a uma dose maior que, em condições normais, poderia ser letal para as células (Beckhouse e col 2008). Se o composto gera estresse oxidativo, se esperaria que as leveduras em fase estacionária fossem mais resistentes. Com isso, as células de *S. cerevisiae* PE-2 e JP1 foram coletadas em ambas as fases exponencial e estacionária de crescimento e testadas para viabilidade na presença de PHMB. As células em fase exponencial de crescimento são mais resistentes do que as células em fase estacionária, e a linhagem JP1 é mais resistente do que a linhagem PE-2 (Figura 12). Em princípio estes resultados rejeitam hipótese inicial do PHMB como gerador de ROS.

### 4.2 A resistência a PHMB é dependente de *YAPI* e não estaria envolvida com resposta a estresse oxidativo.

A via regulatória mediada por Yap1p controla a resposta adaptativa a estresse oxidativo e é ativada por mecanismos que captam o estado redox intracelular causado por espécies reativas de oxigênio e tioles oxidados. Estes mecanismos envolvem resíduos de cisteína sensível ao estado redox que rapidamente transduzem os sinais de estresse a proteínas regulatórias. Esta transdução de sinais frequentemente envolve mudanças na conformação protéica devido à formação reversível de pontes disulfeto (Herrero e col, 2008) e por tanto se esperaria encontrar um nível baixo de compostos reduzidos dentro de células submetidas a um composto oxidante.

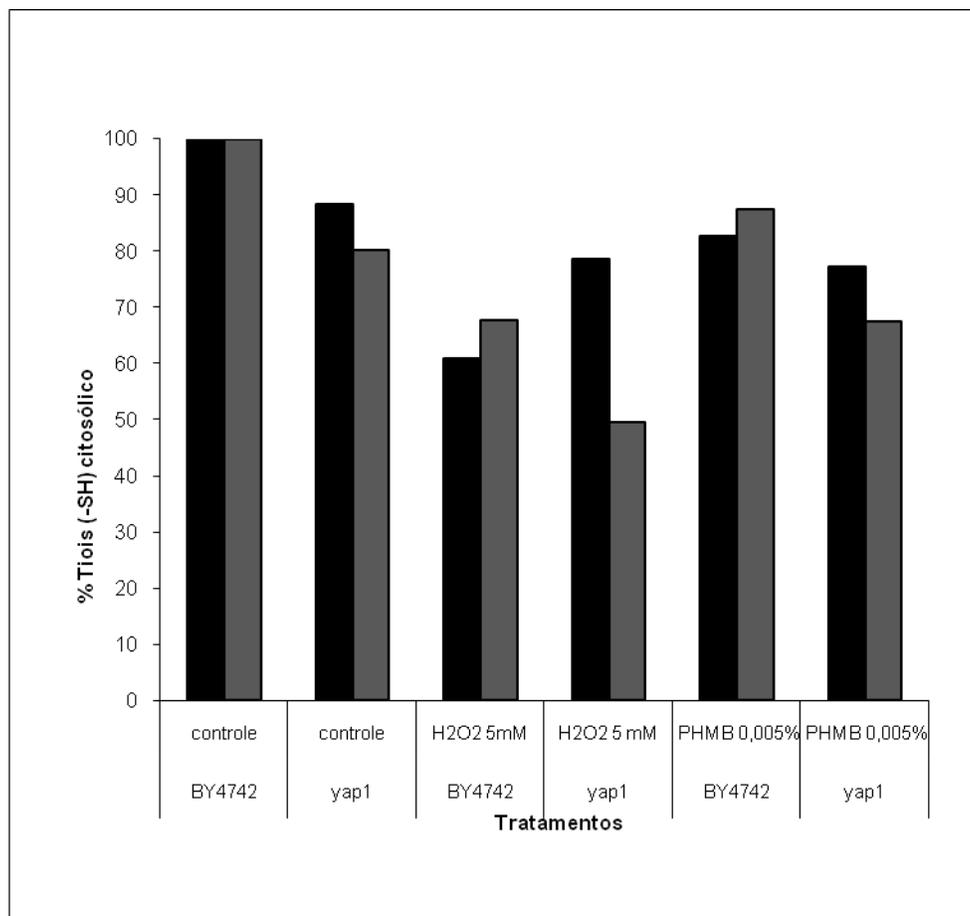
Ainda no contexto da possibilidade de geração de estresse oxidativo pelo PHMB, as células de levedura foram avaliadas quanto a concentração e mobilização de grupos tióis totais quando tratada com este composto.



**Figura 12.** Ensaio de citotoxicidade de PHMB em leveduras. *Saccharomyces cerevisiae* JP1 (□) e PE-2 (◇) coletadas na fase exponencial (A) e estacionária (B) de crescimento submetidas a concentrações crescentes de PHMB.

Na figura 13 estão representados os níveis de tióis citosólicos presentes no parental e no mutante *yap1* quando submetidos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e PHMB. Não há uma mobilização significativa de grupamentos tióis reduzida, seja nas formas protéica ou não-protéica, no interior das células parentais e mutante tratadas com PHMB (figura 13). As células tratadas com peróxido de hidrogeno apresentam uma menor quantidade de compostos reduzidos, corroborando a ação do agente oxidante sobre os compostos celulares e a sensibilidade esperável do mutante *yap1* (figura 13). Se o PHMB atua na formação de danos oxidativos, estes não induzem o mecanismo de detoxificação dependentes de glutathione/tiorredoxina. Além disso, se esta resposta existir deve ser independente da proteína Yap1p. Esta proteína regula a expressão dos genes envolvidos no metabolismo e reciclo de glutathione e de outras enzimas relacionadas com a supressão de compostos oxidados na célula, portanto é esperável que o mutante apresente menor quantidade de componentes reduzidos. O fator de transcrição Yap1p está envolvido com a resistência a PHMB, mas essa relação parece não estar implicada com a resposta a estresse oxidativo. Isto mostra que

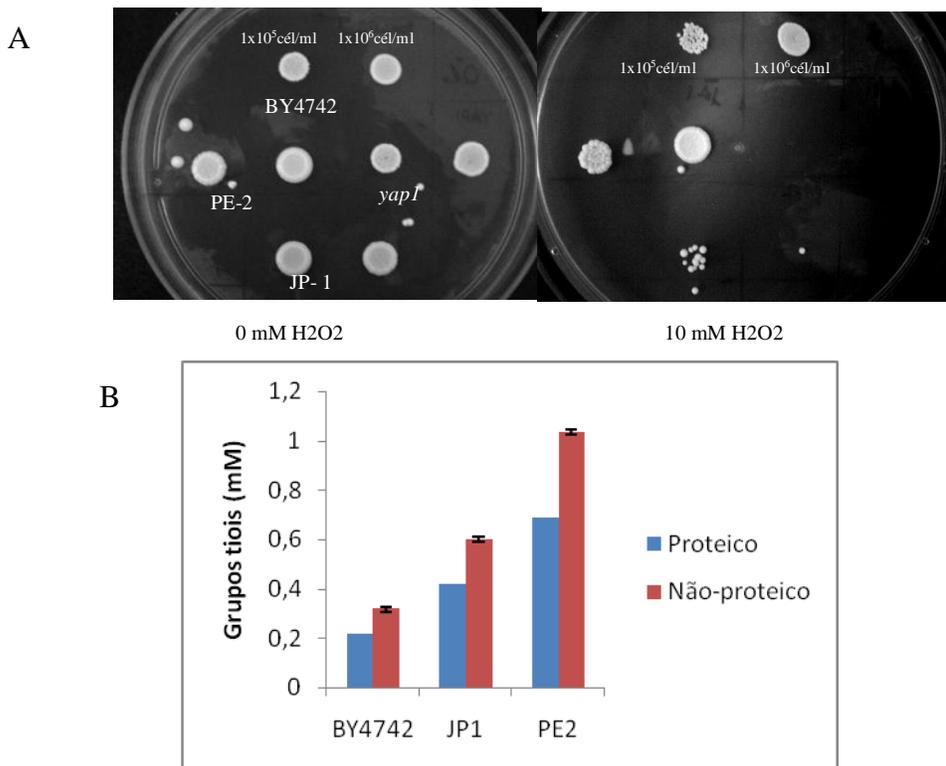
um novo mecanismo de regulação mediado por Yap1p deve atuar na resistência celular a este composto.



**Figura 13.** Concentração relativa de grupos tióis livres em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Linhagens parental BY4742 e o mutante *yap1* submetidos ao tratamento com PHMB e peróxido de hidrogênio foram avaliadas pelo método do DTNB para avaliar estado redox intracelular.

Os dados anteriores revelam que a linhagem JP1 é mais resistente ao PHMB do que a PE-2. Se o PHMB atuasse como gerador de ROS, se esperaria obter um padrão similar de sensibilidade destas leveduras frente ao agente peróxido de hidrogênio. Para verificar esta hipótese, foram realizados experimentos de sensibilidade comparando-se as linhagens JP1, PE-2, BY4742 e *yap1* em placas contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 14). A linhagem mutante *YAP1* é altamente sensível aos efeitos tóxicos deste agente, enquanto que a linhagem JP1 é mais sensível do que a linhagem PE-2, resultado contrário ao observado para PHMB (Figura 14). Esta sensibilidade é devida, em parte, a menor produção de grupamentos tióis nas células de *S. cerevisiae*. Portanto, a maior resistência da linhagem JP1 ao PHMB, sua maior sensibilidade ao peróxido de hidrogênio

e menor produção de grupos tióis livres comprova definitivamente que, ao contrário do que se observou para *Acantamoeba*, o PHMB não deve produzir lesões oxidantes nas células de levedura.



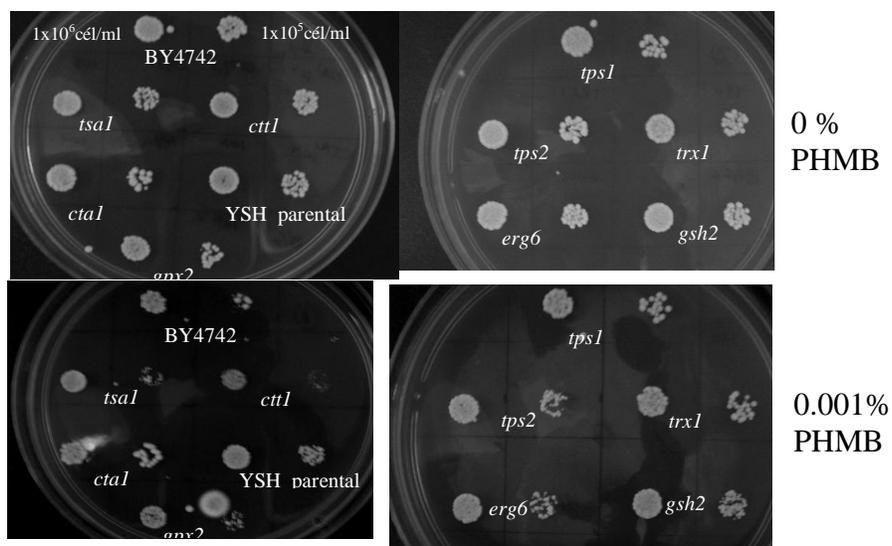
**Figura 14.** Ensaio em placa de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio das linhagens *S. cerevisiae* JP1, PE-2, BY4741 e o mutante *yap1*. As células foram cultivadas em meio YPD até a fase exponencial de crescimento e semeadas nas placas contendo ou não H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), e também foram testadas para a concentração intracelular de grupamentos tióis livres protéicos e não-protéicos(B).

Para verificar a hipótese de que PHMB não atua gerando estresse oxidativo, linhagens mutantes de genes envolvidos na resistência à ROS foram cultivados em meio YPD líquido e coletadas em fase exponencial de crescimento. Suspensões celulares foram gojetadas em placas de meio YPD contendo ou não PHMB e incubadas por 72 h a 30°C (Tabela 2; Figura 15). Os resultados confirmam que o PHMB não gera estresse oxidativo dependente do mecanismo regulado por Yap1p já que as linhagens com mutações em genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo não apresentaram sensibilidade a este composto (Tabela 2; Figura 15), embora tenha sido confirmada a participação da proteína Yap1p na resistência celular a este composto

(Tabela 2; Figura 14). Entretanto, os mutantes para os genes *ctl1*, que codifica a catalase citosólica, e *tsa1*, que codifica a tiorredoxina redutase envolvida no reciclo de tiorredoxina utilizada para corrigir danos oxidativos, apresentaram leve redução no crescimento celular na presença de PHMB (Tabela 2; Figura 15), indicando a participação dessas proteínas em algum mecanismo envolvido na resistência ao PHMB.

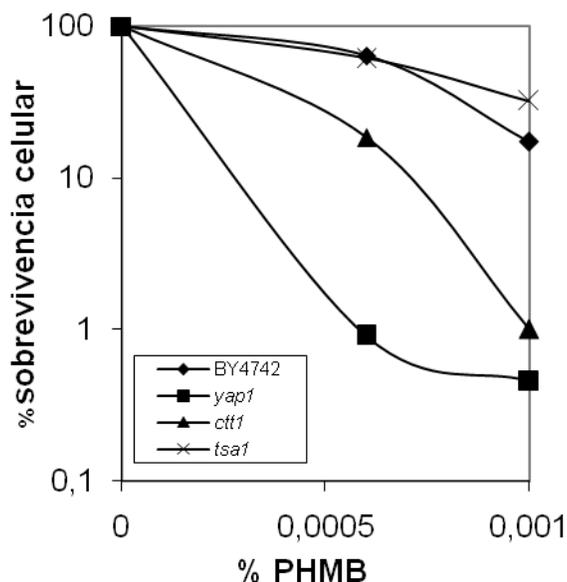
**Tabela 2.** Sensibilidade de linhagens com deleções em genes envolvidos com a resposta a estresse oxidativo em *S. cerevisiae*. S: sim; N: não; I: intermediário. As linhas em negrito correspondem ao parental haplóide das linhagens mutantes

Linhagem	Função do gene	Sensibilidade ao PHMB
<b>BY4742</b>	<b>Parental</b>	N
<i>yap1</i>	Regulador transcricional	S
<i>tsa1</i>	Tiorredoxina peroxidase	I
<i>cta1</i>	Catalase mitocondrial	N
<i>ctl1</i>	Catalase citosólica	I
<b>YSH6.127.1C</b>	<b>Parental</b>	N
<i>tps1</i>	Subunidade sintase do complexo trealose-6-fosfato sintase-fosfatase	N
<i>tps2</i>	Subunidade fosfatase do complexo trealose-6-fosfato sintase-fosfatase	N
<i>gsh2</i>	Glutationa sintetase	N
<i>erg6</i>	Delta(24)-esterol C-metiltransferase	N
<i>trx1</i>	Tiorredoxina citoplasmática	N
<i>gpx2</i>	Glutationa peroxidase	N



**Figura 15.** Ensaio de sensibilidade de linhagens parentais e mutantes de *S. cerevisiae* ao PHMB. 5ul de uma suspensão celular de  $1 \times 10^6$  cel/ml (direita) e  $1 \times 10^5$  cel/ml (izquierda) das linhagens *tsa1*, *ctl1*, *cta1*, *gpx*, *tps1*, *tps2*, *trx1*, *erg6* e *gsh2* foram gotejadas em placas com YPD contendo 0.001% PHMB a temperatura ambiente por 72 horas. Panel superior: 0% PHMB, panel inferior, 0.001% PHMB.

Para validar estes resultados, foram realizados ensaios de citotoxicidade com os mutantes *yap1*, *tsa1* e *ctl1*. Este ensaio permite saber como o composto atua produzindo morte celular (fungicida), enquanto o ensaio em placa permite obter um resultado de como o composto atua impedindo o crescimento celular (fungistático). O efeito é muito mais pronunciado nos mutantes *yap1* e *ctl1* com relação aos parentais e ao mutante *tsa1*, demonstrando que o gene *ctl1* também está envolvido na resposta ao PHMB e que o gene *tsa1* não estaria implicado na resistência (Figura 16).

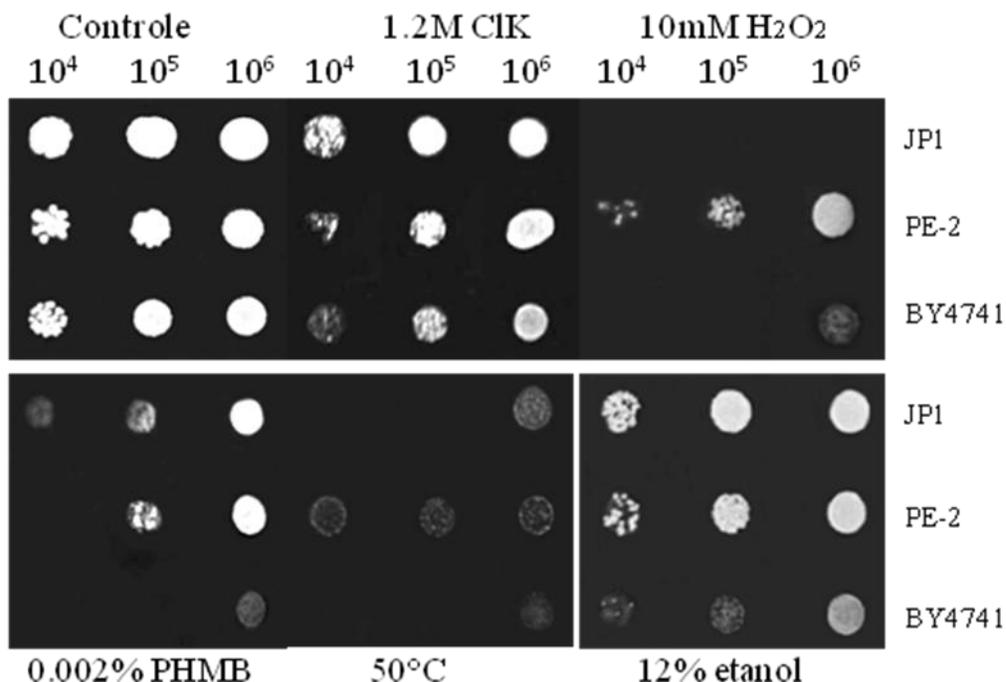


**Figura 16:** Ensaio de sensibilidade celular ao PHMB de diferentes linhagens *S. cerevisiae* cultivadas até a fase exponencial de crescimento em meio YPD.

