

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Patrícia Gonçalves Prates Barbosa

**ANÁLISES DE QTL E GENÔMICA COMPARATIVA PARA ESTUDAR
MECANISMOS REGULATÓRIOS DA H⁺-ATPASE DE MEMBRANA
PLASMÁTICA DE *Saccharomyces cerevisiae***

Tese de Doutorado

Ouro Preto

2021

PPGBIOTEC

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Patrícia Gonçalves Prates Barbosa

**ANÁLISES DE QTL E GENÔMICA COMPARATIVA PARA ESTUDAR
MECANISMOS REGULATÓRIOS DA H⁺-ATPASE DE MEMBRANA**

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

Coorientador: Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha

Prof^a. Dr^a. Izinara Rosse da Cruz

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia do núcleo de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia industrial.

Ouro Preto, Julho 2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

B238a Barbosa, Patrícia Gonçalves Prates .
Análises de QTL e genômica comparativa para estudar mecanismos regulatórios da H⁺-ATPase de membrana. [manuscrito] / Patrícia Gonçalves Prates Barbosa. - 2021.
109 f.: il.: color., tab..

Orientador: Prof. Dr. Rogélio Lopes Brandão.

Coorientadores: Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha, Profa. Dra. Izinara Rosse da Cruz.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. ATPases transportadoras de cálcio da membrana plasmática. 2. Locos de características quantitativas . 3. Leveduras. I. Brandão, Rogélio Lopes. II. Cruz, Izinara Rosse da. III. Cunha, Aureliano Claret da . IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 604

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
PRO-REITORIA DE PESQUISA, POS-GRADUACAO E
INOVACAO
NUCLEO DE PESQUISAS EM CIENCIAS BIOLOGICAS
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM BIOTECNOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Patrícia Gonçalves Prates Barbosa

Análise de QTLs e genômica comparativa para estudar mecanismos regulatórios da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de doutor

Aprovada em 30 de julho de 2021

Membros da banca

Doutor - Rogelio Lopes Brandão - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutor - Luciano Gomes Fietto - (Universidade Federal de Viçosa)
Doutor - Tiago Antônio de Oliveira Mendes - (Universidade Federal de Viçosa)
Doutor - Milton Hércules Guerra de Andrade - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutora - Silvana de Queiroz Silva - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Rogelio Lopes Brandão, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 20/09/2021



Documento assinado eletronicamente por **Rogelio Lopes Brandao, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 28/09/2021, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0200145** e o código CRC **72455CB6**.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Giovani e Anilda, obrigada por tudo, pelo incentivo, educação e pelos valores ensinados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFOP pela qualidade do ensino ofertado e aos órgãos de fomento à pesquisa: CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Ao Prof. Dr. Rogélio Brandão pela oportunidade, confiança e estímulo. Será para mim sempre um exemplo de professor e profissional a ser lembrado.

Ao Prof. Dr. Ieso Castro, pelo apoio e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Prof. Dr. Aureliano Claret e Profa. Dra. Izinara Rosse pela coorientação e ensinamentos.

Ao Laboratório Multiusuários de Microscopia Avançada e Microanálise do NUPEB/UFOP pela disponibilização do espaço e equipamentos para realização dos testes de citometria.

Aos grandes amigos do LBCM: Anna Clara Campos, Débora Faria, Diogo Castanheira, Ludmila Ferreira, Marcos Oliveira e Thalita Macedo, obrigada por toda ajuda, apoio e pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos demais colegas de laboratório durante os últimos 6 anos.

À querida Zezé, pela disponibilidade, aprendizado, apoio e alegria.

Ao Lauro, técnico de bioinformática do NUPEB que sempre nos atendeu prontamente.

Aos professores, técnicos e alunos dos Laboratórios de Imunoparasitologia, pela disponibilização de equipamentos.

Aos professores do NUPEB, pelos ensinamentos e pela presteza.

A Irene, por toda atenção e carinho com Ana Júlia nos momentos que estive ausente.

Aos meus familiares pelo incentivo.

Ao meu pai e minha mãe, gratidão eterna.

Ao meu marido pela paciência, amor, carinho e companheirismo.

A minha filha Ana Júlia, meu incentivo diário.

RESUMO

A H⁺-ATPase é uma proteína presente na membrana citoplasmática de plantas e fungos e desempenha um papel essencial na geração de um gradiente eletroquímico de prótons, importante para a captação de nutrientes e regulação do pH intracelular. A ativação da H⁺-ATPase da membrana citoplasmática em *Saccharomyces cerevisiae* induzida por glicose é supostamente atribuída a um sinal de cálcio intracelular correlacionado ao metabolismo do fosfatidilinositol. Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi observada diferença de fenótipo entre as cepas *S. cerevisiae* BY4742 *arg82Δ* e PJ69 *arg82Δ* através do teste de atividade da H⁺-ATPase, indicando que o fenótipo de maior ativação da H⁺-ATPase está relacionado a vários genes. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi utilizar diferentes abordagens genômicas para identificar novos componentes da regulação induzida por glicose da H⁺-ATPase. Para isso, foram realizados o sequenciamento do genoma segregante agrupado, mapeamento de QTLs e análises de Bioinformática para identificar o possível motivo da diferença de fenótipo e, ou, novos componentes desta via de transdução de sinal. Uma vez identificadas as variantes na análise de mapeamento de QTL foi desenvolvido o *script* SNPsInQTLselection.py para identificar as bases genéticas que podem estar envolvidas com o fenótipo de maior atividade da H⁺-ATPase. Após a utilização desse *script* foram identificadas 42 variantes em 33 genes potencialmente envolvidos com o fenótipo de interesse. Para priorização desses genes candidatos foi realizado análise de enriquecimento e interatoma que permitiram identificar 10 genes enriquecidos e envolvidos na via da telomerase e do fosfatidilinositol (*STT4*, *PIK2*, *UGA2*, *EST1*, *MEC3*, *HEK2*, *TOP3*, *PSO2*, *STO1*, *FUR4*). Cepas do *background* BY contendo esses respectivos genes deletados (coleção EUROSCARF) foram utilizadas para teste de fenótipo de acidificação extracelular e sinalização de cálcio induzida por glicose. Por meio desses testes, 4 (*UGA2*, *FUR4*, *EST1* e *STT4*) dos 10 genes enriquecidos, apresentaram o fenótipo de maior ativação da H⁺-ATPase, fenótipo esse evidenciado nos testes de acidificação extracelular e sinal de cálcio. Destes 4 genes, vale destacar o *STT4* visto que, de acordo com a função descrita para esse gene na literatura o fosfatidilinositol-4-fosfato pode exercer um papel na regulação da via de ativação de H⁺-ATPase, controlando a atividade da fosfolipase C. Tendo em vista uma relação positiva entre atividade da H⁺-ATPase e desempenho fermentativo, estudos futuros podem ser feitos com os genes/alelos identificados neste trabalho, com aplicação em cepas de leveduras industriais

visando a melhoria na eficiência de processos fermentativos. Os genes (*UGA2*, *FUR4*, *EST1* e *STT4*) merecem investigação detalhada para verificação do possível envolvimento na via de sinalização da H⁺-ATPase. Esse trabalho apresenta pela primeira vez uma estratégia de Bioinformática para identificar genes candidatos quando o resultado do mapeamento de QTL não for significativo.

Palavras chave: H⁺-ATPase da membrana plasmática; análise de QTL; levedura.

ABSTRACT

The proton-pumping ATPase (H⁺-ATPase) is found in the plant plasma membrane and plays an essential role to generate an electrochemical proton gradient, which is important for nutrient uptake and intracellular pH regulation. Activation of H⁺-ATPase of the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose is supposedly attributed to an intracellular calcium signal correlated to phosphatidylinositol metabolism. Previously, a phenotype difference was observed between the *S. cerevisiae* BY4742 *arg82Δ* and PJ69 *arg82Δ* strains through the H⁺-ATPase activity test, indicating that the H⁺-ATPase activation phenotype is related to several genes. In this context, the objective of this work was to use different genomic approaches to identify new components of glucose-induced regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activation. For this, the sequencing of the clustered segregating genome, QTL mapping and Bioinformatics analyzes were carried out to identify the possible reason for the phenotype difference and/or new components of this signaling transduction pathway. Once the variants were identified in the QTL mapping analysis, the `SNPsInQTLselection.py` script was developed to identify the genetic bases that may be involved with the phenotype of higher activity H⁺-ATPase. Through this script, 42 variants were identified in 33 genes potentially involved with the phenotype of interest. To prioritize these candidate genes, the enrichment and interatoma analysis were performed, which allowed the identification of 10 enriched genes involved in the telomerase and phosphatidylinositol pathway (*STT4*, *PIK2*, *UGA2*, *EST1*, *MEC3*, *HEK2*, *TOP3*, *PSO2*, *STO1*, *FUR4*). Background BY strains containing these respective deleted genes (EUROSCARF collection) were used to test the extracellular acidification phenotype and glucose-induced calcium signaling. Through these tests, 4 (*UGA2*, *FUR4*, *EST1* and *STT4*) of the 10 enriched genes showed the phenotype of greater activation of H⁺-ATPase, a phenotype that was evidenced in the extracellular acidification and calcium signal tests. Of these 4 genes, it is worth highlighting *STT4* since, according to the function described for this gene in the literature, phosphatidylinositol-4-phosphate can play a role in regulating the activation pathway of H⁺-ATPase, controlling the activity of phospholipase C. In view of a positive relationship between H⁺-ATPase activity and fermentative performance, future studies can be done with the genes / alleles identified in this work, with application in industrial yeast strains to improve the efficiency of fermentation processes. The genes (*UGA2*, *FUR4*, *EST1* and *STT4*) deserve detailed investigation to verify their possible involvement in the H⁺-ATPase signaling pathway.

This work presents for the first time a Bioinformatics strategy to identify candidate genes when the result of QTL mapping is not significant.

Keywords: H⁺-ATPase from the plasma membrane; QTL analysis; yeast.

Sumário

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIACÕES	14
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE FIGURAS.....	17
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.2 Sinalização celular	20
1.3 Metabolismo do fosfatidilinositol	21
1.4 H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.4.1 Via de transdução de sinal da ativação da H ⁺ -ATPase induzida por glicose.....	27
1.5 Arg82p, proteína multifuncional em <i>S. cerevisiae</i> e atividade da H ⁺ -ATPase.....	32
1.6 Análise poligênica através de mapeamento de QTLs (<i>Quantitative Traits Loci</i>)	33
1.6.1 Análise de segregantes agrupados	34
1.7 Melhoramento de leveduras de interesse biotecnológico	37
2.0 JUSTIFICATIVA	38
3.0 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos	39
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Microrganismos	40
4.1.2 Vetor	42
4.2 Meios de cultivo.....	42
4.2.1 Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> em glicose	42
4.3 Acidificação extracelular.....	43
4.3.1 Condições de crescimento e preparo das células de leveduras para medida da acidificação.....	43
4.3.2 Medida da acidificação extracelular induzida por glicose	43
4.3.3 Determinação do peso seco das células de levedura.....	44
4.3.4 Cálculo da taxa de acidificação extracelular	44

4.4. Transformação de leveduras.....	44
4.5 Monitoramento <i>in vivo</i> da concentração de cálcio citosólico livre	45
4.6 Obtenção e seleção de haploides com maior ativação da H ⁺ -ATPase a partir do cruzamento entre <i>S. cerevisiae</i> PJ694a e <i>S. cerevisiae</i> BY4742	46
4.6.1 Confirmação das linhagens parentais com fenótipo superior e inferior para ativação da H ⁺ -ATPase	46
4.6.2 Cruzamento entre <i>S. cerevisiae</i> PJ69 <i>arg82Δ</i> e <i>S. cerevisiae</i> BY4742.....	46
4.6.3 Determinação do <i>mating type</i> das leveduras	47
4.6.4 Esporulação das leveduras obtidas do cruzamento	47
4.6.5 Dissecação de tétrades e obtenção dos segregantes haploides.....	47
4.7 Análise da ploidia por Citometria de Fluxo	48
4.8 Avaliação do crescimento dos haploides em presença de higromicina	49
4.9 Avaliação do crescimento dos haploides em presença de cloreto de lítio	50
4.10 Análises estatísticas.....	50
4.11 Extração de DNA e sequenciamento	50
4.12 Análise das sequências e mapeamento dos QTLs	51
4.12.1 Análises de Bioinformática para priorização de genes candidatos	52
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Diferenças entre duas cepas de leveduras de diferentes <i>backgrounds</i> em relação à ativação de H ⁺ -ATPase de membrana plasmática induzida por glicose e à sinalização de cálcio	55
5.2 Obtenção e seleção de segregantes com maior ativação da H ⁺ -ATPase a partir do cruzamento entre <i>S. cerevisiae</i> PJ69-4a e <i>S. cerevisiae</i> BY4742.....	58
5.2.1 Escolha das cepas parentais	58
5.2.2 Cruzamento entre <i>S. cerevisiae</i> PJ694a e <i>S. cerevisiae</i> BY4742.....	58
5.2.3 Esporulação da levedura obtida do cruzamento	61
5.2.4 Avaliação do crescimento dos segregantes em presença de higromicina	62
5.2.5 Seleção de segregantes sensíveis ao cloreto de lítio	67
5.2.6 Seleção de segregantes com maior taxa de bombeamento de prótons	70
5.3 Extração do DNA e conferências das amostras para envio do sequenciamento	72
5.4 Análise de QTLs.....	73
5.5 Análise de Bioinformática para priorização dos genes candidatos.....	75
5.6 Influência dos genes selecionados sobre a atividade da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática e no sinal de cálcio intracelular	83

6.0 CONCLUSÕES.....	96
7.0 PERSPECTIVAS.....	97

LISTA DE ABREVIACOES

μ (h^{-1}): taxa de crescimento específica

AEQ1: gene que codifica para a proteína apoaequorina

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

Arg82p: Fosfatidilinositol 3-quinase com ampla especificidade de substrato; envolvida na biossíntese de inositol fosfato, regulação da biossíntese de arginina e transcrição do promotor RNA Pol II; localizado no núcleo.

ARG82: Gene que codifica Arg82p.

BSA: Bulk segregants analysis – Análise de segregantes agrupados

Ca²⁺: on cálcio

C-terminal: Carboxi terminal

DAG: diacilglicerol

D.O 600nm: densidade tica medida a 600 nm

EUROSCARF: European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis

Glc-6P: Glicose-6-fosfato

Glc-1P: Glicose-1-fosfato

Gpa2p: subunidade α da proteína G

Hxtp: Proteínas transportadoras de hexose

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato

IP₄: Inositol 1,3,4,5-tetrafosfato

IP₅: Inositol 1,3,4,5,6-pentafosfato

kDa: quilodltons

LPXI: gene que codifica para a proteína Lpx1p

MAT: gene que codifica para o fator de acasalamento da levedura

Min: Minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

nm: nanmetros

pH: potencial hidrogeniônico

p/v: peso por volume

pb: pares de base

PCR: Reação de polimerase em cadeia

PI/PtdIns: fosfatidilinositol

PI(4)P: fosfoinositol 4-fosfato

PI (4,5)P₂: fosfoinositol 4, 5 - bifosfato

PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato

PI4Ks: Fosfatidilinositol 4-quinases

PGM1: Gene que codifica para a proteína fosfoglucomutase, responsável pela conversão de glicose 6-fosfato a glicose 1-fosfato

PGM2: Gene que codifica para a proteína fosfoglucomutase, responsável pela conversão de glicose 1-fosfato a glicose 6-fosfato

PIK2: Gene que codifica uma piruvato quinase

Plc1p: Proteína fosfolipase C inositol específica

PMA1: gene que codifica Pma1p

Pma1p: proteína próton-ATPase (H⁺-ATPase)

Pmc1p: Cálcio ATPase vacuolar; capta cálcio do citosol para o vacúolo

PtdIns (4,5)P₂: fosfoinositol 4, 5 –bifosfato

PtdIns (3,4,5)P₃: fosfoinositol 3,4, 5 trifosfato

PTK2: gene que codifica para serina-treonina quinase Ptk2p

pVTU-AEQ: plasmídeo obtido pela inserção do fragmento do gene AEQ1 (permite expressão de apoaquorina)

QTL: *Quantitative Traits Locus* – *Locus* de características quantitativas

rpm: rotações por minuto

RLU/s: unidades relativas de luminescência por segundo

SD –URA: meio sintético sem adição da base nitrogenada uracila

Snf3p: Proteína que atua como sensor de alta afinidade para glicose

SNP: *Single Nucleotide Polimorphism* – Polimorfismo de nucleotídeo único Yvc1p: proteína codificada pelo gene *YVC*, canal catiônico vacuolar; media a liberação de Ca⁽²⁺⁾ do vacúolo em resposta ao choque hiperosmótico.

STT4: Gene que codifica fosfatidilinositol-4-quinase

UGA2: Gene que codifica uma succinato semialdeído desidrogenase

µg: micrograma

µg/mL: micrograma por mililitro

µL: microlitro

µM: micromolar

µmol: micromol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas neste estudo.....	40
Tabela 2: Crescimento celular (DO_{600nm}) dos segregantes em presença de higromicina (150 $\mu\text{g/mL}$).....	66
Tabela 3: Valores da densidade ótica (DO_{600nm}) obtidos pelos segregantes selecionados no teste de sensibilidade a cloreto de lítio (50mM).....	70
Tabela 4: Genes identificados no parental superior e no pool superior e ausentes no parental inferior.	77
Tabela 6: Porcentagem de ocorrência do alelo da cepa <i>PJarg82A</i> em cepas <i>S. cerevisiae</i>	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese de PtdIns(4,5)P ₂	25
Figura 2: Estrutura cristalográfica de H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática de <i>Arabidopsis thaliana</i> (H ⁺ -ATPase 2 – AHA2).....	26
Figura 3: Modelo de ativação da H ⁺ -ATPase de membrana citoplasmática, induzida por glicose.....	28
Figura 4: Via hipotética de ativação da H ⁺ -ATPase induzida por glicose..	31
Figura 5: Esquema da técnica BSA, análise de segregantes agrupados em levedura. ...	36
Figura 6: Disposição e identificação das colônias dos haploides na placa do micromanipulador.	48
Figura 7: Acidificação extracelular induzida por glicose.....	56
Figura 8: Determinação indireta de cálcio intracelular - sinal de cálcio nos <i>backgrounds</i> BY (A) e PJ (B).....	57
Figura 9: PCR <i>mating type</i> das <i>S. cerevisiae</i> PJ69 <i>arg82Δ</i> e BY4742..	59
Figura 10: Histograma do conteúdo de DNA das leveduras parentais e híbridas obtidos por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídio.....	60
Figura 11: Acidificação extracelular induzida por glicose da levedura PJ69 <i>arg82Δ</i> e das cepas resultantes do cruzamento (híbrido 10, 12 e 15).....	61
Figura 12: Células esporuladas do híbrido 10 resultante do cruzamento entre <i>S. cerevisiae</i> BY4742 (wt) e PJ69 <i>arg82Δ</i>	61
Figura 13: Crescimento das cepas de leveduras parentais BY4742 (wt) e PJ69 <i>arg82Δ</i> em diferentes concentrações de higromicina.....	64
Figura 14: Crescimento dos segregantes em presença de higromicina..	65
Figura 15: Crescimento das cepas de leveduras parentais BY4742 (wt) e PJ69 <i>arg82Δ</i> em diferentes concentrações de cloreto de lítio.....	68
Figura 16: Crescimento de segregantes em presença de cloreto de lítio (50mM).....	69
Figura 17: Acidificação extracelular induzida por glicose dos segregantes selecionados no teste de sensibilidade a cloreto de lítio (50mM).....	71
Figura 18: PCR 16s para verificação de possível contaminação bacteriana em DNA extraídos das cepas de levedura de interesse.	72
Figura 19: Mapeamento genético dos QTLs envolvidos no aumento da atividade da H ⁺ -ATPase pela análise de sequências de genomas completos de <i>pool</i> de segregantes.....	74
Figura 20: Visualização de parte do QTL detectado no cromossomo III.....	75

Figura 21: Interatoma dos 33 genes candidatos somados aos genes conhecidos na via hipotética de estudo da H ⁺ ATPase	82
Figura 22: Acidificação extracelular induzida por glicose das cepas com genes candidatos deletados.	83
Figura 23: Transformantes de células BY4741 com os plasmídeos pVTU-AEQ.....	85
Figura 24: Efeitos de diferentes deleções na sinalização de cálcio intracelular em células do <i>background</i> BY4741..	86
Figura 25: Síntese de PtdIns(4,5)P ₂ e hipótese relacionado a H ⁺ -ATPase	89
Figura 26: Alinhamento múltiplo das sequências do gene <i>STT4</i> na cepa <i>PJarg82Δ</i> , BY4742 e cepas <i>S. cerevisiae</i> encontradas no banco de dados (SGD).	92
Figura 27: Domínios conservados identificados.	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Há muito tempo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada na produção de cerveja e pão. Com o passar do tempo passou também a ser utilizada na produção de vinhos, biocombustíveis e biofarmacêuticos. Na indústria cervejeira, são muito utilizadas devido a sua boa capacidade de produzir etanol, crescimento rápido e tolerância a estresses ambientais, como por exemplo alta concentração de etanol e baixos níveis de oxigênio. Técnicas de engenharia genética vem sendo utilizadas em *S. cerevisiae* no intuito de obter cepas que produzem compostos aromáticos, melhorando as características sensoriais de bebidas fermentadas, como vinhos e cervejas. Aplicações biotecnológicas de leveduras vem sendo cada vez mais explorada visando modificações e desenvolvimento de novas cepas, o que contribuem para construção de cepas mais robustas com consequentes melhorias nos processos fermentativos (Domingues *et al.*, 2000; De Carvalho *et al.*, 2017; Figueiredo *et al.*, 2017; Pretorius, 2017; Willaert, 2017).

Entre as aplicações das leveduras destaca-se também a produção industrial de etanol, *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada na produção de etanol de primeira e segunda geração. Com isso, pesquisas de leveduras laboratoriais e industriais contribuem para a produção de etanol além de estarem envolvidas na melhoria da cinética de fermentação, do rendimento e da robustez nas condições envolvidas nos processos (Beato *et al.*, 2016; Jansen *et al.*, 2017).

S. cerevisiae vem sendo utilizadas também em engenharia genética para o desenvolvimento de cepas de levedura de alto desempenho para a produção industrial de óleos, produtos químicos entre outros compostos de interesse comercial (Mans *et al.*, 2018). É um dos modelos de organismos eucariotos que se destaca por ser um organismo unicelular com organização intracelular complexa como eucariotos superiores favorecendo estudos de processos celulares como sinalização, tráfico de membrana, entre outros. Por muito tempo as leveduras *S. cerevisiae* vem sendo usadas nos laboratórios como modelo para entender as células eucarióticas, o sequenciamento do seu genoma favorece a caracterização genética e fisiológica bem como a comparação de eucariotos sequenciados (Goffeau *et al.*, 1996; Piškur e Langkjær, 2004; Feyder *et al.*, 2015).

As aplicações biotecnológicas das leveduras envolvem vários setores, destacando sua ampla utilização nas indústrias de alimentos, bebidas e biocombustíveis devido à sua

excepcional fermentação e capacidade de acumulação de etanol combinada com resistência a stresses, como por exemplo, tolerância a baixo pH e altas concentrações de etanol. Uma notável característica desta espécie é a existência de subgrupos bem adaptados a processos específicos, apresentando características biotecnológicas ideais (Barnett, 2003; De Carvalho *et al.*, 2017; Peltier *et al.*, 2019)

Leveduras podem reproduzir de forma sexuada e assexuada. Reproduzem assexuadamente por brotamento onde a disponibilidade de nutrientes resulta em expansão clonal rápida e mitótica da levedura e a reprodução sexuada ocorre por esporulação seguido de cruzamento entre haploides com formação dos diploides (Boulton e Quain, 2008; Liti, 2015)

O cruzamento acontece com leveduras de diferentes *mating types*, determinado por alelos de um único *locus* (*MAT*). As leveduras apresentam *MAT α* , *MAT α* ou *MAT α / α* . A fusão de células de dois haploides diferentes, formam células diploides. Em condições de carência de nutrientes as células diploides sofrem meiose para produzir quatro esporos haploides. Quanto ao ciclo de vida das leveduras, muitos isolados naturais de *S. cerevisiae* são capazes de sofrer troca de tipo de acasalamento (*mating type*) denominando-as assim como cepas homotáticas. As leveduras que possuem ciclo homotático apresentam fase diploide estável, mas as células haploides possuem capacidade de trocarem seus tipos de fatores de acasalamento, sendo capazes de cruzarem ente si, tornando-se diploide. A troca do *mating type* de leveduras homotáticas se dá devido essas leveduras apresentarem o gene *HO* ativo. O gene *HO* codifica uma endonuclease responsável pela conversão do *MAT α* para *MAT α* ou vice versa. As cepas que não sofrem o processo de troca de *mating* são consideradas heterotáticas, sendo essas cepas haploides e diploides estáveis (Sherman, 1998; Katz Ezov *et al.*, 2010; Haber, 2012).

1.2 Sinalização celular

As células são submetidas a estímulos celulares através de receptores, esses estímulos consistem em perturbações da homeostase celular e as células respondem principalmente a problemas mecânicos, estímulos elétricos ou químicos, sendo a maioria dos sinais de natureza química. A partir desses estímulos são desencadeadas sinalizações complexas, resultando em processos bioquímicos, genéticos e estruturais. A sinalização celular tem início quando o primeiro mensageiro se liga ao seu receptor que na maioria das células é uma proteína transmembrana ou uma proteína dentro da célula. A partir do

momento que ocorre essa ligação ocorre indução de mudanças conformacionais no receptor que ativam a maquinaria enzimática ligada ao domínio citoplasmático, geralmente quinases, fosfatases e adaptadores. Ocorre assim ativação de conjuntos de reações realizadas pelos segundos mensageiros (cAMP, cGMP, IP₃, diacilglicerol, cálcio, etc.) ou intermediários que transduzem a mensagem do receptor para efetuar as funções (Nair *et al.*, 2019).

A sinalização celular em síntese envolve inicialmente a percepção do sinal seguido de transmissão do sinal, a partir daí ocorre a passagem da mensagem para uma série de componentes de sinalização celular e chegada da mensagem ao seu destino no interior da célula. Por fim, ocorre a resposta celular, uma efetiva alteração/modificação na fisiologia da célula devido ao estímulo inicial (Hancock, 2017).

A sinalização celular é um sistema multifatorial que representam esquemas semelhantes a nós de cascatas de sinalização com vias que não atuam isoladamente. Em cenários complexos em que o sistema percebe uma combinação de estímulos, com inevitável interação de sinalização (Nair *et al.*, 2019)

Em leveduras, os nutrientes são os principais agentes que sinalizam para a ocorrência de eventos de alteração ou resposta metabólica já em organismos multicelulares, mensageiros extracelulares ativam rotas de sinalização que tem efeito sobre a proliferação, no desenvolvimento ou modificação do metabolismo de células alvo (Thevelein, J., 1994). *Saccharomyces cerevisiae* se adapta rapidamente à diferentes mudanças visto a capacidade de responder à variação da oferta de nutrientes e também à outras variações ambientais como temperatura, osmolaridade, ação de hormônios e outras (Hohmann *et al.*, 1999; Newcomb *et al.*, 2003; Holsbeeks *et al.*, 2004).

As principais vias de sinalização em *Saccharomyces cerevisiae* são sinalização para resposta ao choque térmico, feromônios, estresse oxidativo, pressão osmótica e à presença de nutrientes, cálcio, aminoácidos e fontes de carbono (Engelberg *et al.*, 2014).

1.3 Metabolismo do fosfatidilinositol

O fosfatidilinositol (PI/PtdIns) é um fosfolipídio encontrado na membrana de células eucarióticas. Muitos de seus metabólitos, sofrem rápido “*turnover*” celular, provocando alterações na concentração de PI ou de qualquer um dos seus metabólitos, envolvendo assim impactos em processos celulares importantes como proliferação, diferenciação e apoptose (Cocco *et al.*, 1998; Gardocki *et al.*, 2005).

Estímulos extracelulares induzem alterações rápidas e transitórias nos níveis de lipídios e polifosfatos de inositol solúveis, gerando moléculas que amplificam e propagam sinais para alvos intracelulares (York *et al.*, 1998).

A via de sinalização de inositol é uma via complexa que envolve várias espécies de fosfatos de inositol, originado por diferentes fosfatidilinositol sintetases, quinases, transferases e fosfatases. Os dois principais segundos mensageiros, são diaciglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃). DAG ativa a proteínaquinase C (PKC) e IP₃ induzem a liberação de Ca²⁺ a partir de compartimentos intracelulares, regulando assim uma grande variedade de processos celulares (Cocco *et al.*, 1998; Maraldi *et al.*, 1999).

PtdIns(4,5)P₂ (fosfoinositol 4,5 bifosfato) é substrato da fosfolipase C e substrato de fosfatidilinositol-3 quinase gerando segundo mensageiro fosfatidilinositol tri fosfato PtdIns(3,4,5)P₃. Os mensageiros atuam de forma dependente e sinérgica (Maraldi *et al.*, 1999).

As espécies de fosfoinositóis mais abundantes e mais bem caracterizadas são PtdIns(4,5)P₂ e seu principal precursor, o fosfatidilinositol 4-fosfato PI(4)P. Ambos regulam várias funções estruturais e de desenvolvimento, além de estarem envolvidos em vias de transdução de sinal em todos os modelos eucariotos. Fosfatidilinositol 4-quinases (PI4Ks) catalisam a fosforilação de PI na posição D4 do anel inositol, gerando PI(4)P. Esta molécula pode ser subsequentemente fosforilada na posição D5 por PI4P 5-quinases (PI4P5Ks) para produzir PtdIns(4,5)P₂. A sinalização do PtdIns(4,5)P₂ pode ser também finalizada por meio de sua conversão em PI(4)P catalisada por fosfatases. Além disso o tipo III de fosfatidilinositol quinase consiste na Stt4p que é localizada principalmente na membrana plasmática, sendo necessária para a organização do citoesqueleto e várias vias de sinalização. PI(4)P e PtdIns(4,5)P₂ são provavelmente os principais coordenadores do tráfego de membrana atuando nas vias de transdução de sinal (Delage *et al.*, 2013).

Em leveduras, o PI, fosfatidilcolina (PC) e cardiolipina são sintetizados através de CDP-DAG enquanto que PI e PC podem ainda ser sintetizados via inositol e CDP-colina, respectivamente (Greenberg e Lopes, 1996; Henry e Patton-Vogt, 1998; Schlame *et al.*, 2000).

A ativação da biossíntese do fosfatidilinositol via CDP-DAG consiste na internalização do glicerol através das proteínas Fps1p ou Slt1p, onde é fosforilado a glicerol 3-P pelo produto codificado pelo gene *GUT1*. A utilização do glicerol-3-P pode ocorrer ao longo de duas vias bioquímicas que convergem na síntese de ácido fosfático (PA). As proteínas Gat1p/Gat2p e Slc1p promovem a conversão de glicerol 3-P a acil-

glicerol 3-P (lyso-PA) e desse a PA respectivamente, ao passo que Gut2p converte o glicerol 3-P a dihidroxiacetona (DHAP), enquanto que pela ação seqüencial de Gat1p/Gat2p e Ayr1p tem-se DHAP convertido a acil-dihidroxiacetona-fosfato (acil-DHAP) e a redução de acil-DHAP a lyso-PA (acil-glicerol 3-P). O PA gerado é, então, convertido a DAG ou a CDP-DAG pela ação das proteínas Dpp1p/Lpp1p e Cds1p (Athenstaedt e Daum, 1997; Athenstaedt *et al.*, 1999; Athenstaedt e Daum, 2000).

