

AGENOR VALADARES SANTOS

PROTEOMA EXTRACELULAR DE *Kluyveromyces lactis* EM CULTURA
CONTÍNUA SOB LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237p
2008

Santos, Agenor Valadares, 1974-
Proteoma extracelular de *Kluyveromyces lactis* em
cultura contínua sob limitação de nitrogênio / Agenor
Valadares Santos. – Viçosa, MG, 2008.
xxi, 110f.: il. ; 29cm.

Orientador: Flávia Maria Lopes Passos.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 80-90.

1. *Kluyveromyces lactis*. 2. Leveduras (Fungos) -
Fisiologia. 3. Biotecnologia. 4. Stress (Fisiologia).
5. Fermentação. 6. Enzimas. 7. Leveduras (Fungos) -
Atividade enzimática. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.76

AGENOR VALADARES SANTOS

PROTEOMA EXTRACELULAR DE *Kluyveromyces lactis* EM CULTURA
CONTÍNUA SOB LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

APROVADA: 13 de março de 2008.

Prof. Marcelo Matos Santoro
(Co-Orientador)

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Co-Orientador)

Prof^a. Vera Lúcia dos Santos

Prof^a. Míriam Teresinha dos Santos

Prof^a Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

“O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano.”

Sir Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), onde se realizou este trabalho, pela acolhida.

Ao CNPq, pela concessão das bolsas de estudo do doutorado e da modalidade sanduíche no país.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia e ao Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde se realizou parte deste trabalho, na modalidade sanduíche, pela acolhida.

À Professora Flávia Maria Lopes Passos, pela orientação, amizade, paciência e confiança em todos os momentos.

Aos Professores Hilário Cuquetto Mantovani e Marcelo Matos Santoro, pela amizade e pelas sugestões nos experimentos.

À Luciana Xavier, pelo incentivo, amor e carinho, pela paciência e pelo auxílio na realização dos trabalhos durante todo o período de elaboração desta tese.

À minha Família do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, Professor Galvão, Dr^a Virgínia, Júlio, Valdilene, Lygia, Talita, Raphael, Otávio, Paula e Goiano, pelo companheirismo e pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas (ICB-UFMG) e aos meus colegas e amigos da UFMG, pelo companheirismo e pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (ICB-UFMG), em especial ao Professor Adriano Monteiro de Castro Pimenta e aos alunos Breno e Carla, pela disponibilidade e pelo auxílio nos experimentos de espectrometria de massa.

Aos professores do Departamento de Microbiologia da UFV, pelos ensinamentos e pela amizade.

Às Secretárias da Pós-Graduação e do Departamento de Microbiologia Nilcéa e Laura, respectivamente, pelo apoio e pela atenção; e aos demais funcionários desse departamento, pela agradável convivência.

Aos meus colegas do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e Bioquímica Agrícola, pelo incentivo e companheirismo.

Aos meus amigos Damião, Maurílio, Maurício, Gustavo, Wendel, Hermano, Talita, Leonardo, Wiliam, Aline, Meire, Cecília e Jacqueline, por terem sofrido comigo e me incentivado nas horas mais difíceis da minha vida, rido nas horas alegres e me apoiado neste trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa.

BIOGRAFIA

AGENOR VALADARES SANTOS, filho de Agenor de Campos Santos e Vera Lúcia Valadares Santos, nasceu em 13 de dezembro de 1974, na cidade de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais.

Em agosto de 2001, bacharelou-se em Ciências Biológicas, com ênfase em Bioquímica e Imunologia, pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Em agosto de 2001, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, diplomando-se em 04 de agosto de 2003, com o título de *Magister Scientiae*.

Em agosto de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Microbiologia Agrícola do Departamento de Microbiologia da UFV, submetendo-se à defesa da tese em 13 de março de 2008.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIÇÕES UTILIZADAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Potencial biotecnológico da <i>Kluyveromyces lactis</i>	3
2.2. Proteoma de leveduras: uma ferramenta para o estudo fisiológico.....	6
2.3. Metabolismo de carbono e nitrogênio em condições adversas	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Células e condições de cultivo	21
3.2. Consumo de glicose e produção de proteínas extracelulares	22
3.3. SDS-PAGE e ensaio de glicosilação	23
3.4. Análise do extrato protéico extracelular em cromatografia líquida bi- dimensional (LC-2D)	24
3.5. Espectrometria de massa	24
3.6. Análise <i>in silico</i>	26
4. RESULTADOS	27

	Página
4.1. Consumo de glicose e produção de massa celular e proteínas extracelulares sob limitação nutricional.....	27
4.2. Caracterização das proteínas extracelulares em SDS-PAGE e MS	28
4.3. Caracterização das proteínas extracelulares por LC - 2D e MS.....	30
4.3.1. Análise das proteínas extracelulares das culturas em crescimento a 0,03 h ⁻¹	30
4.3.2. Análise das proteínas extracelulares das culturas de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,09 h ⁻¹	45
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	77
7. PERSPECTIVAS	79
8. REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS	81

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Consumo de glicose, produção de proteína extracelular e biomassa em cultura contínua de <i>K. lactis</i> sob regime permanente, em diferentes velocidades específicas de crescimento	27
2. Proteínas extracelulares de culturas de <i>K. lactis</i> retiradas do SDS-PAGE e identificadas por PMF em MALDI-TOF-TOF (análise pelo software MASCOT).....	31
3. Massa averiguada por MS da F1 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,03 h ⁻¹	36
4. Massa averiguada por MS da F2 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,03 h ⁻¹	37
5. Massa averiguada por MS da F3 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,03 h ⁻¹	39
6. Massa averiguada por MS da F4 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,03 h ⁻¹	41
7. Massa averiguada por MS da F5 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,03 h ⁻¹	44
8. Massa averiguada por MS da F1 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,09 h ⁻¹	46
9. Massa averiguada por MS da F2 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,09 h ⁻¹	51

	Página
10. Massa averiguada por MS da F3 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,09 h ⁻¹	53
11. Massa averiguada por MS da F4 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,09 h ⁻¹	55
12. Massa averiguada por MS da F5 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,09 h ⁻¹	56
13. Massa averiguada por MS da F6 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,09 h ⁻¹	58
14. Massa averiguada por MS da F8 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,09 h ⁻¹	60
15. Massas identificadas das amostras de LC-2D de proteínas extracelulares de <i>K. lactis</i> pertencentes ao banco de dados de proteínas secretadas (Anexo 1)	64
16. Proteínas extracelulares de culturas de <i>K. lactis</i> identificadas por MALDI-TOF-TOF MS (análise pelo software MASCOT)	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Circuito regulatório da transcrição dependente de GATA em <i>S. cerevisiae</i> ..	13
2. Gln3p e Dal80p, na regulação da repressão catabólica por nitrogênio	14
3. Vias de tráfico de proteínas em leveduras.....	17
4. Regulação da resposta à inanição por nitrogênio pela via UPR. (A) A fonte de carbono presente ou ausente é mostrada na coluna esquerda. A coluna da direita mostra como UPR regula o programa de desenvolvimento de células diplóides sob cada condição. O resultado é mostrado em negrito nas caixas. As setas indicam para a via de ativação e os traços, para a via inibitória. (B) Modelo de via sensível a nitrogênio, incluindo a tradução e proteína desenovelada no RE	19
5. Perfil protéico extracelular em SDS-PAGE 5-15%. A - Coloração coloidal com <i>Coomassie Blue</i> R-250. B - Coloração PAS. Canaleta M – Marcador de massa molecular Invitrogen®. Canaleta 1 – Amostra da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,09 h ⁻¹ (15 µg). Canaleta 2 – Amostra da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,03 h ⁻¹ (15 µg).....	28
6. Perfil em SDS-PAGE 5-15% das proteínas extracelulares reduzidas e alquiladas. Canaleta 1 – Amostra da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,09 h ⁻¹ (15 µg, reduzida e alquilada). Canaleta 2 – Amostra da cultura de <i>K. lactis</i> em crescimento a 0,03 h ⁻¹ (15 µg, reduzida e alquilada). Canaletas M e 5 – Marcador de massa molecular Sigma®. Canaleta 3 – calicreína (10 µg - controle). Canaleta 4 – calicreína (10 µg - controle, (15 µg, reduzida e alquilada). Em negrito, a' a f' ; a , b e K indicam as amostras que foram excisadas do gel. Coloração coloidal com <i>Coomassie Blue</i> R-250	29

7. **Cromatograma de troca iônica em coluna SOURCE 15Q de amostra de proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia foi conduzida na temperatura ambiente, utilizando tampão citrato 50 mM, pH 5,4. As amostras foram eluídas empregando-se tampão citrato 50 mM, pH 5,4, com 1 M de NaCl. O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de tampão contendo NaCl 1 M - indicada pela linha tracejada (---)..... 34

8. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F1 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando-se solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 35

9. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F2 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A), sendo a eluição feita por meio de gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---)..... 37

10. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F3 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 39

11. **Espectro de massa evidenciando glicosilações da fração B6 da F3 – 0,03 h⁻¹.** O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido da fração B6, obtida na fase reversa da fração F3 proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹. A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz DHB em placa MTP AnchorChip 800/384, Hex- hexose..... 40

12. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F4 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A), sendo a eluição feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---)..... 41

13. **Espectro de massa evidenciando glicosilações da fração B4 da F4 – 0,03 h⁻¹.** O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido da fração B4 (Tabela 6), obtida na fase reversa da fração F4 proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹. A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz DHB em placa MTP AnchorChip 800/384, Hex- hexose..... 42

14. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F5 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 43

15. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F6 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 44

16. **Cromatograma de troca iônica em coluna SOURCE 15Q de amostra de proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia foi conduzida à temperatura ambiente utilizando tampão citrato 50 mM, pH 5,4, sendo as amostras eluídas utilizando-se tampão citrato 50 mM, pH 5,4, com 1 M de NaCl. O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de tampão contendo NaCl 1 M - indicada pela linha tracejada (---) 46

17. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F1 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 47

18. **Espectro de massa evidenciando glicosilações da fração B6 da F1 – 0,09 h⁻¹.** O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido da fração B6 (Tabela 7), obtida na fase reversa da fração F1 proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹. A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz DHB em placa MTP *AnchorChip* 800/384, Hex- hexose..... 48

19. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F2 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 50

20. **Espectro de massa evidenciando glicosilações da fração A5 da F2 - 0,09 h⁻¹.** O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido da fração A5 (Tabela 9), obtida na fase reversa da fração F2 proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹. A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz DHB em placa MTP *AnchorChip* 800/384, Hex- hexose, HexNAc - N-acetilglicosamina..... 52

21. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F3 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 53

22. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F4 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio de gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 54

23. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F5 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 56

- 24 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F6 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 58

25. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F7 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 59

26. **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F8 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio de gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---) ... 60

27. **Perfil cromatográfico bidimensional de amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** O perfil cromatográfico indicado pelas linhas coloridas refere-se às cromatografias de fase reversa de **F1** (azul-turquesa), **F2** (vermelho), **F3** (ciano), **F4** (verde) **F5** (rosa) e **F6** (azul-celeste), e a linha preta refere-se à cromatografia de troca iônica da amostra cultivada na taxa de crescimento de 0,03 h⁻¹. Esses perfis foram delineados pela leitura da absorvância a 280 nm do material eluído 62
28. **Perfil cromatográfico bidimensional de amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** O perfil cromatográfico indicado pelas linhas coloridas refere-se às cromatografias de fase reversa **F1** (magenta), **F2** (verde), **F3** (azul-celeste), **F4** (rosa), **F5** (marinho), **F6** (ocre), **F7** (roxo) e **F8** (preta), e a linha preta refere-se à cromatografia de troca iônica da amostra cultivada na taxa de crescimento de 0,09 h⁻¹. Esses perfis foram delineados pela leitura da absorvância a 280 nm do material eluído..... 63

ABREVIações UTILIZADAS

ACN – Acetonitrila.