### 4.3 Resistência de linhagens de *S. cerevisiae* a diferentes formas de estresse

Células das linhagens JP1, PE-2 e BY4741 em fase exponencial de crescimento foram testadas para diferentes formas de estresses com o objetivo de relacioná-los com os efeitos do PHMB. Foram testados estresse osmótico (KCl a 1,2 M), etanólico (etanol a 12%), oxidativo ( $H_2O_2$  a 10 mM), térmico ( $50^\circ C$ ), além do tratamento com PHMB a 0,002%. Os resultados mostraram que a linhagem JP1, mais resistente ao PHMB do que PE-2, também mostrou maior resistência ao

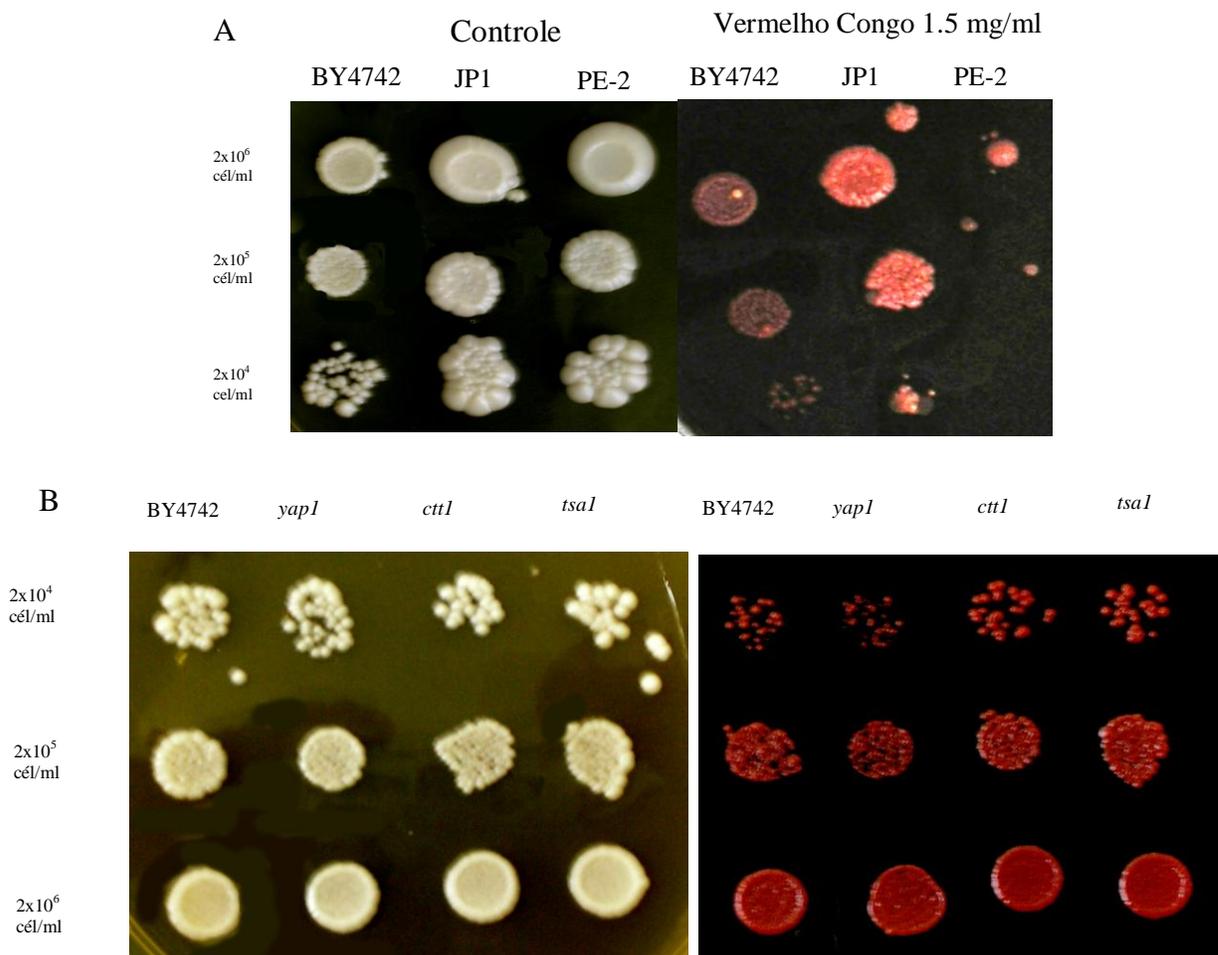
estresse osmótico causado por KCl e ao estresse etanólico (Figura 17). Por outro lado, a linhagem PE-2, que é mais resistente a estresse oxidativo, também apresentou maior resistência a choque térmico (Figura 17). Isto sugere que o mecanismo de resistência celular a PHMB deve estar relacionado com mecanismo de resistência a choque osmótico.



**Figura 17.** Ensaio de sensibilidade celular em placa. A resistência das linhagens *S. cerevisiae* JP1, PE-2 e BY4742 cultivadas em meio YPD até a fase exponencial de crescimento foram submetidas e avaliadas frente diferentes tipos de estresse.

Para testar o efeito perturbador na superfície celular foram realizados experimentos em placa com o composto vermelho Congo, um corante biológico que atua desestabilizando a malha de  $\beta$ -1,3-glucanos da parede celular. As células da linhagem JP1 apresentaram maior resistência a este composto, seguido da linhagem de laboratório BY4741. A cepa mais sensível foi a PE-2 (Figura 18). Levando em conta o perfil de sensibilidade das linhagens em relação a PHMB, conclui-se que o modo de ação do PHMB apresenta similaridade com Vermelho Congo. A linhagem mutante *yap1* apresentou-se mais sensível do que os outros mutantes e do que a linhagem parental, corroborando os resultados apresentados por Bourdineaud e col (2000) que sugeriram que o gene *YAP1* atuaria na regulação da síntese ou manutenção apropriada da capa  $\beta$ -

1,3-glucano da parede celular de *S. cerevisiae*. Isto indica que o PHMB deve atuar desestabilizando esta estrutura da parede celular, causando aumento da pressão osmótica. Portanto, os mecanismos de resposta ao PHMB em *S. cerevisiae* devem incluir as respostas das vias CWI, HOG e o gene *YAP1*, que atuam em conjunto para manter a integridade da superfície (membrana+p parede) celular.



**Figura 18.** Ensaio de sensibilidade ao Vermelho Congo. Linhagens *S. cerevisiae* JP1, PE-2, BY4742 (painel A), BY4742, *yap1*, *ctt1* e *tsal* (painel B) em suspensões de  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$  e  $2 \times 10^4$  cel/ml foram gotejadas e crescidas em placas de YPD contendo o corante biológico vermelho Congo (1,5 mg/ml).

#### 4.4 Expressão de genes relacionados com a integridade da parede celular nas linhagens industriais JP1 e PE-2.

Com o objetivo de identificar os genes que estão afetados pela presença do PHMB, e determinar quais poderiam ser relacionados com o fenótipo resistente, analisou-se a expressão gênica de

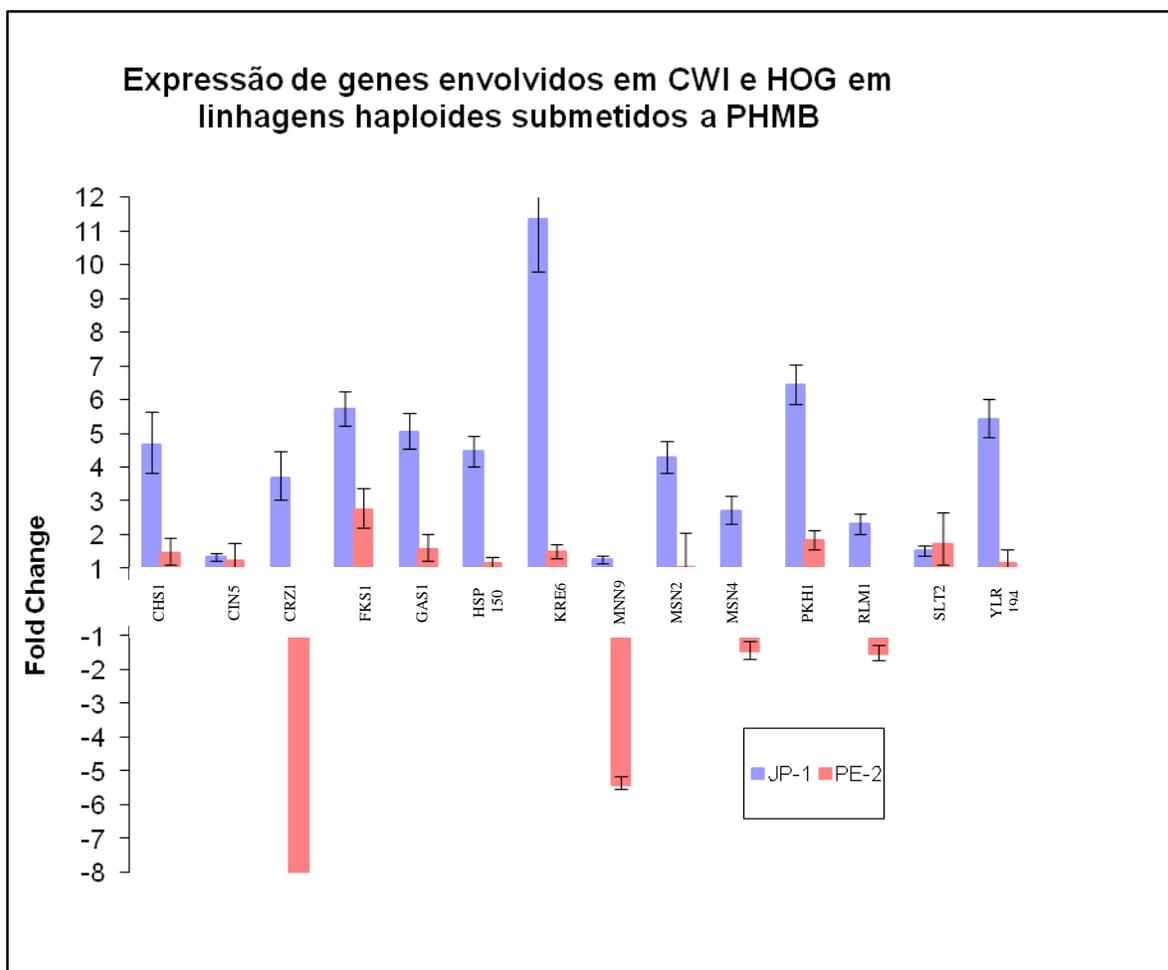
genes relacionados à manutenção da integridade da parede celular por meio da técnica de PCR em tempo real. As linhagens JP1 (resistente) e PE-2 (sensível) foram tratadas como descrito em Material e Métodos.. Os genes testados estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Genes de *S. cerevisiae* testados para expressão na presença de PHMB.

Gene	Função biológica
<i>MSN2</i>	Ativador transcripcional ativado em condições de estresse que induz a expressão de genes de resposta geral a estresse.
<i>MSN4</i>	Ativador transcripcional ativado em condições de estresse que induz a expressão de genes de resposta geral a estresse.
<i>CRZ1</i>	Fator de transcrição envolvido em resposta a estresse, regulado pela via da calcineurina mediante fosforilação.
<i>FKS1</i>	Subunidade catalítica de B-1,3-D-glucan sintase, funcionalmente redundante com o gene <i>GSC2</i> , se une a subunidade regulatória Rho1p.
<i>CHS1</i>	Quitina sintase I que transfere N-acetil glicosamine (GlcNAc) a quitina
<i>RML1</i>	Fator de transcrição MADS-box, fosforilado pela MAP quinase <i>SLT2p</i>
<i>SLT2</i>	MAP quinase da via CWI, regulada por Pkc1p
<i>YLR194c</i>	Constituinte estrutural da parede celular ancorada na membrana plasmática e sua expressão é aumentada sobre estresse celular. Sua função biológica ainda não foi definida.
<i>CIN5</i>	Fator transcricional da família YAP, media resistência pleiotrópica a drogas e se localiza constitutivamente no núcleo, substituindo a proteína <i>YAP1p</i> .
<i>KRE6</i>	Proteína requerida para síntese B-1,6 glucanos
<i>MNN9</i>	Subunidade do complexo mannosiltransferase que alonga o esqueleto de mannosilpolisacarídeos
<i>GAS1</i>	B-1,3-glucanosiltransferase, requerida para a formação da parede celular, localizada na superfície celular via glicosil fosfatidil inositol (GPI)
<i>HSP150</i>	Proteína de resposta a choque térmico que é O-mannosilada, secretada e covalentemente ligada á parede celular via B-1,3-glucano e pontes dissulfeto. Requerida para a manutenção da parede celular; e induzida por diferentes formas de estresse e por limitação de nutrientes
<i>PKH1</i>	Proteína quinase envolvida na via de sinalização mediada por esfingolipídios que controla endocitose, ativada por componentes da cascata da manutenção da parede celular

Os resultados mostraram que os genes *CHS1*, *CRZ1*, *FKS1*, *GAS1*, *HSP150*, *KRE6*, *PKH1* e *YLR194c* foram mais expressos em JP1 do que em PE-2. *CHS1*, *CRZ1*, *FKS1*, *GAS1*, *HSP150*,

*PKH1* e *YLR194c* apresentaram induções de 4 vezes em JP-1 com relação a PE-2, e *KRE6* está induzido 10 vezes. Todos estes genes estão envolvidos com a integridade e/ou manutenção da parede celular, revelando que PHMB exerce uma resposta molecular envolvida com o reforço na camada exterior para afrontar o dano que o antifúngico gera na parede celular. Um resultado muito relevante foi o fato de que o gene *KRE6* está 10 vezes mais expresso em JP1 do que em PE-2. Recentemente foi mostrado que células do mutante *pkc1*, deficiente na organização da parede celular, recuperam o fenótipo normal quando o gene *KRE6* é superexpresso (Levin, 2005). A proteína Kre6p é atua como sintetase de  $\beta$ -1,6-gucanos, ligação que une as proteínas glicosiladas de parede à capa de  $\beta$ -1,6-gucanos; mutações que inativam o gene *KRE6* causam redução de 50% na síntese da rede de  $\beta$ -1,6 glucanos na parede (Kapteyn e col, 1999). Este gene poderia ser chave para explicar a diferença na resistência ao PHMB das duas linhagens.

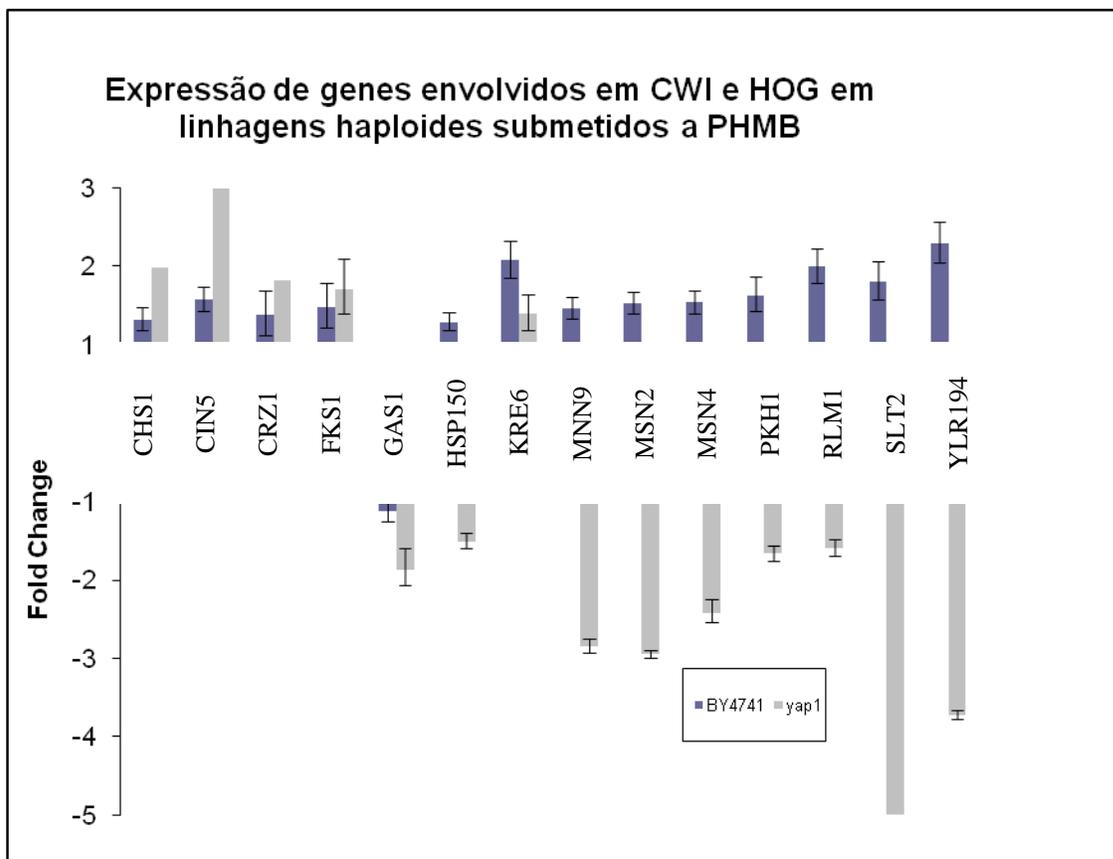


**Figura 19.** Padrão de expressão de genes envolvidos com a via de integridade da parede celular em *S. cerevisiae* nas linhagens JP1 e PE-2 em resposta ao PHMB. Culturas das linhagens PE-2 e JP-1 foram submetidos a 0,001% PHMB por uma hora, coletadas em nitrogênio líquido e logo processadas para a extração de RNA total e posterior síntese de

cDNA. Amplificaram-se genes da via CWI por meio de RT-qPCR, os níveis relativos de transcrito foram calculados pelo método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  sendo a condição controle a linhagem crescida em ausência do antifúngico.