A obtenção de PI mediada pela proteína Pis1p pode originar-se endogenamente a partir da metabolização da glicose 6-P ou ainda ser captado de fontes nutricionais, sendo transportado para o interior da célula pelos transportadores Itr1p/Itr2p. O PI pode também ser produzido através de metabólitos do fosfatidilinositol, como o inositol trifosfato (I(1,4,5)P₃) que é defosforilado pela ação de fosfatases (Saul *et al.*, 2004).

O fosfatidilinositol é usado para sintetizar fosfoinositóis (PIPs), inositóis polifosfatos (IPs) e complexos esfingolípídios (IPCs), enquanto que seu catabolismo gera glicerofosfoinositóis (GroPI). Em leveduras, PI(4)P e PI(4,5)P₂ são sintetizados a partir de PI por meio da ação de PI 4-quinases (*STT4* e *PIK1*) e PI(4)P 5-quinase (*MSS4*), respectivamente (Odorizzi *et al.*, 2000; Wera *et al.*, 2001).

A produção de PI(3)P e PI(3,5)P₂ a partir de PI é mediado pela ação das enzimas PI 3-quinase (Vps34p) e PI(3)P 5-quinase (Fab1p) respectivamente. A síntese de PtdIns(4,5)P₂ ocorre a partir de PtdIns(4)P, através da fosforilação de PI por Pik1p ou Stt4p. Logo, PtdIns4P é fosforilado em PtdIns(4,5)P₂ através de Mss4p (Odorizzi *et al.*, 2000; Wera *et al.*, 2001).

Em leveduras dois genes (*STT4* e *PIK1*) codificam o fosfatidilinositol 4-quinases gerando PtdIns4P. Esses dois genes desempenham papel essencial na viabilidade de leveduras, entretanto embora a atividade bioquímica de ambas sejam as mesmas sabe-se que o aumento da expressão de qualquer uma das quinase não pode compensar a perda da outra. A proteína Stt4p é necessária para a manutenção da morfologia do vacúolo, integridade da parede celular e organização do citoesqueleto de actina. Já a proteína Pik1p é essencial para a manutenção da estrutura de Golgi e para a secreção de proteínas. A proteína Stt4p é um regulador crítico da morfologia do vacúolo, organização do citoesqueleto de actina e integridade da parede celular, sugerindo um papel pleiotrópico para Stt4p na manutenção e organização da célula. Quando deletados os genes *STT4* ou *PIK1* de forma individual foi verificado redução de 50% de PtdIns4P. Acredita-se que as proteínas Stt4p e Pik1p atuam como as principais, senão as únicas, PtdIns 4-quinases em leveduras e produzem dois essenciais e independentes *pools* de PtdIns4P e PtdIns(4,5)P₂

que atuam em diferentes membranas intracelulares para recrutar ou ativar proteínas efetoras ainda não caracterizadas. Em síntese, PtdIns4P dependentes de Stt4p é necessário para a manutenção da morfologia do vacúolo e do citoesqueleto de actina, enquanto que PtdIns4P dependentes de Pik1p é essencial para formação de vesículas secretoras e manutenção do Golgi e endossomos (Audhya *et al.*, 2000).

Por fim, a enzima fosfolipase C converte fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em IP₃ e DAG. DAG e IP₃ controlam diversos processos celulares além de serem substratos para síntese de outras moléculas sinalizadoras. Sendo assim, a fosfolipase C participa de importantes redes regulatórias interligadas (Kadamur e Ross, 2013).

As enzimas fosfatidilinositol quinase são divididas em três subgrupos com base no domínio catalítico e na especificidade do substrato. Os tipos I e III, são 5-quinases que fosforilam preferencialmente PtdIns4P e PtdIns3P, respectivamente. Os PIPkins tipo II são 4-quinases que fosforilam PtdIns5P (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001).

PtdIns(4,5)P₂ contribui, por exemplo, em transdução de sinal e processos celulares, incluindo a dinâmica do citoesqueleto de actina e regulação do canal iônico na membrana. Isso ocorre devido a organização espacial de PtdIns(4,5)P₂ em nanodomínios na membrana, permitindo assim que vários processos ocorram simultaneamente. PtdIns(4,5)P₂ tem sido principalmente associado à geração de dois segundos essenciais mensageiros, inositol 1,4,5-trifosfato e diacilglicerol, necessários em uma variedade de respostas celulares (Audhya e Emr, 2003; Katan e Cockcroft, 2020).

Quanto a ativação da Plcp, pode-se detalhar dois ramos de ativação independentes, o primeiro consiste no fosfatidilinositol que é fosforilado pela fosfatidilinositol 4-quinase gerando fosfatidilinositol 4-fosfato. O fosfatidilinositol 4-fosfato sobre ação da fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase gera PtdIns(4,5)P₂ que é convertido em DAG e IP₃ pela Plcp (Gardocki *et al.*, 2005). Por outro lado, o fosfatidilinositol sob ação da fosfatidilinositol 3-quinase gera fosfatidilinositol 3-fosfato (Whitman *et al.*, 1988; Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Em seguida fosfatidilinositol 3-fosfato 5-quinase gera o fosfatidilinositol 3,5-bifosfato (Cooke *et al.*, 1998). Através desse substrato fosfatidilinositol 3,5-bifosfato 3-fosfatase gera fosfatidilinositol 5-fosfato (Walker *et al.*, 2001). Por fim, fosfatidilinositol 5-fosfato 4-quinase gera PtdIns(4,5)P₂ com subsequente ativação de Plcp (Boronenkov e Anderson, 1995; Rameh *et al.*, 1997).

De forma concomitante o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato através da enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatase também origina PtdIns(4,5)P₂

(Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). A figura 1 demonstra as vias envolvidas na síntese de PtdIns(4,5)P₂.

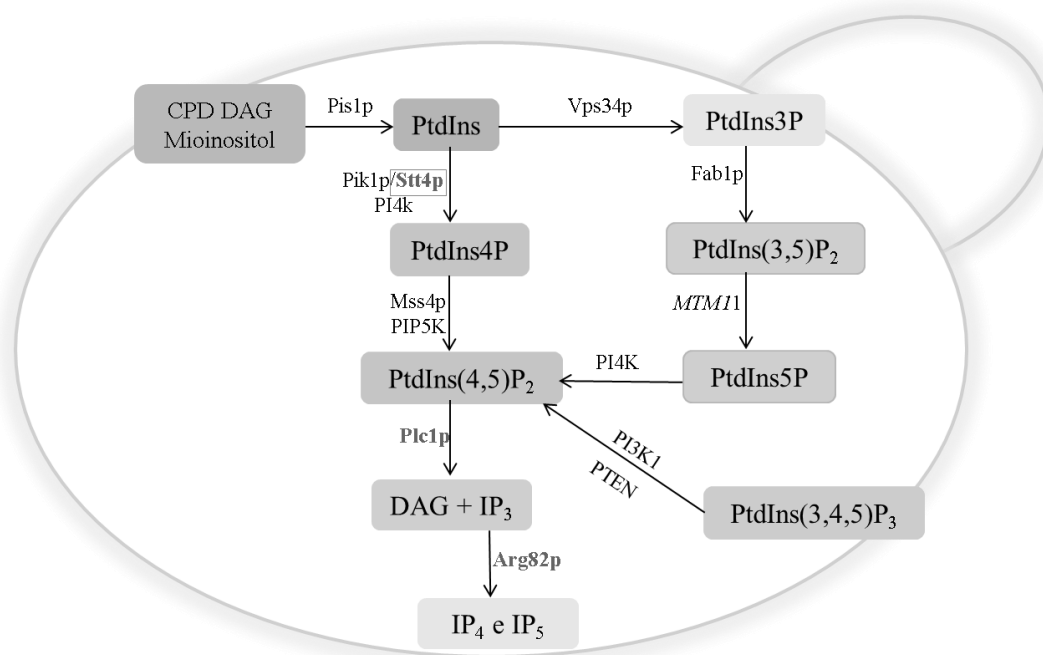


Figura 1: Síntese de PtdIns(4,5)P₂. Reações catalisadas por fosfatidilinositol -4-quinases PtdIns4Ks a partir de PtdIns com envolvimento das proteínas Pik1p, Stt4p e PtdIns5K envolvendo Mss4p. Reações catalisadas por fosfatidilinositol 4-quinases PtdIns4K a partir de PtdIns5P com envolvimento das proteínas Vps34 p e Fab1 p. PtdIns(4,5)P₂ é fosforilado em DAG e IP₃ pela Plc1p. IP₃ em presença de Arg82 p é fosforilado em IP₄ e IP₅.

É importante ressaltar o envolvimento do metabolismo do fosfatidilinositol na regulação de diversos processos celulares que incluem sobrevivência e proliferação celular, entre esses processos pode-se citar rearranjo do citoesqueleto, tráfego de membrana, migração celular, quimiotaxia, sinalização de cálcio, transporte de glicose entre outros (Fruman *et al.*, 1998; Zhang e Majerus, 1998).

1.4 H⁺-ATPase de membrana citoplasmática em *Saccharomyces cerevisiae*

A proteína H⁺-ATPase é uma das proteínas mais abundantes presentes na membrana plasmática de leveduras cuja função é o bombeamento de prótons para fora da célula. A enzima H⁺-ATPase é codificada pelo gene *PMA1* e consiste em um polipeptídeo de 100 kDa inserida na bicamada lipídica da membrana plasmática. Em sua estrutura terciária, apresenta uma estrutura com dois grandes domínios hidrofílicos e 10 segmentos transmembranares (Malpartida e Serrano, 1980; Ambesi *et al.*, 2000).

A H⁺-ATPase de membrana citoplasmática presente em *Arabidopsis thaliana*, apresenta similaridades com a encontrada em leveduras e tem sua estrutura cristalográfica (Figura 2), com 4 domínios distintos: um domínio transmembrana com 10 hélices e 3 domínios citosólicos denominados N (domínio de ligação com nucleotídeo), P (domínio de fosforilação) e A (domínio atuador) (Pedersen *et al.*, 2007).

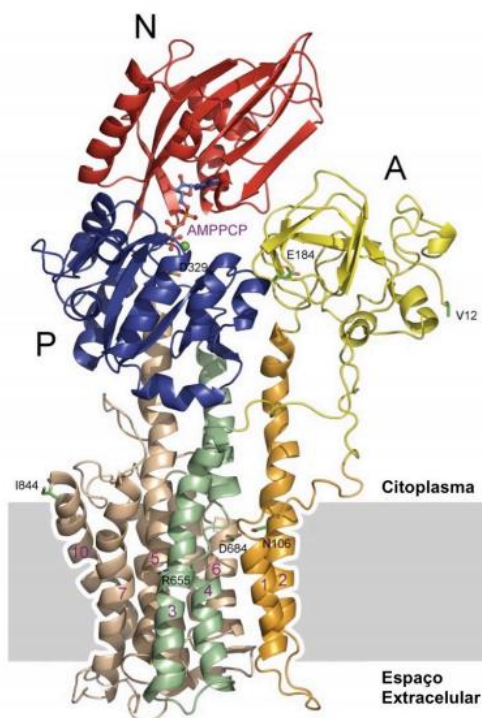


Figura 2: Estrutura cristalográfica de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática de *Arabidopsis thaliana* (H⁺-ATPase 2 – AHA2). A estrutura representa a forma ativa da bomba de prótons complexada com AMPPCP (um análogo de ATP não-hidrolisável). Estão presentes 10 hélices transmembrana (nas cores laranja, verde e marrom); domínio de ligação com nucleotídeo (N, em vermelho); o domínio de fosforilação (P, em azul); o domínio atuador (A, em amarelo). Mg-AMPPCP é encontrado na interface entre os domínios N e P. Adaptado de PEDERSEN *et al.* (2007).

A H⁺-ATPase pertence à família das ATPases do tipo P (P-ATPases) que consiste em uma ampla família que realiza muitos processos desde a geração do potencial de membrana até a contração muscular e a remoção de íons tóxicos das células, proteínas envolvidas nos processos de transporte que bombeiam íons e lipídios através de membranas (Axelsen e Palmgren, 1998; Kuhlbrandt, 2004).

A H⁺-ATPase utiliza a energia da hidrólise de ATP para o transporte de prótons do citoplasma para o meio extracelular, criando um gradiente eletroquímico de H⁺, processo indispensável para manter o pH intracelular, captação de nutrientes através do sistema de transporte ativo secundário e manutenção da homeostase de íons, processos essenciais para a viabilidade celular (Chang e Slayman, 1991; Volkov, 2015). O aumento do potencial de membrana, proporcionado pela H⁺-ATPase, favorece o aumento da

sensibilidade celular à higromicina e a alguns cátions como lítio, sódio, entre outros (Perlin *et al.*, 1988; Portillo, F., 2000; Rogowska - Wrzesinska *et al.*, 2001). O contrário também já foi observado, atividade diminuída da H⁺-ATPase ocasiona diminuição do crescimento celular e maior resistência a drogas carregadas positivamente foram evidenciadas em células com mutações na Pma1p. Essa resistência poderia ser explicada pela diminuição do potencial de membrana da célula, ocasionado pela diminuição da expressão da enzima, visto que o transporte do antibiótico estaria relacionado ao gradiente eletroquímico de prótons mantido pela H⁺-ATPase, que é atenuado nos mutantes. Assim, a resistência a higromicina B estaria relacionada a uma menor atividade da enzima, diminuindo a entrada do antibiótico (Mccusker *et al.*, 1987; Vallejo e Serrano, 1989).

A atividade da H⁺-ATPase pode ser regulada em nível de transcrição, por meio do aumento da síntese de RNA mensageiro do gene *PMA1* e pós-tradução com a indução da atividade da enzima (Moreno e Lagunas, 1991; Portillo, Francisco, 2000; Brandao, 2014).

A presença de glicose no meio e o pH ácido são fatores responsáveis pela regulação da enzima (Romero *et al.*, 1997). A atividade da H⁺-ATPase é aumentada durante o metabolismo da glicose com conseqüente acidificação do meio de crescimento (Eraso e Portillo, 1994). Situações de estresse como presença de etanol, ácidos orgânicos e choque térmico também são capazes de promover aumento da atividade da H⁺-ATPase (Portillo, F., 2000; Tropa *et al.*, 2006).

1.4.1 Via de transdução de sinal da ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose

A transdução de sinal envolve um sistema que regula atividades e funções celulares que são fundamentais para a manutenção da vida, essa ativação de eventos intracelulares são ocasionados por estímulos externos como por exemplo alterações no pH, pressão osmótica e presença de nutrientes (Clapham, 2007).

Nutrientes, como a glicose, são moléculas sinalizadoras em leveduras e têm sido sugeridos como os recursos que constituem as vias primárias de sinalização. A preferência de *S. cerevisiae* por glicose, é demonstrada por várias vias regulatórias que são desencadeadas pela presença de glicose, tendo como principal objetivo o estímulo da fermentação e da proliferação celular (Thevelein, J. M., 1994; Peeters e Thevelein, 2014).

Estudos mostram que a ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática induzida por glicose resulta na promoção de uma modificação conformacional da região C-terminal, desfazendo a interação inibitória deste domínio com o domínio de ligação do

ATP e fosforilação direta da enzima por intermédio de proteína(s) quinase(s) (Figura 3). Isso permitiria a enzima adotar uma conformação mais ativa, pela fosforilação da enzima nos resíduos de aminoácidos serina-899 e treonina-912 por uma proteína quinase (McDonough e Mahler, 1982; Eraso e Portillo, 1994; Portillo, F., 2000).

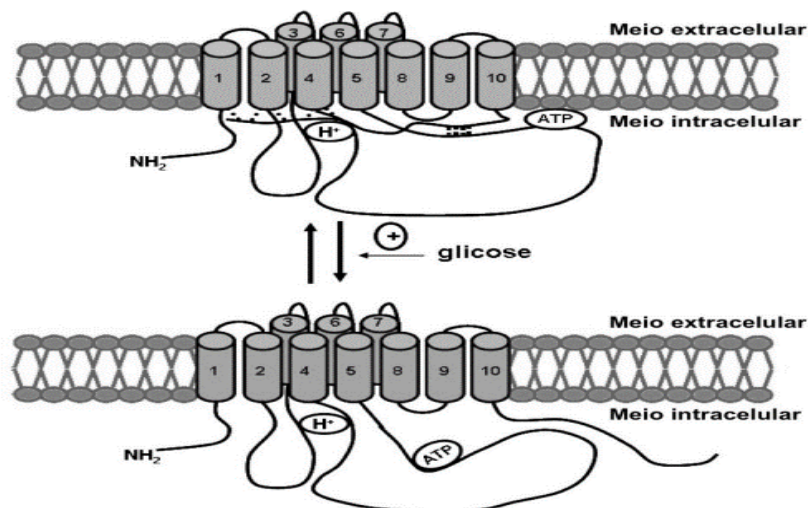


Figura 3: Modelo de ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, induzida por glicose. Após a adição de glicose, os resíduos Ser-899 e Thr-912 são fosforilados desfazendo a interação inibitória, aumentando o bombeamento de prótons. Adaptado de PORTILLO (2000).

Trabalhos demonstraram que Ptk2p seria a quinase envolvida na fosforilação do resíduo Ser-899 (Serrano, 1983; Portillo *et al.*, 1989; Eraso e Portillo, 1994). Ptk2p pertence a uma família de proteína quinase serina/treonina dedicada à ativação de transportadores da membrana citoplasmática. Estudo recente com triagem de proteínas quinases em leveduras reafirmou o envolvimento da quinase Ptk2p na ativação da H⁺-ATPase (Goossens *et al.*, 2000; Eraso *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2015a).

A indução de transportadores de glicose apropriados durante o crescimento fermentativo é controlada por proteínas do tipo transportador da membrana plasmática, que funcionam como sensores de glicose. Nas células de *S. cerevisiae* a glicose é internalizada pelo transportador de hexose Hxtp; em seguida ocorre a sua fosforilação catalisada pelas proteínas quinases específicas, Hxk1p, Hxk2p e Glk1p (Hohmann e Mager, 2007; Peeters e Thevelein, 2014).

Considerando a glicose fosforilada como molécula de sinalização que regula os aspectos fisiológicos da levedura, três receptores poderiam estar envolvidos, sendo eles Gpr1p, Rgt2p e Snf3p. A ativação eficiente da H⁺-ATPase estaria relacionado a entrada e fosforilação da glicose com subsequente participação da subunidade alfa da proteína G (Gpa2p) e do sensor de glicose Snf3p. Estudos do nosso laboratório demonstraram que

Gpr1p não parece estar envolvida na ativação da H⁺-ATPase; no entanto, mutantes *Gpa2Δ* não apresentam uma ativação da H⁺-ATPase, induzida por glicose, quando comparada com cepas selvagens, indicando o papel da Gpa2p na via de ativação da H⁺-ATPase (Souza, 2001; Tropa *et al.*, 2006).

Trabalhos mostram relação entre a regulação da atividade de H⁺-ATPase e o modelo de sinalização relacionado à homeostase de cálcio. O fosfatidilinositol 4,5-bifosfato hidrolisado pela Plc1p com subsequente participação do inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) que atuaria como um mensageiro secundário responsável pela geração do sinal de cálcio induzido por glicose (Ansari *et al.*, 1999b; Tisi *et al.*, 2002; Tisi *et al.*, 2004). Brandão *et al.*, 1994 sugeriram o envolvimento da via do fosfatidilinositol (PI) na ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose. Outros trabalhos também evidenciaram a relação entre a adição de glicose em meio com células de levedura e a via do tipo fosfatidilinositol (Kaibuchi *et al.*, 1986; Coccetti *et al.*, 1998).

O IP₃ é rapidamente fosforilado a IP₄ e IP₅ por uma quinase (Arg82p) produto do gene *ARG82*, que codifica uma multiquinase inositol polifosfato, o aumento nas concentrações de cálcio intracelular foi observado em leveduras que possuem mutações no gene *ARG82* (Tisi *et al.*, 2004). Esses mutantes apresentaram também um aumento na concentração de fosfatidil inositol trifosfato (IP₃) e maior ativação da H⁺-ATPase (Tropa *et al.*, 2006). Surgindo assim a hipótese de conexão entre a sinalização do fosfatidilinositol, liberação de cálcio intracelular e a via ativação da H⁺-ATPase.

Um canal de alta afinidade (Gicp) atua como transportador e é o principal responsável pelo influxo de cálcio do meio externo para o citosol por adição de glicose (Brandao, 2014). E o canal de cálcio Yvc1p é um componente importante na via de sinalização de ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose, uma vez que a ativação deste canal parece estar correlacionada com as mudanças nas concentrações intracelulares de IP₃ (Bouillet *et al.*, 2012a). No entanto, resultados demonstraram que não é o IP₃ que está envolvido diretamente com a ativação do canal de cálcio Yvc1p, é possível que outros componentes poderiam mediar a ação do IP₃ sobre a mobilização de cálcio do vacúolo (Palmer *et al.*, 2001).

Estudos paralelos evidenciaram a fosforilação da glicose com participação da Plc1p e Gpa2p como sendo proteínas essenciais para a sinalização de cálcio (Nakajima-Shimada *et al.*, 2000; Tisi *et al.*, 2002; Tökés-Füzesi *et al.*, 2002; Brandao, 2014). Esses dados levaram a pressupor que a sinalização de cálcio e a ativação da H⁺-ATPase atuam como eventos integrativos uma vez que a ativação da enzima e a absorção e, ou, sua

mobilização interna de cálcio seria estimulada pela glicose. Diante desses dados, tornou-se evidente que a ativação induzida por glicose da H⁺-ATPase seria dependente da sinalização de cálcio intracelular.

O receptor Snf3p apresenta a capacidade de detectar os níveis intracelulares de Glc-6-P e, ou, Glc-1-P, há evidências que esse sensor de glicose atuaria de forma paralela à proteína Gpa2p, e que sua ação estaria relacionada a extremidade C-terminal. Ao utilizar uma cepa mutante *snf3Δ* foi evidenciado o fenótipo de acumulação de cálcio na célula. Estudos mostram que o sensor de glicose Snf3p seria inibido pelo aumento da relação entre a Glc-1P e Glc-6P induzindo um aumento de cálcio no citoplasma via inibição da Pmc1p, uma Ca²⁺-ATPase vacuolar, com subsequente, ativação da H⁺-ATPase (Tropia *et al.*, 2006; Brandao, 2014).

Evidências recentes experimentais sugerem que a ativação da H⁺-ATPase, induzida por glicose, envolveria a participação de novos elementos. No modelo proposto, a forma não ativada da H⁺-ATPase após a adição de glicose estaria associada a degradação de tubulinas acetiladas que seriam hidrolisadas, devido à ação de uma serino-protease Lpx1p, liberando o domínio C-terminal da H⁺-ATPase, tornando-o suscetível à fosforilação e consequente ativação (Campetelli, 2005; Campetelli, 2013).

A sinalização de cálcio parece ser então, responsável pela ativação da proteína Lpx1p. De acordo com novo modelo, a ativação de Lpx1p causaria hidrólise de tubulinas acetiladas ligada a H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, permitindo a liberação da sua cauda C-terminal para fosforilação e posterior ativação da H⁺-ATPase (Castanheira *et al.*, 2017).

Essas informações permitiram propor um modelo hipotético relacionando níveis intracelular de cálcio, induzido por glicose, e regulação pós-transcricional da H⁺-ATPase (Figura 3). A via de ativação da H⁺-ATPase dispõe de duas vertentes em que a adição de glicose controla a disponibilidade de cálcio citosólico com consequente ativação desta enzima (Tropia *et al.*, 2006).

Em síntese, o primeiro lado da via está relacionado ao transporte de glicose e sua fosforilação por diferentes quinases, gerando um sinal que ativaria a proteína Gpa2p que, por sua vez, estimula a atividade da Plc1p. Subsequentemente, o fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) seria hidrolisado à diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), que possui interação direta ou indireta com o canal de cálcio Yvc1p, regulando dessa forma a intensidade da sinalização de cálcio no citoplasma. O outro lado da via estaria relacionado com a inibição do sensor de glicose Snf3p pelas concentrações de Glc-1P e Glc-6P com

sucessiva inibição da Pmc1p, gerando uma maior concentração de cálcio no citoplasma e consequentemente maior atividade da H⁺-ATPase. O aumento de cálcio citosólico em ambos os lados da via hipotética ativaria a serino-protease Lpx1p que, através de hidrólise, degradaria tubulinas acetiladas ligadas à porção C-terminal de H⁺-ATPase. A liberação da cauda C-terminal da H⁺-ATPase permitiria então a sua fosforilação pela proteína quinase, Ptk2p, levando a extrusão de prótons (Figura 4).

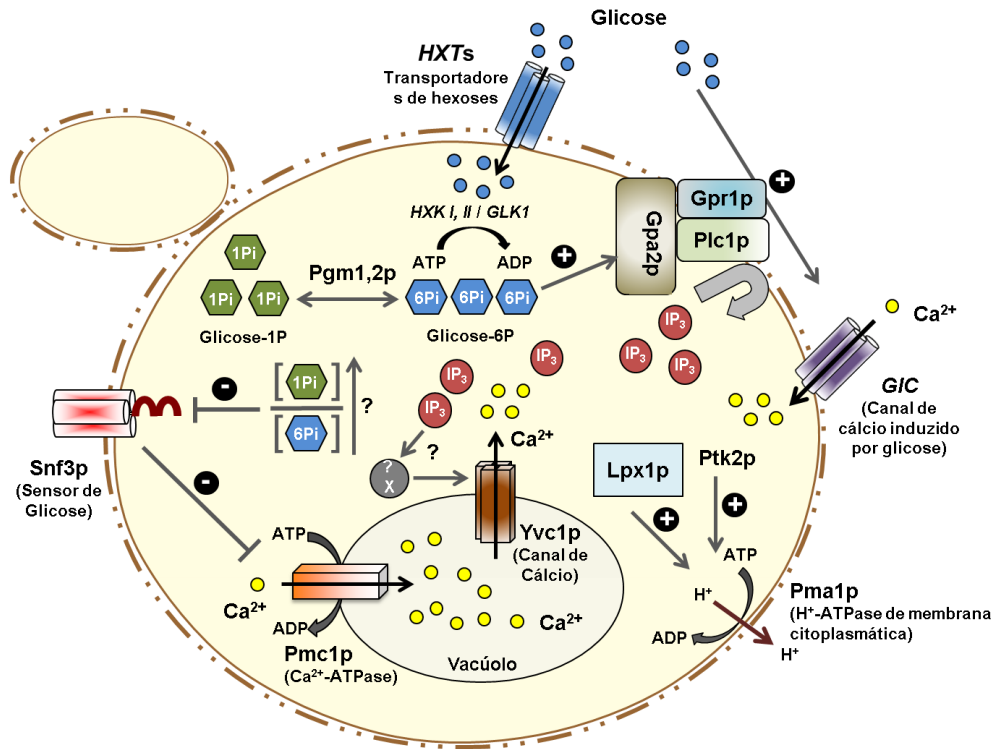


Figura 4: Via hipotética de ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose. A glicose é internalizada por Hxtp, fosforilada por Hxk1p e Hxk2p e Glk1p. A Gpa2p seria um receptor do sinal (glicose fosforilada) ativando Plc1p convertendo PIP₂ em DAG e IP₃. O IP₃ ativa uma proteína ainda em estudo que ativa Yvc1p levando a saída de cálcio do vacúolo, induzindo uma quinase a fosforilar e ativar a H⁺-ATPase. O outro lado da via consiste na internalização da glicose por Hxtp, fosforilação pelas Hxk1p e Hxk2p e Glk1p sendo posteriormente convertida em Glic-1P por Pgm1p e Pgm2p. O aumento da relação entre as concentrações de Glic-1P e Glic-6P inibiria a Snf3p, com conseqüente inibição da Pmc1p e aumentando o cálcio citoplasmático. O equilíbrio gerado pela ação dos dois ramos é responsável pelo sinal de cálcio intracelular. O sinal de cálcio gerado ativaria a serino-protease Lpx1p que, através de hidrólise, degrada tubulinas acetiladas ligadas à porção C-terminal de H⁺-ATPase. A liberação da cauda C-terminal de H⁺-ATPase permitiria então a sua fosforilação pela proteína quinase, Ptk2 p (Bouillet *et al.*, 2012b; Castanheira, 2018).

1.5 Arg82p, proteína multifuncional em *S. cerevisiae* e atividade da H⁺-ATPase

O gene *ARG82*, codifica a proteína Arg82p, que é uma inositol quinase, que fosforila o inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), em inositol 1,3,4,5-tetrafosfato (IP₄) e inositol 1,3,4,5,6-pentafosfato (IP₅) (Xia e Guang, 2005). As suas atuações como mensageiros ocorrem quando o IP₃ é liberado do retículo endoplasmático para o citosol e o IP₄ é responsável por mediar a entrada de Ca²⁺ através da membrana plasmática e mobilizar Ca²⁺ intracelular agindo sinergicamente com IP₃ (Vetter e Leclerc, 2003).

Inositol polifosfato são moléculas de sinalização eucarióticas conservadas implicadas na regulação de muitos processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, sinalização e respostas ao estresse ambiental, reparação do DNA, remodelação da cromatina, sinalização de cálcio induzido por glicose e alongamento dos telómeros (El Alami *et al.*, 2003; Steger *et al.*, 2003; Tisi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2013; Hatch *et al.*, 2017).

Em levedura *S. cerevisiae*, a geração de inositol polifosfato inicia com a enzima fosfolipase C (Plc1p) que hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), liberando inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (Flick e Thorner, 1993; York *et al.*, 1999).

O inositol-trifosfato (IP₃) em levedura é rapidamente convertido em IP₄ e IP₅ pela quinase Arg82p, em seguida a quinase Ipk1 p fosforila o IP₅ em IP₆. Em células *arg82Δ*, o sinal de cálcio induzido por glicose foi detectado em maior quantidade quando comparado à estirpe selvagem. A ativação da Plc1p por glicose leva a clivagem de PIP₂ formando IP₃ que está relacionado com o aumento de cálcio citosólico (Tropia *et al.*, 2006).

A Arg82p forma um complexo com Arg80p, Arg81p e Mcmlp para regular a expressão de genes do metabolismo da arginina. O mutante *arg82Δ* apresenta aumento da expressão dos genes catabólicos da arginina e repressão dos genes anabólicos. Esses mutantes apresentam deficiências pleiotrópicas, incluindo falha no cruzamento e na esporulação das leveduras (Dubois e Messenguy, 1994; Saiardi *et al.*, 2000).

De acordo com os componentes já estabelecidos para a homeostase de Ca²⁺ e aqueles envolvidos na atividade da H⁺-ATPase descritos na literatura, um vínculo pode ser criado já que ambas as vias apresentam componentes em comum, sendo um deles o IP₃ (Pereira, 2006).

A fosfolipase C (Plc1p), codificada pelo gene *PLC1*, está envolvida no aumento de cálcio citosólico transitório, induzido por glicose em *S. cerevisiae*, além dos receptores de hexoquinases Gpr1p e Gpa2p. O aumento na concentração citosólica do cálcio ocorre principalmente devido a influxo do meio externo (Tisi *et al.*, 2004).

Mutantes com deleção no gene *ARG82* apresentam maiores concentrações de IP₃ e maior sinalização de cálcio (Tisi *et al.*, 2004). No entanto, Carvalho (2007) verificou que o mutante *arg82Δ* em BY4742 e PJ69 apresentaram taxas de bombeamento de prótons diferentes no teste de acidificação extracelular induzido por glicose, medida indireta da H⁺-ATPase, quando comparados às respectivas cepas selvagens. O mutante PJ69 *arg82Δ* apresentou maior taxa de bombeamento de prótons quando comparado ao mutante BY4742 *arg82Δ*, sugerindo que o metabolismo do fosfatidilinositol embora relacionado ao fenótipo de maior taxa de bombeamento de prótons apresenta diferenças quando PJ69 e BY4742 são comparadas (Carvalho, 2007).

1.6 Análise poligênica através de mapeamento de QTLs (*Quantitative Traits Loci*)

Estudo de fenótipos poligênicos por meio da análise de QTLs é uma metodologia muito utilizada que correlaciona fenótipo e genótipo, com identificação de bases genéticas de uma característica de interesse. Essa técnica relaciona características complexas a regiões específicas do cromossomo (Consortium, 2003b; Miles e Wayne, 2008).