BSA – Albumina soro bovina.

CHCA – Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

CID – *Collision induced dissociation*, dissociação induzida por colisão.

DHB – Ácido gentísico (ácido 2,5-diidroxibenzóico).

DTT – Ditionitrito.

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético (quelante de íons metálicos divalentes, inibidor de metaloproteases).

ESI-TOF – Espectrômetro de massa com fonte de ionização *electrospray* com analisador por tempo de voo.

Iodoacetamida – Inibidor de cisteína protease.

kDa – Kilodáltons.

K_s – Constante de saturação.

μ_{MAX} – Máxima velocidade específica de crescimento.

MALDI-TOF – Espectrômetro de massa com fonte de ionização por desorção a laser, com o auxílio de matriz sólida, e analisador por tempo de voo.

MDLC – Cromatografia líquida multidimensional.

MS – Espectrometria de massa.

MS/MS – Espectrometria de massa em *Tandem*.

Pepstatina A – Inibidor de aspartil protease.

PMF – Mapeamento através de massas peptídicas (*Peptide Mass Fingerprinting*).

PMSF – Fenilmetilsulfonil fluoride (inibidor de serino proteases).
SA – Ácido sinapínico (ácido trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico).
SDS – Dodecil sulfato de sódio.
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.
TFA – Ácido trifluoroacético.
Tris – Tris (hidroximetil) amino metano.
YCB – Meio base de carbono para leveduras.

RESUMO

SANTOS, Agenor Valadares, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2008.
Proteoma extracelular de *Kluyveromyces lactis* em cultura contínua sob limitação de nitrogênio. Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Co-Orientadores: Marcelo Matos Santoro e Hilário Cuquetto Mantovani.

A identificação de proteínas extracelulares de leveduras em cultura contínua pode oferecer informações sobre a influência do *status* nutricional na via de captura de nutrientes alternativos. Essa análise auxilia a otimização das condições necessárias para a produção dessas proteínas com o máximo rendimento, além de oferecer uma estratégia de construção de um sistema de expressão e secreção de proteínas em leveduras. Neste trabalho, mostra-se o perfil das proteínas extracelulares de culturas de *Kluyveromyces lactis* submetidas a estresse por nitrogênio. A técnica de cultivo em regime contínuo, aliada à análise proteômica, foi utilizada para investigar a resposta da cultura de *K. lactis* em duas velocidades de crescimento estabelecidas em função da concentração de nitrogênio, ou seja, $0,03\text{ h}^{-1}$ e $0,09\text{ h}^{-1}$. A velocidade de crescimento de $0,09\text{ h}^{-1}$ mostrou o maior rendimento na produção de proteínas extracelulares ($1,54\text{ mg.L}^{-1}$), maior conversão de glicose em proteína ($3,3 \times 10^{-4}\text{ g.g}^{-1}$) e um maior rendimento de biomassa ($0,13\text{ g.g}^{-1}$). Através da análise dos perfis protéicos em SDS-PAGE gradiente de amostras dos extratos extracelulares nas duas velocidades de crescimento, pôde-se distinguir, inicialmente, diferenças no proteoma de culturas de *K. lactis*. A velocidade de $0,09\text{ h}^{-1}$ apresentou maior número de bandas quando comparada com o perfil obtido

para $0,03\text{ h}^{-1}$. Na identificação proteômica das bandas excisadas do gel por espectrometria de massa em MALDI-TOF-TOF-MS, os espectros obtidos foram analisados utilizando-se o *software* MASCOT[®]. As proteínas sugeridas por essa análise estão relacionadas a processos de ciclo celular, replicação, transcrição, mudanças pós-traducionais, metabolismo de carboidrato, ubiquitinação e degradação celular e são comumente encontradas no interior celular. Os extratos extracelulares de *K. lactis* também foram analisados por cromatografia líquida bi-dimensional (LC-2D), na qual a velocidade específica de crescimento de $0,09\text{ h}^{-1}$ apresentou maior número de picos cromatográficos, resultado que indica a presença de maior número de proteínas nessa velocidade com relação a $0,03\text{ h}^{-1}$. Nas várias análises por espectrometria de massa em MALDI-TOF-TOF-MS, das amostras advindas da cromatografia líquida 2D, obteve-se um total de 95 massas moleculares nas duas velocidades específicas de crescimento; dessas massas, aproximadamente 30% pertencem às amostras da velocidade específica de crescimento de $0,03\text{ h}^{-1}$ e 70%, à velocidade específica de crescimento de $0,09\text{ h}^{-1}$. A análise por espectrometria de massa também evidenciou a presença de glicosilações (moléculas de *N*-acetilglicosamina e de 8 a 15 moléculas de hexose por proteína) e de outras possíveis mudanças pós-traducionais em amostras resultantes da LC-2D de ambas as velocidades específicas de crescimento. Na identificação das proteínas extracelulares, as amostras, obtidas na LC-2D das duas velocidades específicas de crescimento, foram tripsinolizadas e analisadas novamente por espectrometria de massa, e as proteínas sugeridas pela análise foram aquelas de *K. lactis* ligadas ao trânsito de peptídios e ao metabolismo de carboidrato, enzimas de transcrição e outras enzimas, como transferases, cinases, hidrolases, descarboxilases, oxidases e mutarotases, do mesmo modo que na avaliação anterior; e essas proteínas não obtiveram os *scores* mínimos para a identificação por homologia ser considerada estaticamente significativa.

ABSTRACT

SANTOS, Agenor Valadares, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2008.
Extracellular proteome of *Kluyveromyces lactis* in continuous culture under nitrogen limitation. Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co-Advisers: Marcelo Matos Santoro and Hilário Cuquetto Mantovani.

The identification of proteins secreted by yeast, in continuous culture, offers information about the influence of nutritional status in the nutrient capture alternative via. This analysis assists the optimization of conditions needed for the production of these proteins with the highest yield. In addition, it offers a strategy for the construction of a system of proteins expression and secretion in yeast. The present work shows the profile of extracellular proteins of *Kluyveromyces lactis* cultures submitted to stress by nitrogen. The continuous culture technique associated to the proteomic analysis was utilized in order to investigate the response of *K. lactis* culture in two growth velocities established as a function of nitrogen concentration, respectively, 0,03 h⁻¹ and 0,09 h⁻¹. The 0,09 h⁻¹ growth velocity showed the major yield in the production of extracellular proteins (1,54 mg.L⁻¹), a better conversion of glucose to product (3,3 x 10⁻⁴ g.g⁻¹) and a greater biomass yield (0,13 g.g⁻¹). Differences in proteomic cultures of *K. lactis* could be initially distinguished through the analysis of protein profiles in SDS-PAGE sampling gradient of extracellular extracts in the two growth velocities. The 0,09 h⁻¹ velocity presented a larger number of bands when compared to the profile obtained for 0,03 h⁻¹. In the proteomic identification of the bands excised from the gel by mass

spectrometry in MALDI-TOF-TOF-MS, the spectrums acquired were analyzed using the *software* MASCOT[®]. Proteins suggested by this analysis are related to process such as cell cycle, replication, transcription, post translational changes, carbohydrates metabolism, ubiquitination and cellular degradation. They are commonly found inside the cell. Extracellular extracts of *K. lactis* were also analyzed by bi-dimensional liquid chromatography (LC-2D), in which the 0,09 h⁻¹ specific growth velocity presented larger numbers of chromatographic peaks. This result indicates the presence of a larger number of proteins in this velocity when compared to the 0,03 h⁻¹. In the several analysis performed through mass spectrometry in MALDI-TOF-TOF-MS, made from samples obtained by 2D liquid chromatography, it was acquired a total of 95 molecular masses in the two specific growth velocities. From these masses, about 30% belongs to the 0,03 h⁻¹ specific growth velocity and 70% belongs to the 0,09 h⁻¹ specific growth velocity. The analysis by mass spectrometry also evidenced the presence of glycosylations (molecules of N-acetylglucosamine and from 8 to 15 molecules of hexoses per protein) and of other possible post translational changes in samples resulting from LC-2D of both specific growth velocities. In the extracellular protein identification, the samples obtained from LC-2D of both specific growth velocities were treated with trypsin and analyzed once more by mass spectrometry. Proteins suggested by the analysis were *K. lactis* proteins connected to the traffic of peptides and to the metabolism of carbohydrates, transcription enzymes and other enzymes, such as tranferases, kinases, hydrolases, decarboxylases, oxidases and mutarotases, as well as in the previous evaluation; nevertheless, these proteins did not obtain the minimal scores to the homology identification be considered statistically significant.

1. INTRODUÇÃO

A levedura *Kluyveromyces lactis* possui propriedades de interesse biotecnológico, portanto estudar a sua fisiologia propicia prever mecanismos para explorar esse potencial. O potencial biotecnológico e sua fisiologia são alvos de estudo em nosso grupo de *K. lactis*, cujos resultados se mostraram promissores com relação à secreção de proteínas nativas, produção de β -galactosidase, etanol e biomassa utilizando o soro de queijo ultrafiltrado como substrato em culturas sob estresses por nitrogênio. Contudo, é importante também avaliar a fisiologia da célula em baixa concentração de nutrientes influencia a localização extracelular de proteínas.

A realização do proteoma extracelular de *K. lactis*, além de contribuir para o entendimento da resposta global ao estresse nutricional, pode subsidiar estratégias futuras para a construção de um vetor de expressão e secreção de proteínas de interesse. O cultivo em biorreatores contínuos, onde o estresse nutricional é imposto pelo baixo fluxo de alimentação do meio de cultura, constitui uma estratégia para analisar proteínas de interesse. O avanço das técnicas proteômicas, nas quais pequenas quantidades de proteínas e mudanças pós-traducionais podem ser identificadas, permite a análise do conjunto de proteínas extracelulares de leveduras. Essas análises podem revelar proteínas de interesse industrial e auxiliar a otimização das condições necessárias para a produção dessas proteínas com máximo rendimento.