#### 4.5 *YAP1* regula positivamente alguns genes envolvidos em CWI

Os testes de citotoxicidade mostraram que o gene *YAP1* está envolvido na resistência ao PHMB. Há evidências que mostram que este gene poderia exercer uma função na integridade celular frente ao vermelho Congo. Para determinar se Yap1p regula alguns dos genes testados, os níveis de transcritos dos genes da via CWI foram determinados em células das linhagens parental BY4741 e mutante *yap1* submetidos ao PHMB (Figura 14). Os genes *GAS1*, *HSP150*, *MNN9*, *MSN2*, *MSN4*, *RLM1*, *SLT2*, *PKH1* e *YLR194* estão reprimidos no mutante *yap1* submetido ao PHMB. Estes genes apresentam níveis normais no parental. Os genes *KRE6*, *SLT2*, *RLM1* e *YLR194c* apresentam uma leve indução na linhagem parental, sugerindo que estes genes seriam necessários para resistir ao PHMB.



**Figura 20.** Padrão de expressão de genes envolvidos com a via de integridade da parede celular em *S. cerevisiae* após a incubação com PHMB. Culturas das linhagens BY4742 e *yap1* foram submetidos a 0,0005% PHMB por uma hora, coletadas em nitrogênio líquido e logo processadas para a extração de RNA total e posterior síntese de cDNA.

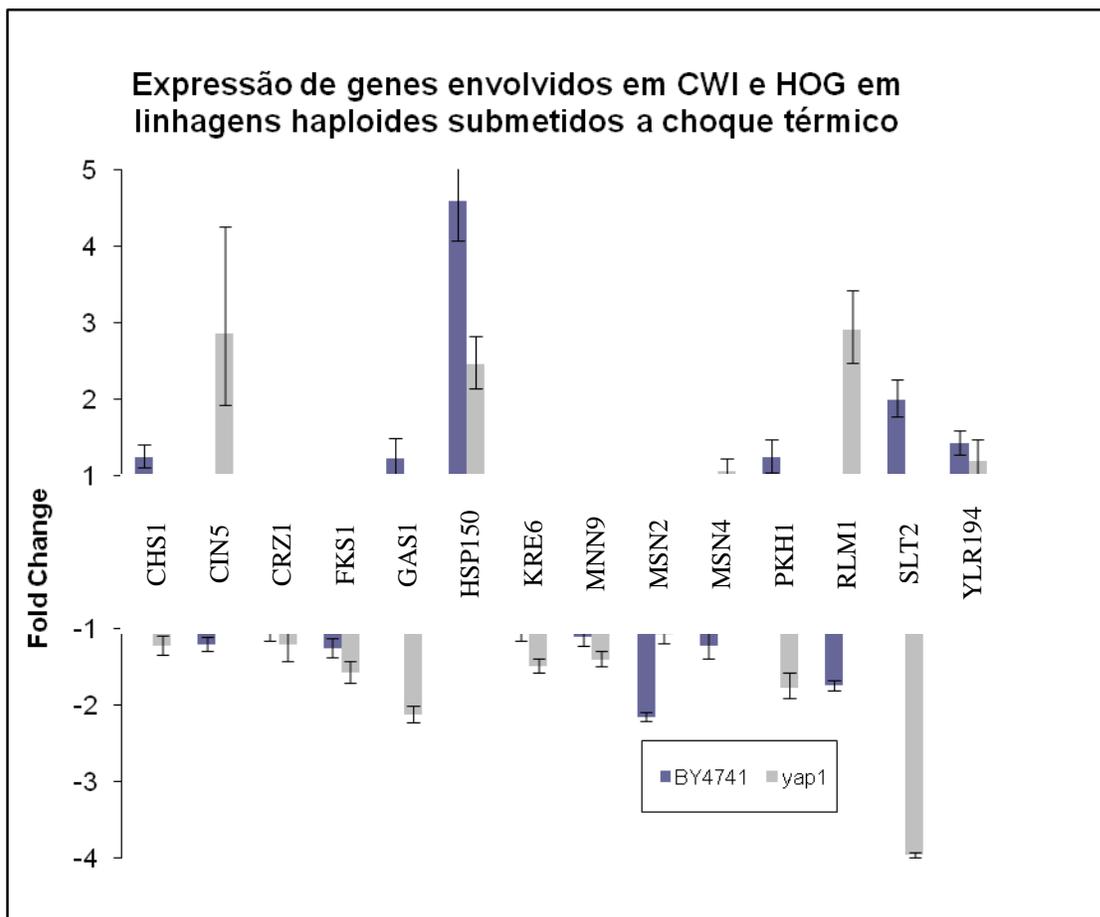
Amplificaram-se genes da via CWI por meio de RT-qPCR, os níveis relativos de transcrito foram calculados pelo método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  sendo a condição controle a linhagem crescida em ausência do antifúngico.

Sob o objetivo de verificar se os genes envolvidos em resposta a PHMB dependentes de *YAP1* se comportam de forma similar com choque térmico, as linhagens BY4741 e *yap1* foram testadas para a expressão destes genes em resposta a choque térmico por incubação por uma hora a 42°C (Figura 21). Os genes *GAS1*, *HSP150*, *KRE6*, *PKH1* e *SLT2* parecem serem regulados positivamente, ao menos em parte, pela proteína *YAP1* em células submetidas ao tratamento térmico. O gene *RLM1*, ao contrario do que acontece com PHMB, apresentou-se negativamente regulado por Yap1p após tratamento térmico. Talvez algum outro gene regulado por Yap1p durante a resposta a choque térmico atue como repressor de *RLM1* nesta condição. O gene *HSP150* apresentou indução pelo tratamento, validando desta forma os resultados do experimento. A expressão deste gene parece ser controlado em parte por Yap1p. O gene *CIN5*, também chamado *YAP4*, é um fator de transcrição da família YAP. Nas duas condições PHMB (figura 20) e choque térmico (figura 21), este gene apresentou indução na linhagem mutante *yap1*. Estes genes apresentam certa redundância e este aumento poderia dever-se a um mecanismo compensatório da célula ante a ausência do gene *YAP1*, expressando então o gene *CIN5/YAP4* para exercer as funções de *YAP1*.

#### 4.6 Genes pertencentes a CWI e HOG estão envolvidos com a resistência a PHMB.

A hipótese de que o PHMB gera estresse na parede celular foi testada pela análise da sensibilidade de mutantes da via de manutenção da parede celular ao PHMB. Culturas mutantes em fase logarítmica foram gotejadas em placas com YPD contendo 0.002% e 0.003% para determinar suas sensibilidades. As linhagens mutantes testadas foram: *hog1*, *mid1*, *wsc2*, *slg1*, *mkk2*, *slt2*, *skn7*, *swi6*, *mkk1*, *mid2*, *hsp150*, *rom2*, *ste11*, *rlm1*, *wsc3*, *bsk1*, *crz1*, *gsc2*, *pbs2*, *tps1*, *swi4* e *swi6*. Os genes cujas mutações promovem sensibilidade ao PHMB listados na Tabela 4. Os mutantes correspondentes foram testados por ensaio em placa para sensibilidade ao PHMB (Figura 22). Os resultados mostraram que os mutantes *rom2*, *swi6* e *slt2* apresentaram a maior sensibilidade ao PHMB, mostrando que estes três genes são importantes para conferir resistência aos efeitos do PHMB durante o crescimento celular.



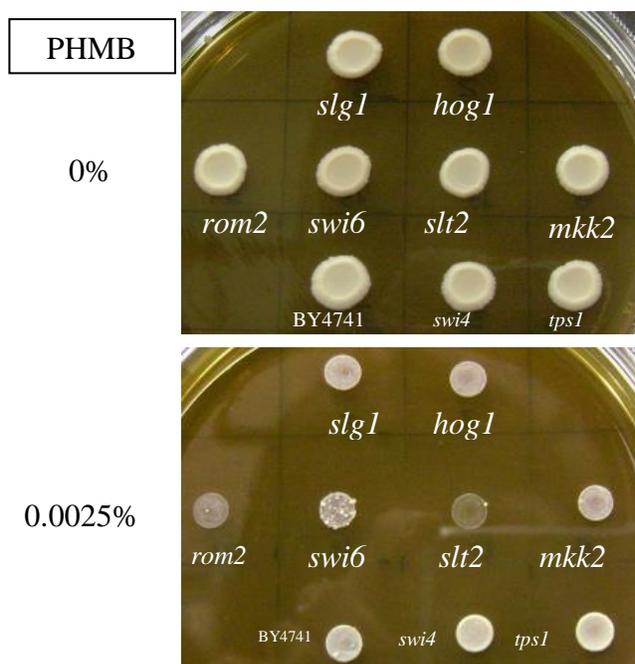


**Figura 21.** Padrão de expressão de genes envolvidos com a via de integridade da parede celular em *S. cerevisiae* após choque térmico. Culturas das linhagens BY4742 e *yap1* foram submetidos à incubação a 42°C por uma hora, coletadas em nitrogênio líquido e logo processadas para a extração de RNA total e posterior síntese de cDNA. Amplificaram-se genes da via CWI por meio de RT-qPCR, os níveis relativos de transcrito foram calculados pelo método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  sendo a condição controle a linhagem crescida a 30°C.

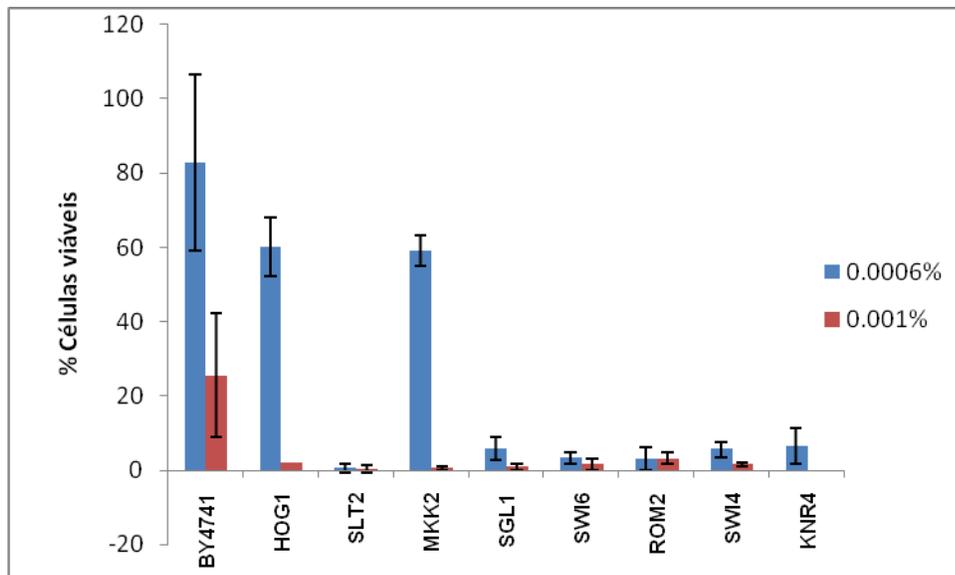
**Tabela 4** Genes envolvidos na manutenção e integridade do envelope celular em *S. cerevisiae* cujos mutantes foram testados para sensibilidade ao PHMB.

Gene mutado	Função
<i>hog1</i>	Proteína quinase ativada por estresse osmótico
<i>slg1</i>	Sensor da rota de manutenção da parede celular
<i>mkk2</i>	Proteína quinase quinase envolvida em integridade da parede
<i>slt2</i>	Proteína quinase quinase quinase envolvida em manutenção da parede
<i>swi6</i>	Cofator do fator de transcrição SBF
<i>rom2</i>	Proteína de intercambio GTP/GDP
<i>tps1</i>	Sintase da trealose-6-fosfato
<i>swi4</i>	Cofator do fator de transcrição SBF

Para constatar a ação fungicida do PHMB sobre os mutantes, realizou-se um ensaio de citotoxicidade submetendo células de cada linhagem que amostraram sensibilidade a PHMB em meio líquido e posteriormente se realizou a contagem de colônias sobreviventes (Figura 23). Neste ensaio se testou também o crescimento do mutante  $\Delta knr4$ . Este gene é interessante neste contexto porque é responsável de coordenar a progressão do ciclo celular com a síntese da parede celular (Kubota e col, 2004). Todas as linhagens apresentaram maior sensibilidade em relação ao parental, com diferentes intensidades. O mutante  $\Delta slt2$  apresentou o efeito mais pronunciado, enquanto *hog1* e *mkk2* aparecem afetados nas concentrações mais altas. Os mutantes  $\Delta slt2$ ,  $\Delta swi4$ ,  $\Delta swi6$ ,  $\Delta slg1$ ,  $\Delta rom2$  e  $\Delta knr4$  apresentaram intensa redução no crescimento celular, confirmando que estes genes estão completamente envolvidos na resposta celular ao PHMB. Um dado interessante é o fato de  $\Delta slt2$  ser extremamente sensível, mas o gene *SLT2* não é induzido com a presença do antifúngico (Figura 19 ,20 e 21). Estes resultados sugerem que a proteína *Slt2p* é necessária para a resistência ao PHMB e que sua regulação deve se dar mais ao nível pós-traducional em resposta a esse estresse. A proteína *Slg1* é o principal e mais descrito sensor da via CWI na literatura. Os resultados mostraram que dentre as linhagens mutantes para os genes codificantes de sensores,  $\Delta slg1$  é o único que apresentou sensibilidade aos efeitos tóxicos do PHMB.



**Figura 22.** Ensaio de sensibilidade em placa dos mutantes da via CWI e HOG1. Linhagens mutantes *S. cerevisiae* e o correspondente parental foram crescidas em YPD líquido, coletadas em fase logarítmica, lavadas em NaCl 0.85%, resuspendidas em buffer fosfato de potássio 0.1M pH7 ate atingir uma concentração de  $2 \times 10^6$  cel/ml, e posteriormente diluídas 1/10. Cada linhagem esta identificado com o nome do gene mutado e os parentais com a linhagem. A suspensão foi gojetada à em placas contendo YPD em ausência ou 0.0025% PHMB. As placas foram crescidas a temperatura ambiente por 72 horas.



**Figura 23.** Ensaio de citotoxicidade do PHMB nos mutantes das vias CWI: *slt2*, *mkk2*, *slg1*, *swi6*, *rom2* e *swi4*; no parental BY4741; e nos mutantes *hog1* e *knr4*. Células em fase exponencial foram submetidas 0.0006% e 0.001% PHMB por meia hora e logo semeadas em placas YPD. As colônias foram contabilizadas e a porcentagem de células sobreviventes calculadas.

## 5. DISCUSSÃO

De modo geral as células de levedura foram mais resistentes ao PHMB quando na fase exponencial de crescimento (Fig 12). A parede celular estreita é característica de células em fase estacionária, com maior resistência a digestão por glucosidase, zimolase e glucanase. (Klis, 2006; Werner-Washburne, 1993). Parte desta resistência se deve a mudanças na estrutura das mannoproteínas, as quais se localizam ao redor da matriz de glucanos. O número de pontes dissulfeto na parede celular incrementa seis vezes quando as células entram na fase estacionária de crescimento, os perfis protéicos mudam radicalmente, e a largura da parede e a porosidade relativa celular são menores. Estas características da fase estacionária fazem que o acesso das enzimas aos polissacarídeos seja menos efetiva, e que as células apresentem mais resistência a vários estresse (Werner-Washburne, 1993). As modificações que sofre a parede celular das leveduras quando atravessam a fase dióxica de crescimento (mudança do estado respiratório para o estado respiratório), promove alterações na constituição do envelope celular que induzem ao aumento da resistência celular a diferentes condições ambientais (Klis, 2006). No caso do PHMB, a diferença de sensibilidades nas duas etapas de crescimento da levedura mais resistente JP1 é aguda, e surpreendentemente as três linhagens apresentam mais resistência na fase exponencial. O PHMB causa a formação de domínios de fosfolípidos ácidos na membrana citoplasmática e altera sua permeabilidade. A sequência de eventos durante sua ação na interação com o envoltório celular de *E. coli* consiste na sua rápida atração pela carga negativa da superfície celular e absorção específica a componentes contendo fosfatos, quebra da integridade da membrana externa, ligação com os fosfolípidos da membrana interna, e aumento da permeabilidade da membrana produzindo bacteriostases. Após a quebra total da integridade da membrana se produzem precipitações dos constituintes intracelulares, conduzindo ao efeito bacteriocida (McDonnell and Russell, 1999). O estresse que coincide com o perfil obtido em células expostas a PHMB é o gerado por etanol 12 % (figura 17). Coincidentemente, a resistência a etanol tem se relacionado com composição lipoprotéica da membrana celular, aumentando a proporção de ácidos graxos insaturados da membrana celular (You e col, 2003), conferindo a capacidade de impedir a fluidização e desestruturação da membrana (Chi and Arneborg, 1999). A importante vantagem desta fase poderia estar relacionada com diferenças na ordem de envelope celular, talvez na composição relativa dos lipídeos que formam a membrana reduzindo a capacidade de adsorção do composto; e/ou de polímeros específicos na parede celular que

dificultariam a entrada do PHMB à célula. Células das linhagens pré-tratadas com trealose antes de serem submetidas a PHMB mostraram uma diminuição taxa de morte que células não tratadas (Elsztein e col, 2008) . A trealose, amplamente descrita na literatura como molécula protetiva sintetizada por organismos eucariotas para afrontar diversos estresses, também protege as leveduras contra o estresse etanólico (Ding e col, 2009). O dissacarídeo toma o lugar da água e do etanol nas membranas celulares e forma pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila da trealose e os grupos polares dos lipídeos, estabilizando desta forma a membrana (Ding e col, 2009). O estresse gerado por etanol e o dano provocado por PHMB estão relacionados por terem como alvo o envelope celular, e o efeito protetivo da trealose é gerado na membrana celular, portanto estes resultados com trealose estão em concordância pela forma de ação destes compostos.