As características fenotípicas podem ser classificadas em qualitativas e quantitativas. Quando a variação fenotípica é mensurável, essa característica é considerada quantitativa com envolvimento de dois ou mais genes. A maioria das características fenotípicas de interesse em cepas de *S. cerevisiae* é quantitativa, o que significa que elas são controladas por múltiplos *loci* genéticos. Características quantitativas são aquelas que possuem variação fenotípica mensurável devido a influências genéticas e, ou, ambientais. Geralmente, características quantitativas são influenciadas por vários genes, de modo que um ou muitos *loci* ou QTLs podem influenciar uma característica ou um fenótipo. Em síntese QTL se refere a uma região que explica a expressão fenotípica de uma característica quantitativa, podendo conter um ou mais genes que, em conjunto irão contribuir para o fenótipo (Consortium, 2003a; Swinnen, Thevelein, *et al.*, 2012).

S. cerevisiae tornou-se um organismo de produção favorito na biotecnologia industrial, com desafios na engenharia de levedura visando a introdução de traços fenotípicos vantajosos quando as bases genéticas de tais características fenotípicas são identificadas. O sequenciamento de todo o genoma para detectar variações genéticas entre cepas facilitou a detecção de um grande número de marcadores moleculares (Swinnen, Thevelein, *et al.*, 2012).

Em leveduras o mapeamento de QTLs apresenta várias aplicações, determinando regiões envolvidas com tolerância e máxima acumulação de etanol (Swinnen, Schaerlaekens, *et al.*, 2012; Pais *et al.*, 2013), termotolerância (Marullo *et al.*, 2009), produção de glicerol (Hubmann *et al.*, 2013), produção e alta tolerância a ácido acético (Marullo *et al.*, 2007; Meijnen *et al.*, 2016), via de sinalização da MAP quinase (Treusch *et al.*, 2015), e produção de composto aromáticos em bebidas (De Carvalho *et al.*, 2017). Essa técnica vem sendo utilizada também na produção de vinho e saquê com seleção de cepas com fenótipos relacionados à tolerância de crescimento a altas temperaturas, capacidade de esporulação, resistência a drogas, síntese e resistência ao etanol (Katou *et al.*, 2008; Steyer *et al.*, 2012).

O mapeamento de QTLs exige uma metodologia que seja capaz de localizar todos os *loci* simultaneamente, havendo inicialmente sequenciamento do genoma inteiro e busca por marcadores genéticos como nucleotídeos de polimorfismo único (SNPs - *Single Nucleotide Polimorfism*). Para realização dessa metodologia é necessário o uso da técnica de segregantes agrupados (BSA - *Bulk Segregant Analysis*), que corresponde ao agrupamento de indivíduos que apresentem o fenótipo de interesse com consequente componente genético responsável por tal fenótipo (Pais *et al.*, 2014b).

Essas novas metodologias permitem a exploração de grande biodiversidade de *S. cerevisiae* para identificação de genes que afetam características comercialmente importantes. Genes que exercem efeito significativo sobre uma característica de interesse revelam a base genética completa do fenótipo (Den Abt *et al.*, 2016).

1.6.1 Análise de segregantes agrupados

Para o mapeamento de regiões genômicas relacionadas com fenótipos de interesse é utilizado a BSA associada ao sequenciamento de alta performance. A análise de BSA é um método que permite a identificação simultânea de *loci* genéticos que contribuem para uma característica específica ou fenótipo. Essa técnica baseia-se no cruzamento de duas

linhagens haploides com fenótipos opostos, sendo um de interesse, chamado parental de fenótipo superior, e a outra cepa, chamada parental de fenótipo inferior. As duas cepas são cruzadas com subsequente obtenção do híbrido diploide (Bhatia *et al.*, 2014; Pais *et al.*, 2014b).

Quando células diploides são submetidas a condições de estresse nutricional, haverá o processo de esporulação, que por meiose ocorre a formação de quatro esporos, sendo dois MAT α e dois MAT a (Duitama *et al.*, 2014). A meiose está relacionada com a mistura dos alelos, conseqüentemente aumento na diversidade genética associada a variação na expressão fenotípica da característica quantitativa (Mancera *et al.*, 2008; Swinnen, Thevelein, *et al.*, 2012).

Posteriormente, esses segregantes são selecionados para identificar um subconjunto que exhibe o fenótipo de interesse. Estes indivíduos selecionados são agrupados (aqui referidos como o “*pool superior*”), seguido de extração do DNA genômico do *pool* isolado (Duitama *et al.*, 2014).

Ao comparar os genomas do *pool* selecionado, do parental inferior, do parental superior e do *pool* randômico (indivíduos não selecionados agrupados) é possível encontrar os QTLs, determinados pela frequência de polimorfismos encontrada no *pool superior*. Quando a frequência de polimorfismos é analisada em relação à cepa de fenótipo inferior ela apresentará um aumento na sua porcentagem, caso algum(s) gene(s) determinante(s) ao fenótipo esteja(m) presente(s) no cromossomo em estudo, em contraste, o *pool* não selecionado apresentará distribuição de frequências de polimorfismos em torno de 50% (Ehrenreich *et al.*, 2010; Swinnen, Thevelein, *et al.*, 2012; Pais *et al.*, 2014a). As regiões de polimorfismos (SNPs) devem, teoricamente, ser de 50% para qualquer variante com exceção das regiões geneticamente ligadas ao fenótipo de interesse. Nesses QTLs, o alelo causativo do parental superior será sobre-representado. O alelo correspondente do parental inferior será sub-representado (Duitama *et al.*, 2014).

Desta forma o método de análise de BSA permite a detecção de múltiplos *loci* relacionados a determinado fenótipo. Em síntese, a execução dessa técnica pode ser representada como na Figura 5.

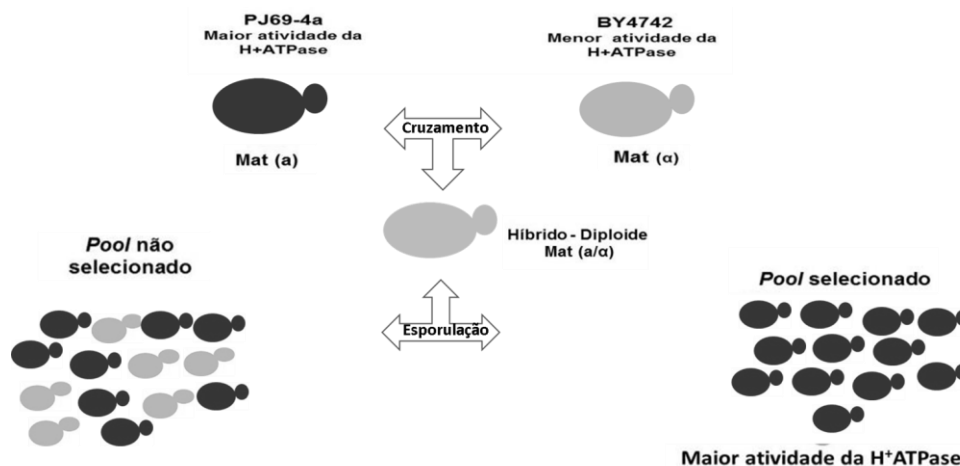


Figura 5: Esquema da técnica BSA, análise de segregantes agrupados em levedura. Duas estirpes parentais que possuem fenótipos superior (n) e inferior (n). A cepa híbrida ($2n$) é esporulada. Os segregantes (n) são selecionados por apresentar característica como a parental superior. Adaptado, Pais, 2012.

Após a identificação dos QTLs por tratamento computacional e estatístico dos dados obtidos dos sequenciamentos genômicos das cepas parentais e dos dois conjuntos de segregantes, o *pool* superior e randômico, métodos tradicionais de engenharia genética devem ser utilizados para determinação da participação desse QTL no fenótipo. Os QTLs podem ser analisados por análise de reciprocidade hemizigótica, que consiste na avaliação dos efeitos pontuais de cada gene presente no QTL sobre o fenótipo. São realizadas deleções do gene candidato na cepa parental superior ou inferior, seguido de cruzamento e verificação do fenótipo, possibilitando a identificação do alelo que apresenta o gene responsável pela característica de interesse (Pais *et al.*, 2014b).

A análise genética de características complexas continua sendo uma tarefa desafiadora. Vários elementos genéticos são necessários, entre eles o grande número de segregantes que precisam ser fenotipados com posterior seleção (Swinnen, Schaerlaekens, *et al.*, 2012). Por outro lado a rapidez e diminuição de custos dos sequenciamentos genômicos propiciados pelo advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração contribuíram para um aumento significativo de dados genômicos disponibilizados. Esses dados geram necessidade de aplicação de soluções computacionais para resolução de dados biológicos. As análises genômicas comparativas, propiciadas pelas ferramentas bioinformáticas, permitem a inferência de relações evolutivas baseadas nas características funcionais conservadas entre os diversos organismos. As análises genômicas podem se tornar essenciais para o estudo de vias de sinalização e mapas metabólicos ainda não desvendados usando metodologias que fazem avaliação funcional do gene através de deleções e modulações de sua expressão (Karlin *et al.*, 1998; Dutilh *et al.*, 2007).

1.7 Melhoramento de leveduras de interesse biotecnológico

As características quantitativas como por exemplo a produção e tolerância ao etanol, produção de compostos voláteis, tolerância ao estresse dentre outras são normalmente controladas por vários *loci* referidos como QTLs. Esse *locus* é responsável por uma parte específica da expressão fenotípica de uma característica quantitativa, podendo conter um grupo de genes intimamente ligados que contribuem para o traço quantitativo (Swinnen, Schaerlaekens, *et al.*, 2012; Pais *et al.*, 2013).

A identificação dos QTLs tem sido aplicada na indústria de bebidas, como vinho e saquê, e tem sido utilizado essa metodologia para seleção de cepas com fenótipos de interesse como por exemplo, tolerância a altas temperaturas de crescimento, capacidade de esporulação, resistência a drogas, síntese e resistência ao etanol (Katou *et al.*, 2008; Steyer *et al.*, 2012).

Avanços em ferramentas moleculares combinadas com tecnologias de sequenciamento de alto rendimento de baixo custo permitem o mapeamento de *loci* de características quantitativas (QTL) de características poligênicas. Uma vez que as regiões genômicas de interesse são identificadas, elas podem ser investigadas a fim de encontrar os genes causadores, que podem em seguida, ser usado para modificar com precisão a característica de interesse em cepas-alvo específicas, sem afetar outras propriedades desejáveis (Swinnen, Schaerlaekens, *et al.*, 2012; Meijnen *et al.*, 2016).

Com essas abordagens foi possível identificação de genes envolvidos na baixa produção de glicerol, na capacidade máxima de acumulação de etanol e genes responsáveis pela baixa produção de acetato de etila responsável pelo aroma frutado de bebidas. A identificação dos genes responsáveis por esses fenótipos favorece o melhoramento de leveduras em caráter industrial (Hubmann *et al.*, 2013; Pais *et al.*, 2013; Den Abt *et al.*, 2016).

2.0 JUSTIFICATIVA

A via de sinalização da H⁺-ATPase ainda está sendo desvendada, portanto, estudar o fenótipo poligênico do *background* PJ69 por meio da metodologia de QTL pode nos favorecer na descoberta de marcadores moleculares eventualmente presentes no *background* PJ69 e ausentes em BY4742 que podem estar direta ou indiretamente relacionados a ativação da H⁺-ATPase.

Tendo em vista uma relação entre atividade da H⁺-ATPase e desempenho fermentativo pretendemos introduzir os genes alelos identificados em cepas visando melhorar a eficiência dos processos fermentativos.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar novos componentes da via de ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* induzida por glicose.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliação da ativação da H⁺-ATPase em duas cepas de diferentes *backgrounds*;
- Realizar técnica de BSA para realizar mapeamento de QTL;
- Realizar análise de mapeamento de QTL relacionado a maior ativação da ativação da H⁺-ATPase.
- Desenvolver o refinamento da análise de mapeamento de QTL de maior ativação da ativação da H⁺-ATPase utilizando ferramentas de bioinformática para identificar genes candidatos ao fenótipo de interesse;
- Identificar genes envolvidos na maior ativação da H⁺-ATPase.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.1 Microrganismos

Para realização deste trabalho foram utilizadas as leveduras *S. cerevisiae* obtidas da coleção Euroscarf (European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis), linhagens gentilmente cedidas pelo Dr. Enzo Martegani (Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Itália) e pelo Dr. Johan Thevelein (Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica) (Tabela 1).

Tabela 1: Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo

Identificação	Genótipo	Origem
PJ69-2a	<i>MATa; trp-901; leu2-3; 112 ura3-52; his3-200; gal4Δ gal80Δ; LYS::GAL1-HIS3; GAL2-ADE2; met2::GAL7- lacZ.</i>	James Caffrey (SAIARDI et al., 2000)
PJarg82Δ (*PJ69-4a)	<i>PJ69-2a; arg82::KanMX4</i>	James Caffrey (SAIARDI et al., 2000)
BY4742	<i>MATa, his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0.</i>	Coleção EUROSCARF
BY <i>arg82Δ</i> (*Y23531)	<i>BY4742; arg82:: KanMX4</i>	Coleção EUROSCARF
S288C	<i>MATa SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	Coleção EUROSCARF
BY <i>pik2Δ</i> (*Y01644)	<i>BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YOR347c::kanMX4</i>	Coleção EUROSCARF
BY <i>uga2Δ</i> (*Y03141)	<i>BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YBR006w::kanMX4</i>	Coleção EUROSCARF
BY <i>fur4Δ</i>	<i>BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0;</i>	Coleção EUROSCARF

(*Y03158) Identificação	ura3Δ0; YBR021w::kanMX4 Genótipo	Origem
BY <i>est1Δ</i> (*Y05142)	BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR233c::kanMX4	Coleção EUROSCARF
BY <i>hek2Δ</i> (*Y03058)	BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YBL032w::kanMX4	Coleção EUROSCARF
BY <i>top3Δ</i> (*Y05143)	BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR234w::kanMX4	Coleção EUROSCARF
BY <i>pso2Δ</i> (*Y06743)	BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YMR137c::kanMX4	Coleção EUROSCARF
BY <i>sto1Δ</i> (*Y06566)	BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YMR125w::kanMX4	Coleção EUROSCARF
BY <i>mec3Δ</i> (*Y05198)	BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR288c::kanMX4	Coleção EUROSCARF
BY <i>stt4Δ</i> (*Y40681)	BY4741; MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; stt4-4:kanMX (lethal at 37°C)	Mutante construído no presente trabalho
BY <i>arg82Δ</i> + pVTUAEQ	BY <i>arg82Δ</i> + pVTUAEQ	Mutante construído no presente trabalho
BY <i>est1Δ</i> + pVTUAEQ	BY <i>est1Δ</i> + pVTUAEQ	Mutante construído no presente trabalho
BY <i>hek2Δ</i> + pVTUAEQ	BY <i>hek2Δ</i> + pVTUAEQ	Mutante construído no presente trabalho
BY <i>pso2Δ</i> + pVTUAEQ	BY <i>pso2Δ</i> + pVTUAEQ	Mutante construído no presente trabalho
BY <i>uga2Δ</i> + pVTUAEQ	BY <i>uga2Δ</i> + pVTUAEQ	Mutante construído no presente trabalho
BY <i>fur4Δ</i> + pVTUAEQ	BY <i>fur4Δ</i> + pVTUAEQ	Mutante construído no presente trabalho
BY <i>stt4Δ</i> + pVTUAEQ	BY <i>stt4Δ</i> + pVTUAEQ	Mutante construído no presente trabalho

** Mutantes construídos por recombinação homóloga com cassete kanMX

4.1.2 Vetor

Foi utilizado nesse trabalho o vetor pVTU-apoaequorina (pVTU-AEQ) obtido pela inserção do fragmento do gene AEQ1, que codifica para apoaequorina, sob regulação do promotor ADH1. Possui marcador auxotrófico para levedura: URA. Apresenta 6850pb (Tisi *et al.*, 2002).

4.2 Meios de cultivo

Meio YPD - Composto por extrato de levedura 1% (p/v), peptona de carne 2% (p/v) e glicose 2% (p/v). O meio sólido foi acrescido de ágar 1,5% (p/v).

Meio para esporulação – Composto por acetato de potássio 1% (p/v), bicarbonato de potássio 0,05% (p/v) e ágar 2% (p/v), pH 6,0.

Meio para micromanipulação – Composto por extrato de levedura 0,5% (p/v), peptona de carne 1% (p/v), 2% de glicose e ágar 1,5%.

Meio mínimo sintético (SD) – Composto por base nitrogenada para leveduras sem adição de aminoácidos 0,67% p/v (Difco, USA), suplementado com os aminoácidos (mg/L): arginina (20), metionina (20), tirosina (30), isoleucina (30), lisina (30), fenilalanina (50), triptofano (100), histidina (100), ácido glutâmico (100), ácido aspártico (100), valina (100), treonina (200), leucina (250) e serina (375); e as bases nitrogenadas (mg/L): adenina (50) e uracila (50). Para o meio SD sólido foi adicionado ágar 1,5% p/v e o pH ajustado com KOH 3 M para 6,5, antes da esterilização. Para o preparo do meio SD líquido, o pH foi ajustado para 5,5. A glicose foi autoclavada separadamente e adicionada ao meio SD estéril para uma concentração final de 2%.

4.2.1 Cultivo de *S. cerevisiae* em glicose

As cepas *S. cerevisiae* BY4742(wt), BYarg82Δ, PJ69(wt) e PJ69arg82Δ foram pré-cultivadas em 5 mL de caldo YPD a 30 °C por 24 horas sob agitação.

Posteriormente, as culturas foram cultivadas em batelada em frascos Erlenmeyer, contendo um volume final de 25 mL dos meios YPD sob agitação constante a 200 rpm em incubador rotatório (New Brunswick Modelo G25), à temperatura de 30 °C. A absorbância inicial a 600 nm (A_{600}) foi de 0,15 para todas as culturas.

Amostras de 1 mL foram retiradas em intervalos de 3 horas até 60 horas de crescimento. Tais amostras foram lidas em espectrofotômetro (DU-68 Spectrophotometer- Beckman) em absorvância de 600 nm, a fim de obter o perfil de crescimento da população das leveduras.

4.3 Acidificação extracelular

Com o objetivo de medir o efluxo de prótons através da membrana plasmática das células de leveduras, foi utilizado o método descrito por Coccetti et al., 1998 modificado por Trópia, 2003.

4.3.1 Condições de crescimento e preparo das células de leveduras para medida da acidificação

As células de leveduras foram crescidas em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo YPD durante 24 horas a 30 °C e sob agitação. Em seguida, as culturas foram re-inoculadas em 50 mL do mesmo meio líquido, procedendo-se o crescimento nas mesmas condições anteriormente descritas.

O volume de 50 mL de células, previamente cultivadas, foi transferido para Erlenmeyer contendo 300 ml de meio YPD e incubado a 30 °C, sob agitação constante a 200 rpm até o final da fase exponencial de crescimento (entre 18 e 20 horas). As células foram então coletadas por centrifugação a 3.750 rpm por 5 minutos, a 4 °C (centrífuga Beckman GS-6R), e lavadas 2 vezes em água destilada gelada.

4.3.2 Medida da acidificação extracelular induzida por glicose

Amostras de 0,4 g das células, previamente preparadas, foram coletadas em 5 béqueres, contendo 4,5 mL de tampão de acidificação (Tris-HCl 100 mM, KCl 100 mM, pH 4,5). Em dois desses béqueres foram adicionados 0,49 mL de água destilada e a suspensão de células foi homogeneizada, acompanhando-se a estabilização do pH por 2 minutos (potenciômetro Ankersmt, ORION, Modelo 720A). Em seguida as células foram submetidas a um pulso de 1 mmol de H⁺ pela adição de 10 µl de HCl 100 mM. A variação de pH foi acompanhada por 6 minutos, e os valores foram registrados de 30 em 30 segundos, esse procedimento foi realizado duas vezes para cada amostra de célula. Nas outras três amostras de células foram adicionadas 500 µl de glicose 1,0 M (concentração

final de 100 mM), acompanhando-se a variação do pH como descrito anteriormente para o pulso de HCl.

4.3.3 Determinação do peso seco das células de levedura

A determinação do peso seco foi realizada em triplicata ao final de cada experimento de acidificação. Uma alíquota de 100 µL da suspensão de células foi coletado por filtração a vácuo em membranas de celulose 0,45 µm de porosidade (Sartorius Stedim Biotech), previamente pesadas. Após a filtração as membranas contendo as células foram secas em estufa a 80 °C por 24 h e pesadas a fim de determinar o peso seco das células.

4.3.4 Cálculo da taxa de acidificação extracelular

Os valores de pH obtidos nos experimentos de acidificação foram registrados e analisados utilizando os programas Microsoft Excel® e Prism 5, em que as taxas de bombeamento de prótons foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\text{mmol H}^+ \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de células} = \frac{\Delta\text{pH} \div \Delta\text{pH (HCl)} \times 60}{\Delta t \times \text{PS} \times \text{volume da solução (50)} \times 1000}$$

Em que:

ΔpH = variação de pH na presença de glicose

$\Delta\text{pH (HCl)}$ = refere-se à variação de pH após a adição de 1 µmol H⁺ (controle)

PS = valor do peso seco médio em gramas

Multiplicou-se por 60 para converter o valor para hora.

Foi dividido pelo peso seco obtendo o resultado em gramas.

Multiplicação por 1.000 na equação, para que a extrusão de prótons seja apresentada em mmoles de H⁺. h⁻¹. g⁻¹ de célula.

4.4. Transformação de leveduras

Colônias isoladas da cepa hospedeira foram inoculadas em 3 mL de meio, YPD ou SD complementado adequadamente, em um tubo de ensaio. A suspensão celular foi incubada *overnight*, a 30 °C, com agitação, 200 rpm. Este pré-inóculo foi utilizado para

inocular uma cultura em 50 mL de meio, com DO_{600nm} inicial $\sim 0,10$. Seguiu-se o crescimento até a cultura atingir valores de DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6, e procedeu-se à centrifugação das células a 5.000 rpm durante 2 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de LiAc a 0,1 M, sendo as células incubadas a 30 °C por 10 min. Após incubação as células foram homogeneizadas e 100 μ L para cada transformação foi transferido para novo tubo. Em seguida as células foram centrifugadas a 8.000 rpm por 5 segundos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 2 a 4 μ g de DNA (plasmídeo e, ou cassete para recombinação homóloga, em um tubo e o mesmo volume adicionado de DNA foi adicionado de água em outro tubo com a mesma quantidade de células como controle negativo), 100 μ g de DNA de espermatozóide de salmão de alto peso molecular, 240 μ L de PEG 3350 50%, 36 μ L de LiAc 1 M e H₂O ultra pura estéril para volume final de 360 μ L. A mistura foi homogeneizada em vortex por 2 min e em seguida incubada a 30 °C por 30 min sob agitação, 200 rpm. Em seguida, a mistura foi submetida a um choque térmico de 42 °C, por 40 min e imediatamente incubada no gelo, por até 60 min. Para transformações com plasmídeos após incubação em gelo as células foram centrifugadas a 5.000 rpm por 2 min, lavadas 2 vezes com 1 mL de H₂O destilada estéril e inoculadas em placas com meio seletivo (SD ágar sem Ura para o plasmídeo p416GAP CYC). Para transformações por recombinação homóloga, após incubação em gelo as células foram centrifugadas a 5.000 rpm por 2 min, lavadas 2 vezes com 1 mL de YPD e incubadas com YPD a 30 °C sob agitação, 200 rpm, *overnight*. Após incubação as células foram lavadas 2 vezes com 1 mL de H₂O destilada estéril e inoculadas em placas com meio seletivo (SD ágar sem His ou YPD ágar suplementado com geneticina ou higromicina) (Gietz e Woods, 2002; Pedersen *et al.*, 2007). As placas foram incubadas a 30 °C durante 4-5 dias. Os transformantes foram confirmados por PCR, sendo que os positivos foram guardados a -80 °C em estoques de 40% de glicerol.

4.5 Monitoramento *in vivo* da concentração de cálcio citosólico livre

Para a medida *in vivo* da concentração de cálcio citosólico livre foi utilizado o método da Aequorina (Tisi et al., 2002). As cepas transformadas com o plasmídeo pVTUAEQ ou pVTWAEQ, foram inoculadas em 4 mL de meio seletivo SD-URA (pVTUAEQ) e incubadas durante 24 h sob agitação de 200 rpm a 30 °C. As células foram lavadas com água destilada estéril e a DO_{600nm} foi medida. 50 mL de YPD 2% pré aquecidos a 30°C foram inoculados com DO inicial de 0,2 e o crescimento das mesmas

acompanhado até atingir DO_{600nm} de 0,8. As células foram coletadas por centrifugação (3750 g, 5 min, 4 °C) seguida de tripla lavagem com 20 mL de água Milli-Q e a DO_{600nm} aferida novamente. Logo após, foi transferida para 2 microtubos âmbar, alíquotas referentes a 5 mL de suspensão de células com $DO_{600nm} = 0,8$ e as células centrifugadas (5939 g, 2 min), o sobrenadante descartado e as mesmas ressuspensas em 500 μ L de tampão MES/Tris 0,1 M pH 6,5. O tubo foi incubado a 30°C durante 90 min e logo após, centrifugado (5939 g, 2 min) e as células ressuspensas em 25 μ L do tampão MES/Tris 0,1 M pH 6,5 e acrescentado 5 μ L de coelenterazina 0,1 mg/mL (50 μ M coelenterazina), homogeneizada a suspensão e o microtubo incubado à temperatura ambiente por 30 min. A suspensão de células foi centrifugada a 5939 g durante 2min e triplamente lavada com 500 μ L de tampão MES/Tris 0,1M pH 6,5. As células foram então ressuspensas em 450 μ L de tampão MES/Tris 0,1 M pH 6,5 e transferidas para um tubo de luminômetro imediatamente antes da leitura. A luminescência foi medida de 10 em 10 segundos durante 1 min em luminômetro Berthold Lumat LB 9501/16. Em seguida, foi adicionado ao tubo 50 μ L de glicose 1 M, homogeneizado e a luminescência novamente medida de 10 em 10 segundos por um período de 6 min. Foram realizadas duas repetições biológicas em duplicata e os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

4.6 Obtenção e seleção de haploides com maior ativação da H^+ -ATPase a partir do cruzamento entre *S. cerevisiae* PJ694a e *S. cerevisiae* BY4742

4.6.1 Confirmação das linhagens parentais com fenótipo superior e inferior para ativação da H^+ -ATPase

Considerando que a adição de glicose promove a ativação da H^+ -ATPase, a confirmação dos fenótipos foi realizada por meio da medida da acidificação extracelular induzida por glicose como descrito anteriormente no item 3.3.

4.6.2 Cruzamento entre *S. cerevisiae* PJ69 *arg82* Δ e *S. cerevisiae* BY4742

As culturas de PJ69 *arg82* Δ e BY4742(wt) foram crescidas em YPD a 30 °C por 24 horas, sob agitação constante a 200 rpm em incubador rotatório (New Brunswick Modelo G25). As células foram lavadas com água gelada e amostras das duas células foram transferidas para placa com ágar YPD. As células foram misturadas com adição de 10 μ L de água destilada estéril na superfície do ágar YPD. Após secagem da mistura de células, as placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Após esse período, amostras da

biomassa foram coletadas, diluídas e plaqueadas em ágar YPD para obtenção de colônias isoladas. Após esse período, o *matting type* dos híbridos foi confirmado por meio da PCR.

4.6.3 Determinação do *matting type* das leveduras

O *matting type* foi determinado por PCR conforme descrito por (Huxley et al., 1990). As reações foram realizadas em termociclador (T100 Thermal Cycler - Bio-Rad), usando a combinação de primers para as regiões *MATlocus*, *MATa* e *MAT α* : *MATlocus*: AGTCACATCAAGATCGTTTATGG, *MATa*: ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG, *MAT α* : GCACGGAATATGGGACTACTTCG), sintetizados pela Integrated DNA technology, Brasil. As reações foram conduzidas em 25 μ L utilizando 0,2 mM de cada dNTP, 1 mM de MgCl₂, 25 pmol de cada primer, Tampão 1X Green Gotaq® Flexi e Gotaq® Flexi DNA polimerase (Promega, USA), conforme recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram preparadas a partir de suspensões de células de cada colônia em 8 μ L de H₂O estéril e posterior aquecimento a 100 °C por 5 minutos. As condições das reações foram: temperatura inicial de desnaturação 94 °C por 4 minutos; 30 ciclos de amplificação a 94 °C por 1 minuto; 58 °C por 2 minutos; 72 °C por 1 minuto, e temperatura de extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCRs foram visualizados usando o equipamento AlphaImager Mini System (Alpha Innotech, USA) após separação por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed™ Nucleic Acid (Biotium, USA).

4.6.4 Esporulação das leveduras obtidas do cruzamento

As células foram pré-cultivadas em 3 mL de meio YPD a 30 °C sob agitação constante a 200 rpm por 24 horas. Após o crescimento, as células foram coletadas por centrifugação (3.750 rpm por 5 minutos a 4 °C) e lavadas 2 vezes em 1 mL de água destilada estéril gelada e 1 vez com solução de acetato de potássio. As células foram ressuspendidas em 20 μ L de água destilada estéril e inoculadas em forma de microgotas na superfície do meio de esporulação em placas. As placas foram incubadas a 22 °C por aproximadamente sete dias, ou até a visualização da formação de esporos em microscópio óptico.

4.6.5 Dissecação de tétrades e obtenção dos segregantes haploides

As células que apresentaram formação de esporos foram submetidas à dissecação de tétrades em micromanipulador (MSM System 400, Singer Instruments, UK).

Uma pequena porção da biomassa presente no meio de esporulação foi transferida para microtubos Eppendorf estéril contendo 45 μ L de água destilada estéril, 5 μ L de solução de liticase (5.000 U/mL de liticase, 1,0 M sorbitol, 0,1 M citrato de tri-sódio, 0,06 M EDTA e 0,14 M β -mercaptoetanol) e rapidamente agitada. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, foi transferida uma alíquota de 10 μ L para uma placa de Petri estéril descartável (92 mm X 16 mm, Thermo Scientific Nunc™, Denmark) contendo meio para micromanipulação acrescido de 300 μ g de geneticina, para crescimento apenas dos esporos com o gene *ARG82* deletado. A placa foi levada para o micromanipulador para dissecação dos ascos e os ascósporos (esporos) foram ordenados na placa conforme Figura 2. Cada esporo (segregante haploide) foi individualmente cultivado em 3 mL de YPD e estocados a -80 °C. Para melhor identificação dos segregantes, para cada um foi dado um número referente ao asco, uma letra minúscula referente ao esporo e uma letra maiúscula referente a identificação da placa como o exemplo apresentado na Figura 6.

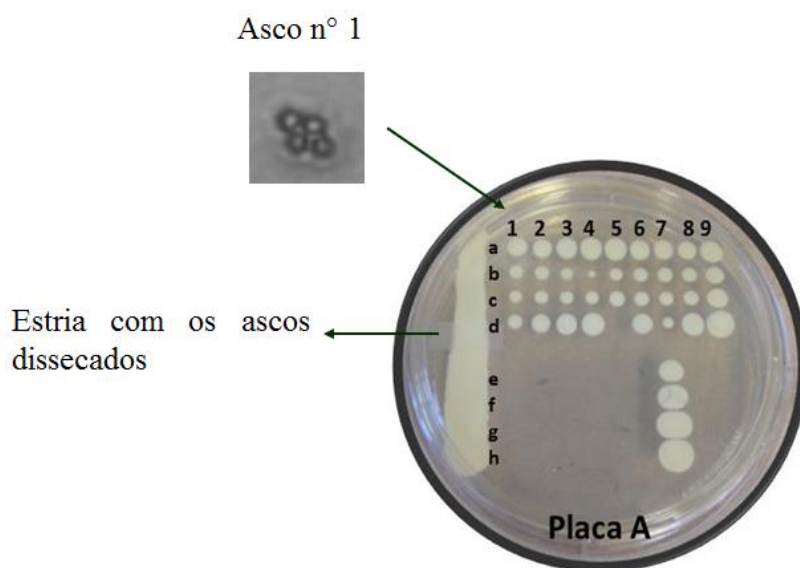


Figura 6: Disposição e identificação das colônias dos haploides na placa do micromanipulador. Exemplo do segregante identificado como 1a.A, está localizado na posição 1 (número do asco), a (letra referente ao esporo), A (letra referente a placa utilizada na dissecação no micromanipulador).