Pretendeu-se caracterizar diferentes perfis de proteínas extracelulares de culturas contínuas de *Kluyveromyces lactis* submetidas a diferentes velocidades específicas de crescimento, que correspondem a dois níveis de estresse nutricional. As proteínas

extracelulares obtidas nas diferentes velocidades específicas de crescimento e as possíveis mudanças pós-traducionais foram identificadas por meio de técnicas de proteômica e ferramentas de bioinformática. Os resultados devem ampliar as perspectivas de explorar o secretoma de *K. lactis*, correlacioná-lo à sua fisiologia e, assim, identificar as condições de cultivo da levedura *K. lactis* na produção de proteínas de interesse biotecnológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Potencial biotecnológico da *Kluyveromyces lactis*

Entre as leveduras com potencial biotecnológico, o interesse pela *Kluyveromyces lactis* surge pelas distintas propriedades fisiológicas que a distingue de *Saccharomyces cerevisiae*. *K. lactis* assimila uma variedade maior de fontes de carbono, por exemplo lactose, e a ausência da repressão da respiração por glicose em *K. lactis* ilustra as maiores diferenças na regulação do metabolismo de glicose, em comparação com *S. cerevisiae* (BREUNIG et al., 2000). O eficiente metabolismo oxidativo de *K. lactis* constitui um aspecto positivo nos processos em que a concentração de células é imprescindível, como produção de biomassa ou proteínas.

Além das propriedades ideais de cultivo em larga escala, *K. lactis* é reconhecida como inócua, isto é, possui o *status* GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) (BONEKAMP; OOSTEROM, 1994) e detém propriedades que permitem sua manipulação genética tanto para transformação quanto para expressão de genes heterólogos. Há mais de uma década, *K. lactis* tem sido objeto de estudos na síntese e secreção de proteínas recombinantes, como proquimosina (renina) de estômagos de bezerros e albumina e interleucina humanas (SALIOLA et al., 1999; MUSTILLI et al., 1999; DURAND et al., 1999; TOKUNAGA et al., 1997; WALSH et al., 1998; FLEER et al., 1991).

O sucesso da secreção de proteínas heterólogas não depende apenas da sua eficiente expressão, mas também das condições fisiológicas que controlam o trânsito da

proteína na via de secreção (UCCELLETTI et al., 2004). Proteínas que transitam pela via de secreção estão submetidas a um minucioso controle de qualidade para garantir que sejam secretadas apenas proteínas dobradas corretamente (ARVAN et al., 2002; FRANZUSOFF et al., 1991). O estado nutricional em que a célula se encontra pode influenciar tanto a expressão quanto o dobramento de proteínas, bem como a preferência da secreção de determinadas proteínas em detrimento de outra. De fato, é bem conhecido que o estado nutricional, ou seja, a concentração de nutriente no meio de cultivo funciona como sinalizador para o controle de qualidade de proteínas de membrana. Recentemente, foi mostrado que o componente central da principal via de sinalização por glicose, a proteína Snf1p (serina/treonina cinase), também possui função de galactose permease em *K. lactis*; Snf1p controla a assimilação de açúcar mediada por Lac12 (WIEDEMUTH; BREUNIG, 2005).

A proximidade evolutiva entre *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* permite um alinhamento dos domínios funcionais a partir da comparação de seqüências de genes homólogos entre as duas leveduras (SCHAFFRATH; BREUNIG, 2000). Conforme mencionado, apesar das relações filogenéticas próximas, *K. lactis* possui fisiologia bem distinta da de *S. cerevisiae*, o que reflete, possivelmente, seu *habitat* (leite e seus produtos derivados), e recentemente foi observado excesso de genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos em *K. lactis*, o que não foi encontrado em *S. cerevisiae* (BOLOTIN-FUKUHARA et al., 2000).

O potencial biotecnológico da levedura *K. lactis*, seu estado nutricional e condições de estresse são alvos de diferentes pesquisas desenvolvidas em nosso grupo e cujos resultados se mostram significantes e promissores com relação à secreção de proteínas nativas (BRUNO, 1998) e à atividade de β -galactosidase em levedura nativa e mutantes resistentes a geneticina (BARRETO, 1998); quanto à utilização do soro de queijo ultrafiltrado (SUF) como meio de cultivo na seleção de mutantes específicos e à suplementação desse meio com sulfato de amônio para a produção de biomassa (CAMPOS, 2001); com relação à atividade de β -galactosidase da *K. lactis* na fase de desaceleração crescida em SUF e produção e consumo de etanol (ORNELAS et al., 2008); no tocante a longevidade de culturas de *K. lactis* sob estresse por nitrogênio (CORRÊIA, 2007); e quanto à influência do metabolismo do carbono na localização subcelular da permease de lactose Lac12GFPp e à ação pós-traducional da KISnf1p sobre a expressão do gene dessa permease (SILVEIRA, 2007).

Nesses trabalhos, quanto à secreção de proteínas nativas por *K. lactis* cultivada em diferentes fontes de carbono, observou-se que a maioria das proteínas secretadas possui massas moleculares na faixa de 31 a 97,7 kDa, sendo que a fase de desaceleração favorece o aumento da secreção e as fontes de carbono (glicose e sacarose) utilizadas no cultivo provocam inibição e favorecimento do processo, respectivamente. Em análise de culturas selvagens e mutantes adicionadas de sulfato de amônio, observou-se aumento na produção de biomassa em cerca de três vezes, revelando perfis protéicos diferenciados por SDS-PAGE entre as culturas selvagens e mutantes. Do mesmo modo, as análises de mutantes resistentes à geneticina demonstraram que os mutantes, crescidos em diferentes meios de cultura suplementados ou não com fonte de carbono, secretaram 1,75 vez mais proteínas extracelulares do que a cultura da levedura selvagem.

Yarrowia lipolytica, isolada de ambiente de laticínios e estudada pelo nosso grupo, quando cultivada em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio apresentou expressão diferenciada de proteases extracelulares (SANTOS, 2003). Expressão diferenciada em *Yarrowia lipolytica* também foi evidenciada quanto à produção de lipases, em diferentes fontes e concentrações de carbono e nitrogênio (FICKERS e colaboradores, 2004). *Sacharomyces cerevisiae*, quando nutricionalmente suplementado com diferentes aminoácidos, apresenta variação na produtividade relativa de uma xilanase extracelular heteróloga, e, dependendo da fonte de aminoácidos, observou-se maior ou menor produção da xilanase extracelular (GÖRGENS et al., 2005).

Várias proteínas extracelulares com atividade enzimática foram identificadas em diferentes gêneros de levedura: *Candida* (pectinases, proteases, glucanases, liquenases, glicosidases, celulasas, xilanases e amilase), *Debaryomyces* (proteases) e *Kloeckera* (proteases, glucanases, liquenases, celulasas e amilases) (STRAUSS et al., 2001). *K. marxianus* secreta uma glicoproteína, a Inulase, um dímero protéico com diferentes formas de agregação de suas subunidades de 64 kDa, variando o teor de carboidratos entre 26 e 37% da massa molecular (LALOUX et al., 1991; ROUWENHORST et al., 1990). Cepas *killer* de *K. lactis* secretam zimocina, um complexo glicoprotéico composto por três subunidades (α , β e γ) mantidas por pontes de sulfeto. Esse complexo é ativo contra o crescimento de leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Candida* (SCHAFFRATH; BREUNIG, 2000). *K. lactis* também secreta uma fosfolipase B altamente glicosilada com 66% de similaridade com fosfolipase B de *Torulaspora delbrueckii* (OISHI et al., 1999). Utilizando técnicas de clonagem molecular, com o gene

codificante para a enzima extracelular 1,3- β -glucanase de *K. lactis* em *S. cerevisiae*, foi possível identificar a proteína expressa no meio extracelular, constituída por 429 aminoácidos, bem como detectar sua atividade enzimática (ESTEBAM et al., 1999).

2.2. Proteoma de leveduras: uma ferramenta para o estudo fisiológico

Mesmo com sua importância em análises filogenéticas, seqüências gênicas e tecnologias de DNA recombinante, o genoma completo do organismo gera somente uma visão relativamente estática do potencial funcional de um organismo, sendo limitado quando é necessário o conhecimento das proteínas realmente expressas em uma condição fisiológica específica ou identificação das modificações pós-traducionais (DUTT; LEE, 2000; LOTTSPREICH, 1999). A população de mRNA, da mesma forma que o genoma, tem limitações em proporcionar tais informações (LOTTSPREICH, 1999). Dessa forma, a análise do proteoma torna-se importante em estudos de comparações da expressão gênica em diferentes estados fisiológicos de um organismo.

O seqüenciamento completo do genoma de várias leveduras, inclusive *Kluyveromyces lactis*, está disponível no banco de dados da rede mundial de computadores (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/KLLA>). Após a análise do genoma, seu potencial funcional tem sido alvo de pesquisas em vários laboratórios na Europa que se dedicam a *Kluyveromyces lactis*. Como por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae* o proteoma mitocondrial evidenciou diferenças entre as condições fisiológicas do metabolismo respiratório e metabolismo fermentativo, não observado na análise do transcriptoma (OHLMEIER et al., 2004).

A análise global do proteoma ou transcriptoma de uma cultura aponta para a necessidade de a análise ser feita sobre uma população de proteína ou mRNA uniforme e representativa da condição fisiológica predeterminada, o que dificilmente é obtido em culturas sob regime de batelada, mas possível de ser obtida em cultura contínua (KAMINISKI; FRIEDMAN, 2002).

O sistema de cultivo contínuo opera na fase de desaceleração do crescimento de uma cultura cultivada em bateladas, isto é, entre a velocidade de crescimento máxima da fase exponencial e a velocidade nula da fase estacionária. Por essa razão, as culturas contínuas são indicadas nos estudos que requerem condições ou estados fisiológicos bem definidos, geralmente associados a estresse nutricional, pelo fato de que o crescimento depende do fluxo de alimentação do meio (BAILEY; OLLIS, 1986). A fase

de desaceleração do crescimento coincide com a fase de resposta global às condições limitantes do meio e reflete a fisiologia em que a célula aciona a expressão de genes que codificam proteínas que permitem explorar melhor os recursos do meio e, conseqüentemente, exibir o máximo de rendimento de determinados produtos (NEIDHART et al., 1990).