As linhagens de *S. cerevisiae* JP1 e PE-2 são leveduras poliplóides isoladas de diferentes destilarias de álcool no Brasil, cada uma delas apresentando diferenças importantes enquanto perfis genéticos, eficiência na produção de etanol e resistência a estresse. A figura 20 mostra que a causa da maior resistência de JP1 em relação a PE-2 poderia se dever em grande parte a maior expressão de genes relacionados com a manutenção da parede celular, principalmente o gene *KRE6* cujo produto é uma sintetase do polímero  $\beta$ -1,6-glucano da parede celular. A comparação dos efeitos de PHMB em células intactas e em esferoplastos demonstra que o envelope celular não produz proteção completa, mas atua razoavelmente como barreira de exclusão. A remoção de lipo-polisacarídeos da membrana externa incrementa significativamente a atividade biocida das frações de alto peso molecular de PHMB, porém as frações menores não mostram diferencia (Gilbert e col 1990). A porosidade relativa das paredes celulares, a composição de glucanos e a espessura da parede celular de *S. cerevisiae* determinam a sensibilidade frente à biguanida Clorhexidina (Hiom, 1996). Levando em conta nossos resultados, a hipótese sobre a resistência ao PHMB destas linhagens estaria relacionado com o reforço na quantidade de  $\beta$ -1,6-glucanos na levedura industrial resistente como produto da indução dos genes envolvidos na síntese manutenção da integridade da parede celular. Portanto, postulamos que o envelope celular atua de barreira efetiva contra o composto na linhagem JP1, e que em grande parte a sensibilidade que apresenta PE-2 se deve a os genes envolvidos na cascata não apresentam grandes variações na expressão e em conseqüência a parede celular não é reforçada.

A função biológica dos genes envolvidos no mecanismo CWI, cujos genes apresentaram modificação na expressão pela exposição ao PHMB é apresentada a seguir. A proteína Hsp150p se localiza na parede celular e é secretada para o meio em resposta a choque térmico ou osmótico. O gene é super-expresso em condições de choque térmico, estresse oxidativo, limitação de nitrogênio, presença de alumínio e quando a parede celular possui baixos níveis de  $\beta$ -1,6-glucanos (Kapteyn e col, 1999). O gene *CHS1* codifica a quitina sintase 1 que se localiza na membrana plasmática. Esta enzima atua como reparadora preenchendo a perda de quitina pela ação excessiva da quitinase que facilita a separação celular degradando parte do *septum* formado durante a divisão celular (Cabib e col, 1993). Crz1p é um fator de transcrição tipo zinc finger dependente de calcineurina que se une ao promotor do gene *FKS2* (que codifica uma  $\beta$ -1,3-glucano sintase) em resposta a calcofluor, e também ao promotor do gene *CHS1* em resposta a cálcio (Lesage e Bussey, 2006). O produto do gene *GAS1* atua alongando a capa de  $\beta$ -1,3-glucano remodelando a parede celular e se localiza na membrana plasmática. Sua expressão é dependente do fator de transcrição SBF, do qual fazem parte as proteínas Swi4p e Swi6p (Lesage e Bussey, 2006). O gene *FKS1* é controlado pela proteína Rlm1p e codifica uma  $\beta$ -1,3-glucano sintase, se localiza na parede e os picos de expressão do gene coincidem com os do gene *GAS1* (Lesage e Bussey, 2006). O gene *PKH1* codifica para uma proteína quinasa dependente de fosfoinositol. Possui funções sobrepostas com seu par *PKH2*, estando envolvidos com a manutenção da parede celular. Estas proteínas fosforilam e ativam Pkc1p (CWI) (Levin, 2005). Os produtos dos genes *FKS1*, *HSP150*, *YLR194*, *PKH1* e *CHS1* se localizam na membrana ou na parede celular e estão envolvidos com a manutenção e remodelamento do envelope celular em resposta à mudanças no ambiente. Estes genes estão superexpressos nas células da linhagem JP1 quando tratadas com PHMB. Em boa parte, a maior resistência de JP1 poderia dever-se a composição mais favorável do envelope celular e a maior capacidade de resposta aos danos causados pelo PHMB. O padrão de baixa expressão destes genes explica em boa parte a sensibilidade da linhagem PE-2 ao PHMB.

Dentre os possíveis receptores do sinal testados, verificou-se Slg1p (Wsc1p) seria o sensor que recebe o sinal (Figura 22). O mutante  $\Delta rom2$  mostrou grande sensibilidade ao PHMB (Figura 22), o que mostra que o sinal da ação do PHMB deve ser transduzido pela via PKC. A literatura descreve os genes *ROM1/ROM2* como redundantes, mas neste caso parece que apenas *ROM2* seria necessário para a resistência ao PHMB. Também foi observado que do par de parálogos

*MKK1* e *MKK2*, que codificam a segunda quinase da via PKC (MAPKK), apenas o segundo parece ser responsável pela transdução desse sinal induzido por PHMB. *Mkk2p* é uma MAPKK cuja função é redundante com *Mkk1p*. O efeito mais leve observado para este mutante poderia se dever à compensação das funções destes genes. *Slr2p* é a MAPK chave da via CWI, indicando que esta via seria a principal efetora da resistência a PHMB. Já a proteína *Slg1p* seria o sensor principal da perturbação por PHMB e talvez o fator de transcrição SBF formado por *Swi4p* e *Swi6p* seja crucial na expressão de genes diretamente envolvidos com a resistência a PHMB. Estes dados definitivamente mostram que o PHMB atua gerando danos na parede celular, que devem ser reparados pelas vias PKC e HOG. E finalmente, foi observado que o gene *SLT2* tem papel fundamental na resistência ao PHMB, tanto pela sua superexpressão nas células tratadas com o biocida como pela grande sensibilidade de seu mutante. Estes fatos posicionam o gene *SLT2* como componente chave no mecanismo de resistência celular ao PHMB.

A figura 24 mostra as inter-relações entre os genes envolvidos na resposta a PHMB. De acordo com nossa hipótese, o produto do gene *YAPI* seria um regulador da via CWI na resposta a PHMB. O biocida dispararia a resposta pelo mecanismo CWI transduzido para via PKC. Nesse contexto, *Yap1p* regularia de maneira direta ou indireta a expressão de *SLT2*.

Existem evidências de que a via de sinalização HOG regularia a síntese de *Yap1p* (Nikolaou e col, 2009). Os resultados do presente trabalho mostram que a via HOG também estaria envolvida na resposta e resistência celular ao PHMB. Esta resposta seria consequência da perturbação na parede celular que induziria um sinal semelhante aqueles causados por estresse hiperosmótico. Nós propomos que a via HOG é induzida por PHMB e que esta rota induz a transcrição do gene *YAPI*, que por sua vez comandaria a expressão do gene *SLT2*, e/ou do gene *RLM1* (figuras 20 e 21), cujo produto é um fator de transcrição que induz a expressão do gene *SLT2* (Levin, 2005), em um mecanismo de regulação reversa, e do gene *KRE6* (Lessage e Bussey, 2006), dentre outros envolvidos no mecanismo CWI. O gene *RLM1* também é induzido em presença de PHMB (Figura 20). O mutante *Orlm1* não apresentou sensibilidade ao biocida, talvez por causa de efeitos compensatórios causados por outros fatores de transcrição, como o complexo SBF. É possível que este complexo seja mais importante na resposta gênica ao PHMB já que as linhagens com mutações nos genes *SWI4* e *SWI6* são sensíveis a este composto. Os fatores de transcrição SBF e *Rlm1p* parecem sobrepor seus genes alvos gênicos (Hohmann, 2002), porém neste caso SBF deve comandar a expressão de genes chave para repelir o efeito tóxico que não se encontram

sob a regulação de Rlm1p. Igual e col (1996) mostraram que a proteína Swi4p regula a transcrição do gene *KRE6*. Mais tarde, Lesage e Bussey (2006) mostraram que esse gene também é regulado por Rlm1p. Tendo em conta que este gene é o mais induzido na linhagem resistente JP1 (Figura 19), e que os mutantes dos genes que codificam para as subunidades do fator de transcrição SBF são sensíveis a PHMB (Figura 22), poderia se esperar que o fator de transcrição SBF tenha um papel crucial na resistência ao PHMB. Os genes *HSP150*, *MNN9*, *KRE6*, *PIR1*, *PIR2* (*HSP150*), *PIR3*, *YLR194C* e *SLT2* são regulados por tanto por Rlm1p como por SBF (Hohmann, 2002). O gene *RLM1* se encontra levemente induzido em JP1 (figura 19) e na linhagem haplóide BY4741 (figura 20), mas sua expressão é reprimida frente a choque térmico e essa inibição é dependente do gene *YAP1* (Figura 21), demonstrando que a sobre-expressão de *RLM1* é dependente de *YAP1* e específica desta condição em particular. A análise de expressão gênica sugere que a proteína Yap1 atua como regulador dos genes *PKH1*, cuja proteína é uma quinase dependente de sinais por mudanças nos esfingolipídios de membrana que em conjunto com Pkh2p contribuiria para a integridade da parede por uma via alternativa a CWI (Roelants e col, 2002). Além disso, Yap1p atuaria como regulador da expressão dos genes *HSP150*, *CHS1*, *MSN2*, *MSN4* e *YLR194c*.

Em adição aos dados de expressão gênica, os ensaios de citotoxicidade mostraram que o gene *CTT1* está envolvido na resistência celular ao PHMB. Este gene codifica a catalase citossólica envolvida na resistência a estresse oxidativo, e ainda é expresso em resposta a limitação de nutrientes, baixo pH, exposição a etanol e estresse osmótico (Alexandre e col, 2001; Tamás e col 2000). A região promotora deste gene apresenta o elemento de resposta a estresse STRE (Toone e Jones, 1998). Nossos experimentos confirmaram que a resistência a PHMB depende do gene *CTT1*. Tanto os resultados fisiológicos quanto de expressão gênica sugerem a relação entre os mecanismos de tolerância a etanol e de resistência a PHMB. Por exemplo, os genes *SLT2*, *ROM2* e *SLG1* pertencentes à via CWI foram fundamentais na tolerância a PHMB (Figure 22) e também na tolerância a etanol (van Voorst e col 2006). A proteína Knr4p interatua fisicamente com outras 20 proteínas, dentre elas Slt2p (Stark e col, 2006). Esta interação modula a ativação dos fatores de transcrição SBF e Rlm1p (Martin-Yken e col, 2003), e o mutante *knr4* é hipersensível a estresse por etanol (Yoshikawa e col, 2009). Estes dados estão em total concordância com o fato de que o PHMB atua gerando estresse na parede celular e que o modo de ação apresenta similaridade ao estresse por etanol.

Segundo Bourdineaud e colaboradores (2000), o mutante *yap1* apresenta defeitos na estruturação e manutenção da parede celular. Já que o envelope celular está relacionado com a sensibilidade à biguanidas (Hiom, 1996; Gilbert e col 1990; Broxton e col, 1984), estudamos a possibilidade de que a resistência ao composto esteja relacionada com o mecanismo que mantém a integridade da parede celular (CWI). O gene *CTTI* parece ter outras funções além de atuar no mecanismo de proteção a agentes oxidantes. A transcrição de *CTTI* é ativada pela via de sinalização HOG, e é negativamente regulado por Rlm1p, fator de transcrição que desempenha papel fundamental na regulação dos genes da CWI (Jung and Levin, 1999). A enzima Ctt1p também é importante para a viabilidade celular sob estresse térmico e osmótico (Schüller e col, 1994).

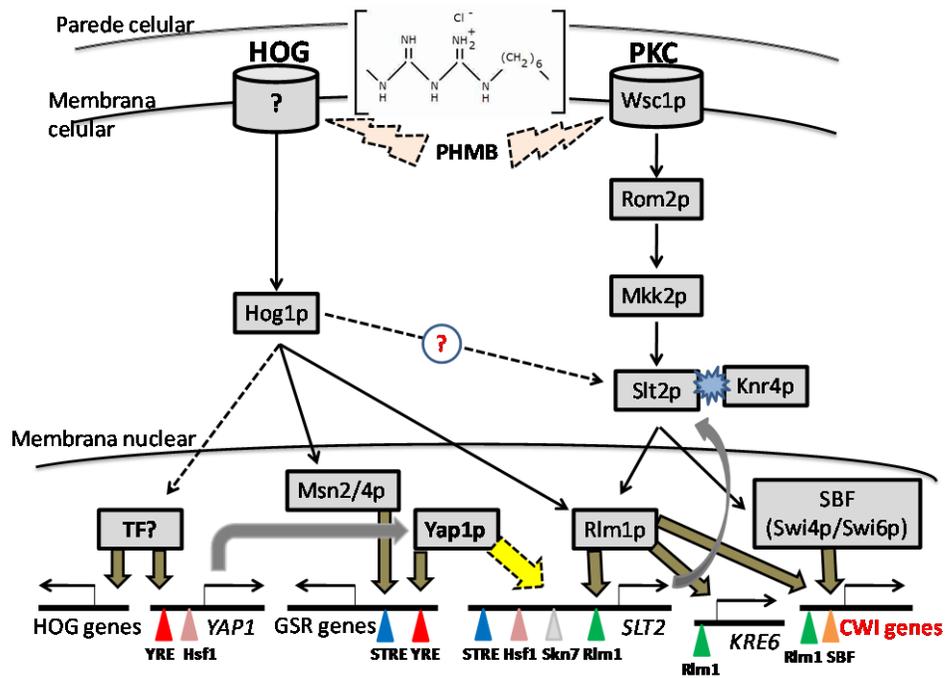
O mutante *hog1* também apresentou sensibilidade a PHMB (figura 22), sugerindo fortemente que a cascata regulatória HOG também é crucial no mecanismo de resistência a este composto. Existem outros trabalhos científicos que apresentam essa interação entre as vias HOG e PKC/CWI na tolerância a zimoliase, uma enzima que hidrolisa a capa  $\beta$ -1,3-glicanos da parede (Saito and Tatebayashi, 2004) e ao cátion metálico Césio, que altera as propriedades do envelope celular (Casagrande e col, 2009). As duas vias são co-reguladas por Cdc37 e Hsp90, proteínas que interatuam formando um complexo com Hog1 e Slt2, controlando a funcionalidade das duas cascatas (Hawle e col, 2007). Existem algumas evidências da função fisiológica da via HOG na biogênese da parede celular sob condições sem estresse: 1) Pbs2p e Hog1p estão envolvidas na regulação da expressão de *EXG1*, uma glucanase presumivelmente envolvida no remodelamento da parede celular, a qual afeta os níveis de  $\beta$ -1,6 glucanos do envelope (Jiang e col, 1995); 2) a sobre-expressão de *PBS2* conduz a alterações na rede de  $\beta$ -1,3 glicanos (Lai e col, 1997); 3) a via HOG é necessária para a localização de Mnn1p, proteína envolvida na mannosilação das proteínas da parede celular no complexo de Golgi (Reynolds e col, 1998). A análise da expressão gênica global de células submetidas a cloreto de potássio revelou que genes que codificam para as proteínas envolvidas no mecanismo CWI, tais como *CWPI*, *SEDI*, *PIR3* e *MLP1* são regulados por Hog1p (O'Rourke e Herskowitz, 2004). Estes resultados apoiam a teoria da função da via HOG na manutenção da parede celular (Rodriguez Peña e col, 2010). Todos estes dados apoiam a ideia de que a resistência a PHMB é co-regulada por CWI e HOG.

Em geral, células expostas a condições de alta osmolaridade respondem aumentando a produção de osmólitos internos, tais como glicerol e trealose. Esta resposta é dependente da ativação do sistema HOG, que está composto por um conjunto de proteínas transdutoras de sinal:

os sensores se localizam na membrana celular, os quais ativam uma cascata fosforilativa que atua com uma série de proteínas quinases. A última dessas quinases é a proteína Hog1p que ao ser fosforilada entra no núcleo e fosforila fatores de transcrição que ativam a transcrição de uma série de genes envolvidos na produção de glicerol, na resposta geral a estresse, dentre outros (Harsen e col 2008). Adicionalmente, a resistência celular ao etanol tem sido relacionada com a composição lipoprotéica da membrana celular a capacidade das células em impedir sua fluidização e desestruturação (Chi e Arneborg, 1999). Esses dados, juntamente com os resultados obtidos com os mutantes *yap1* e *ctl1* indicam que o PHMB atua causando estresse na superfície celular, aumentando a pressão osmótica do meio e impedindo a correta estruturação da parede celular.

Poderia se esperar que no caso do PHMB, que atua no mesmo alvo que os compostos anteriormente mencionados, as duas vias coordenassem a resistência ao biocida. O gene *YAPI* cumpre um papel fundamental nesta resposta, mas surpreendentemente, não da forma convencional, já que este fator de transcrição tipo *zinc finger* é amplamente estudado e descrito na literatura como o principal e mais importante componente que dispara a resposta a estresse oxidativo. No caso particular de PHMB, nossa hipótese inicial foi rejeitada já que vários ensaios provaram que o antifúngico não gera oxidação (Figura 13, 14 e 16). Nosso trabalho aporta um dado muito interessante sobre este gene chave, descrevendo uma nova função praticamente desconhecida relacionando *YAPI* como controlador da via CWI, dados que estão em concordância com o experimento de Bordineaud e col (2000).

*Saccharomyces cerevisiae* combate os efeitos tóxicos provocados por PHMB através dos mecanismos de manutenção da integridade da parede (CWI) e pela via de alta osmolaridade HOG. O gene *YAPI* é um gene chave nesta resposta e atua como controlador da expressão da via CWI, sugerindo que poderia funcionar como nexo para coordenar as duas vias. A intensa indução de *KRE6* na linhagem resistente JP1 gera a hipótese de que uma proporção maior de  $\beta$ -1,6 glucanos da parede conferiria uma barreira efetiva para diminuir a entrada de PHMB.



**Figura 24.** Modelo proposto no presente trabalho para a resposta biológica de *S. cerevisiae* ao PHMB. A perturbação gerada pelo antifúngico é percebida pelas vias HOG e PKC. A ativação da via HOG produziria um aumento na expressão do gene *YAP1*, cujo produto protéico é um fator de transcrição que aumentaria a transcrição de vários genes envolvidos com a manutenção da integridade, dentre eles, *SLT2*, que codifica para a MAPK chave da via CWI.

## **6. CONCLUSÕES**

O PHMB gera estresse no envelope celular e *Saccharomyces cerevisiae* enfrenta o efeito tóxico deste composto através dos mecanismos de manutenção da integridade da parede (CWI) e pela via de alta osmolaridade HOG.

O gene *YAP1* é chave na resistência frente ao biocida PHMB, mas não como gerador de resposta à estresse oxidativo.

O gene *YAP1* regula direta ou indiretamente a expressão de alguns dos genes da via CWI.