4.7 Análise da ploidia por Citometria de Fluxo

A ploidia das leveduras foi determinada por quantificação do conteúdo DNA celular analisado por citometria de fluxo conforme descrito por Popolo *et al.* (1982), com algumas modificações. Tal técnica tem como princípio a intensidade da fluorescência emitida pelo iodeto de propídio intercalados aos ácidos nucleicos.

As células de leveduras previamente cultivadas em 3 mL de YPD por 12 horas foram coletadas por centrifugação e lavadas 3 vezes em tampão Tris-HCl (50 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, pH 7,7). Uma amostra de 2×10^7 células/mL foi fixada com 1 mL de etanol 70% (v/v) gelado, a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 100 µL de tampão Tris-HCl com RNase (0,25 mg/mL) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período as células foram tratadas com proteinase K (1mg/mL) por 1 hora a 50 °C. Posteriormente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 100 µL de solução de iodeto de propídio (0,046 mM) e mantidas a 4 °C por 48 horas. As amostras foram analisadas em citômetro FACScalibur (Becton-Dickinson) emitindo laser a 488 nm. As células foram detectadas a 564-606 nm (FL2-A) e a quantidade de DNA foi estimada com base na intensidade da fluorescência e comparado ao conteúdo de DNA das células de leveduras de referência (*S. cerevisiae* S288C MAT α e S288c MAT α/α).

4.8 Avaliação do crescimento dos haploides em presença de higromicina

A avaliação do crescimento dos haploides em presença de higromicina foi realizada para selecionar o *pool* de segregantes superior. Os segregantes foram previamente cultivados em caldo YPD a 30 °C por 24 horas. Após esse período, os segregantes foram submetidos ao teste de crescimento em caldo YPD acrescido de 150 µg de higromicina medido por ($A_{600\text{ nm}}$) em um espectrofotômetro (Reader Model 680 BIO-RAD), mediante incubação a 30 °C por 48 horas. A absorbância inicial a 600 nm foi de 0,1 para todas as culturas. O crescimento foi avaliado em microplacas de 96 poços (86 x 128 mm, fundo chato) com leitura a cada 6 horas e agitações prévias de 30 segundos antes das leituras. Em cada microplaca foi realizado o crescimento das linhagens parentais com fenótipo superior (PJ69-4a) e fenótipo inferior (BY4742). Os segregantes que apresentaram DO final próximas ou semelhantes a cepa parental *S. cerevisiae* PJ694a (*arg82Δ*) foram selecionados para o teste de tolerância ao cloreto de lítio.

4.9 Avaliação do crescimento dos haploides em presença de cloreto de lítio

A avaliação do crescimento dos haploides em presença de cloreto de lítio foi realizada para selecionar o *pool* de segregantes superior. Os segregantes selecionados pela susceptibilidade a higromicina foram previamente cultivados em caldo YPD a 30 °C por 24 horas. Após esse período, as culturas foram submetidas ao teste de crescimento em caldo YPD acrescido de cloreto de lítio (concentração final de 50 mM) medido por ($A_{600\text{ nm}}$) em espectrofotômetro (Reader Model 680 BIO- RAD), mediante incubação a 30 °C por 48 horas. A absorvância inicial a 600 nm foi de 0,1 para todas as culturas. O crescimento foi avaliado em microplacas de 96 poços (86 x 128 mm, fundo chato) com leitura da absorvância a 600 nm a cada 6 horas e agitações prévias de 30 segundos antes das leituras. Em cada microplaca foi realizado o crescimento das linhagens parentais com fenótipo superior PJ694a (*arg82Δ*) e com fenótipo inferior BY4742 (wt).

Os segregantes que apresentaram DO final próximas ou semelhantes a cepa parental PJ694a (*arg82Δ*) foram selecionados e submetidos a análise da acidificação extracelular induzida pela glicose (item 3.3). A seleção dos segregantes foi feita através de comparação das taxas de acidificação dos segregantes e do parental superior, tendo sido selecionados aqueles que apresentaram taxas maiores ou iguais ao do referido parental.

4.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prisma 5. Os dados obtidos da acidificação extracelular foram analisados pela ANOVA, seguido de teste de Tukey (5% de significância), quando a ANOVA foi significativa, $p < 0,05$. Para os demais resultados foram realizados cálculos de média e desvio padrão.

4.11 Extração de DNA e sequenciamento

Amostras de DNA das leveduras parentais PJ694a, BY4742 e dos grupos de segregantes, tanto superior quanto randômico, foram extraídas para posterior sequenciamento. As células foram cultivadas em meio YPD 2% com ampicilina (20 µg/mL) por 48 horas até a fase estacionária. As culturas dos segregantes foram cultivadas separadamente em 3 mL de YPD, as células foram misturadas antes da extração com base em DO e peso seco com o objetivo de obter quantidades aproximadamente iguais de DNA

para cada cepa. A extração do DNA genômico foi extraído seguindo o protocolo de Pais *et al.*, 2014.

Após a extração do DNA, o material foi quantificado e posteriormente foi realizado análise de contaminação por DNA bacteriano por PCR, através da amplificação do gene rDNA 16S. As reações foram realizadas em termociclador (T100 Thermal Cycler - Bio-Rad), usando a combinação de primers TACGGCTACCTTGTTACGACTT e GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG sintetizados pela Integrated DNA technology, Brasil. Nas reações foram utilizadas 0,2 mM de cada dNTP, 1 mM de MgCl₂, 25 pmol de cada primer, Tampão 1X Green Gotaq® Flexi e Gotaq® Flexi DNA polimerase (Promega, USA). As condições das reações foram: temperatura inicial de desnaturação 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 segundos; 60 °C por 1 minutos; 72 °C por 1 minuto, e temperatura de extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCRs foram visualizados usando o equipamento AlphaImager Mini System (Alpha Innotech, USA) após separação por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed™ Nucleic Acid (Biotium, USA).

Foram fornecidos 2 µg de DNA por *pool* e cepas parentais ao Instituto de Genômica de Pequim (BGI) (Hong Kong, China) para sequenciamento do genoma completo, via plataforma Illumina (HiSeq2000). Nesse sequenciamento o DNA é fragmentado em blocos de aproximadamente 500pb que são lidos em ambas as extremidades (pair-ended), as leituras são curtas, de 100 pb.

4.12 Análise das sequências e mapeamento dos QTLs

As leituras de sequência das cepas parentais e o *pool* foram inicialmente alinhadas à sequência do genoma S288c de referência, após o qual polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) restantes entre as duas cepas parentais e a cobertura mapeamento é de 30x para as cepas parentais e de 70x para os *pools*, de acordo com os protocolos de análise poligênica anteriores (Parts *et al.*, 2011; Claesen *et al.*, 2013). Os *SNPs* são utilizados como marcadores naturais presentes em todo o genoma, servindo para diferenciar alelos provenientes de cada uma das cepas parentais. No mapeamento foi utilizado Phred 64. *SNPs* entre as cepas parentais individuais e a sequência do genoma de referência, mas ausentes nas próprias cepas parentais, foram filtrados usando o plugin de sequenciamento eclipse nova geração (Duitama *et al.*, 2014). As frequências das variantes *SNP* foram calculadas dividindo o número da variante pelo número total de leituras alinhadas. O desvio de 50%, acima ou abaixo, era um sinal de segregação de variante *SNP* unilateral,

indicando ligação genética à característica de interesse (Wera *et al.*, 2001). No programa NGSEP para detecção das variantes teve-se as etapas de filtro de regiões com números de cópias diferentes em comparação com a referência, genes e cromossomos duplicados, genes multi-cópia retirando assim as regiões já conhecidas que eram repetidas. No NGSEP o índice de qualidade do genótipo mínimo varia de 0 a 259, utilizamos o valor padrão 40. Quanto ao alinhamento máximo por posição inicial utilizamos o valor 5, evitando assim perda de dados.

A ligação genética ao fenótipo foi estatisticamente confirmada usando EXPLORA, um algoritmo baseado no modelo oculto de Markov (HMM) para extração de alelos super-representados na análise de segregação em massa. Nesse algoritmo, um marcador é identificado como significativo quando sua probabilidade atribuída é maior que 0,95 (Duitama *et al.*, 2014). Para cada polimorfismo, existem três possibilidades: correlação com o parental superior, correlação com o parental inferior e sem correlação. Com a frequência dos SNPs no pool superior e randômico é determinado quais regiões do genoma estão relacionadas à característica de interesse (Haldermans *et al.*, 2007).

Finalmente, o mapeamento de frequência da variante SNP e a suavização de dados foram realizados usando o algoritmo baseado em HMM desenvolvido por Claesen e Burzykowski (Claesen *et al.*, 2013) na plataforma R (programa RStudio 0.99.903, R versão 3.3.1, R Development Core Team, 2013). Este algoritmo permitiu a redução da largura dos QTLs estimando a significância (valor p) da ligação em cada localização SNP, comparando as frequências das variantes SNP dos pools superior e aleatório nesta posição. Além disso, calculou-se o valor p comparando a frequência variante SNP do *pool* superior e uma frequência variante prevista de um pool aleatório de 0,5, que corresponderia, na ausência de ligação inadvertida, à situação esperada para o total número de leituras em uma determinada posição, metade representa a variante SNP de referência e a outra metade representa a variante SNP alternativa.

4.12.1 Análises de Bioinformática para priorização de genes candidatos

O número de SNPs identificados a partir da análise de mapeamento de QTL foi baixo (item 4.4) e insuficiente para apresentar significância estatística pelos métodos descritos anteriormente e comumente usados para esse fim. Este baixo número de variantes pode ter sido observado devido à proximidade filogenética apresentada pelas cepas que foram utilizadas como parentais. Embora o número de SNPs identificados tenha sido pequeno, eles podem representar variantes/genes envolvidos com o fenótipo

de interesse, uma vez que as cepas sequenciadas apresentaram nítida diferença fenotípica e, portanto, precisavam ser melhor investigadas.

Neste contexto, com o objetivo de identificar as bases genéticas que podem estar envolvidas com o fenótipo de maior atividade da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, tendo em conta as variantes identificadas na análise de mapeamento de QTL, independentemente do valor de *p* apresentado na análise, desenvolveu-se o *script* SNPsInQTLselection.py (<https://github.com/bioinfonupeb/SNPsInQTLSelection>). Este *script* usa o arquivo de SNPs identificados pelo programa NGSEP dos parentais superior e inferior, do *pool* superior e do *pool* aleatório (variantesfile_Annotated.vcf) como entrada, no formato vcf. Na primeira etapa, foi realizada a correção da ploidia das cepas parentais 205 (parental superior) e 206 (parental inferior), uma vez que para a construção do modelo de sequenciamento foram utilizadas as cepas haplóides. Por se tratar do resultado do alinhamento de todas as *reads* obtidas contra uma referência, algumas dessas *reads* podem alinhar em uma região, mesmo com alguma substituição de base. Essa substituição, em linhagens diplóides, seria considerada uma região de heterozigosidade, ou mesmo um SNP. No entanto, como as cepas 205 e 206 são haplóides, para evitar esse tipo de falsa identificação de alelos, todas as *reads* que se alinharam em uma determinada posição foram contadas e foi considerado o alelo mais frequente como o presente nessa cepa. As posições que não apresentaram diferença mínima de duas *reads* entre os alelos, ou que apresentaram o mesmo número de *reads* para cada um dos alelos identificados, foram removidas. Após essa correção de ploidia, a segunda etapa do *script* levou em consideração a confiabilidade dos SNPs identificados. Desta forma, as posições onde a cobertura em profundidade era inferior a 4 *reads* foram removidas. Posteriormente, na terceira etapa, realizou-se a comparação dos alelos de cada uma das quatro linhagens para identificar aquelas possivelmente envolvidas com o fenótipo. Assim, os SNPs que atendiam às seguintes condições foram selecionados, por posição: (1) o alelo mais frequente para o parental superior deve ser o alelo mais frequente para o *pool* superior, mas diferente do alelo mais frequente para o parental inferior; (2) o alelo mais frequente no *pool* superior deve ter uma frequência igual ou superior a 75% e (3) a frequência do alelo no *pool* aleatório deve estar entre 48 e 50%. Os genes portadores de cada um dos SNPs indicados pelo *script* foram selecionados para análise funcional.

Para verificar a via metabólica de ação de cada um dos genes selecionados, e verificar se havia alguma interação entre eles, foi realizada uma análise de enriquecimento funcional utilizando a ferramenta DAVID (Huang et al., 2009 a, b) e de interação usando

STRING (Szkłarczyk et al., 2019). Para tornar a análise de interação mais específica foi adicionado à lista de genes aqueles que já foram descritos como envolvidos na via hipotética de ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, que são: *ARG82*, *YVC1*, *LPX1*, *SNF3*, *PMCI*, *PLC1*, *PTK2* e *PMA1* (Brandão et al., 1994; Coccetti et al., 1998; Souza et al., 2001; Tropia et al., 2006; Buillet et al., 2012; Pereira et al., 2015; Castanheira et al., 2018).

Para verificar se os alelos do gene *STT4* poderiam estar envolvidos com os fenótipos apresentados no teste de acidificação extracelular e sinal de cálcio foi verificado se os alelos se encontram em regiões conservadas através de um alinhamento múltiplo a nível de nucleotídeos e de aminoácidos usando o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), implementado na ferramenta MEGA (Kumar *et al.*, 2018). As sequências gênicas utilizadas nesse alinhamento foram recuperadas do banco de dados *Saccharomyces Genome Database* (SGD) no formato fasta. Posteriormente foi verificado se algum dos alelos desse gene poderiam alterar um dos domínios funcionais descritos para a proteína codificada pelo gene *STT4* através do banco de dados *The protein families database* (Pfam), 2021.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diferenças entre duas cepas de leveduras de diferentes *backgrounds* em relação à ativação de H⁺-ATPase de membrana plasmática induzida por glicose e à sinalização de cálcio

Cepas *Saccharomyces cerevisiae* apresentando deleção no gene *ARG82* não codifica a quinase responsável por fosforilar IP₃ logo, mutantes *arg82Δ* apresentam aumento nas concentrações de IP₃ no citoplasma que atua como mensageiro na resposta intracelular de cálcio, o que resultaria em um aumento da atividade da H⁺-ATPase (Steger *et al.*, 2003; Tisi *et al.*, 2004; Brandao, 2014). A metabolização do IP₃, está relacionada ao metabolismo de fontes alternativas de carbono e a expressão gênica regulada por glicose induzindo a ativação da H⁺-ATPase em leveduras (Saiardi *et al.*, 2000; Carvalho, 2007).

No entanto, quando a atividade de H⁺-ATPase da membrana plasmática, induzida por glicose, foi determinada em duas cepas *Saccharomyces cerevisiae* (BY4742 e PJ69) e seus respectivos mutantes *arg82Δ*, ocorreu um menor aumento da taxa de bombeamento de prótons na célula com deleção no gene *ARG82* do background BY4742 quando comparado ao background PJ69, 0,39 para 0,5 mmol.h⁻¹.g⁻¹ células e 0,43 para 0,74 mmol.h⁻¹.g⁻¹, respectivamente (Figura 7). Esses dados sugerem uma diferença fenotípica entre as cepas do *background* PJ69 e BY4742, resultando numa maior ativação induzida por glicose da H⁺-ATPase no mutante PJ69 *arg82Δ*, observando assim que esses efeitos são claramente dependentes da base genética. Esses resultados se correlacionam com aqueles observados quando a atividade de H⁺-ATPase induzida por glicose foi medida diretamente em membranas plasmáticas purificadas, seguindo a hidrólise de ATP, a mesma tendência foi observada. No *background* genético do PJ69, a ativação da enzima induzida por glicose é quase o dobro quando comparada ao tipo selvagem correspondente (Tropia *et al.*, 2006).

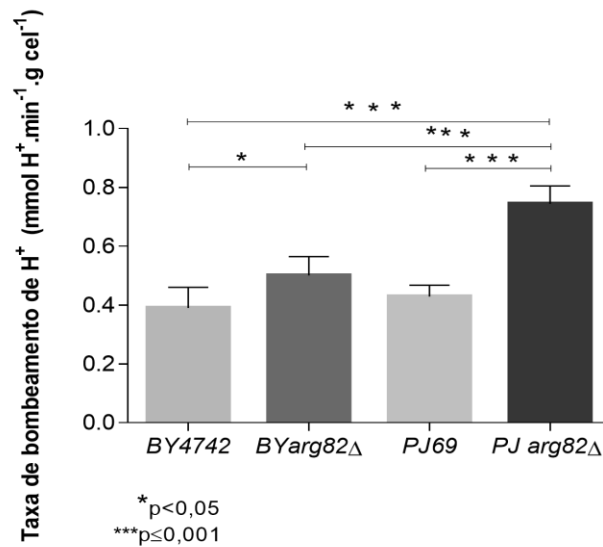


Figura 7: Acidificação extracelular induzida por glicose. Ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose nas cepas BY4742 (wt), BY *arg82Δ*, PJ69 (wt) e PJ69 *arg82Δ*. Os asteriscos demonstram que há diferença significativa entre a taxa de bombeamento de H⁺ de BY4742 e BY *arg82Δ*, entre PJ69 e PJ69 *arg82Δ*, entre BY *arg82Δ* e PJ69 *arg82Δ* e BY4742 e PJ69 *arg82Δ*.

Adicionalmente, quando a sinalização de cálcio induzida por glicose foi medida em ambas as cepas (wt e mutante *arg82Δ*) em ambos os *backgrounds* genéticos (Figura 7), o mutante *arg82Δ* do *background* PJ69 apresenta uma maior sinalização de cálcio após a adição de glicose quando comparada ao tipo selvagem correspondente (Figura 8B) já no *background* BY a cepa selvagem apresentou maior sinal de cálcio quando comparado ao seu respectivo mutante *arg82Δ* (Figura 8A). Os resultados apresentados demonstram que a cepa BY4741 apresentou pico de luminescência máxima de 317 URL/s já o mutante BY*arg82Δ* apresentou um pico máximo em torno de 163 URL/s, aproximadamente 51% abaixo do valor encontrado na cepa selvagem. No *background* PJ69, o mutante *arg82Δ* atingiu pico de luminescência máxima de 1086 URL por segundo e a cepa selvagem 404 URL por segundo, sendo essa luminescência equivalente 37% a cepa PJ*arg82Δ* (Figura 8).

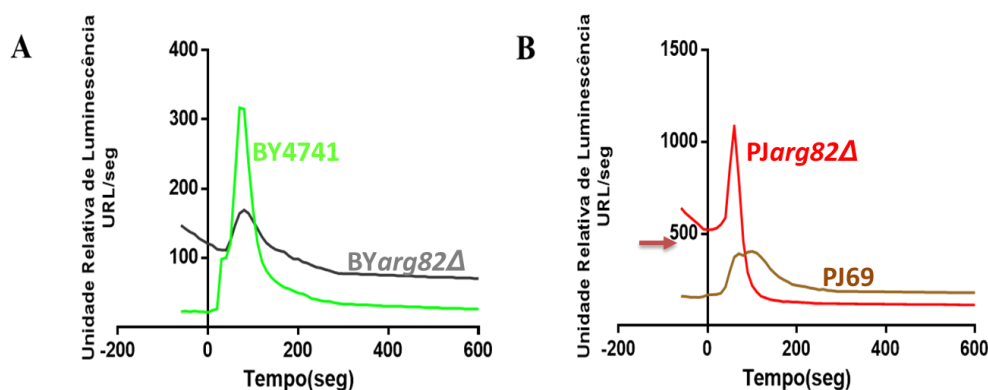


Figura 8: Determinação indireta de cálcio intracelular - sinal de cálcio nos *backgrounds* BY (A) e PJ (B). No *background* BY a cepa selvagem apresentou maior sinal de cálcio quando comparado ao respectivo mutante *arg82* Δ , já no *background* PJ a cepa *PJarg82* Δ apresentou maior sinal de cálcio do que a cepa selvagem PJ69. Cepa BY selvagem (linha verde), *BYarg82* Δ (linha cinza), PJ69 (linha marrom), *PJarg82* Δ (linha vermelha).

Os resultados apresentados pela cepa *PJ arg82* Δ evidenciam a importância do gene *ARG82* no controle do cálcio citosólico corroborando também com os resultados da acidificação extracelular que mostrou uma maior ativação da *Pma1p* nessa cepa quando comparado a cepas do *background* BY (Figura 7). Uma hipótese para explicar a diferença fenotípica desses *backgrounds* seria a presença de um ou mais alelos gênicos eventualmente envolvidos na ativação da H^+ -ATPase, codificando para proteínas com atividades distintas presentes no *background* genético PJ69 e ausentes em BY4742 ou vice-versa.

Dada a complexidade da via de sinalização envolvida na ativação da H^+ -ATPase de membrana citoplasmática (Brandão *et al.*, 1994; Coccetti *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2001; Tropia *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Bouillet *et al.*, 2012b; Brandao, 2014; Pereira *et al.*, 2015a; Castanheira *et al.*, 2018), ou mesmo a presença de novos elementos ainda não anteriormente descritos e considerando que essas diferenças de fenótipos podem estar relacionadas a diferentes genes e, ou, alelos, foi aplicada uma análise poligênica através do mapeamento de QTL usando sequenciamento de genoma de segregantes agrupados seguido de análise de QTL e, ou, mapeamento fino. A técnica de mapeamento de QTL permite identificar regiões que explicam parte da expressão fenotípica de uma característica quantitativa, podendo conter um ou mais genes que, em conjunto, irão contribuir para o fenótipo (Katou *et al.*, 2009; Pais *et al.*, 2014a).

5.2 Obtenção e seleção de segregantes com maior ativação da H⁺-ATPase a partir do cruzamento entre *S. cerevisiae* PJ69-4a e *S. cerevisiae* BY4742

5.2.1 Escolha das cepas parentais

Nesta abordagem, duas cepas de parentais haplóides devem diferir em uma característica particular (parentais superiores e inferiores); então, essas cepas são cruzadas para gerar segregantes que diferem nessas propriedades e, dessa forma, podem ser submetidas à seleção de segregantes superiores, análise de segregantes agrupados para mapeamento de QTL (Holt *et al.*, 2018)

Os parentais superior e inferior são o mutante *arg82Δ* – *background* PJ69 (*MATa*) e a cepa de tipo selvagem BY4742 (*MATα*), respectivamente. Essa escolha foi feita porque em estudo anterior foi demonstrado que leveduras com deleções no gene *ARG82* são consideradas incapazes de esporular, e que o fenótipo seria restaurado após a transformação da célula com a inserção de um plasmídeo contendo o gene *ARG82* (Dubois e Messenguy, 1994). De fato, quando realizado o cruzamento da cepa PJ69 *arg82Δ* com a cepa BY4742 *arg82Δ*, os diploides gerados não apresentaram capacidade de esporulação (dados não mostrados).

Diante disso a cepa selvagem BY4742 (*Mat α*), foi selecionada como parental inferior (menor atividade da H⁺-ATPase) para o cruzamento, dissecação e seleção do *pool* de segregantes.

5.2.2 Cruzamento entre *S. cerevisiae* PJ694a e *S. cerevisiae* BY4742

Foi realizado o cruzamento da cepa PJ69 *arg82Δ* (*MAT a*) com a cepa BY4742 (wt) (*MAT α*) (Figura 8A) e dezoito colônias, resultantes da diluição da biomassa formada pela mistura das duas cepas, foram escolhidas aleatoriamente para realizar a PCR a fim de confirmar o *mating type*. Foram obtidos três híbridos, denominamos 10, 12 e 15, resultantes do cruzamento, demonstrado pela amplificação dos dois amplicons, um com 404 pb (*MATα*) e outro com 544 pb (*MAT a*) (Figura 9B).

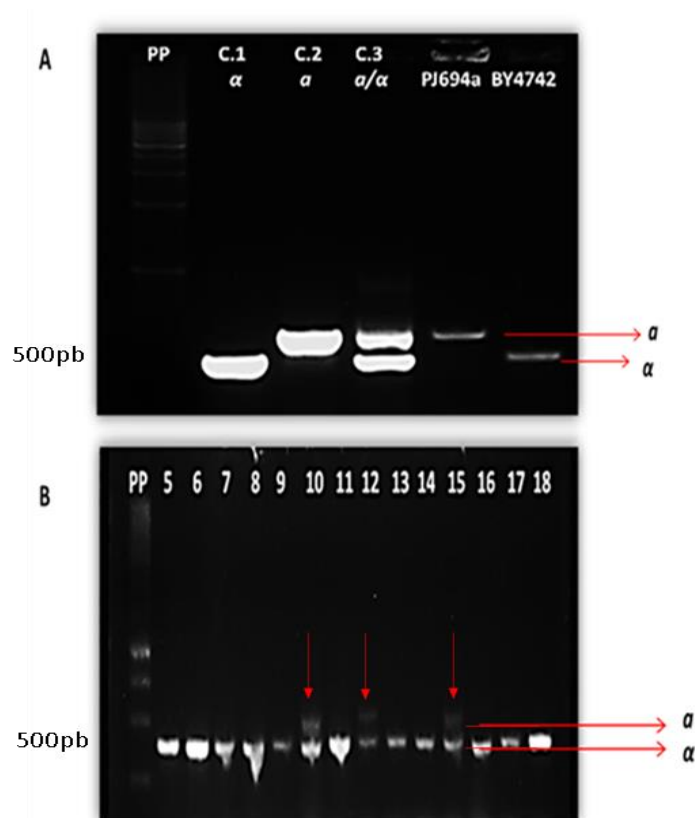


Figura 9: PCR *mating type* das *S. cerevisiae* PJ69 *arg82Δ* e BY4742. Painei A - PP (DNA ladder 100pb), C1, C2, C3: *S. cerevisiae* S288c Mat α , Mat a e Mat a/α , respectivamente. Painei B - colônias obtidas do cruzamento dos parentais haploides: 10, 12 e 15.

Para confirmar a obtenção dos híbridos, além da PCR de *mating type*, foi realizada também a análise da ploidia por citometria de fluxo. A quantidade de material genético dos híbridos e dos parentais foram comparadas com cepas controles haploides e diploides, (Figura 10). Os parentais BY4742(wt) e PJ69 *arg82Δ* foram confirmados como haploides de acordo com as cepas controles haploides marcados em vermelho na Figura 10 (Painéis A e B). Os híbridos 10, 12 e 15 apresentaram quantidade de material genético compatíveis as cepas controles diploides marcados em azul na Figura 10C, 10D e 10E, respectivamente, apresentando o dobro de conteúdo de DNA que as cepas parentais.

Esses dados da citometria de fluxo e da PCR de *mating type*, confirmam a obtenção de três híbridos após o cruzamento das estirpes BY4742 (wt) com PJ69 *arg82Δ*.

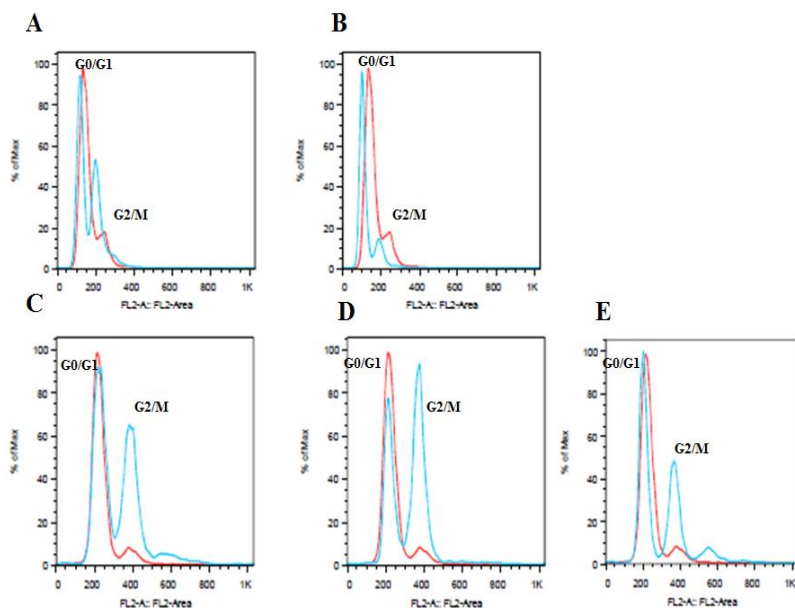


Figura 10: Histograma do conteúdo de DNA das leveduras parentais e híbridas obtidos por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídio. As linhas azuis mostram os perfis de conteúdo de DNA da levedura BY4742 (wt) (A); PJ69 *arg82Δ* (B) e dos híbridos 10 (C), 12 (D) e 15 (E). As linhas vermelhas mostram os perfis das cepas referências haploide e diploide *S. cerevisiae* S288c Mata (A, B) e Mata/ α (C,D e E), respectivamente.

Os três híbridos foram submetidos ao teste de acidificação extracelular e comparado com a cepa parental PJ69 *arg82Δ* para verificação do fenótipo dos mesmos através das taxas de bombeamento de prótons. As taxas calculadas estão representadas na Figura 11.

Conforme pode ser verificado na Figura 11, a taxa de bombeamento de prótons da PJ69 *arg82Δ* foi 0,72 mmol.h⁻¹.g⁻¹.células e das cepas híbridas 10, 12 e 15 foram 0,71, 0,44 e 0,77 mmol.h⁻¹.g⁻¹.células, respectivamente. Portanto, apenas o híbrido 12 apresentou uma menor taxa de acidificação. A levedura híbrida 10 foi escolhida para a etapa posterior de esporulação, dissecação e seleção dos segregantes superiores.

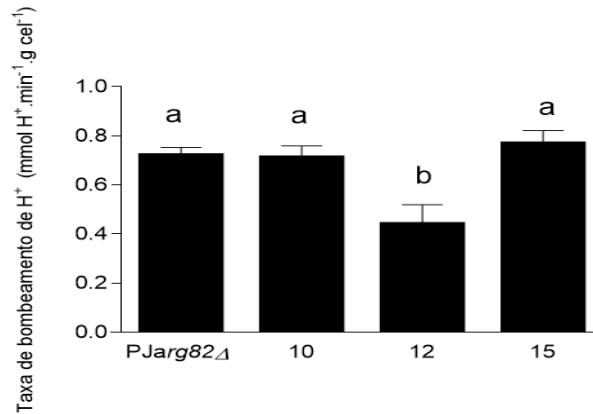


Figura 11: Acidificação extracelular induzida por glicose da levedura PJ69arg82Δ e das cepas resultantes do cruzamento (híbrido 10, 12 e 15). Os valores das taxas de bombeamento de H⁺ seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, p<0,05.

5.2.3 Esporulação da levedura obtida do cruzamento

As células do híbrido 10, resultantes do cruzamento entre a selvagem BY4742 e mutante PJ69 *arg82Δ*, foram submetidas as condições de esporulação até visualização da formação de esporos (tétrades) em microscópio óptico, como mostrado na Figura 12. De fato, houve boa esporulação com visualização da formação de tríades e tétrades após aproximadamente cinco dias de incubação.