Além da possibilidade de conduzir o cultivo da levedura na fase de desaceleração do crescimento, a cultura contínua permite, portanto, a obtenção de uma população de proteínas uniformes para cada condição fisiológica. A reprodutibilidade da cultura contínua é significativa, como tem sido demonstrado pela literatura. Comparações feitas inter e intralaboratórios dessas proteínas resultam em dados de *micro-array* altamente reprodutivos (DARAN-LAPUJADE et al., 2004; BOER et al., 2003; PIPER et al., 2002).

As técnicas de cultura contínua combinada com a análise proteômica podem ser utilizadas para examinar a resposta de culturas, sob diferentes condições de estresse nutricional. Em análise combinada dessas técnicas em cultura de *S. cerevisiae*, sob condições limitantes de glicose ou etanol, foram obtidas e analisadas 400 proteínas. Em regime permanente, somente as enzimas envolvidas no metabolismo central de carbono mostraram alteração significativa na expressão (KOLKMAN et al., 2005).

Numa avaliação similar da resposta adaptativa ao estresse por carbono em *S. cerevisiae* durante o metabolismo fermentativo, houve alteração no proteoma durante a exaustão de glicose, quando a população alcançava a fase estacionária de crescimento. O proteoma identificado dividiu-se em três classes de proteínas: proteínas reprimidas, proteínas induzidas e proteínas autoproteolisadas. O proteoma durante a exaustão da glicose foi relacionado a respostas à concentração de etanol, à hiper-osmolaridade e ao estresse oxidativo (TRABALZINI et al., 2003). Diferenças no proteoma de *S. cerevisiae* também foram estudadas na transição da fase lag para a fase log de crescimento. Aproximadamente 100 proteínas foram induzidas nessa transição, sendo essas proteínas consideradas candidatas potenciais a marcadores biológicos para eventos de iniciação do crescimento e proliferação celular (BREJNING; JESPERSEN, 2002).

A identificação rápida e genérica de proteínas requer um método eficiente para relacionar informações no nível de proteínas com informações no nível do genoma (TYERS; MANN, 2003). Em contraste à análise clássica de proteínas, na qual se analisavam proteínas individualmente, a análise proteômica tem uma vantagem única, em que o estado fisiológico pode ser obtido independentemente da atividade biológica da

proteína individual, pois é indetectado um conjunto de proteínas que podem ser correlacionadas com vias metabólicas (LOTTSPREICH, 1999). Para a análise de proteoma, dois princípios são utilizados: o de separação e o de identificação. As duas técnicas de separação mais utilizadas são a eletroforese bidimensional e a cromatografia multidimensional. Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas por uma focalização isoeletrica (IEF) e, posteriormente, por massa molecular (SDS-PAGE). Essa estratégia possibilita alta resolução para separar proteínas de um extrato proteico complexo (JOUBERT et al., 2000). Na cromatografia multidimensional, as proteínas são separadas pela utilização de cromatografia em várias colunas, com princípios de separação distintos, geralmente empregando-se a cromatografia em colunas de troca iônica e fase reversa (MAYNARD et al., 2004).

Garbis et al. (2005), revisando sobre limitações nas técnicas proteômicas, mostraram que é possível identificar maior número de proteínas utilizando as técnicas de cromatografia líquida multidimensional (MDLC) do que as técnicas de eletroforese bidimensional. O uso de sistemas de MDLC, além de melhorar a resolução da separação cromatográfica, simplifica e prepara a amostra para a análise direta em espectrômetro de massa. Dados obtidos nos bancos genômicos favorecem a análise do proteoma, aliando espectrometria de massa com predições *in silico* do proteoma (CARGNEY et al., 2003).

De acordo com o apresentado, a análise do proteoma extracelular de *K. lactis* por cromatografia líquida multidimensional (MDLC) pode permitir maior reprodutibilidade dos dados e maior capacidade na resolução de misturas proteicas complexas, além de detectar proteínas em menor abundância na amostra total e extremos de hidrofobicidade, pI e massa molecular, o que são condições limitantes para a técnica de eletroforese (SDS-PAGE 2D) (GARBIS et al., 2005; WEI et al., 2005; TOLL et al., 2005; MAYNARD et al., 2004; STRITTMATTER et al., 2003; GRIFFIN; AEBERSOLD, 2001). Além disso, a MDLC é totalmente compatível com a espectrometria de massa de fonte de ionização por desorção a laser, com o auxílio de matriz sólida (MALDI).

A espectrometria de massa permite a identificação de proteínas em pequenas concentrações por seqüenciamento ou por características como modificações pós-traducionais, peso molecular e impressão digital de massas (MO; KARGER, 2002).

A análise proteômica é o principal método atualmente escolhido para a análise de proteínas e peptídios modificados. A enorme versatilidade das modificações que freqüentemente alteram significativamente as propriedades físico-químicas das proteínas é somente uma das características avaliadas na análise proteômica orientada por

modificação. Entretanto, as modificações em proteínas são frequentemente transientes, subestequiométricas, tempo e local-específicas, sítio-específicas e polimórficas, o que torna essas análises mais difíceis (SICKMANN; MREYEN, 2002).

As modificações pós-traducionais desempenham importantes e diferentes papéis em vários processos celulares como a regulação enzimática, a transdução de sinal e o endereçamento protéico, além de atuar na interação protéica e na estabilidade da proteína. Os dados genômicos ultimamente obtidos podem somente ser usados parcialmente na predição dessas modificações, embora programas específicos e novos bancos de dados estejam rapidamente se desenvolvendo (REINDERS; SICKMANN, 2007; CHEN et al., 2006; LEE et al., 2006; XUE et al., 2006; BLOM et al., 2004).

O grande interesse no estudo de mudanças pós-traducionais tem gerado uma nova área na proteômica, denominada “modificômica”, que ainda necessita se desenvolver em totalidade de progressos técnicos e analíticos. Embora existam vários tipos de modificações, as mais bem conhecidas são a fosforilação e glicosilação de proteínas, entretanto as respectivas técnicas de análise estão ganhando maior interesse e sendo revisadas atualmente, diante dos diversos tipos de modificações e de suas funções fisiológicas essenciais. Uma análise mais abrangente dos diferentes tipos de modificações pós-traducionais em paralelo não é usualmente possível em uma escala global, portanto uma análise deve ser focada em uma única ou alguma proteína distinta ou dirigida pelo tipo de modificação, para se obter o sucesso esperado (REINDERS; SICKMANN, 2007).

As proteínas glicosiladas de leveduras contêm cadeias de carboidratos ligadas a resíduos de aminoácidos específicos: asparagina, no caso de oligossacarídeos *N*-ligados, e serina ou treonina para espécies *O*-ligadas. As cadeias externas dos glicanos em leveduras consistem, principalmente, de oligômeros de manose, com exceção de algumas leveduras que adicionam galactose ao resíduo terminal da cadeia (*Schizosaccharomyces pombe*) e *N*-acetilglicosamina (*K. lactis*) (SCHACHTER, 2001; TANNER; LEHLE, 1987; KUKURUZINSKA et al., 1987).

Em *S. cerevisiae*, as glicoproteínas *N*-ligadas são divididas em três grandes grupos: glicoproteínas de parede celular; glicoproteínas secretadas e glicoproteínas vacuolares. As manoproteínas da parede celular servem como componentes estruturais e são compostas por longas cadeias de carboidratos com 100-200 resíduos de manose. As proteínas secretadas, como exemplo a invertase e fosfatase ácida, possuem função na aquisição de nutrientes e cadeias de comprimento intermediário de sacarídeo (>50

unidades de manose). As glicoproteínas localizadas no vacúolo, como ex. carboxipeptidase Y (CPY) e fosfatase ácida, possuem papel digestivo, e sua porção glicídica é bem pequena; CPY contém cerca de nove unidades de manose por cadeia. Os glicanos O-ligados são curtos, geralmente não excedem cinco resíduos de manose de comprimento. Frequentemente, ambos os tipos de glicanos N- e O- ligados estão presentes na mesma proteína (KUKURUZINSKA et al., 1987).

Nos últimos anos, têm-se estudado o processo de glicosilação e a biogênese da parede celular em *K. lactis*, através da seleção e caracterização de mutantes isolados, de acordo com a resistência apresentada ao ortovanadato de sódio (*vga*) (UCCELLETTI et al., 2000; UCCELLETTI et al., 1999). O mutante *vga3* para o gene *KLOCH1* codifica a enzima α 1,6-manossiltransferase, e essa mutação resultou em glicoproteínas N-ligadas defeituosas, alteração na organização da parede celular com o aumento de quitina, na estrutura dos β -1,6-glicanos, e um decréscimo das manoproteínas. Contudo, os mutantes mostraram maior capacidade em secretar proteínas heterólogas (UCCELLETTI et al., 2006).

O estudo da atividade de transportadores de açúcares em vesículas do Golgi em *K. lactis* também tem gerado grande interesse, um deles é o transportador UDP-N-acetilglicosamina, que transfere N-acetilglicosaminas a cadeias terminais de mananas. A proteína KIGda1p (GDPase) possui essa atividade em *K. lactis*, que possui quatro domínios conservados de apirases com outros nucleosídeos difosfatos. Mutantes nulos da proteína KIGda1p testados mostraram efeitos de inibição de glicosiltransferases que utilizam os nucleosídeos uridina e guanossina, promovem a permeabilização de vesículas do golgi e diminuem eventos de O-glicosilação (LOPEZ-AVALOS et al., 2001). Outro gene de *K. lactis* que codifica proteínas GDPase/UDPase, a KLYnd1p, da família das apirases presentes no Golgi, quando superexpresso é capaz de reverter a perda de O-glicosilação e defeitos na parede celular de células mutantes, aumentar a expressão de proteínas recombinantes em células selvagens e sugerir uma parcial superposição de funções entre os genes *KIGDA1* e *KLYND1* (UCCELLETTI et al., 2007). As apirases Ynd1p (*S. cerevisiae*) são proteínas transmembranas reguladas pela ligação direta do seu domínio citossólico a uma subunidade ativadora da H⁺-ATPase vacuolar, após a assimilação de ATP no lúmen do Golgi, e as ATPases vacuolares regulam o processo do transporte vesicular e a conseqüente liberação extracelular de ATP (ZHONG et al., 2003 e 2000).

O estudo da função de ATPases do Golgi e sua relação com mutantes de *K. lactis* também tem crescido ultimamente. A Ca^{2+} -APTase do Golgi, Pmr1p, é a enzima principal na homeostase de cálcio em leveduras. Em vários trabalhos foi verificado o envolvimento da inativação da KIPmr1p (*K. lactis*) em alterações nas O-glicosilações, na manutenção da parede celular, no metabolismo e integridade mitocondrial, além de interferir na resposta ao estresse oxidativo de proteínas de choque térmico (*Heat-Shock*) e levar a célula a buscar outras vias de resposta ao estresse, como a hiperfosforilação de proteínas da família Hog1p MAPK em *K. lactis* (FARINA et al., 2004; UCCELLETTI et al., 2005).