A levedura JP1 é mais resistente que a PE-2 devido ao menos em parte a uma expressão maior dos genes da cascata CWI.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

ABBOTT DA, HYNES SH, INGLEDEW WM. Growth rates of Dekkera/Brettanomyces yeasts hinder their ability to compete with Saccharomyces cerevisiae in batch corn mash fermentations. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 66, p. 641–647, 2005.

ALLEN MJ, MORBY AP AND WHITE GF. Cooperativity in the binding of the cationic biocide polyhexamethylene biguanide to nucleic acids. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 318, p. 397–404, 2004.

ALLEN MJ, WHITE GF AND MORBY AP. The response of Escherichia coli to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide. **Microbiology**, v. 152, p. 989–1000, 2006.

ANDRIETTA MGS, ANDRIETTA SR, STECKELBERGM C, STUPIELLOM ENA. Bioethanol—Brazil, 30 years of Proálcool. **Int Sugar J**, v. 109, p. 195–200, 2007.

ARAÚJO PRL, BASÍLIO ACM, SIMÕES DA, MORAIS JR MA, MORAIS JOF. Informações sobre algumas leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial isoladas no Nordeste do Brasil. **Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Recife, Brasil, 2005.

BASÍLIO ACM, DE ARAÚJO PRL, DE MORAIS JOF, DA SILVA FILHO EA, DE MORAIS JR MA, SIMÕES DA. Detection and Identification of Wild Yeast Contaminants of the Industrial Fuel Ethanol Fermentation Process. **Curr Microbiol**, v. 56, p. 322–326, 2008.

BASSO, L C, DE AMORIM, H V, DE OLIVEIRA, A J AND LOPES, M L Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155–1163, 2008.

BECKHOUSE A, GRANT CM, ROGERS PJ, DAWES IW AND HIGGINS VJ . The adaptive response of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide is mediated by the *YAP1* and *Skn7* transcription factors. **FEMS Yeast Res**, v. 8, p. 1214–1222, 2008.

BOURDINEAUD JP, DE SAMPAIO G, LAUQUIN GJ A. Rox1-independent hypoxic pathway in yeast. Antagonistic action of the repressor *Ord1* and activator *YAP1* for hypoxic expression of the *SRP1/TIR1* gene. **Mol Microbiol**, v. 38, n. 4, p. 879-90, 2000.

BROWN CJ, TODD KM, ROSENZWEIG RF. Multiple duplications of yeast hexose transport genes in response to selection in a glucose-limited environment. **Mol Biol Evol**, v.15, p. 931–942, 1998.

BROXTON P, WOODCOCK PM, HEATLEY F, GILBERT P. Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. **J Appl Bacteriol**, v. 57, n. 1, p. 115-124, 1984.

CABIB E, MOL PC, SHAW JA, CHOI WJ. Biosynthesis of cell wall and septum during yeast growth. **Arch Med Res**, v. 24, n. 3, p. 301-303, 1993.

CARRETO L, EIRIZ MF, GOMES AC, PEREIRA PM, SCHULLER D, SANTOS MA. Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. **BMC Genomics**, v.9, p. 524, 2008.

CASAGRANDE V, DEL VESCOVO V, MILITTI C, MANGIAPELO E, FRONTALI L, NEGRI R, BIANCHI MM. Cesium chloride sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: an interplay among the HOG and CWI MAPK pathways and the transcription factor *Yaf9*. **FEMS Yeast Res**, n. 9, p. 400–410, 2009.

CHEN RE, THORNER J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1311-1340, 2007.

CHI Z, ARNEBORG, N. Relationship between **lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae***. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 1047-1052, 1999.

CONANT GC, WOLFE KH. Increased glycolytic flux as na outcome of whole-genome duplication in yeast. **Mol Syst Biol**, v. 3, p. 129, 2007.

CROWE, LM, CROWE, JH Trehalose and dry dipalmitoyl phosphatidylcholine revisited. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 946, p. 193-201, 1988.

DE LA TORRE-RUIZ MA, TORRES J, ARINO J, HERRERO E. Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 277 , p. 33468–33476, 2002.

DE SOUZA LIBERAL AT, BASILIO AC, MONTE RESENDE A DO, BRASILEIRO BT, DA SILVA-FILHO EA, DE MORAIS JO, SIMOES DA, DE MORAIS JR MA. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **J Appl Microbiol**, v. 102, n. 2, p. 538-547, 2007.

DING J, HUANG X, ZHANG L, ZHAO N, YANG D, ZHANG K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, p. 253–263, 2009.

DONOSO R, MURA JJ, LOPEZ M. Acanthamoeba keratitis treated with propamidine and polyhexamethyl biguanide (PHMB). **Rev Med Chil**, v. 130, n. 4, p. 396-401, 2002.

DORTA C, OLIVA-NETO P, DE ABREU-NETO MS, NICOLAU-JUNIOR N, NAGASHIMA AI. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26) **World Journal of Microbiology and Biotechnology** , v. 22, n. 2, p. 177-182, 2006.

DUNHAM MJ, BADRANE H, FEREA T, ADAMS J, BROWN PO, ROSENZWEIG F, BOTSTEIN D. Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, p. 16144–16149, 2002.

DUNN B, LEVINE RP, SHERLOCK G.. Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. **BMC Genomics**, v. 6, p. 53, 2005.

DURAND F, DAGKESSAMANSKAIA A, MARTIN-YKEN H, GRAILLE M, VAN TILBEURGH M, UVERSKY VM., FRANCOIS JM . Structure–function analysis of Knr4/Smi1, a newly member of intrinsically disordered proteins family, indispensable in the absence of a functional *PKC1–SLT2* pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 25, p. 563–576, 2008.

ELSZTEIN C, SCAVUZZI DE MENEZES JA, MORAIS JR MA. Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel-ethanol fermentation process. **J Ind Microbiol Biotechnol** , v. 35, p. 967–973, 2008.

ELSZTEIN, C. Atividade fungicida de natamicina e polihexametileno biguanida sobre leveduras industriais e identificação dos mecanismos genéticos de resistência. **Dissertação de mestrado**. UFPE. Recife, PE, 2006.

ESTRUCH, F, CARLSON M. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** v. 13, p. 3872–3881, 1993.

FERNANDES L, RODRIGUES-POUSADA C, STRUHL K. Yap, a Novel Family of Eight bZIP Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with Distinct Biological Functions. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 12, p. 6982–6993, 1997.

FRANZIN M. Biguanida Polimérica Versatilidade e Diversificação em um só Produto. 2005. [http://www.opportuna.com.br/produtos/arquivos/Biguanida\\_Arch.pdf](http://www.opportuna.com.br/produtos/arquivos/Biguanida_Arch.pdf) (acesso 23-10-2010).

GARCÍA R, BERMEJO C, GRAU C, PÉREZ R, RODERÍGUEZ-PEÑA JM, FRANCOIS J, NOMBELA C, ARROYO J. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 15183–15195, 2004.

GIBSON BR, LAWRENCE SJ, LECLAIRE JPR, POWELL CD, SMART KA. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiol Rev**, v. 31, p. 535–569, 2007.

GILBERT P, MOORE LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 703–715, 2005.

GILBERT P, PEMBERTON D, WILKINSON DE. Synergism within polyhexamethylene biguanide biocide formulations. **J Appl Bacteriol**, v. 69, n. 4, p. 593-598, 1990.

GOUNALAKI N, THIREOS G. Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. **EMBO J**, v. 13, p. 4036-4041, 1994

HASTINGS PJ, LUPSKI JR, ROSENBERG SM, IRA G. Mechanisms of change in gene copy number. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 551–564, 2009.

HAWLE P, HORST D, BEBELMAN JP. Cdc37p is required for stress-induced high- osmolarity glycerol and protein kinase C mitogen-activated protein kinase pathway functionality by interaction with Hog1p and Slr2p (Mpk1p). **Eukaryot Cell**, v. 6, p. 521–532, 2007.

HE XJ, FASSLER JS. Identification of novel *YAP1p* and *Skn7p* binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**, v.58, p. 1454-67, 2005.

HERRERO E, ROS J, BELLI G, AND CABISCOL E. Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 11, p. 1217-1235, 2008.

HIOM SJ, FURR JR, RUSSELL AD, HANN AC. The possible role of yeast cell walls in modifying cellular response to chlorhexidine diacetate. **Cytobios**, v. 86, p. 123–135, 1996.

HOHMANN S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 300 – 372, 2002.

<http://econ.worldbank.org/WBSITE/EXTERNAL/EXTDEC/EXTRESEARCH/EXTWDRS/EXTWDR2008/0,,contentMDK:21501336~pagePK:64167689~piPK:64167673~theSitePK:2795143,00.html> (acesso 22-10-2010)

[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_105\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_105_22122006154841.html) (acesso 22-10-2010)

<http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics#E> (acesso 22-10-2010)

[http://www.itqb.unl.pt/Genomics\\_and\\_Stress/Research.htm#oxidative](http://www.itqb.unl.pt/Genomics_and_Stress/Research.htm#oxidative) (acesso 24-10-2010)

IGUAL JC, JOHNSON AL, JOHNSTON LH. Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor *SWI4* and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. **EMBO J**, v. 15, p. 5001– 5013, 1996.

IKEDA T, LEDWITH A, BAMFORD CH, HANN RA. Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 769, n. 1, p. 57-66, 1984.

JAMIESON DJ. Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1511-1527, 1998.

JIANG B, RAM AF, SHERATON J. Regulation of cell wall  $\beta$ -glucan assembly: PTC1 negatively affects PBS2 action in a pathway that includes modulation of *EXG1* transcription. **Mol Gen Genet**, v. 248, p. 260–269, 1995.

JUNG US, LEVIN DE. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. **Mol Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 1049-1057, 1999.

KAO KC, SHERLOCK G. Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nat Genet**, v. 40, p. 1499–1504, 2008.

KAPTEYN JC, VAN EGMOND P, SIEVI E, VAN DEN ENDE H, MAKAROW M, KLIS FM. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/*HSP150* to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and  $\beta$ -1,6-glucan-deficient mutants. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 1835–1844, 1999.

KHUNKITTI W, HANN AC, LLOYD D, FURR JR, RUSSELL AD. X-ray microanalysis of chlorine and phosphorus content in biguanide-treated *Acanthamoeba castellanii*. **J Appl Microbiol**, v. 86, p. 453-459, 1999.

KIM, J, BOORSMA A, DE GROOT PW. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185-202, 2006.

KIM J, ALIZADEH P, HARDING T, HEFNER-GRAVINK A, KLIONSKY DJ. Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1563- 1569, 1996.

KOLACZKOWSKA M, GOFFEAU A. A Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. **Drug Resistance Updates**, v. 2, p. 403-414, 1999.

KUBOTA S, TAKEO I, KUME K, KANAI M, SHITAMUKAI A, MIZUNUMA M, MIYAKAWA T, SHIMOI H, IEFUJI H, HIRATA D. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 68, p. 968–972, 2004.

LAI MH, SILVERMAN SJ, GAUGHRAN JP, KIRSCH DR. Multiple copies of PBS2, MHP1 or LRE1 produce glucanase resistance and other cell wall effects in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 13, p. 199–213, 1997.

LESAGE G, BUSSEY H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 70, p. 317-343, 2006.

LEVIN DE. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 69, p. 262-291. 2005.

LEVIN DE, JUNG US. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. **Mol Microbiol**, v. 34, n. 5, p. 1049-1057. 1999.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. **Method**, v. 25, p. 402- 408, 2001.

LUCENA BTL, SILVA-FILHO EA, COIMBRA MRM, MORAIS JOF, SIMÕES DA, MORAIS JR MA. Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 1072-1084, 2007.

LUCERO P, PEÑALVER E, MORENO E, LAGUNAS R Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p. 4456–4461, 2000.

MANSURE JJ, SOUZA RC & PANEK AD. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Biotechnol Lett**, v. 19, p. 1201–1203, 1997.

MARCHLER, G., C. SCHULLER, G. ADAM, H. RUIS. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. **EMBO J**, v. 12, p. 1997–2003, 1993.

MARTIN H, RODRIGUEZ-PACHON JM, RUIZ C. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 275, p. 1511–1519, 2000.

MARTIN-YKEN H, DAGKESSAMANSKAIA A, BASMAJI F. The interaction of *SLT2* MAP kinase with *Knr4* is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**, v. 49, p. 23–35, 2003.

MERICO A, SULO P, PISKUR J, COMPAGNO C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS J**, v. 274, p. 976–989, 2007.

MESSIK CR, PENDLAND SL, MOSHIRFAR M, FISCELLA RG, LOSNEDAHL KJ, SCHRIEVER CA, SCHRECKENBERGER PC. In-vitro activity of polyhexamethylene biguanide (PHMB) against fungal isolates associated with infective keratitis. **J Antimicrob Chemother**, v. 44, p. 297-298, 1999.

NARASIMHAN S, MADHAVAN HN, LT K. Development and application of an in vitro susceptibility test for *Acanthamoeba* species isolated from keratitis to polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. **Cornea**, v. 21, n. 2, p. 203-205, 2002.

NIKOLAOU E, AGRAFIOTI I, STUMPF M, QUINN J, STANSFIELD IB, ALISTAIR JP. Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. **BMC Evol Biol**, v. 9, p. 44, 2009.

NUNEZ LR, JESCH SA, GASPAR ML, ALMAGUER C, VILLA-GARCIA M, RUIZ-NORIEGA M, PATTON-VOGT J, AND. HENRY SA. Cell Wall Integrity MAPK Pathway Is Essential for Lipid Homeostasis **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 49, p. 34204-34217, 2008.

O'ROURKE SM, HERSKOWITZ I. Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. **Mol Biol Cell**, v. 15, p. 532–542, 2004.

O'MALLEY LP, COLLINS AN, WHITE GF. Biodegradability of end-groups of the biocide polyhexamethylene biguanide (PHMB) assessed using model compounds. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, n. 8, 677-684, 2006.

QUEROL A, FERNÁNDEZ-ESPINAR MT, DEL OLMO M, BARRIO E. Adaptive evolution of wine yeast International. **Journal of Food Microbiology**, v. 8, p. 3-10, 2003.

REYNOLDS TB, HOPKINS BD, LYONS MR, GRAHAM TR. The high osmolarity glycerol response (HOG) MAP kinase pathway controls localization of a yeast golgi glycosyltransferase. **J Cell Biol**, v. 143, p. 935-946, 1998.

RODRIGUES-POUSADA C, MENEZES RA, PIMENTEL C. The Yap family and its role in stress response. **Yeast**, v. 27, p. 245-258, 2010.

RODRÍGUEZ-PEÑA J.M, GARCÍA R., NOMBELA C. ARROYO J. The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes . **Yeast**. DOI: 10.1002/yea.1792, 2010.

ROELANTS FM, TORRANCE PD, BEZMAN N, AND THORNER J. Pkh1 and Pkh2 Differentially Phosphorylate and Activate Ypk1 and Ykr2 and Define Protein Kinase Modules Required for Maintenance of Cell Wall Integrity. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 3005, 2002.

RUDOLPH, AS, CHANDRASEKHAR, E, GABER, BP, AND NAGUMO, M. Molecular modeling of saccharide-lipid interactions. **Chem. Phys. Lipids**, v. 53, p. 243-261, 1990.

SAITO H, TATEBAYASHI K. Regulation of the Osmoregulatory HOG MAPK Cascade in **Yeast**. **J. Biochem**, v. 136, p. 267-272, 2004.

SANTOS PD, FERNANDES PS. Utilização de Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB) na desinfecção de indústrias cervejeiras. **Revista TECCEN**, v. 3, n. 1, 2010.

SCANDALIOS JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHULLER C, BREWSTER JL, ALEXANDER MR, GUSTIN MC, AND RUIS H. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. **EMBO J**, v. 13, n. 18, p. 4382-4389, 1994.

SHARMA SC. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 152, p. 11–15, 1997.

SILVA-FILHO EA, MELO HF, ANTUNES DF, SANTOS SKB, RESENDE AM, SIMÕES DA, MORAIS JR MA. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 32, p. 481-486, 2005, A.

SILVA-FILHO EA, SANTOS SKB, RESENDE AM, FALCÃO JO, MORAIS JR MA, SIMÕES DA. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p.13–23, 2005, B.

SILVA-FILHO EA. Caracterização genética de populações de leveduras em destilarias de álcool combustível com vistas à seleção de linhagens promissoras para a expressão heteróloga de genes de interesse industrial. **Tese de Doutorado**, UFPE, Recife, 2003.

SMITS GJ, VAN DEN ENDE H, KLIS FM. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. **Microbiology**, v. 147, p. 781–794, 2001.

STAMBUK BU, DUNN B, ALVES JR SL, DUVAL EH, SHERLOCK G. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome Res**, v. 19, n. 12, p. 2271–2278, 2009.

STARK C, BREITKREUTZ BJ, REGULY T. BioGRID: a general repository for interaction datasets. **Nucleic Acids Res**, v. 34, p. 535–539, 2006.

TACHIBANA T, OKAZAKI S, MURAYAMA A, NAGANUMA A, NOMOTO A, KUGE SA. Major Peroxiredoxin-induced Activation of *YAP1* Transcription Factor Is Mediated by Reduction-sensitive Disulfide Bonds and Reveals a Low Level of Transcriptional Activation. **J. Biol. Chem**, v. 284, p. 4464-4472, 2009.

TERASHIMA H, YABUKI N, ARISAWA M, HAMADA K, KITADA K. Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of *FKS1* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Gen Genet**, v. 264, n. 1-2, p. 64-74, 2000.

THEVELEIN, JM. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 1, p. 42-59, 1984.

THOMSON JM, GAUCHER EA, BURGAN MF, DE KEE DW, LI T, ARIS JP, BENNER SA. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. **Nat Genet**, v. 37, p. 630–635, 2005.

TOONE WM AND JONES N. Stress-activated signalling pathways in yeast. **Genes Cells**, v. 3, p. 485 – 498, 1998.

VANDEN BOSSCHE H, ENGELEN M, ROCHETTE F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. **J vet Pharmacol Therap**, v. 26, p. 5-29, 2003.

WALKER GM. Yeast physiology and biotechnology. **Jhon Wiley and Sons Publishers**. London, 1998.

WERNER-WASHBURNE M, BRAUN E, JOHNSTON GC, SINGER RA. Stationary phase in the yeast. *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol Rev**, v. 57, p. 383-401, 1993.