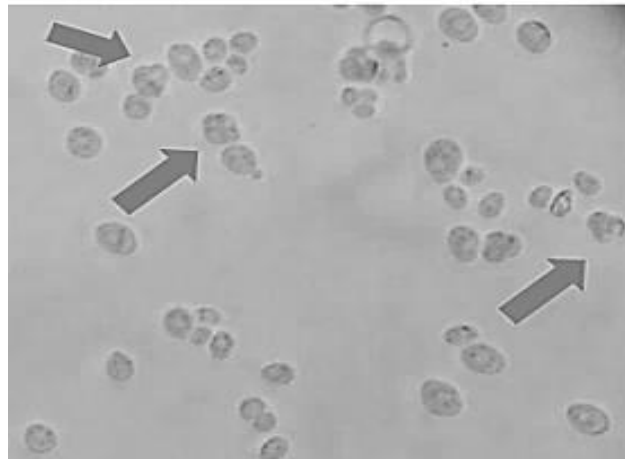


Figura 12: Células esporuladas do híbrido 10 resultante do cruzamento entre *S. cerevisiae* BY4742 (wt) e PJ69arg82Δ. As setas mostram a formação das tétrades observadas em microscopia ótica.

O mutante *arg82Δ* não possui capacidade de esporular, sendo observado formação de ascos somente após inserção de plasmídeo contendo o gene *ARG82* (Dubois e Messenguy, 1994), como observado na Figura 12, o híbrido 10 foi capaz de esporular

evidenciando assim a recuperação de fenótipo pelo cruzamento com a cepa selvagem BY4742, provavelmente pela incorporação do gene *ARG82* dessa cepa.

Foram obtidas 18 placas com colônias oriundas de tétrades dissecadas, contendo 16 a 18 tétrades por placa totalizando 600 segregantes que foram selecionados com o mesmo fenótipo apresentado pelo parental superior, conforme sugerido por (Pais *et al.*, 2014a), uma vez que quanto maior o número de segregantes maior a probabilidade de identificação dos QTLs relacionado à característica de interesse (Ehrenreich *et al.*, 2010). Essa elevada quantidade de tétrades dissecadas foi necessária, pois o meio de cultura para micromanipulação foi suplementado com geneticina, a fim de obter segregantes com gene *ARG82* deletado, como a parental superior, o mutante PJ69 *arg82::KanMX4*. Dentre os 600 segregantes resistentes a geneticina foram identificados aqueles que apresentavam um fenótipo de ativação da H⁺-ATPase igual ou maior o da cepa parental superior (PJ69 *arg82Δ*).

5.2.4 Avaliação do crescimento dos segregantes em presença de higromicina

Células com mutação no gene *PMA1* são mais resistentes à higromicina quando comparadas a cepas do tipo selvagem. Mutantes *pma1Δ* apresentam diminuição no potencial de membrana devido a menor atividade da H⁺-ATPase e, conseqüentemente, menor transporte da higromicina para o interior da célula. Dessa forma, o transporte de prótons está diretamente relacionado ao aumento do potencial de membrana com conseqüente aumento na sensibilidade a algumas drogas como, por exemplo, a higromicina (Perlin *et al.*, 1988; Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2001).

Diante disso, o teste de sensibilidade a higromicina foi o primeiro teste realizado para triagem dos segregantes. Inicialmente foi realizada avaliação com as cepas parentais, superior e inferior para escolha da concentração do antibiótico a ser utilizada, os parentais foram testados em diferentes concentrações de antibiótico (entre 0 a 800 µg/ml de higromicina em YPD). A sensibilidade a essas concentrações está apresentada na Figura 12.

O aumento da sensibilidade das estirpes a higromicina foi diretamente relacionado ao aumento da concentração do antibiótico (Figura 13). É possível observar que a estirpe PJ69 *arg82Δ* é mais sensível que a estirpe BY4742 (wt) em todas as concentrações de higromicina. PJ69 *arg82Δ* apresentou crescimento inferior atingindo

uma DO_{600nm} de 0,6, enquanto BY4742 (wt) apresentou um maior crescimento alcançando uma DO_{600nm} de 1,3 em 150 μg de higromicina, o crescimento dessa estirpe só diminuiu a partir de 400 μg de higromicina. Como afirmado antes, maior sensibilidade a higromicina pode ser devido a uma maior atividade da H^+ -ATPase que atuaria no aumento do potencial de membrana com consequente aumento na sensibilidade a cátions, como observado também por (Goossens *et al.*, 2000).

Diante desses resultados foi escolhida a concentração de 150 μg (Figura 13 – Painel D) para realização de seleção dos segregantes, uma vez que nessa concentração já é possível observar as diferenças no crescimento entre as cepas controles (PJ69 *arg82Δ* e BY4742).

A Figura 13 mostra o perfil de alguns segregantes cultivados em presença de higromicina. Os segregantes 11bF, 12bF, 11dG e 12dG apresentaram crescimento menor que a cepa PJ694a em 24 horas de crescimento (Figura 14 – Painéis A e B). Os demais segregantes não foram selecionados, pois apresentaram crescimento superior ao da cepa PJ694a (Figura 14 – Painéis C e D). A partir dos 600 segregantes, 90 apresentaram crescimento em higromicina igual ou inferior ao da parental superior (Tabela 2).

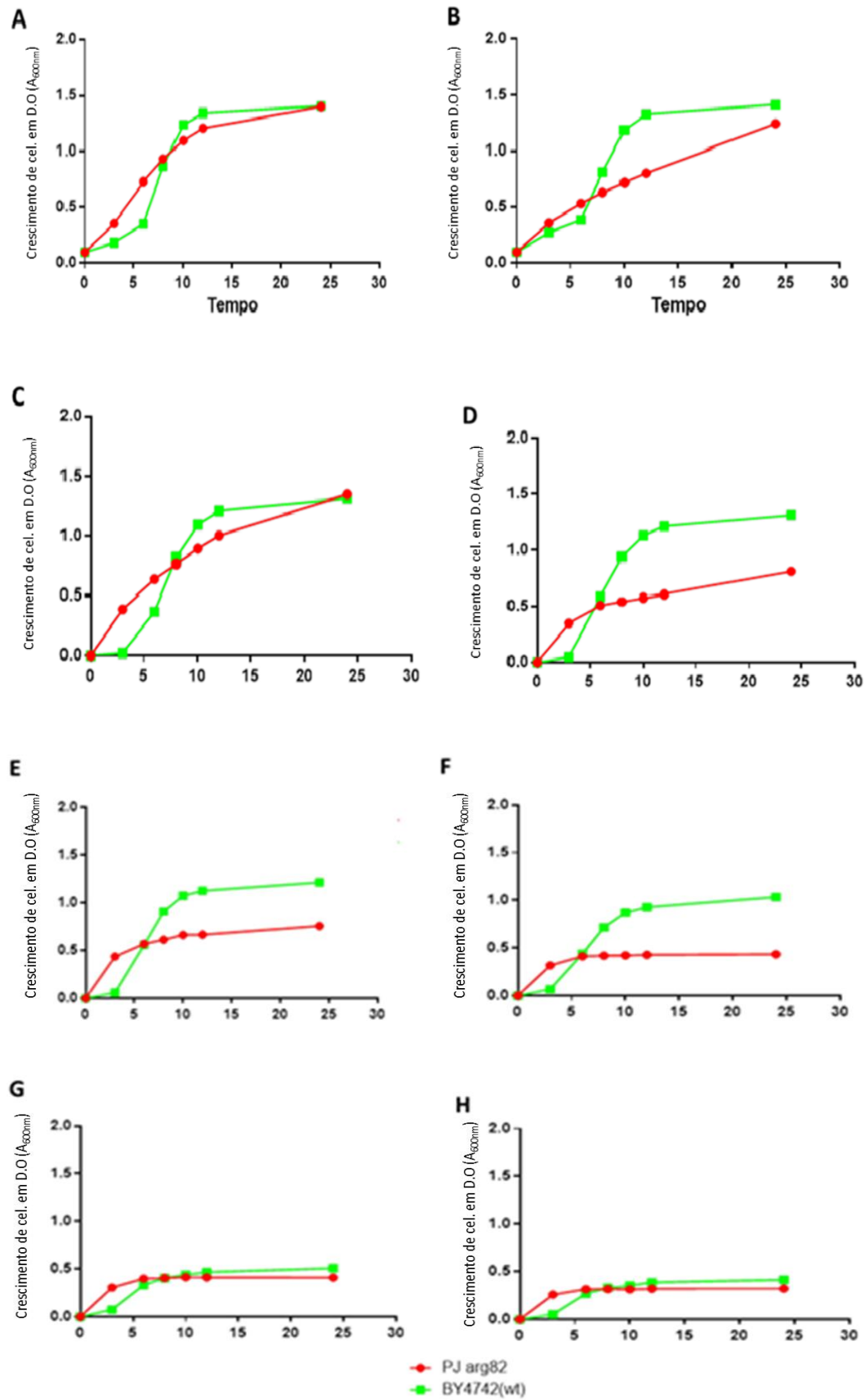


Figura 13: Crescimento das cepas de leveduras parentais BY4742 (wt) e PJ69*arg82*Δ em diferentes concentrações de higromicina. A, ausência de higromicina; B, 50 μ g; C, 100 μ g; D, 150 μ g; E, 200 μ g; F, 400 μ g; G, 600 μ g; H, 800 μ g higromicina por ml de meio YPD. BY4742 (verde) e PJ69 *arg82*Δ (vermelho)

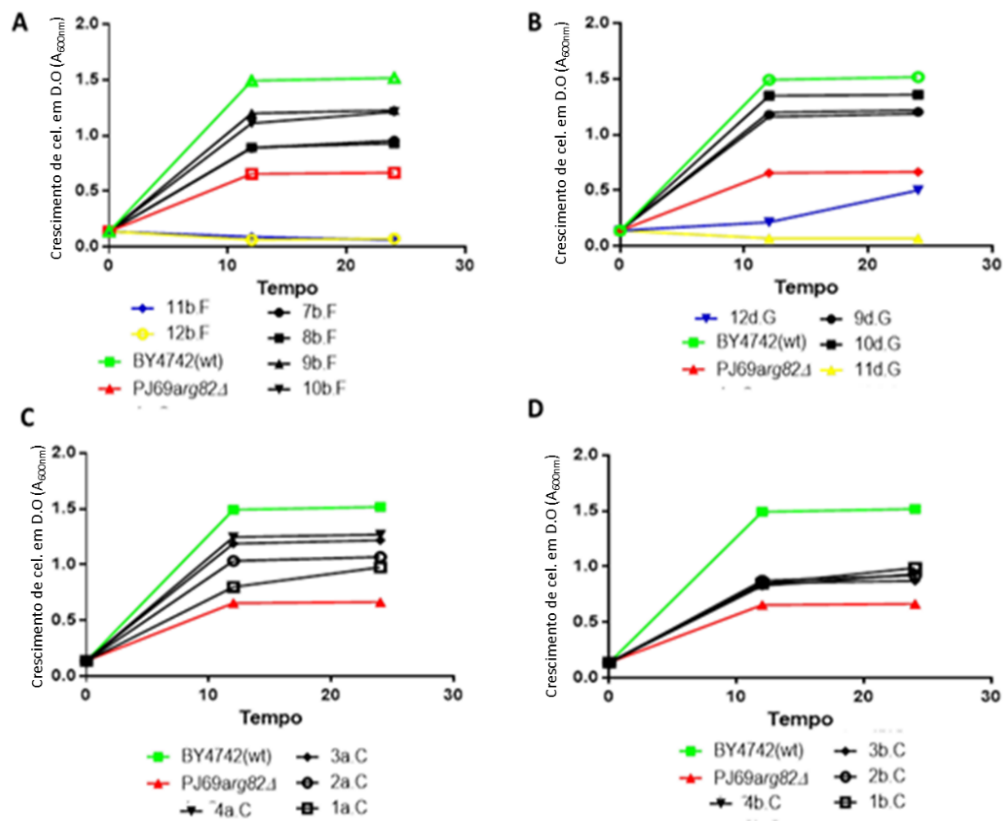


Figura 14: Crescimento dos segregantes em presença de higromicina. Segregantes selecionados apresentaram crescimento igual ou menor a cepa PJ69 *arg82Δ*. (A e B) e não selecionados com crescimento superior ao da cepa PJ69 *arg82Δ* (C e D). BY4742 (verde), PJ69 *arg82Δ* (vermelho), Segregantes não selecionados (preto), segregantes selecionados (amarelo e azul).

A realização do teste de sensibilidade a higromicina em microplaca permitiu comparar o crescimento dos segregantes com as cepas controles e verificar pequenas diferenças de crescimento entre os segregantes (Figura 14) favorecendo assim a identificação daqueles que apresentaram fenótipo igual ou semelhante ao parental superior (Perlin *et al.*, 1988; Withee *et al.*, 1998; Marešová e Sychrová, 2007; Pereira *et al.*, 2015b).

Tabela 2: Crescimento celular (DO_{600nm}) dos segregantes em presença de higromicina (150 µg/mL)

Segregante	D.O final	Segregante	D.O final	Segregante	D.O final
PJ694a	0,774±0,0282	BY4742	1,517±0,023	1e.B	0,289±0,009
1a.A	0,32±0,039	9a.F	0,751±0,080	12a.F	0,063±0,015
3d.A	0,299±0,107	11b.F	0,060±0,004	4a.A	0,052±0,004
3h.C	0,259±0,008	12b.F	0,073±0,008	6b.A	0,395±0,212
11c.E	0,068±0,008	11e.G	0,052±0,015	4a.A	0,474±0,021
12d.G	0,501±0,070	12e.G	0,064±0,035	6b.A	0,368±0,051
6d.B	0,255±0,001	11f.H	0,304±0,059	6d.A	0,355±0,001
3d.B	0,249±0,036	12f.H	0,065±0,007	4d.J	0,074±0,021
3h.A	0,065±0,002	11g.H	0,076±0,002	10e.B	0,059±0,016
7a.A	0,061±0,021	6c.J	0,077±0,025	8d.B	0,368±0,053
7c.A	0,045±0,018	1d.J	0,055±0,098	9d.B	0,367±0,154
6e.J	0,732±0,016	9f.B	0,046±0,006	2h.K	0,070±0,040
4e.J	0,72±0,041	9h.C	0,043±0,002	9b.I	0,077±0,047
3g.K	0,723±0,052	10e.B	0,267±0,299	7c.J	0,243±0,210
12b.A	0,054±0,001	9c.J	0,226±0,210	7b.D	0,051±0,014
12d.B	0,050±0,008	8c.J	0,492±0,063	10c.D	0,055±0,005
12g.C	0,051±0,010	10c.J	0,035±0,053	6b.F	0,764±0,198
4d.D	0,053±0,001	11c.J	0,047±0,033	12a.O	0,060±0,001
7d.J	0,037±0,008	8b.P	0,065±0,011	10g.K	0,075±0,097
11d.J	0,043±0,013	12b.P	0,061±0,011	11g.k	0,072±0,068
12e.K	0,048±0,064	12d.P	0,064±0,028	8a.O	0,047±0,001
9h.K	0,068±0,030	11e.Q	0,067±0,012	8b.L	0,053±0,010
12e.Q	0,061±0,019	1a.O	0,072±0,013	8g.R	0,618±0,183
11c.Q	0,684±0,113	3a.O	0,048±0,002	7h.R	0,548±0,230
7a.O	0,056±0,002	2a.L	0,718±0,029	11a.R	0,076±0,018
5b.O	0,072±0,020	6a.L	0,084±0,020	1b.R	0,056±0,006
4f.N	0,714±0,063	11h.R	0,063±0,013	1f.N	0,084±0,016
1d.M	0,081±0,025	8b.S	0,048±0,011	2b.L	0,088±0,025
3a.O	0,057±0,005	8c.M	0,098±0,029	3c.P	0,066±0,008
5b.O	0,057±0,008	12b.M	0,090±0,001	4c.P	0,066±0,024
10a.O	0,070±0,015	5d.P	0,078±0,004		

5.2.5 Seleção de segregantes sensíveis ao cloreto de lítio

Considerando a relação da ativação da H⁺-ATPase e a absorção de cátions, foi escolhido também o teste de sensibilidade ao cloreto de lítio para seleção dos segregantes. O lítio inibe o crescimento em concentrações suficientemente baixas quando comparado a outros cátions, além disso, algumas cepas (mutantes para genes associados ao transporte através da membrana) podem apresentar resistência específica a lítio (Goossens *et al.*, 2000). De fato, estudos anteriores do nosso laboratório já haviam corroborado que em cepas com sensibilidade a higromicina nem todas apresentaram sensibilidade ao cloreto de lítio, sugerindo que o uso combinado dessas duas substâncias aumenta a estringência de processos seletivos que visam identificar cepas com maior atividade H⁺-ATPase (Pereira *et al.*, 2015b).

Assim, foi realizado um teste de sensibilidade a cloreto de lítio em diferentes concentrações (0 a 200 mM) nas cepas controles (BY4742 e PJ69 *arg82Δ*). A Figura 15 demonstra o crescimento dessas cepas em diferentes concentrações de cloreto de lítio.

Como pode ser observado, a cepa PJ69*arg82Δ* foi mais sensível ao cloreto de lítio que a cepa BY4742 (wt) em todas as concentrações testadas, tendo sido escolhida a concentração de 50 mM para o teste de seleção dos segregantes.

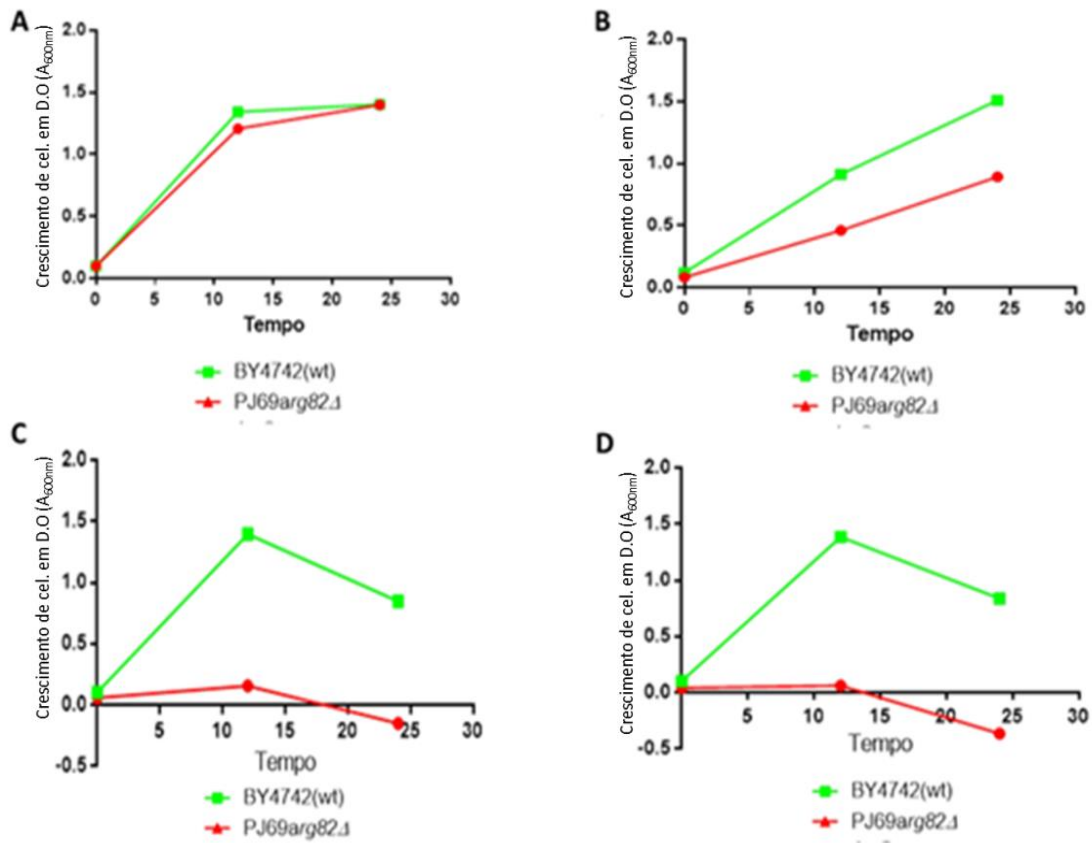


Figura 15: Crescimento das cepas de leveduras parentais BY4742 (wt) e PJ69arg82Δ em diferentes concentrações de cloreto de lítio. A, ausência de cloreto de lítio; B, 50mM; C, 100mM; D, 200mM. BY4742 (verde) e PJ69arg82Δ (vermelho).

O teste de sensibilidade a cloreto de lítio foi realizado com os 90 segregantes selecionados no teste de sensibilidade a higromicina (Tabela 2), o critério de seleção foi crescimento igual ou inferior a parental superior PJ69arg82Δ. A Figura 16 mostra curvas de crescimento de alguns segregantes selecionados (9a.F, 11b.F, 2b.L e 8b.L) e não selecionados. Dos 90 segregantes testados quanto a sensibilidade ao cloreto de lítio, 34 apresentaram crescimento igual ou inferior a cepa parental PJ69arg82Δ (Tabela 3).

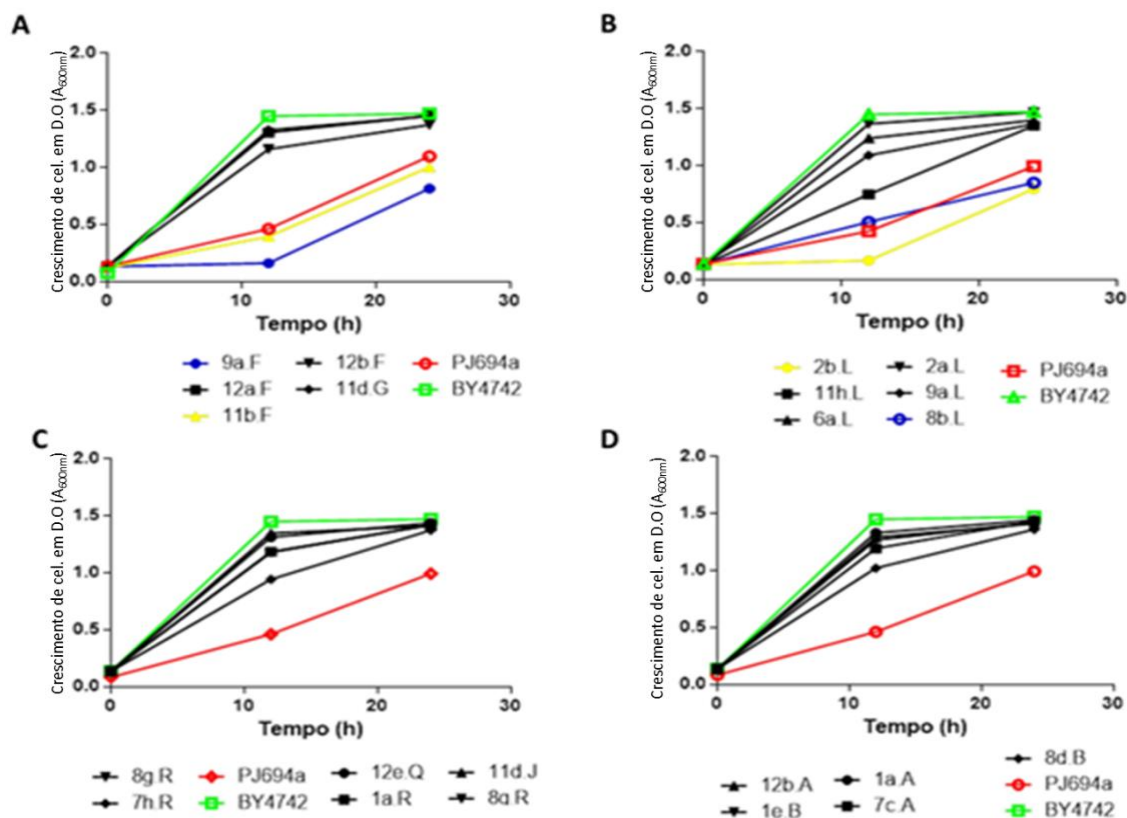


Figura 16: Crescimento de segregantes em presença de cloreto de lítio (50mM). Alguns segregantes selecionados com crescimento igual ou menor a cepa *PJ69arg82Δ* (A e B) e segregantes não selecionados com crescimento maior ao da cepa *PJ69arg82Δ* (C e D). BY4742 (verde) e *PJ69arg82Δ* (vermelho).

O transportador da higromicina ainda não é conhecido, mas há uma hipótese que esse transportador é mais sensível quando comparado a outros transportadores de cátions visto que mutantes com deleções no gene *TRK2* e *HRK1* de estirpes *YOR267c* apresentam pequenas mudanças no potencial de membrana. Há uma hipótese em que a atividade relativa do sistema de transporte de prótons pela *Pma1p*, e o transporte de K^+ pelas proteínas *TrKp* e *TrK2p* definem o estado estacionário do potencial de membrana modulando assim a atividade dos sistemas de transporte ativos secundários, como os envolvidos na absorção de nutrientes e de cátions tóxicos (Goossens *et al.*, 2000). Diante desses dados é possível supor que algumas mutações podem afetar a sensibilidade a alguns cátions e não afetar outros por isso usamos o teste de sensibilidade a higromicina e cloreto de lítio para seleção dos segregante.

Tabela 3: Valores da densidade ótica (DO_{600nm}) obtidos pelos segregantes selecionados no teste de sensibilidade a cloreto de lítio (50mM)

Segregante	D.O final	Segregante	D.O final	Segregante	D.O final
PJ694a	0,943±0,008	BY4742	1,378±0,026	10e.B	0,962±0,157
4a.A	0,921±0,144	9c.J	0,820±0,024	6b.F	0,874±0,249
6b.A	0,905±0,080	11c.E	0,840±0,056	9a.F	0,785±0,029
11c.J	0,993±0,085	11b.F	0,962±0,017	11g.K	0,763±0,309
11d.J	0,963±0,033	11f.H	0,983±0,031	9h.K	0,982±0,025
7d.J	0,624±0,014	4d.J	0,935±0,014	3a.O	0,912±0,008
3g.K	0,960±0,004	11h.R	0,967±0,012	12d.P	0,831±0,006
2h.K	0,979±0,047	1b.R	0,986±0,129	10g.K	0,967±0,001
4c.P	0,961±0,021	2b.L	0,759±0,029	11a.R	0,984±0,052
8b.P	0,956±0,026	8b.L	0,746±0,025	8b.S	0,977±0,0613
8c.M	0,967±0,014	11e.Q	0,963±0,033	7c.J	0,958±0,006
4f.N	0,942±0,064	5b.O	0,557±0,724	11c.Q	0,526±0,083

5.2.6 Seleção de segregantes com maior taxa de bombeamento de prótons

Os trinta e quatro segregantes selecionados na etapa anterior (sensibilidade ao cloreto de lítio) foram submetidos à análise da acidificação extracelular induzida por glicose. As taxas de bombeamento de prótons foram calculadas e os valores encontrados estão representados na Figura 17.

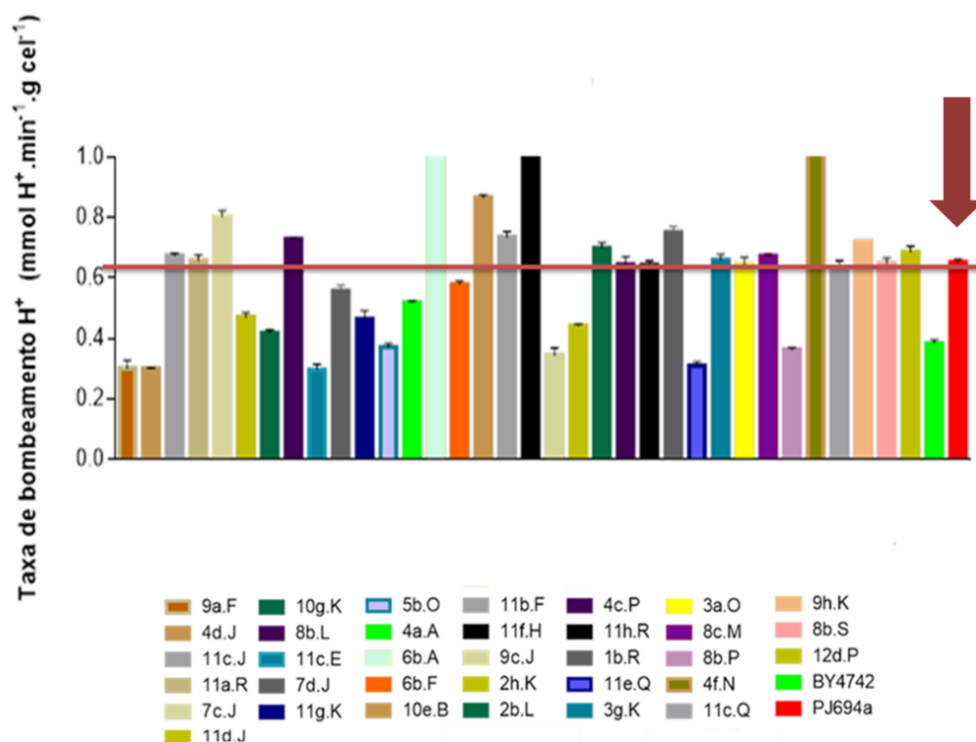


Figura 17: Acidificação extracelular induzida por glicose dos segregantes selecionados no teste de sensibilidade a cloreto de lítio (50mM). Vinte segregantes apresentaram taxa de bombeamento de prótons igual ou maior ao parental superior PJ69arg82Δ (marcação dos segregantes selecionados com a linha vermelha).

Dos 34 segregantes avaliados no teste de acidificação extracelular, 13 segregantes apresentaram taxa de bombeamento de prótons maior a parental superior (PJ69arg82Δ), ou seja, taxa maior a 0,65 e 7 segregantes apresentaram taxas iguais a parental superior, 14 segregantes apresentaram taxa de bombeamento igual a cepa parental inferior BY4742 (Figura 17). Assim, 20 segregantes foram selecionados por apresentar fenótipo igual ou superior a cepa PJ69 arg82Δ. Embora esse número de segregantes seja inferior a 30, que é o recomendado para formação de um *pool* superior, trabalhos recentes mostraram identificação de QTLs com um número de segregantes mais limitado, principalmente em se tratando de características que não são facilmente mensuráveis (Hubmann *et al.*, 2013; Pais *et al.*, 2013; Pais *et al.*, 2014a; Den Abt *et al.*, 2016).

O fato de nem todos os 34 segregantes selecionados no teste de sensibilidade a cátions não terem sido selecionados no teste de acidificação extracelular pode indicar que a relação entre atividade da H⁺-ATPase, potencial da membrana e a resistência a diferentes cátions não ocorre de forma direta, corroborando com estudos que sugerem a participação de outras proteínas na absorção de cátions (Barreto *et al.*, 2011).

5.3 Extração do DNA e conferências das amostras para envio do sequenciamento

Após a seleção do *pool* superior, os 20 segregantes foram agrupados para realização do sequenciamento do genoma. O *pool* randômico foi composto por 120 segregantes escolhidos de forma aleatória e foram agrupados da mesma forma que o *pool* superior para a extração do DNA. Foi realizado também a extração do DNA das cepas parentais, separadamente.

Após a extração do DNA, a integridade do DNA foi verificada no gel de agarose e posteriormente foi realizado uma reação de PCR para verificar amplificação do gene rDNA16s. Como observado na Figura 17 as amostras não apresentaram amplificação de fragmentos como mostrado nos controles positivos da Figura 18, indicando assim que a extração de DNA foi eficaz não apresentando contaminação bacteriana.

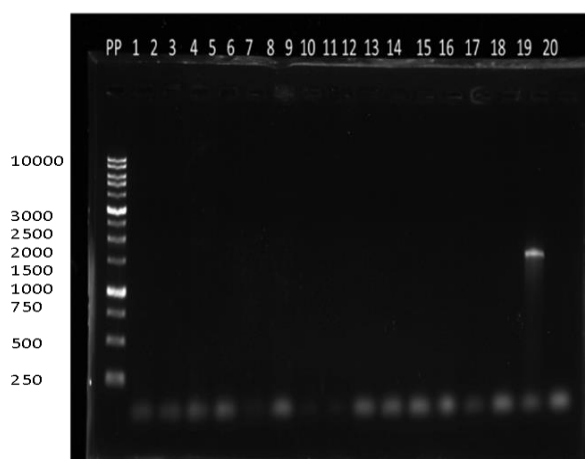


Figura 18: PCR 16s para verificação de possível contaminação bacteriana em DNA extraídos das cepas de levedura de interesse. Painel A – PP (DNA ladder 1kb), 1-2 BY4742, 3-4 PL694a, 5-6 *Pool* superior, 7-9 *Pool* randômico, controle positivo, DNA ladder. Painel B – PP (DNA ladder), 1-4 parental superior, 5-8 parental inferior, 9-14 *pool* superior; 15 a 18 *pool* randômico, 19-controle positivo, 20-controle negativo.