2.3. Metabolismo de carbono e nitrogênio em condições adversas

Leveduras, como a maioria dos microrganismos, dispõem de uma grande diversidade metabólica e podem usar uma variedade de substâncias como nutriente. Ao diminuir a disponibilidade de um nutriente, a levedura aciona a utilização de outro nutriente. Em condições de estresse nutricional (ausência ou baixa concentração de determinado nutriente), a célula inicia um programa de manutenção e entra em um estado não-proliferativo (WERNER-WASHBURNE et al., 1996; WERNER-WASHBURNE et al., 1993), com o objetivo final de sobreviver ao período de inanição (WINDERICKX et al., 2003).

O metabolismo de nutrientes inicia-se com o seu transporte para o interior da célula. A maioria dos compostos utilizados por *Sacharomyces cerevisiae* não atravessa a bicamada fosfolipídica da membrana plasmática e passa para o citoplasma via transportadores específicos; as exceções são o etanol e o glicerol, capazes de se difundirem livremente. Alguns transportadores mediam a difusão facilitada (ex. transportadores de hexoses), enquanto outros mediam o transporte ativo (ex. transportadores de maltose e lactato) (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004).

Além das proteínas com função de transporte, várias proteínas da membrana plasmática têm sido identificadas e caracterizadas como sistemas sensores a nutrientes: como Snf3p e Rgt2p, proteínas da família dos transportadores de glicose (HXT), que não possuem capacidade de transporte; o receptor acoplado à proteína G, Gpr1, que é ativado na presença de açúcar fermentável; o transportador de alta afinidade de amônio Mep2, que também pode funcionar como um sensor de amônio; e o sensor de

aminoácidos, Ssy1. Esses sensores podem atuar individualmente ou em complexo com outras proteínas (FORSBERG; LJUNGDAHL, 2001).

Dois tipos de sensores extracelulares para compostos nitrogenados presentes na membrana plasmática foram identificados em *Sacharomyces cerevisiae*: o primeiro é um sensor de aminoácidos SPS, sendo ele um complexo multimérico, composto pelas proteínas Ssy1p, Ptr3p e Ssy5p; o segundo é um sensor extracelular de amônio, Mep2p (FORSBERG; LJUNGDAHL, 2001; FORSBERG; LJUNGDAHL, 2001a; FORSBERG et al., 2001).

A amônia é considerada a fonte de nitrogênio preferida por *S. cerevisiae*, mas muitas linhagens utilizando glutamina alcançam igualmente altas velocidades de crescimento (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004). A entrada de amônia na célula é facilitada por três permeases, produtos dos genes *MEP1*, *MEP2* e *MEP3* (MAGASANIK; KAISER, 2002), sendo Mep1p considerada uma permease de afinidade média a íons amônio, Mep3p de menor afinidade, mas com alta capacidade de transporte, e Mep2p é considerada uma permease de alta afinidade, podendo agir como sensor de íons amônio que geram sinais para a indução do crescimento diplóide pseudo-hifal em fontes de amônia limitante (FORSBERG; LJUNGDAHL, 2001a).

Uma vez dentro da célula, a amônia reage com α -cetoglutarato, intermediário do metabolismo de carbono, produzindo glutamato. Esse pode ser convertido em glutamina pela incorporação de um íon amônio. Do total de nitrogênio celular, 85% é originário do nitrogênio da amina do glutamato e 15%, do grupamento amida da glutamina (MAGASANIK; KAISER, 2002; COOPER, 1982).

A utilização de vários compostos nitrogenados depende de permeases, que promovem o transporte desses compostos, e de enzimas para a obtenção de amônia destes (MAGASANIK; KAISER, 2002).

O transporte de aminoácidos através da membrana plasmática é ativo, dirigido por um gradiente de prótons, via permeases relativamente específicas a diferentes aminoácidos; por exemplo, a Agp1p é uma permease geral para a maioria dos aminoácidos não carregados (Ala, Gly, Ser, Thr, Cys, Met, Phe, Tyr, Ile, Leu, Val, Gln e Asn); a Gnp1p, semelhante a Agp1p, possui faixa de especificidade menor, transportando apenas Leu, Ser, Thr, Cys, Met, Gln e Asn; a Bap2p e Bap3p, também semelhantes a Agp1p, são capazes de transportar Ile, Leu, Val, Cys, Met, Phe, Tyr e Trp; Dip5p transporta Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Ala e Gly; Tat2p transporta Phe, Trp e

Tyr; Put4p transporta Ala, Gly e Pro; Can1p, Lyp1p e Alp1p são transportadores específicos para aminoácidos catiônicos (REGENBERG et al., 1999).

O controle do metabolismo de nitrogênio determinado pelos genes transcritos e as enzimas usadas no metabolismo em *S. cerevisiae* ocorrem em resposta à concentração de amônia intra e extracelular (TER SCHURE et al., 1995a) e em resposta à qualidade da fonte de nitrogênio disponível. Isso ocorre para tornar o metabolismo mais eficiente e prevenir a operação de vias metabólicas desnecessárias ou fúteis. Esse fenômeno é denominado repressão catabólica por nitrogênio (NCR) (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004; TER SCHURE et al., 1995). Fatores de transcrição que regulam genes catabólicos de nitrogênio: Gln3 e Gat1/Nil1 são ativadores em condições de nitrogênio limitantes, enquanto Dal80/Uga43 e Deh1/Gzf3 são repressores, ambos da família GATA, sendo Deh1 repressora de genes catabólicos somente em meio rico com glutamina, asparagina ou amônio (WINDERICKX et al., 2003; TER SCHURE et al., 2000; TER SCHURE et al., 1995) (Figura 1).

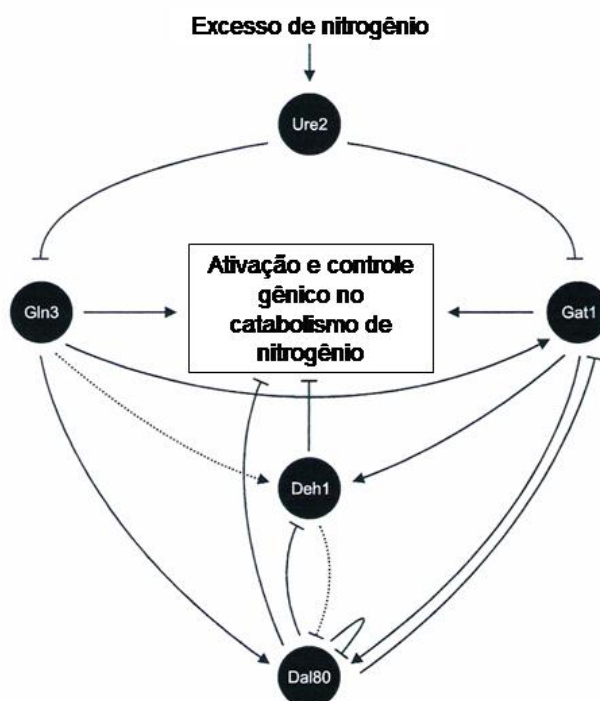


Figura 1 – Circuito regulatório da transcrição dependente de GATA em *S. cerevisiae*.

Fonte: WINDERICKX et al., 2003.

Quando há nitrogênio em excesso, Ure2, uma proteína pró-*prion*, liga-se a Gln3 e Gat1, excluindo-as do núcleo celular; também se liga a genes de transcrição NCR-sensíveis, reprimindo-os (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004; WINDERICKX et al., 2003). Proteínas Tor, Tor1p e Tor2p (*target of rapamycin*), necessárias à resposta ao estresse por nitrogênio (KAWAI et al., 2001), atuam na fosforilação de Gln3 para ligação desta à Ure2, e proteínas Snf1 atuam na transcrição dependente de Gat1 (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004; WINDERICKX et al., 2003). Genes regulados por Gln3, Gat1, Dal80 e Deh codificam permeases gerais ou específicas e enzimas da via metabólica de glutamina, glutamato, prolina, urea, arginina, GABA e alantoína (WINDERICKX et al., 2003) (Figura 2).

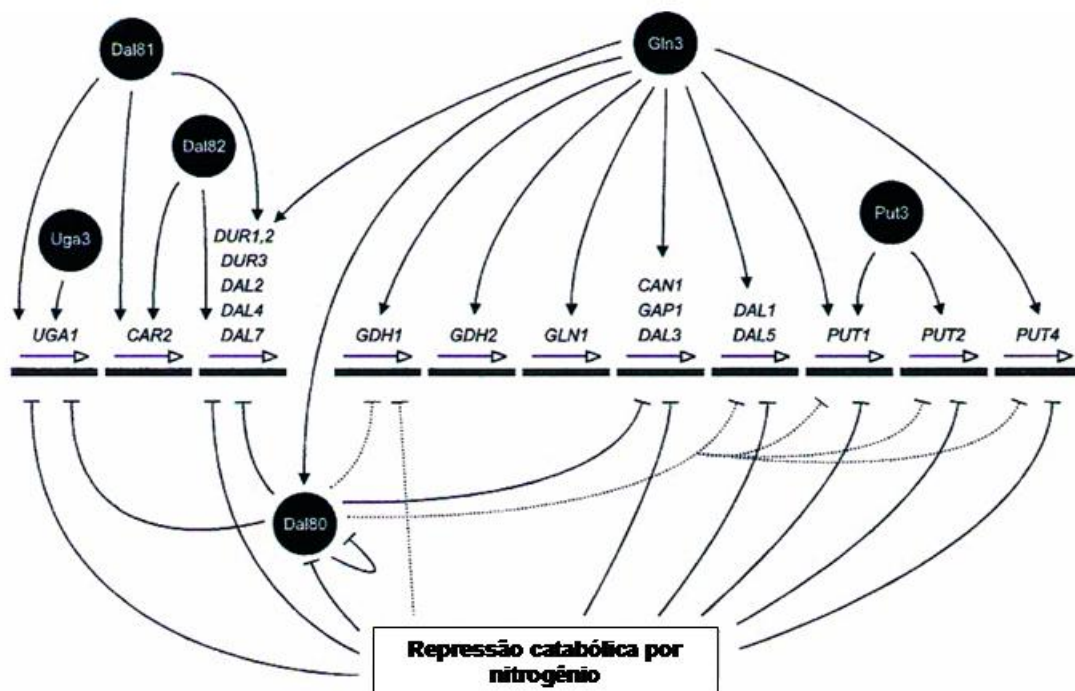


Figura 2 – Gln3p e Dal80p, na regulação da repressão catabólica por nitrogênio.

Fonte: WINDERICKX et al., 2003.