YOSHIKAWA K, TANAKA T, FURUSAWA C, NAGAHISA K, HIRASAWA T AND SHIMIZU H, Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* **FEMS Yeast Res**, v. 9, p. 32–44, 2009.

YOU KM, ROSENFELD CL, KNIPPLE DC. **Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content.** **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.3, p. 1499-1503, 2003.

## 8. ANEXOS

### 1. Resumo do trabalho enviado a 27ª REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS. 12 A 14 DE SETEMBRO DE 2010. GUARUJÁ. SP

**A resistência ao biocida PHMB envolve as cascatas CWI e HOG na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.**

Elsztein, C<sup>1</sup>; Morais JR., MA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Engenharia Metabólica, Universidade Federal de Pernambuco. <sup>2</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

carolinaelsztein@yahoo.com.ar

Palavras-chave: expressão gênica, MAP quinase, parede celular, PHMB, *Saccharomyces cerevisiae*, YAP1

As condições de estresse induzem cascatas de eventos que terminam com uma resposta celular baseada na expressão do genoma. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, muitos desses sinais externos são recebidos e amplificados por vias MAP quinases, que têm sido extensivamente estudadas. Em estudos anteriores mostramos a eficácia do biocida catiônico Polihexametileno biguanida (PHMB) no combate a leveduras que contaminam o processo de fermentação alcoólica industrial. No presente trabalho realizamos a identificação dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta à ação biológica do PHMB e dos mecanismos de resistência celular a este composto. Trabalhos da literatura mostraram que células de *E. coli* respondem a este composto e partir da expressão de genes envolvidos na manutenção da integridade da parede celular (CWI). A partir da identificação desses homólogos em *Saccharomyces cerevisiae* realizamos uma série de experimentos de análise da expressão gênica e da avaliação de linhagens mutantes dessa levedura. Os experimentos mostraram que na levedura o mecanismo da cascata regulatória da via da proteína quinase C (PKC) regula a expressão dos genes do mecanismo CWI que respondem às lesões induzidas pelo PHMB na parede celular, causando um estresse osmótico que é sentido e restaurado pelos genes da via HOG. O

efeito protetor da trealose, a geração de desequilíbrio redox e a natureza do efeito tóxico sugerem que PHMB dispara o mesmo sinal molecular que sentido pelas células quando submetidas a estresse etanólico. Além disso, a proteína Yap1, principal regulador transcricional dos genes de resposta a estresse oxidativo, parece ser crucial para a resistência PHMB, embora neste caso a função desse fator de transcrição estaria relacionada com um efeito protetor sobre a parede celular. Com isso, estamos propondo uma nova função biológica para a proteína Yap1 na resposta a estresse industrial em *Saccharomyces cerevisiae*

Apoio Financeiro: CNPq, CAPES e FACEPE.

## 2. Artigo enviado para BMC Molecular Biology

### **Resistance to PHMB by *Saccharomyces cerevisiae* cells involves the co-operation between PKC and HOG mechanisms: a new regulatory role for Yap1 protein.**

Carolina Elsztein<sup>1</sup> and Marcos Antonio de Moraes Junior<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Interdepartmental Research Group in Metabolic Engineering and <sup>2</sup>Department of Genetics, Federal University of Pernambuco. Av. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

\*corresponding author:

Phone: 00-55-81-21267817

Fax: 00-55-81-21268522

E-mail: [marcos.morais@pq.cnpq.br](mailto:marcos.morais@pq.cnpq.br)

Website: [www.ufpe.br/nem](http://www.ufpe.br/nem)

#### **Abstract**

**Background.** Polyhemethylene biguanide (PHMB) is an antiseptic polymer largely used for cleaning hospitals and pools and to combat *Acantamoeba* infection. Its fungicide activity was recently presented by its killing effect to yeasts that contaminate industrial ethanol process, and to one of the main fermenting yeast in Brazil. It pointed for the need to know the molecular mechanism behind cell resistance to this compound. *Escherichia coli* responds to bacteriostatic levels of PHMB by altering the expression of genes associated with stresses including acid resistance, alkali resistance, osmotic shock and cell-envelope perturbation. In this work we approached the aspects of PHMB-cell interaction and the mechanisms that respond to the damages caused by this interaction. For this purpose two strategies of study were used: the expression of some genes by qRT-PCR and the analysis of mutant strains. **Results.** Cell Wall integrity (CWI) genes were induced in the PHMB-resistant *S. cerevisiae* strain JP-1, while they are poorly express in the PHMB-sensitive *S. cerevisiae* strain PE2. This was suggestive that PHMB damages the glucan structure on the yeast cell wall. This was confirmed by the observed sensitivity of the yeast deletion strains *Dslg1*, *Drom2*, *Dmkk2*, *Dslt2*, *Dknr4*, *Dswi4* and *Dswi4*, showing that protein kinase C (PKC) regulatory mechanism is involved in the response and resistance to PHMB. Besides, the sensitivity of *Dhog1* mutant indicated that PHMB damages imposed osmotic stress to yeast cells. Furthermore, cytotoxicity assay and gene expression analysis showed that participation of *YAP1* and *CTT1* genes in cell resistance to PHMB independent of oxidative stress response. Thus, we proposed that Yap1p has a role in cell wall maintenance by controlling the expression of CWI genes. **Conclusions.** PHMB may cause damages to

yeast cell wall stress that activates the transcriptional regulators involved in CWI gene regulation. These damages impose hyperosmotic shock that is sensed by HOG1 pathway to amplify the molecular signal for cell survival. Therefore, PKC and HOG pathways seem to interplay to confer resistance to PHMB in a manner that is dependent of Yap1p to regulate CWI genes. A model for those interactions is proposed.

## Background

Previous work showed that polyhemethylene biguanide (PHMB) was effective in selectively killing the yeasts considered as contaminant of the ethanol fermentation process, with special attention to *Dekkera bruxellensis* [1]. PHMB has been used as an antiseptic and disinfectant in medicine and industry, and its current applications include impregnation of fabrics to inhibit microbial growth [2,3], water treatment [4], disinfection of a variety of solid surfaces such as contact lenses [5], mouthwashing [6,7], treatment of hatching eggs to prevent contamination by *Salmonella* [8,9], and for the treatment against fungi [10] and *Acanthamoeba* [11,12,13]. Its commercial preparations are mixtures of polymeric biguanides of blocks with molecular structure  $[-(\text{CH}_2)_6.\text{NH.C(=NH).NH.C(=NH).NH-}]_n$ , where  $n$  may vary from 2 to 40 (average of 11) and molecular mass ranging from 400 to 8000 [14].

The heterogeneity of the molecule is increased further by the presence of either amine, or cyanoguanidine or guanidine end-groups in any combination at the terminal positions of each chain. Anyway, the cationic nature of the guanidine group makes the molecule positively charged at physiological to low pH [15]. Consequently, PHMB is highly adsorptive to anionic surfaces such as bacterial cell walls and the mechanism of its biocidal action reported to damage the cell membrane [16]. At lower concentrations, PHMB may exert part of its bacteriostatic effects by a strong cooperative interaction with (polyanionic) nucleic acids [17]. It was proposed that PHMB may interact with phospholipids of the *Acanthamoeba* cell membrane causing changes in cell permeability [18, 19], which was further supported by work in *E. coli* [14]. The external layer of *S. cerevisiae* and other yeast species plasma membrane is enriched in phosphatidylcholine, ergosterol and sphingolipids [20]. Based on the cationic nature of PHMB, its toxic effect may be mediated by its link to the negative phospholipids on the yeast cell surface. In the presence of PHMB the homogeneous distribution of phospholipids normally associated with biological membranes is transformed into a mosaic of individual phospholipids' domains. Each of these will have different phase transition properties causing the membrane to fragment into fluid and liquid crystalline regions [15]. Using whole-genome transcriptional profile, [14] show that *E. coli* responded to bacteriostatic levels of PHMB by altering the expression of many genes involved in all levels of the cell ultra structure, i.e. the outer membrane, periplasm, inner membrane and cytoplasmic domains, but not the lipopolysaccharide layer. Genes associated with stresses including acid resistance, alkali resistance, osmotic shock and cell-envelope perturbation were altered.

Besides the fungicide activity in *D. bruxellensis*, *Pichia galeiformes* and *Candida tropicalis*, yeasts isolated as contaminant from ethanol fermentation, PHMB also differentially affected *S. cerevisiae* industrial strains [1]. That result might impose some impediment for the use of PHMB to control yeast contamination episodes in the industrial fermentations. Thus, the further steps in the way of developing industrial formulations of PHMB must rely on the identification of the biological activity and

targets of PHMB on the yeast cells and in the identification of the yeast mechanisms that respond to the damages imposed by this biocide.

In the present work we tried to understand the aspects of PHMB-cell interaction raised above by two the strategies: 1) testing the biocide effect of PHMB in the expression of yeast strains whose homologous were shown to be induced in *E. coli*, 2) and by testing yeast strains with mutations in genes whose biological pathways were identified by gene expression analysis and physiological assays. The results strongly indicated that PHMB may act by destabilizing the yeast cell wall, mimicking the effects of ethanol, and causing osmotic stress. Moreover, it is also reported a new function of the well-known oxidative stress transcriptional factor Yap1 in responding to damages caused to yeast cell wall.

## Results and Discussion

### PHMB treatment induces genes of the yeast Cell Wall Integrity (CWI) sensing mechanism

Our previous results showed that PHMB killing effects on yeast cells was partially suppressed by trehalose [1], which is known to be a protective agent of the cell envelope [20]. Moreover, previous global gene expression analysis revealed that exposure of *E. coli* cells to PHMB induced the expression of genes involved in cell wall maintenance [14]. Thus, we searched for their homologous in the yeast genome.

Besides, recent report showed that some genes involved in trehalose metabolism are regulated by stress response elements (STRE) in their promoter region [21], so we included some yeast genes containing STRE in their promoter in our analysis. From a list of genes analyzed (Table 1 on on-line supplementary data), we performed quantitative PCR analysis after cell exposure to PHMB and the results revealed that the genes *CHS1*, *GAS1*, *HSP150*, *KRE6*, *MSN2*, *PKH1* and *YLR194c* were up-regulated in the PHMB-resistant strain JP1, while remained unchanged in the PHMB-sensitive strain PE-2 (Figure 1). Four other situations were observed: 1) *FSK1* was more induced in JP1 strain than in PE-2; 2) *CRZ1*, *MSN4* and *RLM1* genes were induced in JP1 and repressed in PE-2; 3) *MNN9* did not change in JP1, but was repressed in PE2; 4) *CIN5* and *SLT2* remained unchanged in both industrial strains (Figure 1).

The products of the genes *CHS1*, *GAS1*, *FKS1*, *HSP150*, *KRE6*, *PKH1* and *YLR194c* are located either in the cell membrane or in the cell wall, and are mostly involved in the maintenance and remodeling of the cell envelope in response to environmental changes. The membrane-located chitin synthase 1 encoded by *CHS1* acts on the turnover of chitin in the septum during cell division [22]. The *GAS1* gene product is a GPI anchored protein located at plasma membrane that acts stretching the cover of  $\beta$ -1,3-glucan during the remodeling of the cell wall. Its expression is dependent on the transcription factor SBF, which comprises the proteins Swi4p and Swi6p [23]. *FKS1* gene encodes the catalytic subunit of the 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase complex. This complex is regulated by the regulatory subunit Rho1p, which in turn is activated by the nutrient sensing TOR pathway and regulates the activity of protein kinase C - Pkc1p, a key component of the Cell Wall Integrity (CWI) mechanism [23]. The protein Hsp150p is located in the cell wall and is secreted into the medium in response to heat or osmotic shock. The gene is up-regulated under Calcofluor white and Zimolyase [24], heat shock [25] nitrogen limitation [26] treatments and by the decreasing of  $\beta$ -1,3-glucan level in the cell wall [27]. *PKH1* gene encodes a phosphoinositol-dependent protein kinase,

which function overlaps Pkh2p, involved with the maintenance of cell wall. This protein phosphorylates and activates Pkc1p [28]. The ORF *YLR194c* encodes for a putative GPI-attached protein whose expression is induced by cell wall stress or by mutation in *FKS1* gene [29]. The *MNN9* gene encodes a  $\alpha$ -1,6-mannosyltransferase involved in the transfer of mannose from UDP-mannose to oligosaccharides during the synthesis of  $\alpha$ -glucan bridge of the cell wall [30]. And the *KRE6* gene encodes a synthetase that acts on the synthesis of the  $\beta$ -1,6-glucan cover and mutation in its gene causes 50% reduction in the synthesis of  $\beta$ -1,6-glucan in the cell wall [29]. The protein Kre6 was shown to be phosphorylated and to genetically interact with components of the Pkc1p-mediated MAP kinase pathway [31] in order to regulate  $\beta$ -1,6-glucan synthesis [32]. Over-expression of *KRE6* gene complements the defect in cell wall organization of *pkc1*-mutant [28]. Therefore, this gene could be a key to explain the difference in resistance to PHMB between the two industrial strains, since it was highly expressed in JP1 strain (Figure 1).

Crz1p is a calcineurin-dependent zinc finger type transcription factor that binds to the promoters of the genes *FKS1* and *CHS1* in response to calcofluor and calcium, respectively [23]. Both genes were reported to be co-expressed peaking in G1 when isotropic cell wall synthesis allows daughter cell expansion [23] and our results (Figure 1) corroborate with that finding. The lower expression level of *CRZ1* gene in PE-2 could explain the lack of induction of *CHS1* and *FKS1* in this strain, and together with the low expression of *KRE6* could produce the previously reported sensitive phenotype of PE-2 strain to PHMB [1]. Besides, these results indicate that the tolerance of JP1 strain might be the result of more efficient restoration of the cell envelope after being damaged by PHMB. This can be the evidence that PHMB damages the glucan structure on the yeast cell wall.

### **Resistance to PHMB depends on the functionality of PKC and HOG mechanisms**

To test the hypothesis of cell wall damage, resistance to PHMB was evaluated in yeast strains with deletion in a series of CWI genes, including genes involved of HOG and PKC pathways. The results of the cytotoxicity assay showed that deletion of the genes *SLG1/WSC1*, *SLT2*, *ROM2*, *SWI4*, *SWI6* and *KNR4* rend yeast cells very sensitivity to PHMB, while mutants of *HOG1* and *MKK2* genes where affected only at higher concentration of PHMB (Figure 2). Other mutants tested did not sensitivity higher the parental BY4741 (data not shown). *SLG1/WSC1* gene encodes one of the sensortransducer proteins located at cell membrane that activates the GDP/GTP exchange protein Rom2p in response to cell wall damage [28]. It was observed that the absence of this protein impairs the activation of Mpk1p kinase by heat shock [33]. The hypersensitivity of *Dslg1/wsc1* mutant to PHMB (Figure 2), together with the parental phenotype of mutants in other sensors (data not shown), showed that it is the main sensor of damages caused by PHMB.

Following the PKC cascade, it was observed that *Drom2* mutant was very sensitive to PHMB (Figure 2). Rom2p activates the Ras-like protein kinase Rho1p that triggers the PKC cascade by activating Pkc1p, which in turn activates Bck1p [23]. Bck1p, known as MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), phosphorylates Mkk2p (MAPKK) in response to cell wall damage, which further phosphorylates Mpk1p/Slk2p (MAPK). The parental phenotype of *Dbck1* mutant and the intermediary sensitivity of *Dmkk2* mutant to PHMB (Figure 2) can be explained from the complementation by their paralogous

Bck2p and Mkk1p, respectively, in the yeast genome.

Furthermore, the hyper-sensitivity of *Dmpk1/slt2* mutant (Figure 2) showed the importance of its gene to PHMB resistance. Slt2p resides predominantly in the nucleus under non-stress conditions, but rapidly relocates to the cytoplasm in response to cell wall stress [34]. Once activated, Slt2p phosphorylates downstream the transcription factor Rlm1p, a member of the MADS box family, that regulates the expression of the genes *SWI4* and *SWI6* [23]. As stated above, Swi4p and Swi6p form the SBF transcriptional factor that regulates CWI genes, such as *GAS1*, *FKS1* and *SMI1/KNR4* [23]. Mutation of *SMI1/KNR4* gene renders yeast cells sensitivity to PHMB (Figure 2). It was proposed that Smi1/Knr4p coordinate cell cycle progression in connection to cell wall integrity, which is essential for cell viability in the absence of functional PKC pathway [35]. A physical interaction between Knr4p and Slt2p was also shown and proposed to modulate Slt2p activation of transcriptional factors Rlm1 and SBF [36]. In addition, Slt2p also phosphorylates and activates Rlm1p, a transcription factor that regulates the expression of *CHS1*, *FKS1*, *KRE6* and *HSP150* [23], all genes upregulated in JP1 strain upon PHMB treatment (Figure1).