Posteriormente, o teor de DNA das amostras foi quantificado no aparelho NanoDrop Microvolume Spectrophotometers, e 2 µg de DNA dos *pools* e cepas parentais foram enviadas para o sequenciamento do genoma usando a tecnologia Illumina HiSeq2000 (Beijing Genomics Institute nBGI], Hong Kong, China). O sequenciamento foi realizado com a colaboração do professor Johan Thevelein, da Universidade Católica de Leuven - Bélgica.

5.4 Análise de QTLs

Na análise de QTL, todos os polimorfismos (SNPs) são identificados a partir do sequenciamento e mapeamento contra o genoma referência. Ou seja, o genoma do parental superior (PJ69 *arg82Δ*), parental inferior (BY4742), *pool* superior e *pool* randômico contra o genoma da cepa controle (S288c). Espera-se observar uma frequência de SNPs em torno de 50% no *pool* randômico, enquanto no sequenciamento do *pool* superior, quando um determinado *locus* do genoma está envolvido com a característica fenotípica de interesse, a frequência de SNPs fica acima de 50% indicando que essa característica poderia estar relacionada a uma região genômica ligada ao parental superior, da mesma forma que a diminuição na frequência de SNPs abaixo de 50% indica ligação entre aquela região e o parental inferior.

A ligação genética foi estatisticamente avaliada utilizando o modelo HMM, um algoritmo para extração de alelos representados na análise de segregantes agrupados. Nesse algoritmo, um marcador é identificado como significativo quando sua probabilidade atribuída é maior que 0,95 (Duitama *et al.*, 2014). Para cada polimorfismo, existem três possibilidades: correlação com o parental superior, correlação com o parental inferior e sem correlação. Com a frequência dos SNPs no *pool* superior e randômico é determinado quais regiões do genoma estão relacionadas à característica de interesse (Haldermans *et al.*, 2007).

Finalmente, o mapa com a frequência da variação dos SNPs obtido utilizando o programa R. Esse algoritmo permitiu a redução da largura de QTLs estimando a significância (valor de *p*) da ligação em cada posição do SNP por comparação da variação da frequência do SNP do grupo superior e do grupo randômico nessa posição.

A frequência da variante SNP foi representada graficamente por cromossomo (Figura 19). O mapeamento QTL de cada cromossomo é dividido em três painéis. O painel superior mostra um gráfico da frequência de variante SNP calculada em relação à posição SNP para o alinhamento de ambas as leituras de sequência de *pool*. Cada ponto representa um SNP e as linhas representam a frequência da variante SNP após a suavização de dados. O *pool* randômico é mostrado em preto e o *pool* superior em vermelho. O painel do meio mostra a confiança. Os valores de P foram plotados com a respectiva posição cromossômica e os valores de $p < 0,05$ (indicados por uma linha pontilhada) foram considerados estatisticamente significativos. A curva obtida pelo sequenciamento de todo o genoma oscilou em torno de 50% na maioria das áreas do

genoma. No entanto, o mapeamento de QTL mostrou poucos SNPs e vários *gaps*, o que seria justificado pelo fato de as cepas parentais utilizadas - PJ69 *arg82Δ* (parental superior) e BY4742 (parental inferior), em se tratando de cepas laboratoriais, poderem ser consideradas muito semelhantes. Além disso, foi encontrado um único QTL, localizado no cromossomo III, mas quando analisado, o fenótipo é relacionado ao parental inferior, conforme mostrado na primeira linha do cromossomo III (caixa preta), onde a linha preta representa o “pool randômico”.

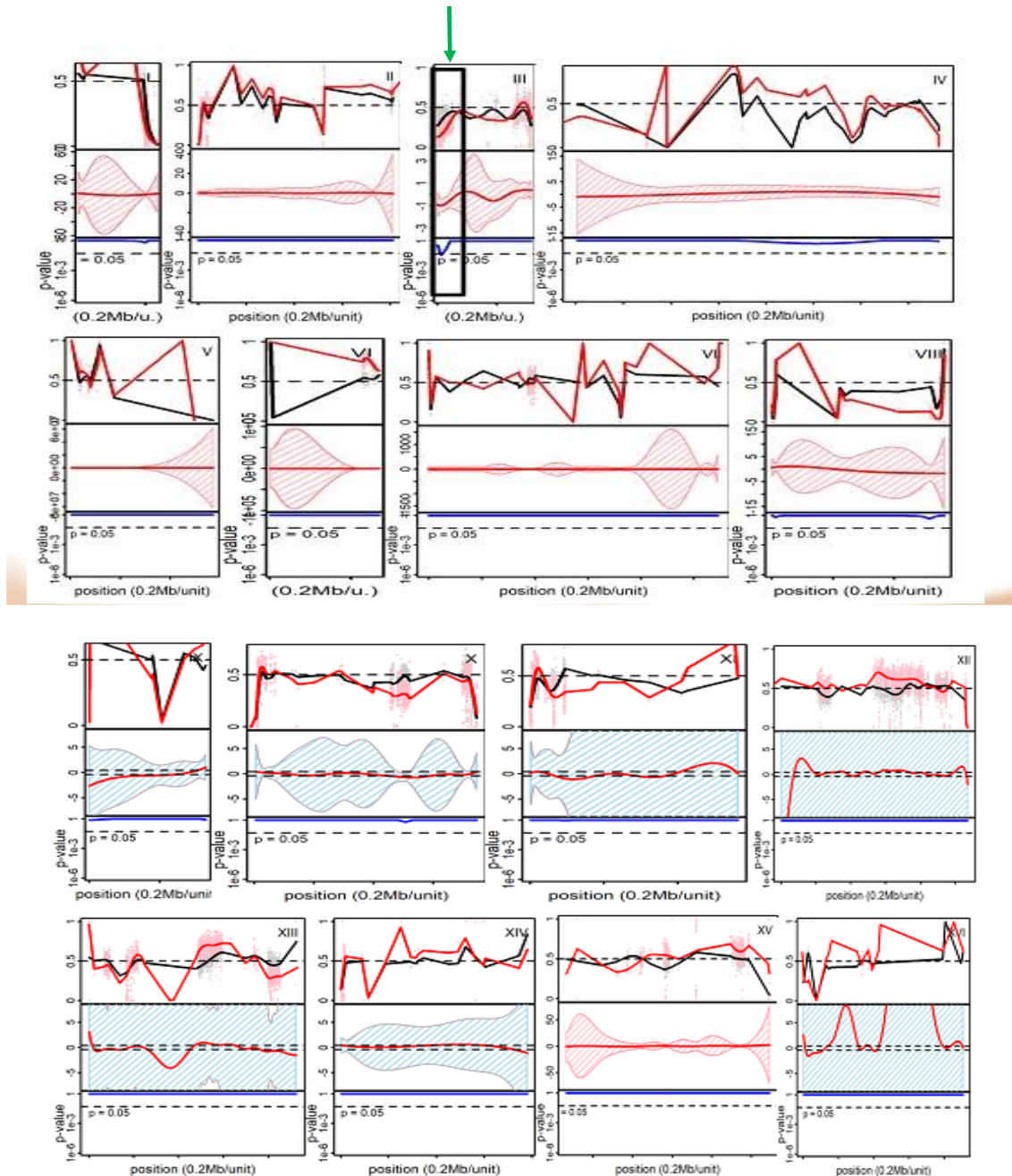


Figura 19: Mapeamento genético dos QTLs envolvidos no aumento da atividade da H⁺-ATPase pela análise de seqüências de genomas completos de *pool* de segregantes. Foram selecionados os segregantes, seguidos de sequenciamento (plataforma Illumina-BGI) do seu genoma. O número do cromossomo é mostrado no canto direito de cada conjunto de gráficos. O *pool* randômico está representado pela linha preta

e a linha vermelha representa o *pool* superior. O QTL mais confiável está representado pelo retângulo preto (cromossomo III). Quando a frequência da variante SNP é maior que 0,05, há ligação com o parental superior e se a frequência da variante é menor que 0,05, a ligação com o parental inferior. Os valores de P calculados a partir desses dados de sequência foram plotados contra as posições dos respectivos cromossômicos (terceiras linhas). Valores de P de 0,05 (indicados por linha pontilhada) são considerados estatisticamente significativos. A linha azul representa o valor de P calculado.

Por outro lado, observamos algumas regiões com potencial QTL em alguns cromossomos, nas quais houve maior frequência de SNPs relacionada ao pool superior ou a um único SNP, mas não foi significativa de acordo com o pipeline usado.

5.5 Análise de Bioinformática para priorização dos genes candidatos

A análise detalhada da região do QTL no cromossomo III foi realizada por meio de inspeção visual utilizando o programa IGV (The Integrative Genomics Viewer). Como pode ser observado na figura 20, o alelo de maior frequência no *pool* superior era igual ao alelo referente ao parental inferior. Esse resultado foi observado para todos os SNPs desse QTL.

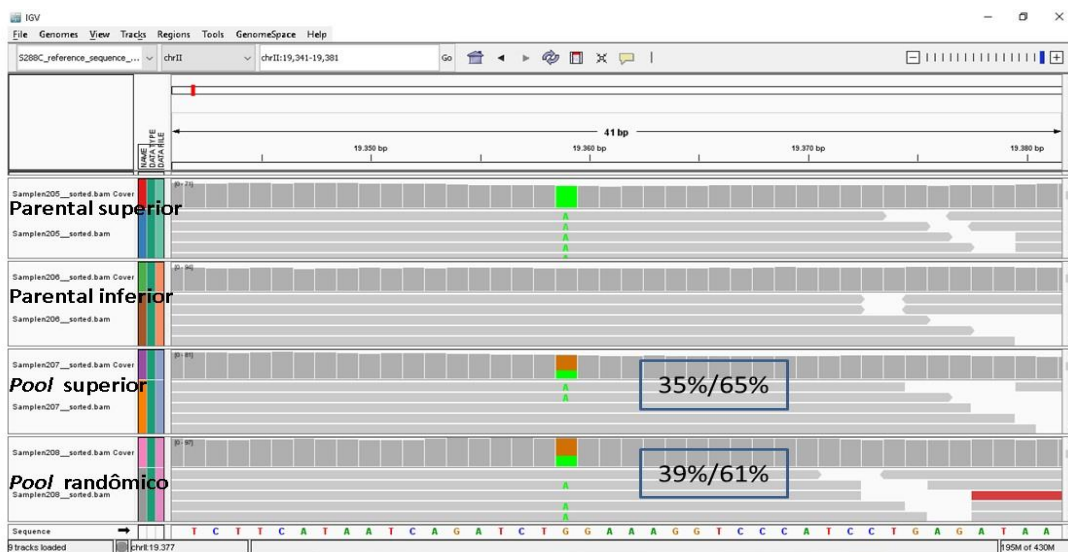


Figura 20: Visualização de parte do QTL detectado no cromossomo III. Parental superior apresenta 100% de bases nitrogenadas A, o parental inferior 100% de bases nitrogenadas G. O *pool* superior apresenta 65% das reads com o mesmo alelo, igual do parental inferior e 35% das reads com o alelo igual ao do parental superior. Já o *pool* randômico apresenta 61% das reads com alelo igual ao do parental inferior e 39% das reads com alelo igual ao do parental superior. Região do Cromossomo III, coordenadas 19.341a 19.381 visualizada no programa IGV (The Integrative Genomics Viewer).

Numa análise mais detalhada dos mapas de QTLs, foi observado algumas regiões com potenciais QTLs nos cromossomos VI, XII, XIII, XIV e XV, nas quais houve maior frequência de SNPs relacionada ao pool superior ou a um único SNP, mas essas regiões não foram significativas de acordo com o *pipeline* usado. Diante disso, com o intuito de identificar as bases genéticas que podem estar envolvidas com o fenótipo de interesse, levando em consideração as variantes identificadas a partir da análise de mapeamento de QTLs, independente do valor de p apresentado na análise, foi desenvolvido o *script* SNPsInQTLselection.py, descrito em Materiais e Métodos.

O número total de SNPs identificados foi de 15.221. Após a correção da ploidia foram detectados 4.272 SNPs, sendo que todos atenderam à condição de que o alelo mais frequente para o parental superior correspondia ao alelo mais frequente para o *pool* superior, mas era diferente do alelo mais frequente no parental inferior. Posteriormente os SNPs foram filtrados de acordo com as porcentagens dos alelos identificados. 42 SNPs atenderam ao critério de que o alelo mais frequente no pool superior apresentava frequência igual ou superior a 75% e o pool randômico apresentava frequência alélica entre 48 e 50%. Dessa forma, foram identificados 42 SNPs candidatos, localizados em 33 genes relacionados. Na Tabela 4 é possível observar esses 33 genes identificados, bem como a descrição da função conhecida para cada um deles.

Tabela 4: Genes identificados no parental superior e no pool superior e ausentes no parental inferior.

Cromossomo	Nome sistemático	Gene	Função (SGD)
II	YBL032W	<i>HEK2</i>	- Proteína de ligação de RNA envolvida na localização assimétrica de mRNA de ASH1; - Reprime a tradução de ASH1 mRNA, um efeito revertido pela fosforação dependente de Yck1p; - Regula o efeito e o comprimento da posição do telômero; similaridade com hnRNP-K
	YBR006W	<i>UGA2</i>	- Succinato semialdeído desidrogenase; - Envolvido na utilização de gama-aminobutirato (GABA) como fonte de nitrogênio; - Parte das vias de degradação do 4-aminobutirato e do glutamato; - Localizado no citoplasma
	YBR021W	<i>FUR4</i>	- Permease de uracila localizada na membrana plasmática; - A expressão é rigidamente regulada pelos níveis de uracila e sinais ambientais; - Alterações conformacionais induzidas por desdobramento ou ligação de substrato resultam em ubiquitinação e degradação mediada por Rsp5p
	YBR259W	<i>YBR259W</i>	Proteína de função desconhecida; - YBR259W não é um gene essencial; forma focos citoplasmáticos após estresse de replicação de DNA 1 2
VI	YFR043C	<i>IRC6</i>	- Fator acessório do revestimento de clatrina; - Envolvido no tráfego de vesículas mediado por clatrina; - Pode funcionar para ligar o complexo adaptador de clatrina AP-1 com o Rab GTPase Ypt31p; - Tem semelhança estrutural com proteínas G;
XII	YLR222C	<i>UTP13</i>	- Proteína nucleolar; - Componente do processoma da subunidade pequena (SSU) contendo o U3 snoRNA que está envolvido no processamento do rRNA 1 pré-18S
	YLRWdelta12 intergenic_variant	<i>YLRWdelt a12</i>	- Função não conhecida
	YLR228C	<i>ECM22</i>	- Proteína de ligação do elemento regulador de esteroide; - Regula a transcrição de genes biossintéticos de esteroide após a depleção de esteroide, após a realocação de membranas intracelulares para focos perinucleares; - Ativador redundante de filamentos com UPC2, regulando positivamente a expressão de genes envolvidos no crescimento filamentosos;
	YLR230W	<i>YLR230W</i>	- Quadro de leitura aberto duvidoso improvável de codificar uma proteína funcional; - Sobreposição a extremidade 5' do gene CDC42 / YLR229C essencial que codifica uma pequena GTPase semelhante a Rho essencial para o estabelecimento e manutenção da polaridade celular

Cromossomo	Nome sistemático	Gene	Função (SGD)
XII	YLR233C	<i>EST1</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fator associado ao RNA TLC1 envolvido na regulação do comprimento dos telômeros; - Subunidade de recrutamento da telomerase; - Tem atividade de promoção do G-quadruplex necessária para o alongamento do telômero; - Papel na ativação de Est2p-TLC1-RNA ligado a telômeros;
	YLR234W	<i>TOP3</i>	<ul style="list-style-type: none"> - DNA Topoisomerase III; - Proteína conservada que funciona em um complexo com Sgs1p e Rmi1p para relaxar preferencialmente o DNA superenrolado negativamente de fita simples; - A atividade de catenação / decatenação do DNA é estimulada por RPA e Sgs1p-Top3p-Rmi1p; - Envolvido na estabilidade dos telômeros e regulação da recombinação mitótica.
	YLR248W	<i>RCK2</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína quinase envolvida na resposta ao estresse oxidativo e osmótico; - Identificado como supressor de mutações de ponto de verificação do ciclo celular de <i>S. pombe</i>; - Semelhante a CaM (calmodulina) quinases;
	YLR264C-A	<i>YLR264C-A</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína putativa de função desconhecida
	YLR284C	<i>ECI1</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Delta3, delta2-enoil-CoA isomerase peroxissomal; - Proteína hexamérica que converte 3-hexenoil-CoA em trans-2-hexenoil-CoA, essencial para a beta-oxidação de ácidos graxos insaturados, induzida por oleato; ECI1 tem um parólogo, DCI1, que surgiu da duplicação do genoma inteiro
	YLR288C	<i>MEC3</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Dano ao DNA e proteína de ponto de verificação do paquiteno meiótico; - Subunidade de um complexo heterotrimérico (Rad17p-Mec3p-Ddc1p) que forma uma braçadeira deslizante, carregada em DNA duplex parcial por um complexo carregador de braçadeira;
	YLR305C	<i>STT4</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fosfatidilinositol-4-quinase; - Funções na via da proteína quinase Pkc1p; - Necessária para a morfologia normal do vacúolo, integridade da parede celular e organização do citoesqueleto de actina; - Necessária para a fusão autofagossomo-vacúolo durante a autofagia e para a lipofagia em células em fase estacionária e durante a privação de nitrogênio; - Localiza-se na membrana plasmática e mitocôndrias em estudos HTP.
	YLR307C-A	<i>DPA10</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína de montagem mitocondrial dependente de Delta-Psi de 10 kDa.
	YLR311C	<i>YLR311C</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Quadro de leitura aberto duvidoso; - Improvável de codificar uma proteína funcional, com base nos dados de sequência experimental e comparativa disponíveis.

Cromossomo	Nome sistemático	Gene	Função (SGD)
	YML029W	<i>USA1</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Subunidade de andaime da ubiquitina ligase Hrd1p; - Também promove a oligomerização da ligase; - Envolvido na degradação de proteínas associadas ao ER (ERAD);

XIII			- Interage com a proteína U1 snRNP específica, Snp1p.
	YMR119W	<i>AS11</i>	- Subunidade do complexo da membrana nuclear interna Asi ubiquitina ligase; - O complexo Asi tem como alvo proteínas mal dobradas da via de degradação associada à membrana nuclear interna (INMAD) e reguladores da biossíntese de esterol para degradação mediada por ubiquitina; - Atua com Asi2p e Asi3p para garantir a fidelidade da sinalização do sensor SPS ao direcionar formas latentes não processadas de Stp1p e Stp2p, mantendo o estado reprimido de expressão gênica na ausência de aminoácidos indutores.
	YMR124W	<i>EPO1</i>	- Proteína envolvida no tethering da septina-ER; - Interage com a proteína da membrana ER, Scs2p e Shs1p, um componente do anel de septina, no pescoço do botão para criar uma barreira de difusão no ER; - A proteína de fusão GFP localiza-se na periferia da célula, citoplasma, botão e pescoço do botão; - Interage com Crm1p em ensaio de dois híbridos;
	YMR125W	<i>STO1</i>	- Grande subunidade do complexo de proteína de ligação a cap de mRNA nuclear; - Interage com Npl3p para transportar poli (A) + mRNA nuclear para o citoplasma; - Também envolvido na degradação do mRNA nuclear e manutenção do telômero.
	YMR126C	<i>DLT1</i>	- Proteína de função desconhecida;
	YMR128W	<i>ECM16</i>	- Helicase de RNA dependente de ATP de caixa DEAH essencial específica para U3 snoRNP; - Funções com metiltransferase Bud23p; - Distribuição predominantemente nucleolar; - Necessário para a síntese de rRNA 18S.
	YMR130W	<i>DPI35</i>	- Proteína de importação mitocondrial dependente de Delta-Psi de 35 kDa.
	YMR137C	<i>PSO2</i>	- Nuclease necessária para reparo de quebra de fita simples e dupla de DNA; - Atua em uma etapa pós-incisão no reparo de quebras que resultam de ligações cruzadas entre as cadeias produzidas por uma variedade de derivados de psoraleno monofuncionais e bifuncionais; - Induzido por irradiação UV; - Forma focos nucleares após estresse de replicação de DNA.

Cromossomo	Nome sistemático	Gene	Função (SGD)
	YMR140W	<i>SIP5</i>	- Proteína de função desconhecida; - Interage com a fosfatase Reg1p / Glc7p e a quinase Snf1p; - Forma focos citoplasmáticos após estresse de replicação de DNA.
	YMR143W	<i>RPS16A</i>	- Componente de proteína da subunidade ribossômica pequena (40S); - Homóloga à proteína ribossomal S16 de mamífero e S9 bacteriana; - RPS16A tem um parálogo, RPS16B, que surgiu da duplicação do genoma inteiro.

XIII	YMR146C	<i>TIF34</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Subunidade eIF3i do fator de iniciação da tradução eucariótica 3 (eIF3); - Subunidade do complexo central de eIF3; <ul style="list-style-type: none"> - Essencial para tradução; - Estimula a taxa de varredura ribossômica durante a reinicialização da tradução; - eIF3 também está envolvido na leitura do códon de parada programada.
	YMR151W	<i>YIM2</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Quadro de leitura aberto duvidoso; improvável que codifique uma proteína funcional, com base nos dados de sequência experimental e comparativa disponíveis;
	YMR161W	<i>HLJ1</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Co-acompanhante para Hsp40p; - Ancorado na membrana ER; - Com seu homólogo Ydj1p promove a degradação de proteínas associadas ao ER (ERAD) de substratos de membrana integral; - Semelhante a <i>E. coli</i> DnaJ.
	YMR162C	<i>DNF3</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Trans-golgi rede aminofosfolipídeo translocase (flippase); ATPase de tipo P tipo 4; - Envolvido na translocação de fosfolipídios, contribuindo para a manutenção da assimetria lipídica da membrana nas vesículas secretoras pós-Golgi; - Papel no tráfego de proteínas entre o sistema de Golgi e endossomal; - Localiza-se na rede trans-Golgi; - Localiza-se na ponta <i>shmoo</i>, onde tem um papel redundante na resposta celular ao feromônio de acasalamento.
XV	YOR347C	<i>PYK2</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Piruvato quinase; parece ser modulado por fosforilação; - Transcrição reprimida por glicose, e Pyk2p pode ser ativo sob baixo fluxo glicolítico; - PYK2 tem um parálogo, CDC19, que surgiu da duplicação do genoma inteiro.

Com o intuito de priorizar um número menor de genes candidatos para validação experimental, foi realizada uma análise de enriquecimento (para verificar a via metabólica de atuação de cada um dos genes selecionados) e de interação (para verificar se ocorria alguma interação entre eles). Dos 33 genes identificados, 6 genes estavam envolvidos na via da telomerase (*EST1*, *MEC3*, *HEK2*, *TOP3*, *PSO2* e *STO1*), 1 gene envolvido na via de metabolismo do fosfatidilinositol (*STT4*), 1 gene envolvido no metabolismo de aminoácidos (*UGA2*) e um gene envolvido no metabolismo de carbono (*PIK2*).

Curiosamente o gene *STT4* codifica para uma fosfatidilinositol-4-quinase, estando a mesma envolvida com a via do metabolismo de fosfatoinositol bem como no sistema de sinalização do fosfatidilinositol como apresentado no item 2.1.

No metabolismo do fosfatidilinositol além do gene *STT4*, estão presentes os genes *ARG82* e *PLC1* que codificam a multiquinase inositol-fosfato e a fosfolipase C respectivamente, proteínas essas integrantes da via hipotética de estudo da H⁺ATPase induzida por glicose.

O gene *PIK2* codifica uma piruvato quinase, relacionada ao metabolismo de carbono e piruvato. O gene *UGA2* codifica uma succinato semialdeído desidrogenase, estando relacionado ao metabolismo de alanina, aspartato e glutamato. Os demais genes apresentados na análise de enriquecimento foram os genes *EST1*, *MEC3*, *HEK2*, *TOP3*, *PSO2*, *STO1* que estão relacionados a via da telomerase, estando esses genes associados a manutenção e organização dos telômeros.

Por fim, para analisar se havia alguma interação entre os 33 genes bem como para tornar a análise de interação mais específica, foi adicionado à lista de genes aqueles que já foram descritos como envolvidos na via hipotética de ativação da membrana citoplasmática H⁺-ATPase (*ARG82*, *YVC1*, *LPX1*, *SNF3*, *PMC1*, *PLC1*, *PTK2* e *PMA1*). O resultado do interatoma pode ser observado na Figura 21.

Essa abordagem nos permitiu identificar duas redes: a primeira está relacionada a via da telomerase (Painel B) corroborando com os resultados apresentados na análise de enriquecimento. No Painel C é possível verificar interação entre as proteínas Arg82p com Pik2p; Pma1p com Fur4p; e Plc1p e Fab1p com Stt4p.

Diante desses resultados, foram selecionados 10 genes apresentados na análise de enriquecimento e interatoma (*STT4*, *PIK2*, *UGA2*, *EST1*, *MEC3*, *HEK2*, *TOP3*, *PSO2*, *STO1*, *FUR4*) como potenciais genes relacionados ao fenótipo de maior ativação da H⁺ATPase para validação experimental. Para isso, foram utilizadas cepas do *background* BY contendo os respectivos genes de interesse deletados (coleção EUROSCARF) e realizamos os testes de acidificação extracelular induzida por glicose e teste de monitoramento *in vivo* da concentração de cálcio citosólico livre.

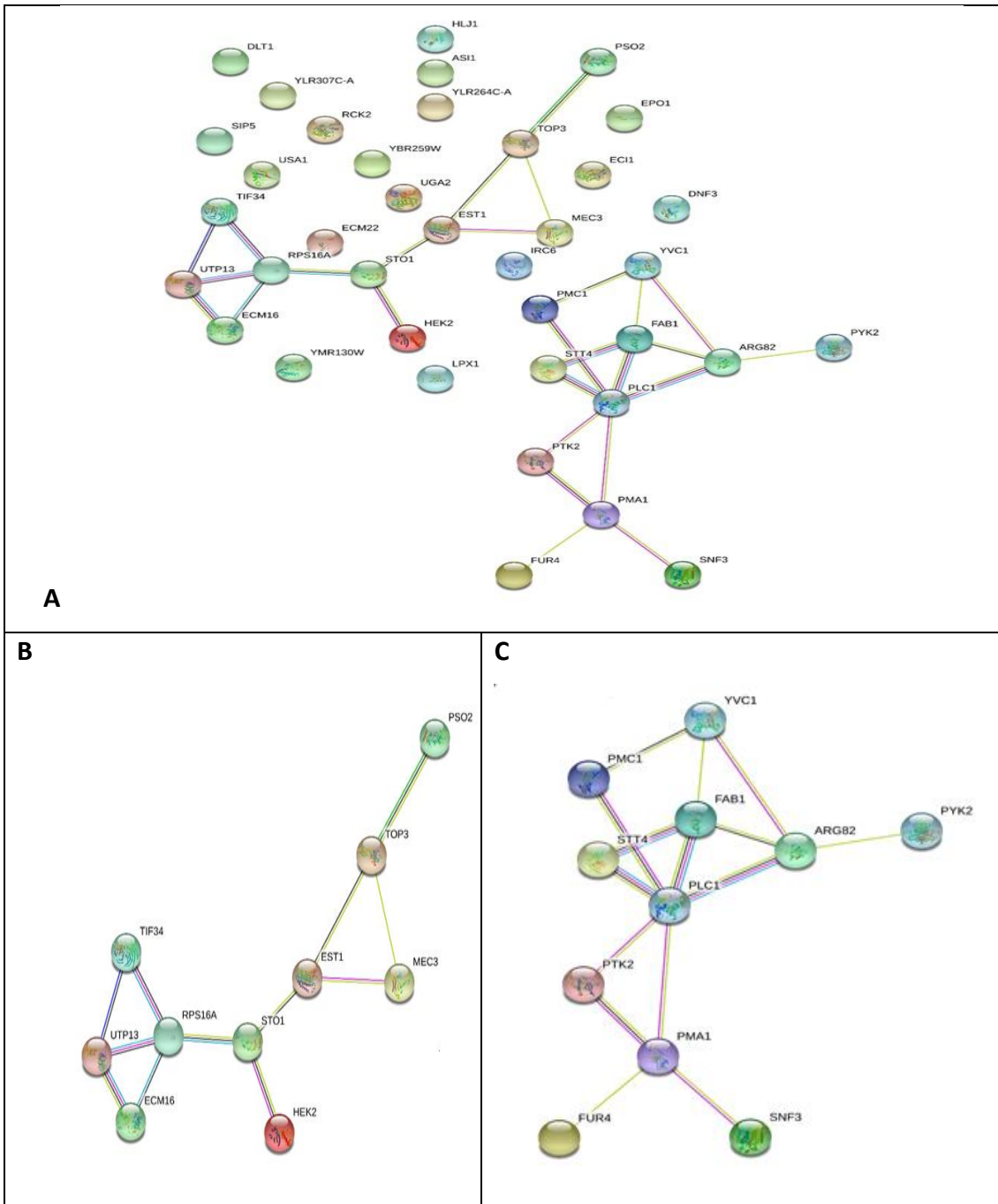


Figura 21: Interatoma dos 33 genes candidatos somados aos genes conhecidos na via hipotética de estudo da $H^+ATPase$ (A). Imagem B e C representam os grupos de interações apresentados na Figura A com destaque para as interações que foram observadas. Figura 6B está relacionada a via da telomerase. Na figura 6C é possível verificar interação entre as proteínas Arg82p com Pik2p, Pma1p com Fur4p, e Plc1p e Fab1p com Stt4p. (STRING, 2019).

5.6 Influência dos genes selecionados sobre a atividade da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática e no sinal de cálcio intracelular

Para verificar o envolvimento dos genes apontados na análise de enriquecimento e interatoma na ativação da H⁺-ATPase, realizamos inicialmente o teste de acidificação extracelular induzida por glicose (medida indireta da H⁺-ATPase) na linhagem selvagem e nos mutantes com deleção nos genes codificantes para as proteínas candidatas. (*UGA2*, *PIK2*, *FUR4*, *EST1*, *TOP3*, *HEK2*, *MEC3*, *STO1*, *STT4* E *PSO2*). As taxas de bombeamento de prótons após o pulso de glicose foram calculadas e os resultados estão apresentados na Figura 22.

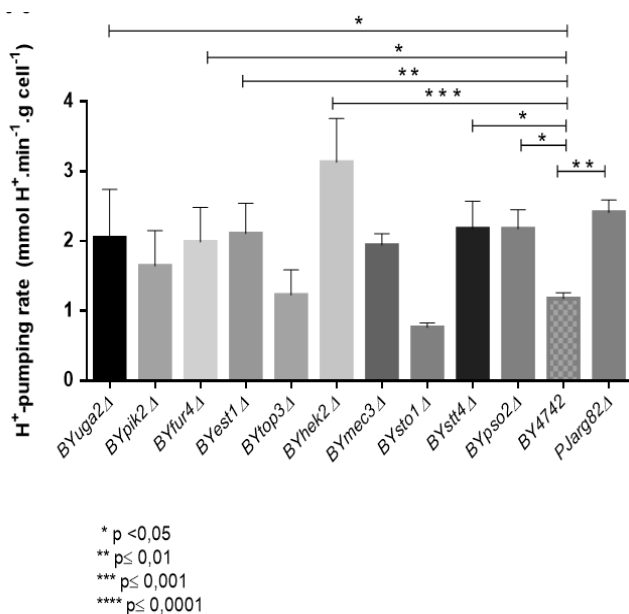


Figura 22: Acidificação extracelular induzida por glicose das cepas com genes candidatos deletados. Análise estatística relacionada ao parental inferior BY4742. Seis cepas (*uga2Δ*, *fur4Δ*, *est1Δ*, *hek2Δ*, *stt4Δ* e *pso2Δ* mutantes) tiveram taxas de bombeamento estatisticamente diferentes ao observado no parental inferior BY4742.