Estudos da via de sinalização TOR em leveduras, *Drosophila* e mamíferos demonstraram que TOR está envolvido no controle do crescimento celular (tanto no número de células quanto no tamanho celular) pela regulação de vários processos, com:

transcrição, tradução, degradação protéica e biogênese ribossomal. *S. cerevisiae* possui dois genes TOR diferentes, denominados *TOR 1* e *TOR 2*, os quais codificam proteínas com massa molecular de aproximadamente 280 kDa, Tor1p e Tor2p. Ambas possuem papel crítico na iniciação da tradução e progressão do ciclo celular em resposta a nutrientes, sendo essas funções inibidas por rapamicina. Tor2p é capaz de regular a polarização do citoesqueleto de actina durante a progressão do ciclo celular (MARTIN; HALL, 2005; INOKI et al., 2005).

Recentemente, dois distintos complexos TOR em leveduras foram identificados, como: complexo TOR 1 (TORC1) contém ou Tor1p ou Tor2p. Além do controlador de crescimento (Kog1p) e de uma proteína letal (Lst8p), TORC1 modula a iniciação da tradução, inibe o *turnover* protéico e reprime a transcrição de genes específicos que são induzidos por inanição de nutrientes; o complexo TOR 2 (TORC2) consiste de Tor2p, Avo1p (se liga a Tor2), Avo2p, Avo3p e Lst8p. TORC2 medeia a reorganização do citoesqueleto de actina (INOKI et al., 2005).

Em leveduras, a via TOR pode ser ativada por fontes de nitrogênio e de carbono, embora a natureza exata dessa regulação ainda não tenha sido esclarecida. O aminoácido glutamina é particularmente importante como fonte de nitrogênio na sinalização de TOR. Glutamina controla a expressão de genes regulados por nutrientes, modulando a localização celular de vários fatores de transcrição responsivos a nutrientes, incluindo Gln3p, Gat1p, Rtg1p, Rtg3p e Msn2p-Msn4p. A inanição de glutamina ativa somente Gln3p e Rtg1p-Rtg3p, indicando que outros nutrientes sinalizam para a regulação de Gat1p e Msn2p-Msn4p (CRESPO et al., 2002).

Alterando a fonte de carbono de um meio de cultura de fermentável (ex. glicose) para não-fermentável (ex. etanol), um grupo de genes de repressão catabólica é induzido, os quais também são ativados pela mudança na fonte de nitrogênio de alta para baixa qualidade (WINDERICKX et al., 2003).

A falta de carbono causa a localização de Gln3 no núcleo e o aumento na transcrição de genes NCR-sensíveis. Devido ao efeito indireto do metabolismo de nitrogênio, Gln3 não se desloca para o núcleo de uma célula em inanição de carbono se a glutamina é a fonte de nitrogênio em vez da amônia. A proteína Snf1 reguladora global do metabolismo de carbono está envolvida na regulação intracelular de Gln3 e Gat1 (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004). Tor1p e Tor2p podem agir como sensores de carbono ou sensores de qualidade de fontes nitrogenadas. A conexão entre o metabolismo de carbono e nitrogênio é evidente na aminação redutiva de α -cetoglutarato pela enzima glutamato desidrogenase NADPH dependente, codificada pelo gene *GDH1*

(WINDERICKX et al., 2003). Mas a interconexão entre as fontes podem ser mais complexas; genes sensíveis à repressão catabólica por nitrogênio estão sujeitos e envolvidos numa complexa matriz regulatória do metabolismo geral (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004).

Situações de estresses influenciam diretamente a tradução, expressão, translocação, processamento e enovelamento (no retículo endoplasmático e Golgi), secreção de proteínas, como também a reciclagem protéica por proteólise (MATTANOVICH et al., 2004). O correto direcionamento para organelas específicas permite que as proteínas possam exercer suas funções, sofrer modificações pós-traducionais e, ou, ter seus resíduos reciclados. A translocação é determinada pela sequência *N*-terminal da proteína nascente, o peptídeo sinal, que permite o reconhecimento pela maquinaria celular e o encaminhamento. Durante o processo, peptidases sinal clivam o peptídeo, tornando a proteína nascente madura (YODA; NODA, 2001).

Os processos de secreção e glicosilação (modificação pós-traducional) possuem importante papel na coordenação apropriada entre a arquitetura e dinâmica da parede celular e da manutenção das atividades celulares, que resultam no crescimento e integridade da célula. A conexão entre morfogênese e tais processos é bem exemplificada pelo estudo de mutantes *mcd* (*morphogenesis checkpoint defect*): muitos dos quais correspondem a genes envolvidos nos passos de glicosilação no retículo endoplasmático ou no Golgi (MONDÉSERT et al., 1997).

Proteínas secretadas, de superfície celular, e proteínas destinadas para endossomos ou lisossomos são separadas e marcadas para o destino correto no Golgi. Existem múltiplas vias de tráfico de proteínas em leveduras, como ilustrado na Figura 3.

As proteínas são secretadas do Golgi em vesículas diretamente para membrana plasmática. Na via endocítica, as proteínas podem ser secretadas ou marcadas para a superfície celular, ou transportadas para endossomos. A via CPY (*hidrolase carboxipeptidase Y vacuolar*) direciona proteínas do endossomo/corpo multivesicular (MVB) para o vacúolo. A via CPY e a via endocítica convergem ou para endossomo ou para o MVB. Proteínas transmembranas destinadas ao lúmen vacuolar são separadas dentro das membranas internas do MVB, por exemplo. Ste2p – degradada no vacúolo, e CPS – hidrolase vacuolar. Proteínas destinadas à membrana do vacúolo, como a V-ATPase (Vph1p), não são separadas dentro dessas vesículas luminiais. A via ALP separa proteínas tal qual ALP (fosfatase alcalina) e Vam3p para o vacúolo a partir do Golgi, desviando da rede endossomal (BOWERS; STEVENS, 2005).

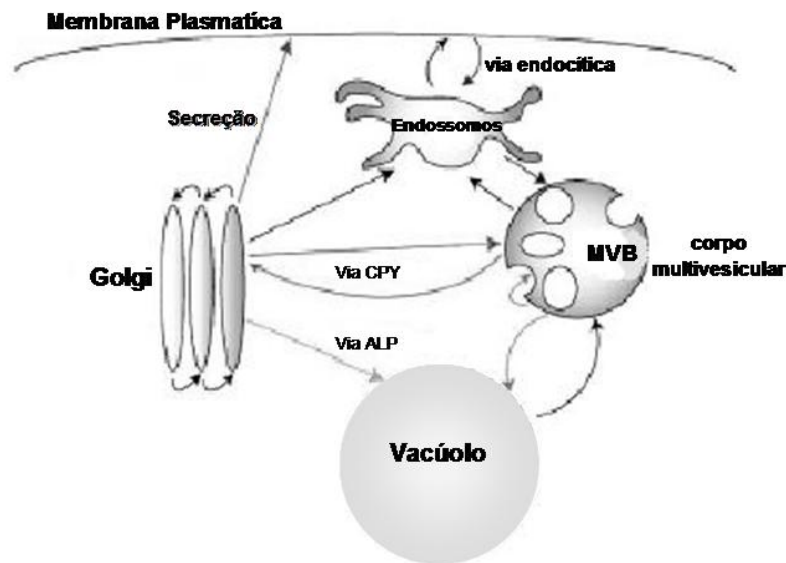


Figura 3 – Vias de tráfico de proteínas em leveduras.

Fonte: BOWERS; STEVENS, 2005.

O direcionamento da permease geral de aminoácido, Gap1p, de *S. cerevisiae* para a membrana plasmática é regulada pela qualidade da fonte de nitrogênio no meio de cultivo. Mutações em *GDH1* e *GLN1* diminuem o fluxo da via de síntese de glutamato e glutamina, o que resulta em aumento no encaminhamento de Gap1p para a membrana plasmática. A deleção do gene *MKS1* que codifica uma proteína citoplasmática envolvida na via de biossíntese de lisina, metabolismo de nitrogênio e sinalização, aumenta a síntese de glutamato e glutamina e diminui o encaminhamento de Gap1p para a membrana plasmática. Glutamato e glutamina não são únicos na regulação do endereçamento de Gap1p, e a adição de todos os aminoácidos naturais e de muitos análogos em meio de cultura resulta no aumento do direcionamento de Gap1p para o vacúolo (CHEN; KAISER, 2002).

Proteínas secretáveis que possuem defeitos significantes no enovelamento do polipeptídeo nascente ou no agrupamento das subunidades são frequentemente retidas no retículo endoplasmático (RE) para posterior degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Entretanto, existem evidências de que compartimentos posteriores ao RE participam no controle de qualidade na via secretória: a partir do Golgi, substratos marcados para a degradação podem retornar pelo transporte retrógrado ao RE pela rota ERAD (RE associado à degradação) e ser marcados diretamente no sistema endossomal

para a rota de degradação vacuolar/lisossomal, ou podem ser direcionados à membrana plasmática para depois serem entregues à rota de degradação vacuolar/lisossomal. Também, é possível que uma parcela das proteínas recém-sintetizadas enviadas para secreção e que proteínas da membrana plasmática podem utilizar endossomos primários como rota biossintética intermediária durante seu primeiro passo, através do sistema de endomembranas na rota para a superfície celular; em cada caso, esse intermediário endossomal pode servir como sítio inicial de marcação para controle de qualidade na via secretória (ARVAN et al., 2002).

Em resposta à inanição por nitrogênio, as leveduras exibem dois programas de desenvolvimento, pseudo-hifal e esporulação. Ambos os programas de resposta são reprimidos pela ativação da via UPR (*unfolded protein response*), uma via de transdução do sinal de estresse no RE, responsável pela indução de chaperones residentes no RE. As proteínas com enovelamento incorreto são sequestradas por proteínas transmembranas cinase/endorribonuclease tipo I, Ire1p, resultando em sua dimerização e autofosforilação; em leveduras, a Ire1p cliva o mRNA do fator transcricional Hc1p, fator esse que ativa a transcrição de genes de chaperones residentes no RE (*KAR2*, *PDI11* e *LHS1*). Globalmente, a via UPR regula a transcrição de 381 ORFs (*open reading frame*) em resposta ao estresse no RE, com a ressalva de que aproximadamente 100 ORFs induzidas pela UPR no estresse não possuem nenhuma conexão conhecida com a via secretória. As principais causas de estresse no RE são a expressão de proteínas mutantes e o enovelamento incorreto de proteínas.

A atividade da UPR é também detectada em células consideradas não-estressáveis ou em crescimento vegetativo, sugerindo a existência de uma atividade basal da via UPR nessas células. A atividade basal está relacionada à sensibilidade a nutriente e ao controle da resposta celular a flutuações na concentração de nutrientes. O nível de *splicing* de *HCA1* mRNA, em leveduras em crescimento exponencial, correlaciona com a qualidade da fonte de carbono, sendo também regulado por nitrogênio. Em fontes ricas de nitrogênio *HCA1*, mRNA é processado e o seu *splicing*, imediatamente parado após a indução por inanição de nitrogênio (Figura 4) (SCHRÖDER et al., 2000; SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005).