And finally, *Dhog1* mutation showed intermediate sensitivity to PHMB (Figure 2). It was reported that Hog1p interacts with PKC pathway by activating the Ptp2/3 complex that co-activates Slt2p [37]. Therefore, the present results indicate that Hog1p may act as amplifier of the sensing mechanism of cell wall damage caused by PHMB as it has been recently reported [38]. Furthermore, double mutant analysis showed the synergistic interplay between Hog1p and Yap1p for the resistance to arsenite stress, suggesting the existence of a genetic inter-dependence of both genes on the stress response [39]. Therefore, PHMB may affect the  $\beta$ -glucan structure of the cell wall that is sensed by the PKC pathway, causing osmotic stress sensed by the HOG pathway. They both converge to Slt2p in order to express genes of CWI mechanism. This hypothesis agrees with the idea that PKC and HOG pathways converge for the regulation of the cell wall maintenance [40,41,38]

#### **The YAP1 gene is also involved in the cellular resistance to PHMB, but not through oxidative stress response**

Following the induction of *MSN2* and *MSN4* genes in JP1 strain upon exposure to PHMB (Figure 1), we further screened by spot tests the collection of deletion strains whose genes encode proteins involved in various general stress response mechanism. Among them, the *yap1* mutant showed high sensitivity to PHMB, similar to observed for the treatment with hydrogen peroxide (Figure 3A). It was indicative that PHMB could induce some oxidative stress at cell membrane. This hypothesis had support in the literature by the proposition that interaction between PHMB and acid phospholipids in the *E. coli* cell membrane could explain its bactericidal activity [16,42]. Yap1p-mediated regulatory pathway that controls the oxidative stress adaptive response is activated by redox sensory mechanisms which detect changes in the intracellular redox balance caused by reactive oxygen species (ROS) and by oxidized thiols such as glutathione, thioredoxin and SH-containing proteins [43]. Nevertheless, we did not observe any changes in either mobilization of intracellular thiol groups, increase in the peroxidation of the membrane phospholipids and production of any other oxidative damage after PHMB treatment (data not shown). In addition, no other strain with deletion in oxidative stress genes was sensitive to PHMB, except the *ctt1* mutant

(Figure 3B). *CTT1* gene encodes the cytosolic catalase T involved in the breakdown of hydrogen peroxide to oxygen and water that is regulated by the oxidative stress transcription factors Yap1p and Skn7p and by the general stress response transcriptional complex Msn2/4p [44]. Yap1p play a role in regulating expression of components of the STRE activation machinery, and the STRE-dependent gene expression as consequence, even though Yap1 does not bind STREs directly [44]. It suggests that *YAP1* and *CTT1* genes might be involved in the resistance to PHMB in a way that is independent from oxidative stress pathway. There are some indications on the participation of the upper elements of the PCK pathway on the cell survival to oxidizing agents such as diamide and hydrogen peroxide [45]. It is known that ethanol induces the expression of various stress responsive genes, such as *CTT1*, via the binding of Msn2/4 transcriptional complex on their promoters. This complex is activated by Hog1p phosphorylation that promotes the migration of Msn2p and Msn4p from the cytosol to the nucleus in order to trigger the induction of the target genes [46]. It indicates the connection between the osmotic stress response (PKC-HOG) and the oxidative stress response in *S. cerevisiae*, in which Ctt1p could act as a bridge. Very recently, Liu et al (2010) reported that *SOD1* gene is involved in tolerance to cell wall damaging agents in yeast, which supported this connection between those pathways.

It was showed that Yap1p appears to be necessary for activation of *SRP1* gene that encodes a cell wall protein [47]. Besides, the authors showed that *Dyap1* mutant is sensitive Congo Red (CR), which lead to the conclusion that Yap1p is somehow involved in CWI mechanism. We also observed such CR-sensitive phenotype of *Dyap1* mutant (data not shown). The high sensitivity of *Dyap1* mutant to PHMB (Figure 3) was similar to that observed for *Dslt2* mutant (Figure 2). It corroborates with the involvement of Yap1p as an important regulator of the CWI genes.

#### **Yap1p also regulates the expression of CWI genes**

The supposed involvement of Yap1p on the regulation of CWI genes was tested by measuring the expression in parental and *Dyap1* strains of those genes up-regulated by PHMB in JP1 strain. The results showed that none of them was up-regulated by PHMB treatment in the parental BY4741 cells (Figure 4A), which should explain the higher sensitivity of this laboratory strain compared to JP1 (data not shown). Two results were particularly relevant in the *Dyap1* mutant. First, the expression of *SLT2* gene was downregulated by a factor of four (Figure 4A), which was not observe even in the PHMBsensitive industrial strain PE-2 (Figure 1). It is also noteworthy that *CIN5* gene showed up-regulation by a factor of 2.5 after PHMB treatment (Figure 4A), while no change was observed for this gene in both industrial strains (Figure 1). It can be concluded that Yap1p also works in response to cell wall damage by controlling the expression of the genes at the lower part of the PKC cascade. It is known that Slt2p phosphorylates and activates Rlm1p transcription factor, which in turn back-regulates the expression of *SLT2* gene itself [29]. Therefore, Yap1p could be involved in the regulation of both *RLM1* and *SLT2* gene expression. This idea was reinforced by further observation that *SLT2* gene was down-regulated in *Dyap1* mutant after heat shock treatment (Figure 4B). *RLM1* gene was showed an opposite behavior of its expression, in which a significant over-expression was observed in *Dyap1* mutant after heat shock treatment (Figure 4B). Thus, we suggest that Yap1p may directly co-regulate the expression of *SLT2* gene in response to damages in the cell wall, so that it would act on the regulation of CWI genes

in consequence. It was proposed that activation of Slt2p by heat shock could occur in PKC-independent manner [48]. In the present model the osmotic shock caused by PHMB should be transduced via Hog1p to the activation of a transcription factor that shall induce the expression of HOG-responsive genes and *YAP1* (Figure 5). Then, Yap1p should induce the expression of general stress response genes, together with Msn2/4p complex, and *SLT2* gene, together with Rlm1p (Figure 5). This co-regulation may amplify the signal for CWI gene expression. The presence of TF binding sites in the promoter region of those genes were identified *in silico* (Figure 5). The fact that we did not observe the presence of the conserved Yap1-Responsive Element (YRE) motif at the *SLT2* gene promoter should suggest that Yap1p might bind to a variant sequence or to an alternative motif together with Hsf1p or Rlm1p. All those possibilities must be tested further.

## Conclusion

This work showed that PHMB may induce damages to the yeast cell wall that can be both sensed by the PKC pathway and by the CWI proteins. Moreover, such damages in the cell wall may cause osmotic stress that is sensed by HOG pathway that may amplify the signal of the PCK pathway by activating the transcriptional regulators involved in CWI gene regulation. It means that CWI and HOG pathways could interplay to confer resistance to PHMB. Besides, the transcriptional factor Yap1p showed to be important role in the regulation of CWI genes.

## Methods

### Strains and media

Industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* JP1 and PE-2 were previously described [49]. Yeast mutant strains were from EUROSCARF collection (Institute of Microbiology of the University of Frankfurt, Germany). Cells were grown and maintained in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), with 2% agar for solid medium. The antifungal compound PHMB (polyhexamethyl biguanide) was provided by AEB Bioquímica Latino Americanas S/A (Brazil).

### Cytotoxicity tests

Yeast cells were pre-cultivated overnight in YPD at 30°C and re-inoculated to the same medium for exponential growth phase (5 hours) or stationary growth phase (24 hours). Cells were collected by centrifugation, washed in 0.85% NaCl and re-suspended in 100 mM potassium phosphate buffer pH 7 to concentration of  $2 \times 10^7$  cells/ml. When necessary, pre-incubation of the cells in the presence of 1 mM reduced glutathione, 10% (w/v) trehalose or 2 mM N-acetyl cysteine (final concentrations) was performed for 30 min with agitation at 180 rpm. Yeast cells were treated for 30 minutes in the presence of different concentrations of PHMB with agitation at 180 rpm, adequately diluted and plated on YPD. After five days of incubation at 30°C, the number of viable cells after each treatment was calculated by the percentage of colony forming units using water-treated cells as reference of 100% cell viability. The results are the average of biological replicates with technical triplicates for each. Semi-quantitative spot-test assays were performed with exponentially growing cells at  $2 \times 10^7$  cells/ml in 100 mM potassium phosphate buffer pH 7. After appropriated dilutions, aliquots of five  $\mu$ l were spotted on YPD plates supplemented with PHMB in different concentrations. The plates were incubated at 30°C for 72 hours.

### Cell treatments for gene expression analysis

Two independent cultures of each strain of *S. cerevisiae* were grown in YPD until early stationary phase. The cultures were re-inoculated in fresh medium to an initial DO at 600 nm of 0.5 and split in two flasks for non-treated and PHMB-treated cells. After incubation for one hour at 30°C with agitation, cells were collected by centrifugation and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For genes response to thermal shock, cells of BY4741 and *\_yap1* strains prepared as above and test cell suspensions were incubated for one hour 42°C, while the reference were incubated at 30°C. Afterwards, yeast cells were collected and stored as above.

#### **RNA extraction and cDNA Synthesis**

For total RNA extraction, frozen cells were suspended in 600 µl of AE buffer (50 mM sodium acetate, 10 mM EDTA, adjusted to pH 5.3 with acetic acid), 40 µl of 10% SDS and 600 µl phenol equilibrated to pH 4 (Invitrogen) and homogenized 15 seconds on vortex. Following incubation at 65°C for 10 minutes, with mixing every two minutes, and incubation for five minutes at 4°C, the lysate was centrifuged at 13,000 g for five min at 4°C. Aqueous phase was recovered to a new tube and extracted once with equal volume of phenol-chloroform (5:1) solution pH 5.3 and once with one volume of chloroform. At last, lithium chloride was added to 2.5 M final concentration and total RNA was precipitated for 30 minutes at -20°C and recovered by centrifugation for 20 min at 13,000 g. The pellet was washed with 70% cold ethanol, dried at room temperature for 10 minutes, suspended in 25 µl of DEPC-treated deionized water and stored at -80°C until use. RNA quantification was performed by absorbance analysis at 260 nm (1 OD<sub>260</sub> = 40 µg RNA/ml). The purity was analyzed by the absorbance ratio 260 nm/280 nm (pure samples presented ratio of 1.9 to 2.1). The integrity of RNA was verified by agarose gel electrophoresis using as parameter the sharpness and intensity of bands corresponding to 26S and 18S rRNA. For cDNA was synthesis, one µg of total RNA was used 40 µl of reverse transcription reaction with the kit ImProm-II™ Reverse Transcription System Promega II (Promega, USA), following manufacturer's instructions.

#### **Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)**

Coding regions of target genes were recovered from the Yeast Genome Database - SGD (<http://www.yeastgenome.org>). Primer design was done by the on-line Genscript Primer Design in advanced mode ([www.genscript.com/cgi-bin/tools](http://www.genscript.com/cgi-bin/tools)) using the following parameters: the sizes of the primers between 17 and 25 bases, T<sub>m</sub> value of 59°C and size of amplicons between 70 and 110 bp. The primer pairs were analyzed with Netprimer tool for determining the formation of self-hybrids, duplex, hairpins and loops ([www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html](http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html)) to select those with a ranking greater than 90%. The primer pairs were subjected to an analysis of match with coding regions of target genes ([www.blast.org](http://www.blast.org)) and to PCR in sand (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) using as template the genome of *S. cerevisiae*. The sequences of primers were synthesized by IDT Technologies (USA). Tests on RealTime PCR were performed in the detection system ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The amplification conditions used were: initial step at 50 ° C for 2 min, 95 ° C for 10 minutes, and 40 cycles of 95 ° C for 15 sec, and 60 min for 1 min. For the determination of contamination by genomic DNA, the PCR reactions were carried out with RNA samples for each condition. The results produced no detectable amplification in any condition. The values of Ct threshold cycle were given

automatically for the independent amplification. Relative gene expression was calculated by the  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  method [50] normalized against the endogenous control gene *ADKI* and compared according to the calibrator condition (Table 2 - supplementary data for Ct values for *ADKI* in all conditions tested on this work, showing variation lower than one cycle). The relative gene expression values are the average of two technical replicates, with biological duplicates each.

The data were expressed in folds of up-regulation and down-regulation relative to endogenous control (*ADKI*) provided the calibrator at value 1. Values between 0 and 1 (gene down-regulation) were transformed to  $-1/2^{-\Delta\text{Ct}}$  and subsequently subtracted from the value of the endogenous control (1) to all values. The standard error ( $\delta$ ) calculation used the formula:  $\delta = \sigma / \sqrt{N}$ , where  $\sigma$  is the variance of different Ct values obtained, and N is the number of values of Ct used in the calculation. To determine the error of  $-\Delta\text{Ct}$  it was used the formula for the propagation of the standard error as  $\delta_{-\Delta\text{Ct}} = \sqrt{(\delta_1)^2 + (\delta_2)^2}$ , where  $\delta_1$  is the standard error of the gene of interest and  $\delta_2$  is the standard error of the endogenous control.

### Biochemical analysis

Determination of intracellular sulphydryl groups were performed according to the DTNB method [51] using 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoic acid. The level of membrane lipids peroxidation was measured using the thiobarbituric acid reactive and the production of intracellular ROS was measured by the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate reactive [52]. Yeast cell suspension at 0.5 OD<sub>600nm</sub> were treated as described above, washed with 0.85% NaCl and lysated by vortexing three times of 30 seconds with glass beads. The soluble cell-free extract was tested for free-thiols and ROS while the pellet was tested for membrane lipid peroxidation.

### In silico gene promoter analysis

Sequences corresponding to -1000 to -1 nucleotide position of the target genes were recovered in FAST format from SGD database and used to search for TF binding sites and DNA motifs at the YEASTRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking) database at <http://www.yeasttract.com/index.php> [53], following the instructions in the tutorial.

### Authors' contribution

CE carried out the cytotoxicity and molecular genetic studies and drafted the manuscript. MAMJ conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian agencies FACEPE and CNPq. CE received PhD scholarship from CAPES.

### References

1. Elsztein C, Scavuzzi de Menezes JA, Morais MA: **Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel-ethanol fermentation process.** *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2008, **35(9)**: 987-973.
2. Cazzaniga A, Serralta V, Davis S, Orr R, Eaglstein W, Mertz PM: **The effect of an antimicrobial gauze dressing impregnated with 0.2-percent polyhexamethylene biguanide as a barrier to prevent Pseudomonas aeruginosa wound invasion.** *Wounds* 2002, **14(5)**: 169-176.

3. Payne JD, Kudner DW: **A durable antiodor finish for cotton textiles.** *Text Chem Color* 1996, **28**: 28–30.
4. Kusnetsov JM, Tulkki AI, Ahonen HE, Martikainen PJ: **Efficacy of three prevention strategies against legionella in cooling water systems.** *J Appl Microbiol* 1997, **82**: 763–768.
5. Hiti K, Walochnik J, Haller-Schober EM, Faschinger C, Aspöck H: **Viability of Acanthamoeba after exposure to a multipurpose disinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems.** *Br J Ophthalmol* 2002, **86**:144–146.
6. Rosin M, Welk A, Bernhardt O, Ruhnau M, Pitten FA, Kocher T, Kramer A: **Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque.** *J Clin Periodontol* 2001, **28**:1121–1126.
7. Rosin M., Welk A, Kocher T, Majic-Todt A, Kramer A, Pitten FA: **The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth.** *J Clin Periodontol* 2002, **29**:392–399.
8. Cox NA, Bailey JS, Berrang ME: **Bactericidal treatment of hatching eggs. I. Chemical immersion treatments and salmonella.** *J Appl Poult Res* 1998, **7**: 347–350.
9. Cox NA, Berrang ME, Buhr RJ, Bailey JS: **Bactericidal treatment of hatching eggs. II. Use of chemical disinfectants with vacuum to reduce salmonella.** *J Appl Poult Res* 1999, **8**:321–326.
10. Messick CR, Pendland SL, Moshirfar M, Fiscella RG, Losnedahl KJ, Schriever CA, Schreckenberger PC: **In-vitro activity of polyhexamethylene biguanide (PHMB) against fungal isolates associated with infective keratitis.** *J Antimicrob Chemother* 1999, **44**:297-298.
11. Donoso R, Mura JJ, and Lopez M: **Acanthamoeba keratitis treated with propamidine and polyhexamethyl biguanide(PHMB).** *Rev Med Chil* 2002, **130**:396-401.
12. Gray JV, Ogas JP, Kamada Y, Stone M, Levin DE, Herskowitz I: **A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of Saccharomyces cerevisiae in bud emergence and identification of a putative upstream regulator.** *EMBO J.* 1997, **16**:4924–4937.
13. Narasimhan S, Madhavan HN, K LT: **Development and application of an in vitro susceptibility test for Acanthamoeba species isolated from keratitis to polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine.** *Cornea* 2002, **21**:203-205.
14. Allen MJ, White GF, Morby AP: **The response of Escherichia coli to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide.** *Microbiology* 2006, **152**:989–1000
15. O'Malley LP, Collins NA, White GF: **Biodegradability of end-groups of the biocide polyhexamethylene biguanide (PHMB) assessed using model compounds.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006, **33**:677–684.
16. Broxton P, Woodcick, PM, Heatley F, Gilbert P: **Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in Escherichia coli.** *J Appl Bacteriol* 1984, **57**:115-124.
17. Allen MJ, Morby AP, White GF: **Cooperativity in the binding of the cationic biocide polyhexamethylene biguanide to nucleic acids.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **318**:397–404.
18. Seal D: **Treatment of Acanthamoeba keratitis.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003, **1**:205–208.
19. Khunkitti W, Hann AC, Lloyd D, Furr JR, Russell AD: **X-ray microanalysis of**

- chlorine and phosphorus content in biguanide- treated *Acanthamoeba castellanii*. *J Appl Microbiol* 1999, **86**:453–459.
20. Beney L, Gervais P: **Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2001, **57**:34–42.
21. Li L, Ye YR, Pan L, Zhu Y, Zheng SP, Lin Y: **The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009, **387**:778–783.
22. Cabib E, Mol PC, Shaw JA, Choi WJ: **Biosynthesis of cell wall and septum during yeast growth.** *Arch Med Res* 1993, **24**:301-303.
23. Lesage G, Bussey H: **Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**:317-343.
24. Boorsma A, Nobel HH, Riet BB, Bargmann B, Brul S, Hellingwerf KJ, Klis FM: **Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 2004, **21**:413–427.
25. Yun DJ, Zhao Y, Pardo JM, Narasimhan ML, Damsz B, Lee H, Abad LR, D’Urzo MP, Hasegawa PM, Bressan RA: **Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, **94**:7082–7087.
26. Russo P, Simonen M, Uimari A, Teesalu T, Makarov M: **Dual regulation by heat and nutrient stress of the yeast HSP150 gene encoding a secretory glycoprotein.** *Molecular and General Genetics* 1993, **239**:273-280.
27. Kapteyn JC, Van Egmond P, Sievi E, Van Den Ende H, Makarow M, Klis FM: **The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and b1,6-glucan-deficient mutants.** *Molecular Microbiology* 1999, **31**:1835–1844.
28. Levin DE: **Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2005, **69**: 262-291.
29. Terashima H, Yabuki N, Arisawa M, Hamada K, Kitada K: **Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Gen Genet* 2000, **264**:64-74
30. Jungmann J, Munro S: **Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity.** *EMBO J* 1998, **17**:423-34
31. Roemer T, Paravicini G, Payton MA, Bussey H: **Characterization of the yeast (1-6)- $\beta$ -glucan biosynthetic components, Kre6p and Sknlp, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly.** *The Journal of Cell Biology* 1994, **127**:567-579.
32. Shahinian S, Bussey H: **B-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular Microbiology* 2000, **35**: 477-489.
33. Jacoby JJ, Nilius SM, Heinisch JJ: **A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene.** *Mol Gen Genet* 1998, **258**:148–155.
34. Kamada Y, Jung US, Piotrowski J, Levin DE: **The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response.** *Genes Dev* 1995, **9**:1559–1571.