Das 10 cepas avaliadas no teste de acidificação extracelular, seis cepas (*uga2Δ*, *fur4Δ*, *est1Δ*, *hek2Δ*, *stt4Δ* e *pso2Δ* mutantes) apresentaram diferença estatística significativa no teste ANOVA com múltiplas comparações quando comparados ao parental inferior (Figura 22) e as mesmas não apresentaram diferença estatística quando comparada ao parental superior PJ69 *arg82Δ*. As cepas BY *top3Δ*, BY *sto1Δ*, BY *mec3Δ* e BY *pik2Δ* apresentaram acidificação extracelular igual ou menor ao parental inferior (Figura 22). Diante desses resultados essas quatro cepas foram eliminadas do próximo teste de fenótipo uma vez que nessa etapa utilizamos como critério de seleção as cepas que apresentaram fenótipo igual a cepa PJ69 *arg82Δ*. Portanto, uma vez que a cepa do *background* PJ tem uma ativação mais alta de H⁺-ATPase quando o gene *ARG82* é

deletado, o que não foi observado no *background* BY, o aumento na atividade de H⁺-ATPase nos seis mutantes *uga2Δ*, *fur4Δ*, *est1Δ*, *hek2Δ*, *stt4Δ* e *pso2Δ* sugerem que, na ausência dessas proteínas, Pma1p é mais ativada quando induzida por glicose no *background* BY ou que esses genes estariam inibindo a síntese de IP₃ e, neste caso, a ausência de Arg82p não levaria a um maior aumento do IP₃, conforme observado no *background* PJ.

A correlação entre atividade H⁺-ATPase e disponibilidade de cálcio intracelular já vem sendo mostrada em vários estudos, evidenciando que quanto maior a quantidade de cálcio citosólico disponível maior é a ativação da enzima (Tropia *et al.*, 2006; Bouillet *et al.*, 2012b; Pereira *et al.*, 2015a). Diante disso e dos resultados apresentados, foram selecionadas para o teste de monitoramento in vivo de cálcio citosólico livre as cepas mutantes *uga2Δ*, *fur4Δ*, *est1Δ*, *hek2Δ*, *stt4Δ*, *pso2Δ*.

Para a medida da concentração de cálcio citosólico livre foi utilizado o método da aequorina-coelenterazina, onde foram utilizadas células previamente transformadas com o plasmídeo pVTU-AEQ. Para realização do teste de cálcio citosólico livre inicialmente é necessário transformar a levedura com um plasmídeo contendo o gene que codifica para a Aequorina (pVTU-AEQ), uma fotoproteína altamente sensível a íons cálcio. Em sua forma ativa, a aequorina apresenta um polipeptídeo covalentemente ligado ao grupo prostético coelenterazina. Em consequência da ligação de Ca²⁺ a três sítios de alta afinidade, ocorre uma reação irreversível na qual o grupo prostético é liberado e um fóton é emitido (Allen e Blinks, 1978; Tisi *et al.*, 2002).

Sendo assim, as cepas mutantes *uga2Δ*, *fur4Δ*, *est1Δ*, *hek2Δ*, *stt4Δ*, *pso2Δ* foram utilizadas para transformação com o plasmídeo pVTU-AEQ. Após crescimento em meio SD-URA contendo glicose 2% (Figura 23), as colônias de cada uma das placas foram utilizadas para realização do teste de cálcio citosólico livre.

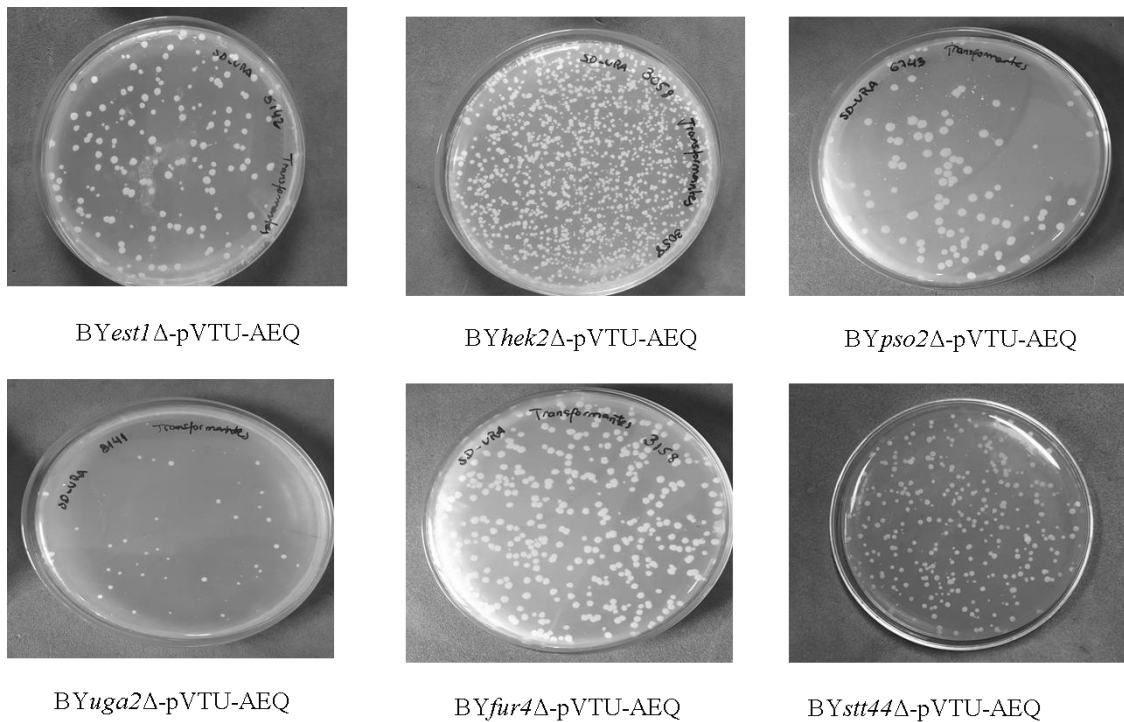


Figura 23: Transformantes de células BY4741 com os plasmídeos pVTU-AEQ. As células foram transformadas com os plasmídeos pVTU-AEQ e crescidas em placas SD-URA com glicose 2% p/v, durante 3 dias.

Uma vez que as deleções *uga2Δ*, *fur4Δ*, *est1Δ*, *hek2Δ*, *stt4Δ* e *pso2Δ* do *background* BY4741 mostraram uma maior atividade da Pma1p realizou-se o teste de sinalização de cálcio para avaliar o efeito das deleções gênicas quanto à ativação da Pma1p na presença de cálcio citosólico livre.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 24 é possível observar que a ausência de qualquer um dos genes que codificam para as proteínas Pso2p e Hek2p não comprometeram a elevação dos níveis de cálcio citosólico livre após a adição de glicose 100 mM (concentração final) demonstrando que a deleção destes genes não prejudicou o sinal de cálcio intracelular.

Por outro lado, os resultados mostram que nas linhagens mutantes *uga2Δ*, *est1Δ* e *fur4Δ*, após o estímulo (glicose 100 mM na concentração final), o sinal intracelular de cálcio nestas cepas foi prejudicado em comparação ao sinal de cálcio gerado pela cepa selvagem correspondente. Com luminescências geradas decrescentes após o estímulo, demonstrando que estas cepas não responderam ao estímulo, o que afetou a intensidade da sinalização intracelular de cálcio, mostrando assim envolvimento desses genes no sinal de cálcio uma vez que ao deletá-los o sinal é prejudicado. Por sua vez, a cepa *stt4Δ* não apresentou um sinal típico induzido por glicose, em vez disso, mostra níveis de cálcio

basal altos e quase constantes, sugerindo que, de uma forma particular, estaria envolvido na via de transdução de sinal que controla a atividade de H⁺-ATPase da membrana plasmática.

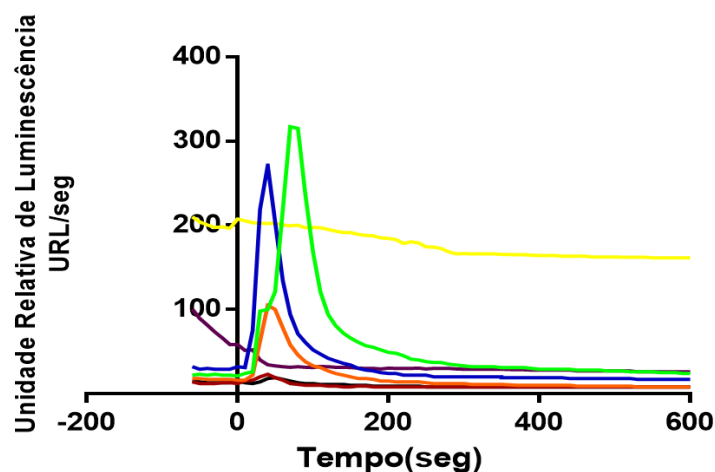


Figura 24: Efeitos de diferentes deleções na sinalização de cálcio intracelular em células do background BY4741. A medida de cálcio citosólico livre foi realizada através do método da aequorina-coelenterazina em células previamente incubadas com 50 μ M de coelenterazina, após a adição de glicose 100 mM (concentração final). Cepas selvagem BY4741 (linha verde), BY *uga2* Δ (linha preta), BY *fur4* Δ (linha roxa), BY *est1* Δ (linha vermelha), BY *hek2* Δ (linha laranja), BY *stt4* Δ (linha amarela), BY *pso2* Δ (linha azul). Os mutantes *uga2* Δ , *est1* Δ e *fur4* Δ , após o estímulo (glicose 100 mM na concentração final), apresentaram sinal intracelular de cálcio prejudicado em comparação ao sinal de cálcio gerado pela cepa selvagem correspondente. A cepa *stt4* Δ não apresentou um típico sinal induzido por glicose, mas mostra níveis de cálcio basal elevado.

Esses testes permitiram selecionar os genes *UGA2*, *FUR4*, *EST1* e *STT4* visto que a deleção desses genes interferiu na acidificação extracelular e no sinal de cálcio intracelular demonstrando uma relação com a via de ativação da Pma1p bem como na via de sinalização de cálcio intracelular.

A proteína Uga2p consiste em uma succinato semialdeído desidrogenase; o gene *EST1* codifica para uma proteína relacionada a via de manutenção de telômeros; e Fur4p é uma uracil permease. Até o presente momento, não há evidências na literatura que apontem a relação dessas proteínas com a ativação da Pma1p. Entretanto, levando em consideração os resultados aqui apresentados que envolvem análises de sequenciamento de *pools* de segregantes, identificação de alelos, priorização gênica e confirmação do envolvimento desses genes com o fenótipo de interesse por validação experimental, este trabalho aponta quatro novos genes potencialmente envolvidos na ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática induzida por glicose.

O modelo de sinalização relacionado à homeostase de cálcio apresenta semelhanças com os mecanismos que regula a atividade da H⁺-ATPase, sabe-se que a elevação transitória de cálcio citosólico também é ativado pela presença de glicose. Foi

verificado que para que haja geração de sinal de cálcio é necessário o transporte do açúcar seguido da sua fosforilação bem como a atuação de Gpr1p (receptor de glicose associado à Gpa2p) e fosfolipase C. (Ansari *et al.*, 1999a; Lemaire *et al.*, 1999; Tisi *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2008).

A fosfolipase C hidrolisaria fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) gerando diacilglicerol (DAG) e IP₃. Trabalhos evidenciaram pela primeira vez em leveduras, a participação IP₃ como um mensageiro secundário, responsável pela geração do sinal de cálcio induzido por glicose (Tisi *et al.*, 2004; Bouillet *et al.*, 2012b)

Em condições fisiológicas, o IP₃ é rapidamente fosforilado a IP₄ e IP₅ por uma quinase (Arg82p). Trabalhos mostram que a deleção do gene *ARG82* foi capaz de gerar uma elevação dos níveis de IP₃ e, ainda, um aumento significativo do sinal intracelular de cálcio. Diante disso a hipótese de uma conexão entre a sinalização do fosfatidilinositol, liberação de cálcio intracelular e a via de ativação da H⁺ATPase foi reforçada (Tisi *et al.*, 2004; Tropa *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008).

Trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório demonstraram que na ausência de Plc1p uma redução significativa da ativação da H⁺-ATPase pode ser observada, ao passo que na ausência da quinase Arg82p esta ativação é fortemente intensificada (Tropa *et al.*, 2006)

A Plc1p controla, via DAG, a proteína quinase C de leveduras. No entanto, a relação do IP₃ no controle dos níveis de cálcio ainda não está bem estabelecida visto não ter sido encontrado um receptor homólogo aos receptores para IP₃ já descritos para outros organismos. Trabalhos mostraram a geração e manutenção de um gradiente de cálcio intracelular através do seqüestro de íon de vesículas vacuolares pela ligação de IP₃ em um provável receptor na membrana. Entretanto, em leveduras esses mecanismos não foram elucidados (Belde *et al.*, 1993; Silverman-Gavrila e Lew, 2001; Wera *et al.*, 2001).

O fosfatidilinositol, seus metabólitos e enzimas responsáveis por sua síntese possuem uma participação direta em vias de transdução celular. O fosfatidilinositol (PI/PtdIns) é um fosfolípido encontrado na membrana de células eucarióticas. Alterações na concentração de PI ou de qualquer um dos seus metabólitos pode gerar profundos impactos em processos celulares importantes (Hokin e Hokin, 1955; Gardocki *et al.*, 2005).

A participação de uma via do tipo fosfatidilinositol no processo de ativação, induzida por glicose, da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, já foi demonstrada em vários estudos, revelando que a hidrólise do fosfatidilinositol mediada pela fosfolipase C

gera duas importantes moléculas: o diacilglicerol e o inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) (Brandão *et al.*, 1994; Noh *et al.*, 1995; Coccetti *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2001).

Desde a década de 90 no século passado, procura-se entender como a adição de glicose desencadeia a ativação da H⁺-ATPase da membrana plasmática em células de levedura. Múltiplas evidências sugeriram que este processo é dependente do metabolismo do cálcio por meio de um mecanismo fortemente dependente de uma via de sinalização do tipo fosfatidilinositol. Apesar do grande número de dados acumulados para comprovar essa conexão, muitos detalhes dessa via de transdução de sinal ainda não estão claros. Por exemplo, o mecanismo que controla a atividade da fosfolipase C é desconhecido.

Em células de levedura, a produção de PIP₂ é realizada a partir de fosfatidilinositol (PI) que pode ser obtido endogenamente a partir do metabolismo da glicose 6-P ou de fontes nutricionais, a partir da captação de inositol realizada pelos transportadores Itr1 p / Itrr2 p. O PI também pode ser produzido por meio de metabólitos de fosfatidilinositol, como o trifosfato de inositol (IP₃), que pode ser desfosforilado pela ação de fosfatases (Saul *et al.*, 2004).

Como abordado no item 1.2 a respeito do metabolismo do fosfatidilinositol o PtdIns(4,5)P₂ pode ser gerado através de dois ramos de ativação. De um lado a fosforilação de PtdIns-4-P na posição 5 por PIP5Ks e do outro lado através da fosforilação PtdIns-5-P na posição 4 por PIP4Ks (Fig. 24). Sabe-se também que de forma concomitante o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato através da enzima fosfatidilinositol - 3,4,5-trifosfato 3-fosfatase também origina PtdIns(4,5)P₂ (Fruman *et al.*, 1998; Vanhaesebroeck *et al.*, 2001).

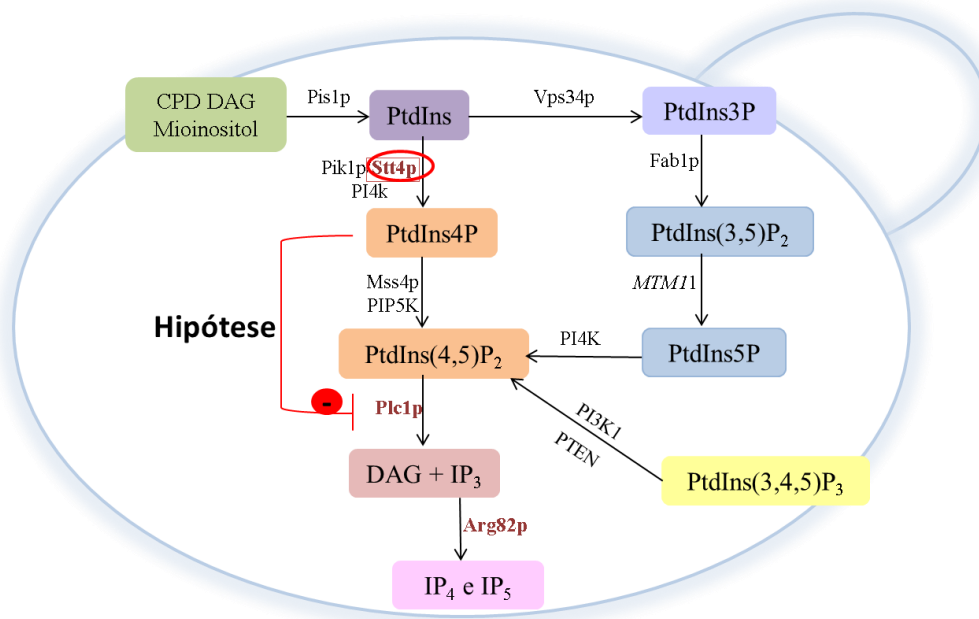


Figura 25: Síntese de PtdIns(4,5)P₂ e hipótese relacionado a H⁺-ATPase: PtdIns é fosforilado por Stt4p gerando PtdIns4P. PtdIns4P em cepas do *background* BY atua como regulador negativo da Fosfolipase C com consequente diminuição de IP₃ e subsequente diminuição da ativação da H⁺-ATPase.

Como demonstrado na Figura 25 qualquer que seja a fonte, o PI é fosforilado por fosfatidilinositol 4-quinases (Stt4p e Pik1p) produzindo fosfatidilinositol 4-fosfato PI(4)P. Já o PI(4)P é fosforilado pela fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase (Mss4p), gerando finalmente PIP₂. No entanto, PIP₂ também pode ser produzido a partir de fosfatidilinositol 3-fosfato PI(3)P. Este metabólito é produzido por fosforilação de PI mediada pela enzima fosfatidilinositol 3-quinase (Vps34p) (Whitman et al., 1988; Vanhaesebroeck et al., 2001). Subsequentemente, PI (3) P é fosforilado por fosfatidilinositol (3) P 5-quinase (Fab1 p) produzindo fosfatidilinositol (3,5) bifosfato PI (3,5) P₂ (Cooke et al., 1998) que é desfosforilado pela enzima fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato 3-fosfatase gerando fosfatidilinositol 5-fosfato (Walker et al., 2001). Finalmente, por ação da fosfatidilinositol 5-fosfato 4-quinase ocorre a produção de PIP₂ (Boronenkov e Anderson, 1995; Rameh et al., 1997). Em células de mamíferos, o PIP₂ também pode ser produzido a partir de outro metabólito de PI produzido a partir de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato pela enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatase (Vanhaesebroeck et al., 2001).

Qualquer que seja a forma pela qual o PIP₂ é hidrolisado pela fosfolipase C produzindo diacilglicerol (DAG) e inositol 3,4,5-trifosfato (IP₃), ambos funcionam como segundo mensageiros onde o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) e o IP₃ desencadeia a liberação de Ca²⁺ dos compartimentos intracelulares, regulando assim uma ampla

variedade de processos celulares, incluindo sobrevivência celular, proliferação, rearranjo do citoesqueleto, tráfego de membrana, migração celular, quimiotaxia, sinalização de cálcio, transporte de glicose, entre outros (Cocco et al., 1998; Maraldi et al., 1999; Fruman et al., 1998; Zhang e Majerus, 1998).

Em células de levedura, o IP₃ é ainda fosforilado por uma inositol quinase (Arg82p) que gera dois tipos de polifosfato inositóis solúveis em água: inositol-tetrafosfato - I(1,3,4,5)P₄ e I(1,4,5,6)P₄ e inositol-pentafosfato I(1,3,4,5,6)P₅ (respectivamente IP₄ e IP₅) também envolvidos nas respostas celulares ao ambiente externo (Saiardi et al., 1999; Odom et al., 2000)

Conforme demonstrado aqui e em outros trabalhos, a deleção do *ARG82* gera um aumento nos níveis de IP₃ e um aumento significativo na sinalização intracelular de cálcio, mediado por Plc1p também resultando em uma ativação mais forte induzida por glicose da membrana plasmática H⁺-ATPase (Wera et al., 2001; Tisi et al., 2004; Tropaia et al., 2006; Pereira et al., 2008; Bouillet et al., 2012). No entanto, o efeito desta deleção parece ser fortemente dependente do *background* genético.

Curiosamente, e usando ferramentas genômicas e de bioinformática, foi demonstrado que a deleção do gene *STT4* no *background* BY4741 levou a uma ativação mais intensa de Pma1p (comparável à observada na cepa parental superior PJ69 *arg82Δ*) e níveis basais mais elevados de cálcio intracelular, mas sem um sinal típico induzido por glicose. Esses resultados nos leva a sugerir que muito provavelmente na cepa parental superior (mutante PJ69*arg82Δ*) há um alelo do gene *STT4* que codifica para uma fosfatidilinositol 4-quinase menos ativa, gerando níveis mais baixos de PI(4)P que controlaria a ação e, ou, a localização da fosfolipase C. Para fortalecer esta hipótese, a deleção do gene *STT4* no fundo BY4741 - cepa de tipo selvagem, mas ainda com Arg82p funcional - levaria a uma ativação da H⁺-ATPase induzida por glicose comparável aoparental superior PJ69 *arg82Δ*.

Uma vez que o gene *STT4* está relacionado a via de fosfatidilinositol, e que sua deleção no *background* BY 4741 levou a uma mais intensa ativação da Pma1p e níveis basais elevados de cálcio intracelular, ambos os efeitos comparáveis ao observado na cepa parental superior PJ69 *arg82Δ*, poder-se-ia hipotetizar que no *background* BY4741 na presença da Stt4p e mesmo com ausência da proteína Arg82p o inositol 4-fosfato atuaria como um inibidor negativo da fosfolipase C com conseqüente diminuição dos níveis de IP₃ (Figura 25). Isso justificaria o fenótipo encontrado na cepa BY*arg82Δ* de menor acidificação extracelular e menor pico de luminescência visto que a deleção no gene

ARG82 não é favorecida devido a formação do IP_3 ser diminuída nesse *background* supostamente devido a inibição da fosfolipase C.

Por outro lado, na cepa PJ69 *arg82Δ* o aumento da acidificação extracelular e do sinal de cálcio seria justificado pela presença de um alelo do gene *STT4* codificando para uma enzima menos ativa, e assim com baixos níveis de Inositol 4-fosfato, portanto com menor inibição de Plc1p. Como consequência de níveis mais elevados de síntese de IP_3 e a sua não fosforilação (ausência de Arg82p), maior seria o sinal de cálcio e, conseqüentemente, maior ativação da Pma1p. Ou seja, no *background* PJ69 haveria duas forças atuando, sendo uma com concentrações de inositol4 fosfato diminuída (regulador negativo) e do outro lado altas concentrações IP_3 (regulador positivo).

Diante disso, buscamos identificar esses alelos no gene *STT4*. Ao analisar os SNPs, identificados nesse gene na cepa PJ*arg82Δ*, a partir do mapeamento de QTLs, identificamos 29 SNPs, sendo 23 sinônimos e 6 missenses, mutações que alteram os resíduos de aminoácidos da proteína podendo, assim, alterar a função da proteína em menor ou maior grau.

De acordo com a literatura o gene *STT4* codifica para uma proteína (Stt4p) presente na via do fosfatidilinositol, logo esse gene foi analisado com intuito de observar se os alelos desse gene poderiam ser responsáveis diretos na alteração do fenótipo. Para isso foi realizado a análise de conservação das variantes através de alinhamento múltiplo utilizando o algoritmo MUSCLE implementado no Programa MEGA versão 10.2.6. Foram baixadas 35 sequências do gene *STT4* em *S. cerevisiae*, depositadas no SGD. Na figura 26 é possível observar os alelos da cepa PJ*arg82Δ* comparado com as demais cepas.

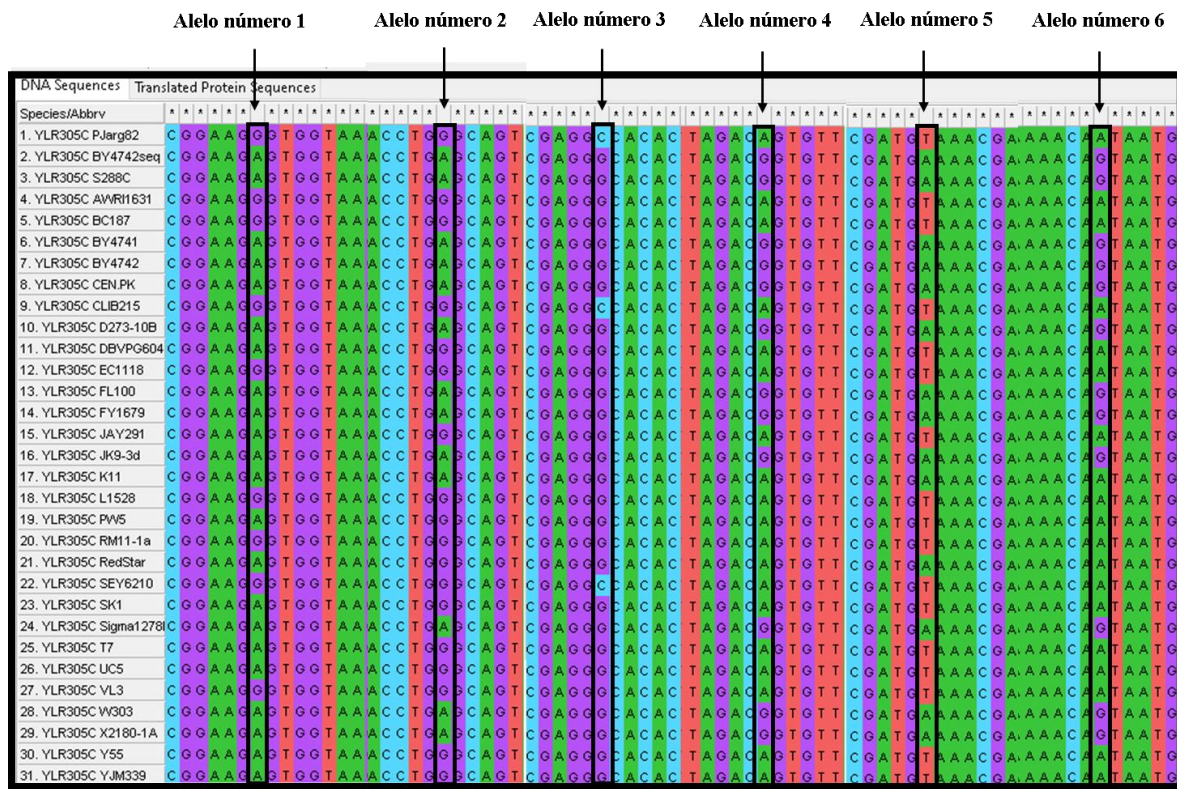


Figura 26: Alinhamento múltiplo das seqüências do gene *STT4* na cepa *PJarg82Δ*, *BY4742* e cepas *S. cerevisiae* encontradas no banco de dados (SGD). Representação do alinhamento múltiplo, realizado utilizando o MEGA version X, demonstra 6 mutações do tipo missenses (apontadas pela seta e retângulos pretos).

Verificou-se que em nenhuma das 6 posições o alelo apresentado pela cepa *PJarg82Δ* é único dessa cepa, entretanto alguns desses alelos apresentam baixa ocorrência quando analisado nas 36 cepas. Um exemplo disso é o alelo 1 e o alelo 3, onde apenas 27,7% e 8,3% das cepas apresentam o mesmo alelo da cepa *PJ arg82Δ* como demonstrado na tabela 6, respectivamente.

Tabela 5: Porcentagem de ocorrência do alelo da cepa *PJarg82Δ* em cepas *S. cerevisiae*

Alelo da cepa <i>PJarg82Δ</i>	% de ocorrência do alelo da cepa <i>PJarg82Δ</i> em cepas <i>S. cerevisiae</i>
SNP 1) G	27,7%
SNP 2) G	66,6%
SNP 3) C	8,3%
SNP 4) A	66,6%
SNP 5) T	58,3%
SNP 6) A	66,6%

Os alelos apresentados não são raros, outras cepas também apresentam o mesmo alelo. O alelo 3 em que a cepa *PJarg82Δ* apresenta C(citosina), só é visualizado em 3 cepas (figura 26) entretanto não há dados fenotípicos dessas três cepas mostrando fenótipo semelhante ao da cepa *PJarg82Δ*.

. Posteriormente foi verificado se algum dos alelos desse gene poderiam alterar um dos domínios funcionais descritos para a proteína codificada pelo gene *STT4* através do banco de dados The protein families database (Pfam), 2021. Segundo o *The protein families database* (Pfam), 2021 o gene *STT4* apresenta dois domínios conservados. O primeiro domínio consiste em uma fosfoinosite – 3 quinase (PI3Ka) que está relacionado a funções de regulação do ciclo celular, controle da transcrição, transporte de proteínas mitocondriais e peroxissomais, neurogênese e dobramento de proteínas. Estando esse domínio localizado na coordenada 1348 a 1543 do alinhamento. Já o segundo domínio conservado é uma fosfatidilinositol- 3, 4 quinase inclui as proteínas quinases Serina / Treonina e Tirosina, bem como quinases relacionadas que atuam em substratos não proteicos, o mesmo está localizado na coordenada 1642 a 1847 (Mistry et al., 2021)

A variante missense de coordenada 739624 e uma variante sinônima de coordenada 739411 estão localizadas no domínio PI3Ka. Já a variante sinônima de coordenada 738353 está localizada no domínio PI3PI4Ka. Ao fazer uma busca pelos domínios conservados no banco de dados Pfam e mesmo alterando o alelo, conseqüentemente alterando o resíduo de aminoácido o domínio PI3Ka ainda é identificado. Portanto, como pode ser visto na Figura 27 embora as variações estejam dentro de um domínio conservado ela não é capaz de alterar o domínio, entretanto outras análises precisam ser feitas para confirmar se a variante missense (coordenada 739624) pode alterar a estrutura da proteína.

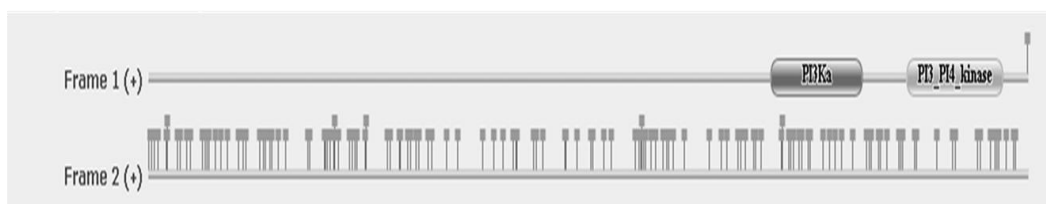
A**B**

Figura 27: Domínios conservados identificados. A – Domínios identificados com os alelos do parental inferior. B - Domínios identificados com os alelos alternativos do parental superior PJ *arg82A*. (Pfam, 2021).