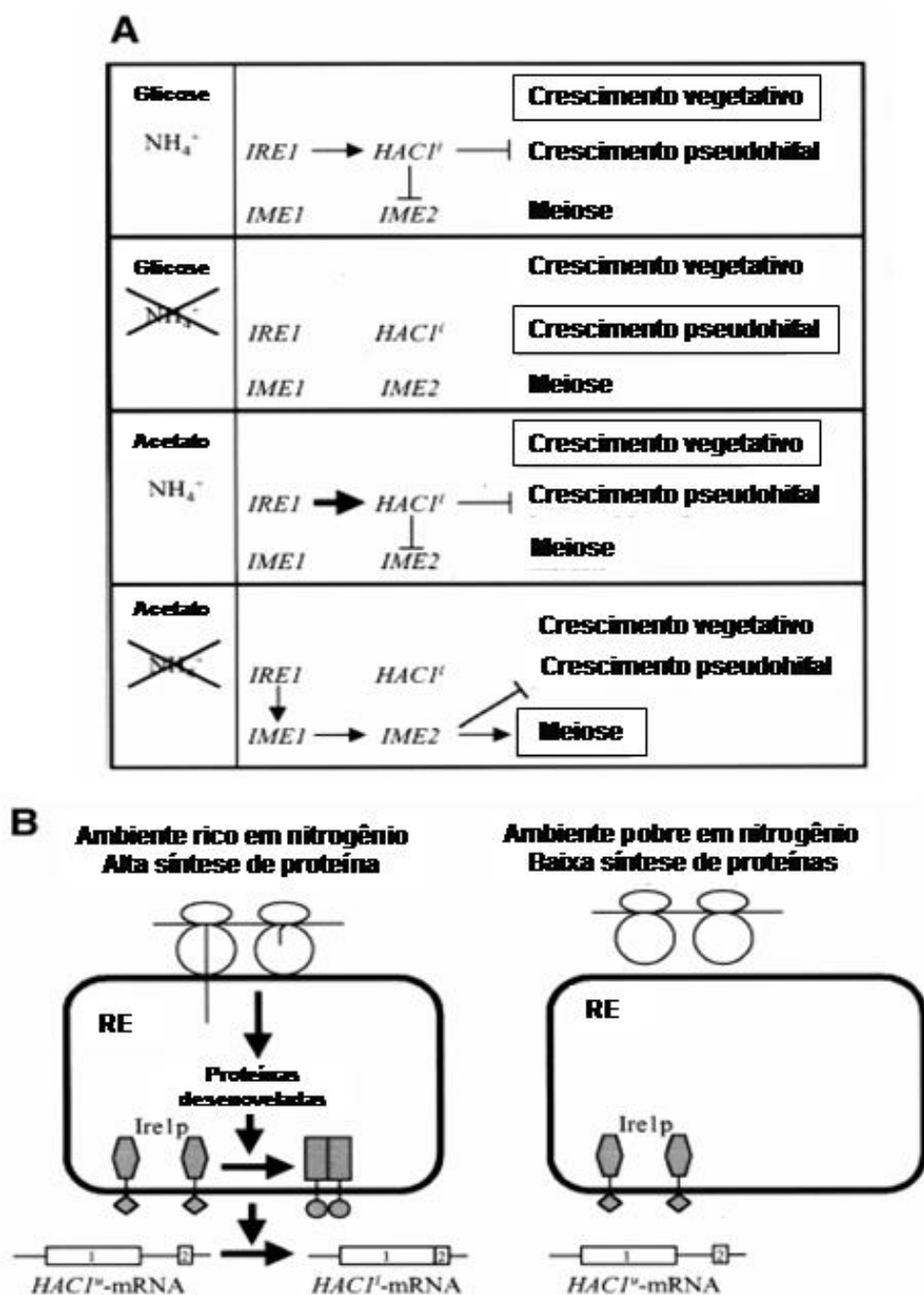


Figura 4 – **Regulação da resposta à inanição por nitrogênio pela via UPR.** (A) A fonte de carbono presente ou ausente é mostrada na coluna esquerda. A coluna da direita mostra como UPR regula o programa de desenvolvimento de células diplóides sob cada condição. O resultado é mostrado em negrito nas caixas. As setas indicam para a via de ativação e os traços, para a via inibitória. (B) Modelo de via sensível a nitrogênio, incluindo a tradução e proteína desenovelada no RE.

Fonte: SCHRÖDER et al., 2000.

É importante identificar, portanto, como a fisiologia da célula desprovida de nutrientes influencia a secreção extracelular. Isso significa identificar o conjunto de proteínas, cuja expressão e localização estariam associadas a uma condição fisiológica que precisa ser identificada para subsidiar estratégias futuras de utilização dessa levedura. O proteoma extracelular de *K. lactis*, além de contribuir para o entendimento da resposta global ao estresse nutricional, pode substanciar estratégias futuras para a construção de um vetor de expressão e secreção de proteínas de interesse. Nesse sentido, culturas de *K. lactis* conduzidas sob condições de estresse nutricional em regime de cultura contínua devem revelar um padrão de proteínas secretadas, induzido pelo estresse (BURKOVSKI, 2003; GONZALEZ-LOPEZ et al., 2002; TER SCHURE et al., 1995).

Com o avanço das técnicas proteômicas, nas quais pequenas quantidades de proteínas podem ser identificadas e mudanças pós-traducionais ser observadas, essas técnicas se tornaram ideais para serem utilizadas na análise do conjunto de proteínas extracelulares de culturas de leveduras, pois poderão indicar a resposta fisiológica global da levedura ao estresse nutricional imposto pela cultura contínua. A identificação dessas proteínas em diferentes condições fisiológicas fornecerá informações sobre a influência do *status* nutricional sobre o controle da via de secreção de proteínas. Essas análises poderão revelar também proteínas de interesse farmacológico e, ou, industrial, bem como auxiliar a otimização das condições necessárias para produção dessas proteínas com o máximo rendimento.

Neste trabalho são mostrados diversos perfis de proteínas extracelulares de culturas de *Kluyveromyces lactis* submetidas a duas velocidades específicas de crescimento, ou seja, sob estados fisiológicos definidos por estresse nutricional. As proteínas extracelulares obtidas em diferentes velocidades específicas de crescimento e as mudanças pós-traducionais observadas foram identificadas por meio de técnicas de proteômica e ferramentas de bioinformática, cujos resultados ampliam as perspectivas de estudar o secretoma de *K. lactis* e correlacioná-lo à sua fisiologia e, assim, explorar plenamente o potencial industrial da *K. lactis* na produção de proteínas de interesse biotecnológico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Células e condições de cultivo

A levedura utilizada foi a linhagem de *Kluyveromyces lactis* CBS 2359 proveniente do “Laboratoire de Génétique et Physiologie, Institut de Génétique et Microbiologie – Université Paris-Sud, Orsay/France”, laboratório participante do consórcio francês formado para seqüenciar o genoma dessa levedura. *K. lactis* foi mantida estocada em YPD (40% de glicerol) a -80 °C, no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos - BIOAGRO/UFV, e foi ativada em YCB (Sigma[®], ST Louis/USA) adicionado da fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) e incubada em agitador rotacional a 200 rpm, na temperatura de 30 °C.

Os parâmetros cinéticos (μ_{MAX} e K_S) foram determinados, segundo Monod (1949), em culturas conduzidas em regime de batelada, em diferentes concentrações de sulfato de amônio (0 a 5 g.L⁻¹). O crescimento celular foi acompanhado em espectrofotômetro pela leitura de densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}). O cálculo dos parâmetros cinéticos (μ_{MAX} e K_S) foi feito pelo Programa Sigma Plot 8.0 (Systat Software Inc., Califórnia/USA).

O cultivo em regime contínuo foi realizado na temperatura de 30 °C e agitação de 200 rpm utilizando o fermentador Bioflo III (New Brunswick Scientific, New Jersey/USA), com volume de trabalho de 1 L. A cultura contínua foi desenvolvida nas velocidades específicas de crescimento de 0,03 h⁻¹ e 0,09 h⁻¹, usando o meio de cultura sintético YCB acrescido de 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio). As

amostragens foram feitas em regime permanente após 10 gerações. A correlação da densidade ótica com o peso da matéria seca foi determinada pela equação: peso seco (g) = (DO₆₀₀-0,0601)/1885,9.

3.2. Consumo de glicose e produção de proteínas extracelulares

O consumo de glicose nas amostras foi determinado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, HP 1050M) – Hewlett Packard série 1050, detector HP1047A, utilizando coluna BIORAD aminex HPX-874 (300 mm x 7,8 mm), eluente H₂SO₄ 0,005 M e fluxo 0,7 mL/min a 60 °C. Na montagem dos métodos e da curva-padrão foram preparados padrões de 2,5 mM, 6,5 mM, 10,0 mM, 12,5 mM e 20,0 mM de glicose. Com os dados obtidos na cromatografia, os parâmetros de rendimento celular ($Y_{X/S}$), rendimento de proteína extracelular por biomassa ($Y_{P/X}$) e rendimento de proteína extracelular por glicose ($Y_{P/S}$) foram calculados segundo o descrito por Bailey e Ollis (1986).

$$Y_{X/S} = \frac{\text{massa celular final (g. L}^{-1}) - \text{massa celular inicial (g. L}^{-1})}{[\text{glicose}] \text{ final (g. L}^{-1}) - [\text{glicose}] \text{ inicial (g. L}^{-1})}$$

$$Y_{P/X} = \frac{[\text{proteína}] \text{ final (g. L}^{-1}) - [\text{proteína}] \text{ inicial (g. L}^{-1})}{\text{massa celular final (g. L}^{-1}) - \text{massa celular inicial (g. L}^{-1})}$$

$$Y_{P/S} = \frac{[\text{proteína}] \text{ final (g. L}^{-1}) - [\text{proteína}] \text{ inicial (g. L}^{-1})}{[\text{glicose}] \text{ final (g. L}^{-1}) - [\text{glicose}] \text{ inicial (g. L}^{-1})}$$

Para a obtenção das proteínas extracelulares, a cultura foi centrifugada a 10.000 g por 10 min a 4 °C; ao sobrenadante obtido foram adicionados inibidores de proteases (pesptatina A - 1 µM, EDTA - 10 mM, PMSF - 1 mM, iodoacetamida - 10 µM). Esse material protéico extracelular (sobrenadante) foi ultrafiltrado e concentrado no sistema da AMICON®, utilizando-se membranas de 3.000 Da. Após essa fase, o material foi dializado 150 vezes em tampão acetato de sódio 50 mM, utilizando-se membranas de diálise de 1.000 Da. A determinação da concentração de proteína total das amostras foi estimada pelo método descrito por Bradford (1976), usando-se solução de 0,2 mg/mL BSA para a obtenção de uma curva-padrão de 5 µg a 25 µg de proteína.