35. Durand F, Dagkessamanskaia A, Martin-Yken H, Graille M, Van Tilbeurgh H, Uversky VN, François JM: **Structure-function analysis of Knr4/SmiI, a newly member of intrinsically disordered proteins family, indispensable in the absence of a functional PKCI-SLT2 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 2008, **25**:563-576.
36. Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, Basmaji F: **The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Microbiol* 2003, **49**:23–35.
37. Mattison CP, Spencer SS, Kresge KA, Lee J, Ota IM: **Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:7651–7660.
38. Rodríguez-Peña JM, García R, Nombela C, Arroyo J: **The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes.** *Yeast* 2010, **27**:495-502.
39. Thorsen M, Di Y, Tängemo C, Morillas M, Ahmadpour D, Van der Does C, Wagner A, Johansson E, Boman J, Posas F, Wysocki R, Tamás MJ : **The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast.** *Molecular Biology of the Cell* 2006, **17**:4400–4410.
40. Casagrande V, Del Vescovo V, Militti C, Mangiapelo E , Frontali L, Negri R and Bianchi MM: **Cesium chloride sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: an interplay among the HOG and CWI MAPK pathways and the transcription factor Yaf9.** *FEMS Yeast Res* 2009, **9**: 400–410
41. García R, Rodríguez-Peña JM, Bermejo C, Nombela C, Arroyo J: **The HOG and CWI pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *S. cerevisiae*.** *The journal of biological chemistry* 2009, **284**:10901-10911.
42. McDonnell G, Russell DA: **Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance.** *Clinical Microbiology Reviews* 1999, **12**:147-179.
43. Herrero E, Ros J, Belli G, and Cabisco E: **Redox control and oxidative stress in yeast cells.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1780**:1217-1235.
44. Verbelen PJ, Depraetere SA, Winderickx J, Delvaux FR, Delvaux F: **The influence of yeast oxygenation prior to brewery fermentation on yeast metabolism and the oxidative stress response.** *FEMS Yeast Res* 2009, **9**:226–239.
45. Vilella F, Herrero E, Torres J, Torre-Ruiz MA: **Pkc1 and the upstream element of the Cell Integrity Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress.** *The Journal of Biological Chemistry* 2005, **280**:9149–9159.
46. Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang: **Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2009, **85**:253–263.
47. Bourdineaud JP, De Sampaio G, and Lauquin GJ: **A Rox1-independent hypoxic pathway in yeast. Antagonistic action of the repressor Ord1 and activator Yap1 for hypoxic expression of the SRP1/TIR1 gene.** *Mol Microbiol* 2000, **38**:879-90.
48. Harrison, J.C., Zyla, T.R., Bardes, E.S.G., Lew, D.J. **Stress-specific Activation Mechanisms for the "Cell Integrity" MAPK Pathway.** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(4):2616-2622.

49. Silva-Filho EA, Melo HF, Antunes DF, Santos SKB, Resende AM, Simões DA, Morais Jr MA: **Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuelethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005, **32**:481-486
50. Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
51. Sedlak J, Lindsay RH: **Estimation of total, protein- bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent.** *Anal Biochem* 1968, **25**:192-205.
52. Moraitis C, Curran BPG: **Can the different heat shock response thresholds found in fermenting and respiring yeast cells be attributed to their differential redox states?** *Yeast* 2007, **24**:653-666.
53. Monteiro PT, Mendes N, Teixeira MC, D'Orey S, Tenreiro S, Mira N, Pais H, Francisco AP, Carvalho AM, Lourenço A, Sá-Correia I, Oliveira AL and Freitas AT: **YEASTRACT-DISCOVERER: new tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nucl Acids Res* 2008, **36**: 132-136.

#### Figure legends

**Figure 1.** Relative expression of yeast genes involved in cell wall integrity mechanism and in general stress response. Fold change represent the expression of the studied genes in PHMB-treated cells over non-treated cells of the two industrial strains JP1 and PE-2.

**Figure 2.** Cytotoxicity assay of yeast CWI mutants to different doses of PHMB. The percentage of viable cells after treatments refers to the number of CFU in treated samples over non-treated samples of a given strain.

**Figure 3.** Cytotoxicity assay of yeast oxidative stress response mutants to different doses of PHMB. **(A)** Spot test assay of parental BY4741 and *Dyap1* mutants to oxidizing compound H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and to PHMB. **(B)** Dose-response cell survival assay of mutant strains of the oxidative stress response.

**Figure 4.** Relative expression of yeast genes involved in cell wall integrity mechanism and in general stress response of parental BY4741 and *Dyap1* strains in response to treatments with PHMB **(A)** and heat shock at 42°C **(B)**.

**Figure 5.** Proposed model of cell response to damages caused by PHMB in the yeast cell wall showing the interplay between HOG and PCK/CWI mechanisms. Straight lines indicate transducing activation of target proteins and dotted lines indicates putative transducing connection. Thick brown lines indicate transcriptional regulations of a given transcriptional factor (TF) by recognition of a motif (colored triangles) in the promoter of target gene (YRE: Yap1p-responsive element; Hsf1: motif bounded by heat shock factor 1; STRE: stress responsive element; Skn7: motif bounded by Skn7p; Rlm1: motif bounded by Rlm1p; SBF: motif bounded by SBF Swi4/6 complex).

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

#### Additional files provided with this submission:

Additional file 1: Table 1 - supplementary data [Elsztein and Morais].doc, 40K  
<http://www.biomedcentral.com/imedia/1407262466443928/supp1.doc>

Additional file 2: Table 2 - supplementary data [Elsztein and Morais].doc, 36K  
<http://www.biomedcentral.com/imedia/1224261820443928/supp2.doc>

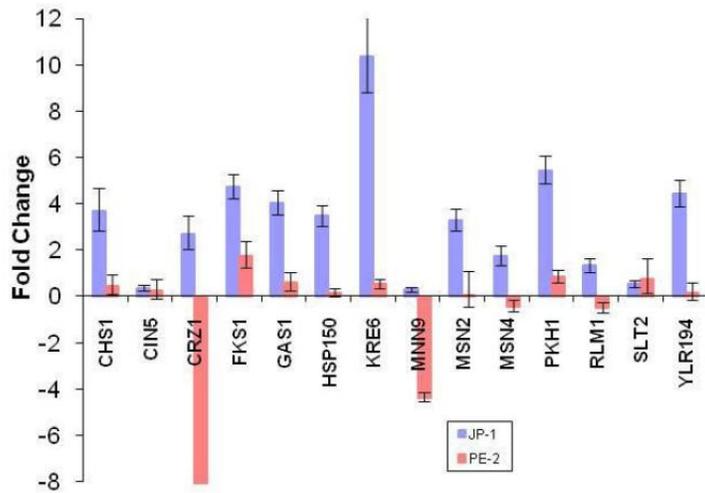


Figure 1

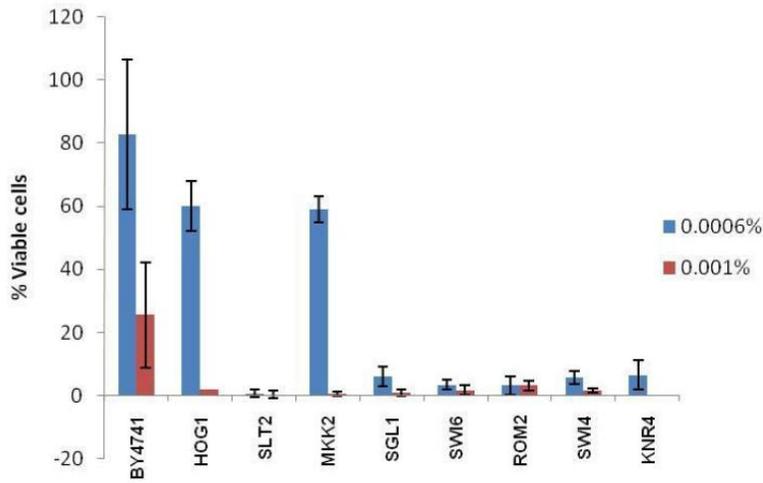


Figure 2

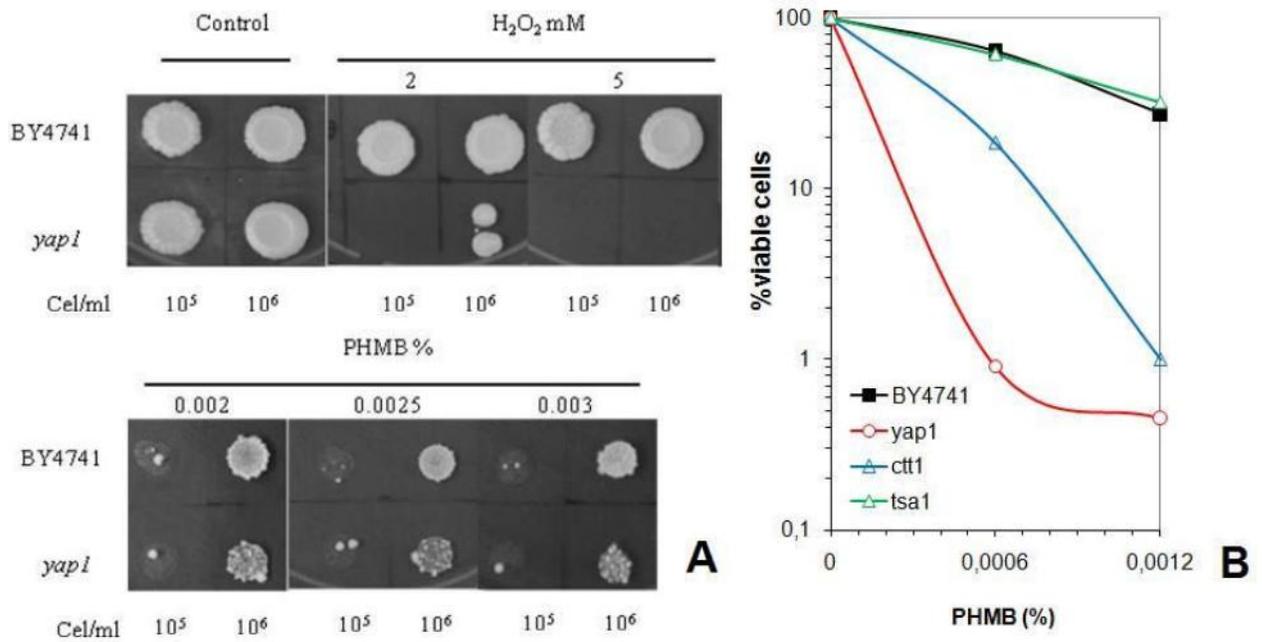


Figure 3

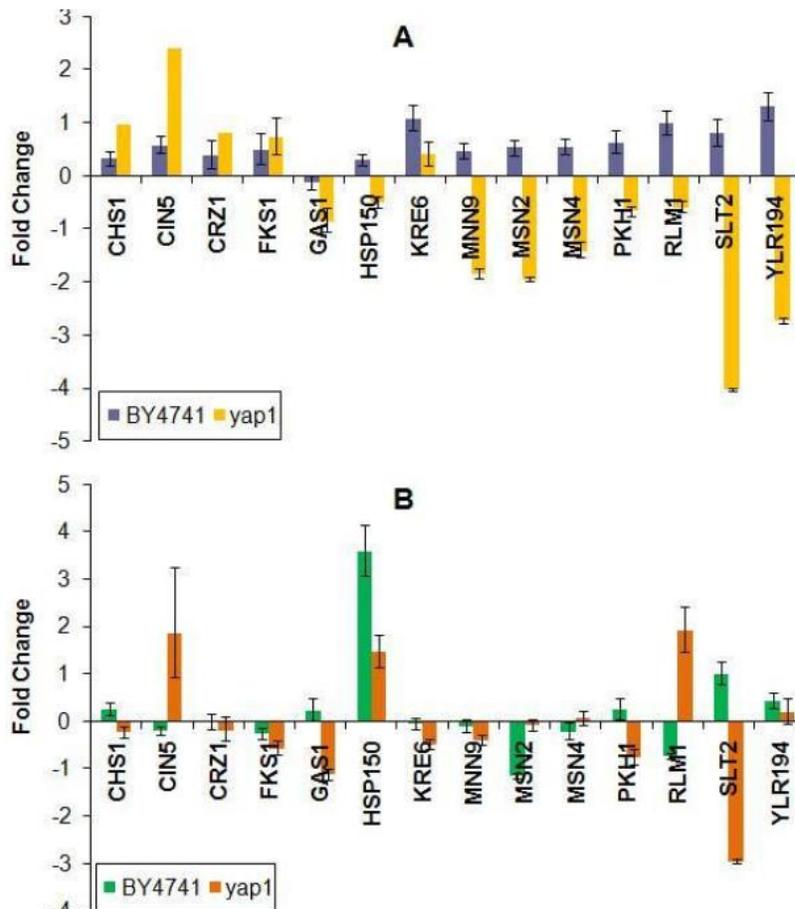
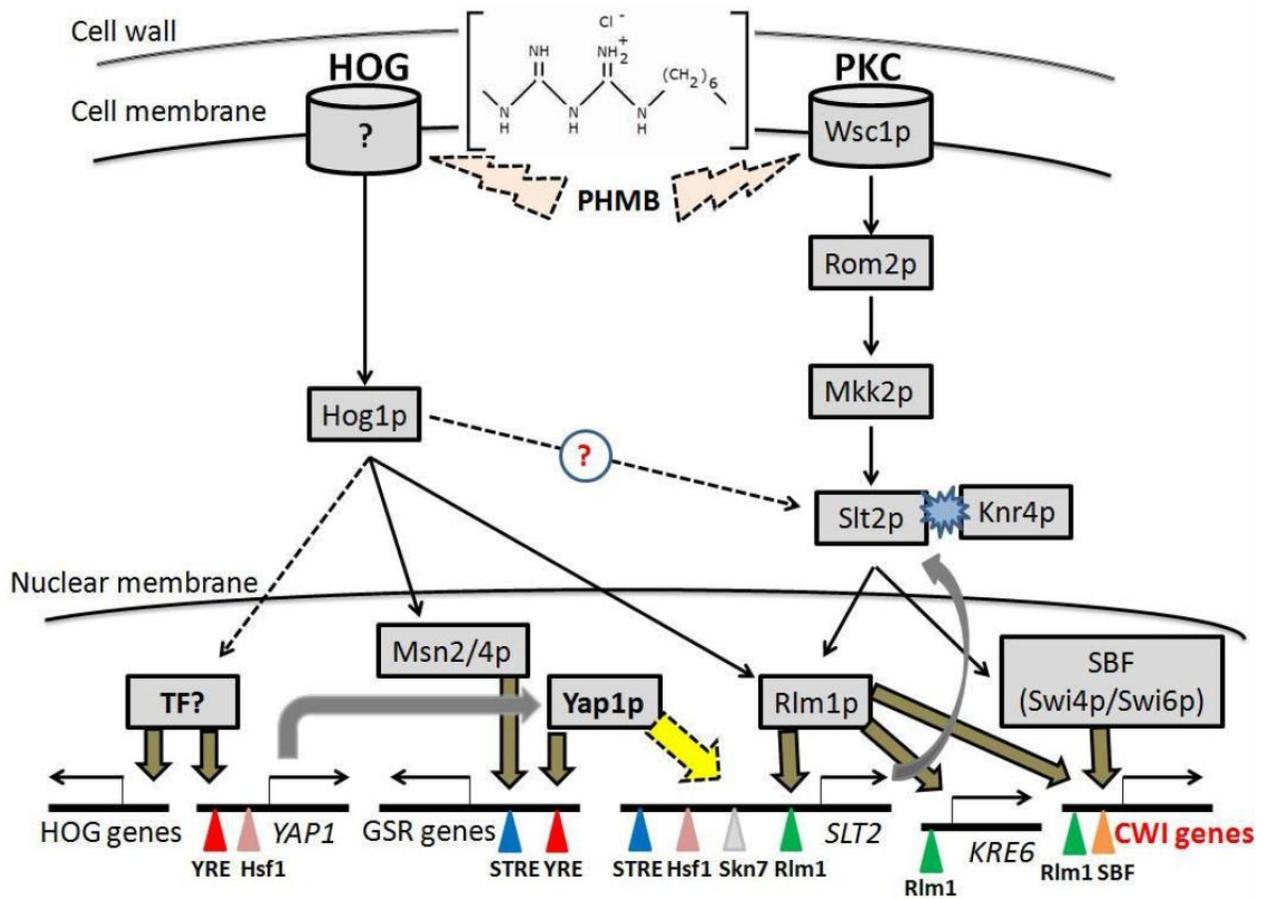


Figure 4



## 9. MEMORIAL

Meu nome é Carolina Elsztein e nasci o16 de dezembro de 1973 na cidade de Olavarría, Argentina. Fiz meus estudos de primeiro grau e segundo grau na minha cidade natal e aos 18 anos mudei-me para a cidade de Mar Del Plata, estado de Buenos Aires, para estudar a carreira de Bachelor em Ciencias Biológicas da Universidad Nacional de Mar Del Plata. O últimos anos de minha formação, fiz estágios em FIBA, trabalhando em Biologia Molecular de Plantas, e no Hospital Regional , trabalhando 6 meses no laboratório de Histopatología. Como requisito para finalizar os estudos, minha monografía foi na área de Biología Molecular no Instituto de Investigaciones Biológicas, UNMdP, específicamente em proteases da arqueobacteria *Natronococcus occultus* .Entre o ano 2000 e 2003 trabalhei no laboratório de Biología Molecular da empresa Monsanto, na área de Pureza genética e *Molecular breeding*. No ano 2004 comecei o Mestrado em Genética no Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, tendo como orientador ao Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior, finalizando o curso no ano 2006 com a defesa da dissertação intitulada: Atividade fungicida de natamicina e polihexametileno biguanida sobre leveduras industriais e identificação dos mecanismos genéticos de resistência. No ano 2007 comecei o doutorado na mesma instituição, com o mesmo orientador, aprofundando o efeito molecular produzido pelo PHMB em leveduras.