Em princípio, para aceitar essa hipótese, PI(4)P pode ser capaz de se ligar a Plc1p. Na verdade, foi demonstrado que todos os membros da família da fosfolipase C possuem os chamados domínios de homologia de plecstrina (PH) que são encontrados em uma ampla gama de transdução de sinal e proteínas do citoesqueleto sendo capazes de se ligar a fosfoinosítídeos com uma gama de afinidades de ligação e especificidades (Rhee, 2001; Levine e Munro, 2002; Hammond e Balla, 2015). Primeiramente, este tipo de interação revelou o primeiro e canônico princípio das interações fosfatidilinositol-proteína, ou seja, a ligação de fosfatidilinositol de alta afinidade por famílias conservadas de domínios de ligação de lipídeos impulsiona o recrutamento de proteínas por membrana, regulando assim a atividade da proteína no tempo e no espaço (Lemmon, 2003). Assim, uma maior produção de PI(4)P poderia competir com PIP₂ afetando uma ligação apropriada e/ou atividade da fosfolipase C na membrana plasmática, levando a uma diminuição da hidrólise de produção de PIP₂.

Quanto aos genes *HEK2* e *PSO2*, embora não estejam relacionados a via de sinal de cálcio ficou evidente pelo teste de acidificação extracelular que os mesmos podem estar relacionados com a via de ativação da H⁺-ATPase. Uma vez que pelo modelo proposto (Campetelli *et al.*, 2005; Campetelli *et al.*, 2013; Castanheira *et al.*, 2018), a forma não ativada da H⁺-ATPase estaria associada a tubulinas que seriam hidrolisadas após a adição de glicose, liberando assim o domínio C-terminal da H⁺-ATPase, tornando-o suscetível à fosforilação e consequente ativação, sugerindo assim, a ação dos genes

HEK2, *PSO2* como reguladores negativos da tubulina, tendo em vista ainda presença de sinalização de cálcio induzida por cálcio nesses mutantes.

Nos últimos anos, vários trabalhos foram realizados em nosso laboratório com o objetivo de elucidar a via de sinalização responsável pela regulação pós-transducional da H⁺-ATPase de levedura, sendo possível verificar que a ativação da Pma1p envolve processos de sinalização celular complexos com participação de diferentes proteínas. A identificação dos genes *UGA2*, *FUR4*, *EST1* e *STT4* demonstram envolvimento com aumento dos níveis de cálcio e maior acidificação extracelular, condições importantes que evidenciam a maior ativação da H⁺-ATPase, logo, os resultados desse trabalho contribuem no esclarecimento dos componentes envolvidos nessa via de sinalização.

Estudos realizados envolvendo fermentação de vinho mostraram que cepas de leveduras contendo superexpressão do alelo *PMA1* apresentaram uma cinética de fermentação mais rápida e a mesma aconteceu em condições de baixo pH, característica particular dos vinhos espumantes. A importância da homeostase iônica e manutenção do pH intracelular usando um ambiente com baixo pH e pressão seletiva podem possibilitar a construção de novas cepas de leveduras industriais mais adequadas (Walker *et al.*, 2014; Martí-Raga *et al.*, 2017).

A regulação de prótons (H⁺) pode ser um mecanismo primário de mediação do fenótipo de tolerância a álcool. Gradientes opostos de íons K⁺ e H⁺ são gerados através da membrana plasmática de leveduras pelo importador K⁺ *TRK1* e exportador H⁺ *PMA1*, sugerindo que modificações genéticas dessas bombas dependentes de ATP, projetadas para perturbar ou fortalecer esses gradientes, produziriam efeitos correspondentes ao desempenho fermentativo. Quando realizado deleções para debilitar a importação de K⁺ ou a exportação de H⁺ houve diminuição na produção de etanol, já as cepas com superexpressão de *PMA1* e *TRK1* aumentaram a produção de etanol a níveis que excederam as cepas industriais (Lam *et al.*, 2014).

Avanços tecnológicos nos permitem introduzir alelos responsáveis por características biotecnológicas de interesse em cepas industriais visando a construção de cepas mais robustas (Hubmann *et al.*, 2013; Pais *et al.*, 2013; De Carvalho *et al.*, 2017). Diante disso, uma vez que a atividade da H⁺-ATPase pode estar relacionada a melhor capacidade de fermentação de leveduras os possíveis alelos apresentados nesse trabalho podem ser utilizados para melhoramento de cepas de leveduras de interesse biotecnológico.

6.0 CONCLUSÕES

Desde a década de 70, muitos esforços têm sido feitos para identificar o mecanismo pelo qual a adição de glicose desencadeia a ativação pós-transcricional da membrana plasmática H⁺-ATPase em células de levedura. Muitas evidências sugerem que a sinalização de cálcio está envolvida nesta via regulatória, principalmente aquelas provenientes da utilização de mutantes sem o gene ativo *ARG82* que codifica para uma inositol quinase responsável pela fosforilação IP₃ em IP₄ e IP₅. No entanto, uma sinalização de cálcio induzida por glicose mais forte e, conseqüentemente, uma ativação mais elevada de H⁺-ATPase da membrana plasmática induzida por glicose é mais claramente observada em uma cepa em um *background* PJ69.

Nesse trabalho, indentificamos 33 possíveis genes relacionados ao fenótipo de interesse e após análise de enriquecimento, interatoma e testes de fenótipos, 4 genes foram selecionados como potenciais genes relacionados ao fenótipo de maior ativação da H⁺-ATPase, sendo eles *UGA2*, *FUR4*, *EST1* e *STT4*. O gene *STT4* é o mais promissor, os resultados mostraram que muito provavelmente o fosfatidilinositol-4-fosfato poderia desempenhar um papel na regulação da via de ativação da H⁺-ATPase, controlando a atividade da fosfolipase C.

Com o uso de todas as abordagens citadas anteriormente relacionadas a identificação de genes/alelos relacionados a maior ativação da H⁺-ATPase, foi possível não apenas saber o possível motivo da diferença observada entre as duas cepas (PJ69 e BY) quanto aos efeitos da deleção do gene *ARG82*, como também sugerir um novo tipo de controle regulatório na sinalização de cálcio induzida por glicose e ativação da H⁺-ATPase da membrana plasmática envolvendo fosfatidilinositol-4-fosfato e ativação da fosfolipase C. Além disso, esse trabalho descreve pela primeira vez uma estratégia de análises de Bioinformática para identificar genes envolvidos com o fenótipo de interesse quando a análise de mapeamento de QTL não identificar SNPs significativamente associados.

7.0 PERSPECTIVAS

- Confirmar os possíveis genes relacionados a maior atividade da H⁺-ATPase através de reciprocidade hemizigótica.
- Introduzir os genes/alelos identificados em cepas industriais visando melhorar a eficiência dos processos fermentativos.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, D. G.; BLINKS, J. R. Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. **Nature**, v. 273, n. 5663, p. 509-513, 1978. ISSN 1476-4687.

AMBESI, A. et al. Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H (+)-ATPase. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 1, p. 155-160, 2000. ISSN 0022-0949.

ANSARI, K. et al. Phospholipase C binds to the receptor-like GPR1 protein and controls pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 42, p. 30052-30058, 1999a. ISSN 0021-9258.

Phospholipase C Binds to the Receptor-like GPR1 Protein and Controls Pseudohyphal Differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 42, p. 30052-30058, 1999b. ISSN 0021-9258.

ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 24, p. 7611-7616, 1997. ISSN 0021-9193.

ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. 1-Acyldihydroxyacetone-phosphate Reductase (Ayr1p) of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Encoded by the Open Reading Frame YIL124w Is a Major Component of Lipid Particles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 235-240, 2000. ISSN 0021-9258.

ATHENSTAEDT, K. et al. Redundant systems of phosphatidic acid biosynthesis via acylation of glycerol-3-phosphate or dihydroxyacetone phosphate in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 5, p. 1458-1463, 1999. ISSN 0021-9193.

AUDHYA, A.; EMR, S. D. Regulation of PI4, 5P2 synthesis by nuclear–cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. **The EMBO journal**, v. 22, n. 16, p. 4223-4236, 2003. ISSN 1460-2075.

AUDHYA, A.; FOTI, M.; EMR, S. D. Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. **Molecular biology of the cell**, v. 11, n. 8, p. 2673-2689, 2000. ISSN 1059-1524.

AXELSEN, K. B.; PALMGREN, M. G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. **Journal of molecular evolution**, v. 46, n. 1, p. 84-101, 1998. ISSN 0022-2844.

BARNETT, J. A. Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. **Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 557-567, 2003. ISSN 1465-2080.

BARRETO, L. et al. A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1241-1250, 2011. ISSN 1535-9778.

BEATO, F. B. et al. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Brazilian biomes: new insights into biodiversity and industrial applications. **FEMS yeast research**, v. 16, n. 7, 2016. ISSN 1567-1356.

BELDE, P. et al. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate releases Ca^{2+} from vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 323, n. 1-2, p. 113-118, 1993. ISSN 0014-5793.

BHATIA, A. et al. Yeast growth plasticity is regulated by environment-specific multi-QTL interactions. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 4, n. 5, p. 769-777, 2014. ISSN 2160-1836.

BORONENKOV, I. V.; ANDERSON, R. A. The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 7, p. 2881-2884, 1995. ISSN 0021-9258.

BOUILLET, L. et al. The involvement of calcium carriers and of the vacuole in the glucose-induced calcium signaling and activation of the plasma membrane H^{+} -ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Cell calcium**, v. 51, n. 1, p. 72-81, 2012a. ISSN 0143-4160.

BOUILLET, L. et al. The involvement of calcium carriers and of the vacuole in the glucose-induced calcium signaling and activation of the plasma membrane H^{+} -ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Cell calcium**, v. 51, n. 1, p. 72-81, 2012b. ISSN 0143-4160.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. John Wiley & Sons, 2008. ISBN 0470999403.

BRANDAO, R. L. The Relationship between Glucose-Induced Calcium Signaling and Activation of the Plasma Membrane H^{+} -ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* Cells. **Handbook of H^{+} -ATPases**, p. 431, 2014. ISSN 9814411914.

BRANDÃO, R. L. et al. Possible involvement of a phosphatidylinositol-type signaling pathway in glucose-induced activation of plasma membrane H^{+} -ATPase and cellular

proton extrusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1223, n. 1, p. 117-124, 1994. ISSN 0167-4889.

CAMPETELLI, A. N. et al. Activation of H⁺-ATPase by glucose in *Saccharomyces cerevisiae* involves a membrane serine protease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3593-3603, 2013. ISSN 0304-4165.

CAMPETELLI, A. N. et al. Activation of the plasma membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose is mediated by dissociation of the H⁺-ATPase-acetylated tubulin complex. **The FEBS journal**, v. 272, n. 22, p. 5742-5752, 2005. ISSN 1742-464X.

CARVALHO, F. M. D. Participação de componentes do metabolismo do fosfatidilinositol no controle de vias de sinalização induzidas por glicose em *Saccharomyces cerevisiae*. 2007.

CASTANHEIRA, D. D. **A proteína Lpx1 como elo entre a sinalização de cálcio intracelular e a ativação de H⁺-ATPase de membrana citoplasmática, induzidas por glicose, em células de *Saccharomyces cerevisiae***. 2018. 105 Universidade Federal de Ouro Preto

CASTANHEIRA, D. D. et al. Lpx1p links glucose-induced calcium signaling and plasma membrane H⁺-ATPase activation in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **FEMS yeast research**, v. 18, n. 1, p. fox088, 2017. ISSN 1567-1364.

_____. Lpx1p links glucose-induced calcium signaling and plasma membrane H⁺-ATPase activation in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **FEMS yeast research**, v. 18, n. 1, p. fox088, 2018. ISSN 1567-1364.

CHANG, A.; SLAYMAN, C. W. Maturation of the yeast plasma membrane [H⁺] ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. **The Journal of Cell Biology**, v. 115, n. 2, p. 289-295, 1991. ISSN 0021-9525.

CLAESEN, J. et al. Simultaneous mapping of multiple gene loci with pooled segregants. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55133, 2013. ISSN 1932-6203.

CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1047-58, Dec 14 2007. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674.

COCCETTI, P. et al. The PLC1 encoded phospholipase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is essential for glucose-induced phosphatidylinositol turnover and activation

of plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1405, n. 1-3, p. 147-154, 1998. ISSN 0167-4889.

COCCO, L. et al. Inositides in the nucleus: taking stock of PLC beta 1. **Advances in enzyme regulation**, v. 38, p. 351-363, 1998. ISSN 0065-2571.

CONSORTIUM, C. T. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 11, p. 911, 2003a. ISSN 1471-0064.

_____. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 11, p. 911, 2003b.

COOKE, F. T. et al. The stress-activated phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuole function in *S. cerevisiae*. **Current biology**, v. 8, n. 22, p. 1219-S2, 1998. ISSN 0960-9822.

DE CARVALHO, B. T. et al. Identification of novel alleles conferring superior production of rose flavor phenylethyl acetate using polygenic analysis in yeast. **MBio**, v. 8, n. 6, p. e01173-17, 2017. ISSN 2150-7511.

DELAGE, E. et al. Signal transduction pathways involving phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate: convergences and divergences among eukaryotic kingdoms. **Progress in lipid research**, v. 52, n. 1, p. 1-14, 2013. ISSN 0163-7827.

DEN ABT, T. et al. Genomic saturation mutagenesis and polygenic analysis identify novel yeast genes affecting ethyl acetate production, a non-selectable polygenic trait. **Microbial Cell**, v. 3, n. 4, p. 159, 2016.

DOMINGUES, L. et al. Applications of yeast flocculation in biotechnological processes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, n. 4, p. 288-305, 2000. ISSN 1226-8372.

DUBOIS, E.; MESSENGUY, F. Pleiotropic function of ArgRII_p (Arg82_p), one of the regulators of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Role in expression of cell-type-specific genes. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 243, n. 3, p. 315-324, 1994. ISSN 0026-8925.

DUITAMA, J. et al. Improved linkage analysis of Quantitative Trait Loci using bulk segregants unveils a novel determinant of high ethanol tolerance in yeast. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 207, 2014. ISSN 1471-2164.

DUTILH, B. E. et al. Assessment of phylogenomic and orthology approaches for phylogenetic inference. **Bioinformatics**, v. 23, n. 7, p. 815-824, 2007. ISSN 1460-2059.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004. ISSN 1362-4962.

EHRENREICH, I. M. et al. Dissection of genetically complex traits with extremely large pools of yeast segregants. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1039-1042, 2010. ISSN 0028-0836.

EL ALAMI, M. et al. Arg82p is a bifunctional protein whose inositol polyphosphate kinase activity is essential for nitrogen and PHO gene expression but not for Mcm1p chaperoning in yeast. **Molecular microbiology**, v. 49, n. 2, p. 457-468, 2003. ISSN 1365-2958.

ENGELBERG, D.; PERLMAN, R.; LEVITZKI, A. Transmembrane signaling in *Saccharomyces cerevisiae* as a model for signaling in metazoans: state of the art after 25 years. **Cellular signalling**, v. 26, n. 12, p. 2865-2878, 2014. ISSN 0898-6568.

ERASO, P.; MAZÓN, M. J.; PORTILLO, F. Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates in vitro the C-terminal peptide of the H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 2, p. 164-170, 2006. ISSN 0005-2736.

ERASO, P.; PORTILLO, F. Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 14, p. 10393-10399, 1994. ISSN 0021-9258.

FEYDER, S. et al. Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 1509-1525, 2015.

FIGUEIREDO, B. I. C. et al. New lager brewery strains obtained by crossing techniques using cachaça (Brazilian spirit) yeasts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 83, n. 20, p. e01582-17, 2017. ISSN 0099-2240.

FLICK, J. S.; THORNER, J. Genetic and biochemical characterization of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 9, p. 5861-5876, 1993. ISSN 0270-7306.

FRUMAN, D. A.; MEYERS, R. E.; CANTLEY, L. C. Phosphoinositide kinases. **Annual review of biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 481-507, 1998. ISSN 0066-4154.

GARDOCKI, M. E.; JANI, N.; LOPES, J. M. Phosphatidylinositol biosynthesis: biochemistry and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1735, n. 2, p. 89-100, 2005. ISSN 1388-1981.

GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. **Methods in enzymology**, v. 350, p. 87-96, 2002. ISSN 0076-6879.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996. ISSN 0036-8075.

GOOSSENS, A. et al. Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 20, p. 7654-7661, 2000. ISSN 0270-7306.

GREENBERG, M. L.; LOPES, J. M. Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 1, p. 1, 1996.

HABER, J. E. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 191, n. 1, p. 33-64, 2012. ISSN 0016-6731.

HALDERMANS, P. et al. Using linear mixed models for normalization of cDNA microarrays. **Statistical applications in genetics and molecular biology**, v. 6, n. 1, 2007. ISSN 1544-6115.

HANCOCK, J. T. **Cell signalling**. Oxford University Press, 2017. ISBN 019965848X.

HATCH, A. J.; ODOM, A. R.; YORK, J. D. Inositol phosphate multikinase dependent transcriptional control. **Advances in biological regulation**, v. 64, p. 9-19, 2017. ISSN 2212-4926.

HENRY, S. A.; PATTON-VOGT, J. L. Genetic regulation of phospholipid metabolism: yeast as a model eukaryote. **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, v. 61, p. 133-179, 1998. ISSN 0079-6603.

HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Yeast stress responses**. Springer Science & Business Media, 2007. ISBN 3540456112.

HOHMANN, S. et al. Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of SUC2. **Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 703-714, 1999. ISSN 1350-0872.

HOKIN, L. E.; HOKIN, M. R. Effects of acetylcholine on phosphate turnover in phospholipides of brain cortex in vitro. **Biochimica et biophysica acta**, v. 16, p. 229-237, 1955. ISSN 0006-3002.

HOLSBEEKS, I. et al. The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. **Trends in biochemical sciences**, v. 29, n. 10, p. 556-564, 2004. ISSN 0968-0004.

HOLT, S. et al. Polygenic analysis in absence of major effector ATF1 unveils novel components in yeast flavor ester biosynthesis. **MBio**, v. 9, n. 4, 2018. ISSN 2150-7511.

HUBMANN, G. et al. Quantitative trait analysis of yeast biodiversity yields novel gene tools for metabolic engineering. **Metabolic engineering**, v. 17, p. 68-81, 2013. ISSN 1096-7176.

JANSEN, M. L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. **FEMS yeast research**, v. 17, n. 5, 2017. ISSN 1567-1356.

KADAMUR, G.; ROSS, E. M. Mammalian phospholipase C. **Annual review of physiology**, v. 75, p. 127-154, 2013. ISSN 0066-4278.

KAIBUCHI, K. et al. Possible involvement of RAS-encoded proteins in glucose-induced inositolphospholipid turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 21, p. 8172-8176, 1986. ISSN 0027-8424.

KARLIN, S.; CAMPBELL, A. M.; MRAZEK, J. Comparative DNA analysis across diverse genomes. **Annual review of genetics**, v. 32, n. 1, p. 185-225, 1998. ISSN 0066-4197.

KATAN, M.; COCKCROFT, S. Phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate: diverse functions at the plasma membrane. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 513-531, 2020. ISSN 0071-1365.

KATOU, T. et al. Brewing characteristics of haploid strains isolated from sake yeast Kyokai No. 7. **Yeast**, v. 25, n. 11, p. 799-807, 2008. ISSN 0749-503X.

KATOU, T. et al. QTL mapping of sake brewing characteristics of yeast. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 107, n. 4, p. 383-393, 2009. ISSN 1389-1723.

KATZ EZOV, T. et al. Heterothallism in *Saccharomyces cerevisiae* isolates from nature: effect of HO locus on the mode of reproduction. **Molecular ecology**, v. 19, n. 1, p. 121-131, 2010. ISSN 0962-1083.

KUHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 4, p. 282-95, Apr 2004. ISSN 1471-0072 (Print)

1471-0072.

KUMAR, S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.

LAM, F. H. et al. Engineering alcohol tolerance in yeast. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 71-75, 2014. ISSN 0036-8075.

LEE, J. Y. et al. Inositol polyphosphate multikinase signaling in the regulation of metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1271, n. 1, p. 68-74, 2012. ISSN 0077-8923.

LEMAIRE, K. et al. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1 is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. **Current Genetics**, 1999.

LITI, G. The Natural History of Model Organisms: The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. **Elife**, v. 4, p. e05835, 2015. ISSN 2050-084X.

MALPARTIDA, F.; SERRANO, R. Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent. **FEBS Lett**, v. 111, n. 1, p. 69-72, Feb 25 1980. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793.

MANCERA, E. et al. High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 479-485, 2008. ISSN 0028-0836.

MANS, R.; DARAN, J.-M. G.; PRONK, J. T. Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. **Current opinion in biotechnology**, v. 50, p. 47-56, 2018. ISSN 0958-1669.

MARALDI, N. M. et al. Topology of inositol lipid signal transduction in the nucleus. **Journal of cellular physiology**, v. 181, n. 2, p. 203-217, 1999. ISSN 0021-9541.

MAREŠOVÁ, L.; SYCHROVÁ, H. Applications of a microplate reader in yeast physiology research. **Biotechniques**, v. 43, p. 667-672, 2007.

MARTÍ-RAGA, M. et al. Genetic causes of phenotypic adaptation to the second fermentation of sparkling wines in *Saccharomyces cerevisiae*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, n. 2, p. 399-412, 2017. ISSN 2160-1836.

MARULLO, P. et al. Single QTL mapping and nucleotide-level resolution of a physiologic trait in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. **FEMS yeast research**, v. 7, n. 6, p. 941-952, 2007. ISSN 1567-1364.

MARULLO, P. et al. Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 8, p. 1148-1160, 2009. ISSN 1567-1364.

MCCUSKER, J.; PERLIN, D.; HABER, J. Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 11, p. 4082-4088, 1987. ISSN 0270-7306.

MCDONOUGH, J. P.; MAHLER, H. Covalent phosphorylation of the Mg²⁺-dependent ATPase of yeast plasma membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 24, p. 14579-14581, 1982. ISSN 0021-9258.

MEIJNEN, J.-P. et al. Polygenic analysis and targeted improvement of the complex trait of high acetic acid tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1, 2016. ISSN 1754-6834.

MILES, C.; WAYNE, M. Quantitative trait locus (QTL) analysis. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 208, 2008.

MORENO, E.; LAGUNAS, R. Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1063, n. 2, p. 265-268, 1991. ISSN 0005-2736.

NAIR, A. et al. Conceptual evolution of cell signaling. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3292, 2019.

NAKAJIMA-SHIMADA, J. et al. Ca²⁺ Signal is Generated Only Once in the Mating Pheromone Response Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell structure and function**, v. 25, n. 2, p. 125-131, 2000. ISSN 0386-7196.

NEWCOMB, L. L. et al. Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 1, p. 143-149, 2003. ISSN 1535-9778.

NOH, D.-Y.; SHIN, S. H.; RHEE, S. G. Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1242, n. 2, p. 99-113, 1995. ISSN 0304-419X.

ODORIZZI, G.; BABST, M.; EMR, S. D. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. **Trends in biochemical sciences**, v. 25, n. 5, p. 229-235, 2000. ISSN 0968-0004.

PAIS, T. M. et al. Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast. **PLoS Genet**, v. 9, n. 6, p. e1003548, 2013. ISSN 1553-7404.

PAIS, T. M.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. QTL mapping by pooled-segregant whole-genome sequencing in yeast. **Yeast Metabolic Engineering: Methods and Protocols**, p. 251-266, 2014a. ISSN 1493905627.

_____. QTL mapping by pooled-segregant whole-genome sequencing in yeast. In: (Ed.). **Yeast Metabolic Engineering**: Springer, 2014b. p.251-266.

PALMER, C. P. et al. A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 14, p. 7801-7805, 2001. ISSN 0027-8424.

PARTS, L. et al. Revealing the genetic structure of a trait by sequencing a population under selection. **Genome research**, v. 21, n. 7, p. 1131-1138, 2011. ISSN 1088-9051.

PEDERSEN, B. P. et al. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 1111-1114, 2007. ISSN 1476-4687.

PEETERS, K.; THEVELEIN, J. M. Glucose sensing and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. In: (Ed.). **Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism**: Springer, 2014. p.21-56.

PELTIER, E. et al. Quantitative trait nucleotides impacting the technological performances of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 683, 2019. ISSN 1664-8021.

PEREIRA, M. B. et al. Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone induced calcium signaling and activation of plasma membrane H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 4, p. 622-630, 2008. ISSN 1567-1364.

PEREIRA, M. B. D. M. Mecanismo de ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por agentes despolarizantes. 2006.

PEREIRA, R. R. et al. Detailed search for protein kinase (s) involved in plasma membrane H⁺-ATPase activity regulation of yeast cells. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 2, 2015a. ISSN 1567-1356.

PEREIRA, R. R. et al. Detailed search for protein kinase (s) involved in plasma membrane H⁺-ATPase activity regulation of yeast cells. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 2, p. fov003, 2015b. ISSN 1567-1364.

PERLIN, D.; BROWN, C.; HABER, J. Membrane potential defect in hygromycin B-resistant pma1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 34, p. 18118-18122, 1988. ISSN 0021-9258.

PIŠKUR, J.; LANGKJÆR, R. B. Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. **Molecular microbiology**, v. 53, n. 2, p. 381-389, 2004. ISSN 0950-382X.

PORTILLO, F. Regulation of plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase in fungi and plants. **Biochim Biophys Acta**, v. 1469, n. 1, p. 31-42, Mar 10 2000. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

PORTILLO, F. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 1, p. 31-42, 2000. ISSN 0304-4157.

PORTILLO, F.; DE LARRINOVA, I. F.; SERRANO, R. Deletion analysis of yeast plasma membrane H⁺-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. **FEBS letters**, v. 247, n. 2, p. 381-385, 1989. ISSN 1873-3468.

PRETORIUS, I. S. Synthetic genome engineering forging new frontiers for wine yeast. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 112-136, 2017. ISSN 0738-8551.

RAMEH, L. E. et al. A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate. **Nature**, v. 390, n. 6656, p. 192-196, 1997. ISSN 1476-4687.

ROGOWSKA-WRZESINSKA, A. et al. Comparison of the proteomes of three yeast wild type strains: CEN. PK2, FY1679 and W303. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, n. 4, p. 207-225, 2001. ISSN 1532-6268.

ROMERO, I.; MALDONADO, A.; ERASO, P. Glucose-independent inhibition of yeast plasma-membrane H⁺-ATPase by calmodulin antagonists. **Biochem. J**, v. 322, p. 823-828, 1997.

SAIARDI, A. et al. Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 468, n. 1, p. 28-32, 2000. ISSN 1873-3468.

SAUL, D. et al. Continuous phosphatidylinositol metabolism is required for cleavage of crane fly spermatocytes. **Journal of cell science**, v. 117, n. 17, p. 3887-3896, 2004. ISSN 0021-9533.

SCHLAME, M.; RUA, D.; GREENBERG, M. L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. **Progress in lipid research**, v. 39, n. 3, p. 257-288, 2000. ISSN 0163-7827.

SERRANO, R. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. **FEBS letters**, v. 156, n. 1, p. 11-14, 1983. ISSN 1873-3468.

SHERMAN, F. An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The encyclopedia of molecular biology and molecular medicine**, v. 6, p. 302-325, 1998.

SILVERMAN-GAVRILA, L. B.; LEW, R. R. Regulation of the tip-high [Ca²⁺] gradient in growing hyphae of the fungus *Neurospora crassa*. **European journal of cell biology**, v. 80, n. 6, p. 379-390, 2001. ISSN 0171-9335.

SOUZA, M. A.; TRÓPIA, M.; BRANDÃO, R. L. New aspects of the glucose activation of the H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 147, n. 10, p. 2849-2855, 2001. ISSN 1350-0872.

STEGER, D. J. et al. Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. **Science**, v. 299, n. 5603, p. 114-116, 2003. ISSN 0036-8075.

STEYER, D. et al. QTL mapping of the production of wine aroma compounds by yeast. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 573, 2012. ISSN 1471-2164.

SWINNEN, S. et al. Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. **Genome research**, v. 22, n. 5, p. 975-984, 2012. ISSN 1088-9051.

SWINNEN, S.; THEVELEIN, J. M.; NEVOIGT, E. Genetic mapping of quantitative phenotypic traits in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 2, p. 215-227, 2012. ISSN 1567-1364.

THEVELEIN, J. Signal-transduction in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1753-1790, 1994. ISSN 0749-503X.

THEVELEIN, J. M. Signal transduction in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1753-1790, 1994. ISSN 0749-503X.

TISI, R. et al. Phospholipase C is required for glucose-induced calcium influx in budding yeast. **FEBS letters**, v. 520, n. 1-3, p. 133-138, 2002. ISSN 0014-5793.

TISI, R. et al. Evidence for inositol triphosphate as a second messenger for glucose-induced calcium signalling in budding yeast. **Current genetics**, v. 45, n. 2, p. 83-89, 2004. ISSN 0172-8083.

TÖKÉS-FÜZESI, M. et al. Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1299-1308, 2002. ISSN 1365-2958.

TREUSCH, S. et al. Genetic mapping of MAPK-mediated complex traits across *S. cerevisiae*. **PLoS Genet**, v. 11, n. 1, p. e1004913, 2015. ISSN 1553-7404.

TROPIA, M. J. M. et al. Calcium signaling and sugar-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 343, n. 4, p. 1234-1243, 2006. ISSN 0006-291X.

VALLEJO, C. G.; SERRANO, R. Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. **Yeast**, v. 5, n. 4, p. 307-319, 1989. ISSN 0749-503X.

VANHAESEBROECK, B. et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. **Annual review of biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 535-602, 2001. ISSN 0066-4154.

VETTER, S. W.; LECLERC, E. Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 3, p. 404-414, 2003. ISSN 1432-1033.

VOLKOV, V. Quantitative description of ion transport via plasma membrane of yeast and small cells. **Front Plant Sci**, v. 6, p. 425, 2015. ISSN 1664-462X (Electronic)

1664-462X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26113853> >.

WALKER, D. M. et al. Characterization of MTMR3: an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. **Current Biology**, v. 11, n. 20, p. 1600-1605, 2001. ISSN 0960-9822.

WALKER, M. E. et al. Genome-wide identification of the Fermentome; genes required for successful and timely completion of wine-like fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-17, 2014. ISSN 1471-2164.

WERA, S.; BERGSMA, J. C.; THEVELEIN, J. M. Phosphoinositides in yeast: genetically tractable signalling. **FEMS yeast research**, v. 1, n. 1, p. 9-13, 2001. ISSN 1567-1364.

WHITMAN, M. et al. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. **Nature**, v. 332, n. 6165, p. 644-646, 1988. ISSN 1476-4687.

WILLAERT, R. **Yeast Biotechnology**: Multidisciplinary Digital Publishing Institute 2017.

WILSON, M. S.; LIVERMORE, T. M.; SAIARDI, A. Inositol pyrophosphates: between signalling and metabolism. **Biochemical Journal**, v. 452, n. 3, p. 369-379, 2013. ISSN 0264-6021.

WITHEE, J. L.; SEN, R.; CYERT, M. S. Ion tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* lacking the Ca²⁺/CaM-dependent phosphatase (calcineurin) is improved by mutations in URE2 or PMA1. **Genetics**, v. 149, n. 2, p. 865-878, 1998. ISSN 0016-6731.

XIA, H. J.; GUANG, Y. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate 3-kinases: functions and regulations. **Cell research**, v. 15, n. 2, p. 83-91, 2005. ISSN 1001-0602.

YORK, J. D. et al. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. **Science**, v. 285, n. 5424, p. 96-100, 1999. ISSN 0036-8075.

YORK, J. D.; XIONG, J.-P.; SPIEGELBERG, B. Nuclear inositol signaling: a structural and functional approach. **Advances in enzyme regulation**, v. 1, n. 38, p. 365-374, 1998. ISSN 0065-2571.

ZHANG, X.; MAJERUS, P. W. Phosphatidylinositol signalling reactions. *Seminars in cell & developmental biology*, 1998, Elsevier. p.153-160.