3.3. SDS-PAGE e ensaio de glicosilação

A complexidade dos extratos protéicos extracelulares foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) gradiente de 5 a 15% (WESTERMEIER, 2001), nas condições diferenciadas de estresse nutricional, seguindo-se a metodologia de Laemmli (1970). O gel foi corado pela coloração coloidal com *Coomassie Blue* R-250 (NEUHOFF et al., 1988). A coloração coloidal utilizada nos experimentos de SDS-PAGE foi escolhida de acordo com o menor *background* produzido, pelo fato de a sua sensibilidade estar em torno de 10 a 30 ng e pela compatibilidade com a técnica de espectrometria de massa (KANG et al., 2002; PATTON, 2002; WESTERMEIER, 2001; NEUHOFF et al., 1988).

Os padrões de massa molecular utilizados foram adquiridos de duas empresas distintas: um da Sigma[®], contendo seis bandas distribuídas na faixa de 29 a 200 kDa (código SDS6H2 - Sigma[®], ST Louis/USA); e o outro da Invitrogen[®], contendo 15 bandas distribuídas na faixa de 10 a 220 kDa (“Bench Mark[™] Protein Ladder” - Carlsbad, California/USA).

As amostras foram aplicadas no SDS-PAGE com ou sem tratamento de redução e alquilação, de acordo com o método modificado de Stone e Willians (1996). O tratamento de redução e alquilação consiste, resumidamente, em dissolver as amostras (liofilizadas) em 20 µL de tampão NH₄HCO₃ 0,4 M contendo uréia 8 M; posteriormente, 5 µL de DTT 45 mM foram adicionados e as amostras, incubadas a 50 °C durante 15 min. Após o resfriamento, foram adicionados 5 µL de iodoacetamida 100 mM às amostras, que foram novamente incubadas por 15 min à temperatura ambiente, no escuro.

Após a corrida eletroforética, as bandas coradas pelo método coloidal e amostras reduzidas e alquiladas foram excisadas individualmente do gel, com o auxílio de lâmina de bisturi n° 15, e, posteriormente, tratadas com a enzima tripsina (Promega[®], Madison, Wisconsin, USA). Os peptídios resultantes da tripsinólise de cada amostra foram dessalinizados através de micropurificação em *PerfectPure[™] C-18 tip* (Barkhausenweg, Hamburg, Germany), seguindo-se recomendações dos fabricantes e, posteriormente, analisados por espectrometria de massa. Como padrão foi utilizada uma caliceína tissular de rato, gentilmente cedida pelo professor Amintas Figueredo, da Faculdade de Farmácia da UFMG.

A presença de proteínas glicosiladas no extrato protéico foi verificada pelo ensaio de glicosilação, de acordo com o método de coloração para géis de poliacrilamida com ácido periódico de Shiff (PAS), descrito por Fairbanks et al. (1971).

3.4. Análise do extrato protéico extracelular em cromatografia líquida bi-dimensional (LC-2D)

Os extratos protéicos extracelulares foram submetidos à separação por cromatografia líquida bi-dimensional (LC-2D) *off-line* em sistema ÄKTA Explorer 100 (GE Healthcare® - Waukesha, Wisconsin, USA). Como primeira dimensão, utilizou-se cromatografia de troca aniônica em coluna SOURCE 15Q (GE Healthcare®); na segunda dimensão, empregou-se cromatografia de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC (GE Healthcare®). As amostras obtidas na cromatografia bi-dimensional foram analisadas por técnicas de espectrometria de massa.

As cromatografias foram conduzidas em temperatura ambiente. A cromatografia de troca iônica em coluna SOURCE 15Q foi conduzida utilizando-se tampão citrato 50 mM, pH 5,4. As amostras foram eluídas empregando-se tampão citrato 50 mM, pH 5,4, com 1 M de NaCl. A cromatografia de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC foi conduzida utilizando-se solução de TFA 0,1% e a eluição feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1%. Os perfis cromatográficos foram acompanhados pela leitura de absorvância a 280 nm e 215 nm.

As amostras provenientes do LC-2D também foram posteriormente reduzidas, alquiladas e tripsinolizadas (STONE; WILLIAMS, 1996). Os peptídios resultantes da tripsinólise de cada amostra foram dessalinizados através de micropurificação em ZipTips® C18, seguindo-se recomendações dos fabricantes e, posteriormente, analisados por espectrometria de massa.

O sistema ÄKTA Explorer 100 pertence ao Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas (Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais).

3.5. Espectrometria de massa

Para as análises de espectrometria de massa, utilizou-se o Espectrômetro de Massa sistema MALDI-TOF-TOF MS (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics,

Handelsregister, Bremen, Germany). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz. Foram utilizadas diferentes matrizes específicas para cada circunstância de análise em uma placa MTP *AnchorChip* 800/384 (Bruker Daltonics).

Nas análises com o equipamento MALDI, utilizaram-se matrizes específicas para cada circunstância de análise: AS (ácido sinapínico) – utilizada para peptídios e proteínas grandes (10-150 kDa), além de glicoproteínas; CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) – utilizada para peptídios menores que 8 kDa, lípidos e carboidratos; DHB (ácido gentísico) - utilizada para peptídios, proteínas, carboidratos, glicoproteínas, glicolipídeos, polímeros, lipídios e moléculas orgânicas em geral (WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

Os espectros de massa (MS) e espectros de massa em *tandem* (MS/MS) foram obtidos no modo positivo, e o modo de operação da aquisição foi *Linear*, *Laser repetition rate* a 50 Hz, *Ion source voltage 1* a 20 kV, *Ion source voltage 2* a 18,3 kV, *Ion source lens voltage* 6,75 kV e *number of shots* de 200. Para a fragmentação de peptídios tripsinolisados no PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*), foi empregado o método CID (*Collision induced dissociation*).

Os resultados da espectrometria foram obtidos na forma da razão massa/carga para cada amostra, utilizando-se o programa FlexControl 3.0. As análises dos conjuntos de dados adquiridos foram feitas com o auxílio dos programas FlexAnalysis 3.0 e Biotoools 3.0 (conjunto de ferramentas de análise de espectros de massas, exemplo *software* MASCOT[®]). O aparelho foi calibrado com padrões externos (*Protein Calibration Standard* I e IV - Bruker Daltonics).

O perfil de massa molecular de cada amostra (proveniente do SDS-PAGE e do LC-2D) obtida por MS e MS/MS foi submetido à análise comparativa, utilizando-se o *software* MASCOT[®] (PERKINS et al., 1999), o qual também compara massas de peptídios observados com um banco de dados disponível de massas virtuais de peptídios de proteínas proteolisadas *in silico* e faz a identificação das proteínas mais prováveis correspondentes às massas dos peptídios observados. Esse tipo de análise que foi utilizado denomina-se *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF). O banco de dados *Swissprot* 54.4 foi usado nas análises, limitando-se as buscas por taxonomia ao reino Fungi (19.094 seqüências).

O espectrômetro de massa utilizado pertence ao Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas (Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais).

3.6. Análise *in silico*

Inicialmente, as proteínas contendo peptídio sinal, destinadas à via secretória em *K. lactis*, foram identificadas com o auxílio do banco de dados das proteínas codificadas no genoma (*release 2*, <http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/KLLA>) (BRUSTOLINI et al., 2005). A partir do conjunto de dados *in silico* das proteínas possivelmente secretadas de *K. lactis*, a massa molecular das proteínas foram calculadas na presença e ausência do peptídio sinal (Anexo). Os dados foram obtidos pela submissão das seqüências ao programa *Signal P*, e posteriormente as seqüências dos peptídios sinais foram retiradas e as massas molecular das proteínas, calculadas a partir do programa *Compute pI/MW* (<http://www.expasy.org/tools/>). As ferramentas de busca e análise comparativas de proteínas estão disponíveis na rede mundial de computadores: Expasy Ferramentas Proteômicas: <http://us.expasy.org/tools/>; Instituto Suíço de Bioinformática: <http://www.isb-sib.ch/>; Instituto Europeu de Bioinformática: <http://www.ebi.ac.uk/proteome> (WESTERMEIER; NAVEN, 2002). Essas ferramentas de análise proteômicas também foram utilizadas para prever a massa molecular e mudanças pós-traducionais das proteínas possivelmente secretadas. Os dados da análise *in silico* foram comparados com as massas averiguadas nas proteínas extracelulares caracterizadas por LC-2D/MS.

4. RESULTADOS

4.1. Consumo de glicose e produção de massa celular e proteínas extracelulares sob limitação nitrogênio

A levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2359 foi cultivada em YCB em diferentes concentrações de sulfato de amônio, possibilitando o cálculo dos parâmetros cinéticos. A velocidade máxima (μ_{Max}) observada foi de $0,34 \text{ h}^{-1}$ e a constante de saturação (K_s), de $0,0168 \text{ g.L}^{-1}$ (Anexo). A levedura em regime de cultura contínua nas velocidades de crescimento de $0,03 \text{ h}^{-1}$ e $0,09 \text{ h}^{-1}$ em meio YCB acrescido de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio (p/v) foi analisada quanto à produção de biomassa e de proteínas extracelulares e ao consumo de glicose, sendo, então, os rendimentos calculados (Tabela 1).

Tabela 1 – Consumo de glicose, produção de proteína extracelular e biomassa em cultura contínua de *K. lactis* sob regime permanente, em diferentes velocidades específicas de crescimento

$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Glicose consumida (mM)	pH	Proteína secretada (mg.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)
0,03	62,49	4,5	0,89	0,95	$9,36 \times 10^{-4}$	0,08	$7,9 \times 10^{-5}$
0,09	24,49	4,4	1,54	0,57	$2,7 \times 10^{-3}$	0,129	$3,3 \times 10^{-4}$

4.2. Caracterização das proteínas extracelulares em SDS-PAGE e MS

Os extratos protéicos extracelulares de *K. lactis* foram submetidos a uma SDS-PAGE gradiente 5-15%. As amostras sem tratamento de redução-alquilação, que foram aplicadas no gel de poliacrilamida, mostraram um padrão de bandas bem distinto entre as obtidas nas diferentes velocidades específicas de crescimento de cultivo (Figura 5-A).

No teste de glicosilação, pôde-se verificar que quase todas as proteínas coradas pelo *Coomassie* coloidal também coraram com o PAS, mostrando a presença de proteínas glicosiladas nas amostras provenientes das duas velocidades específicas de crescimento, $0,03\text{ h}^{-1}$ e $0,09\text{ h}^{-1}$ (Figura 5-B).

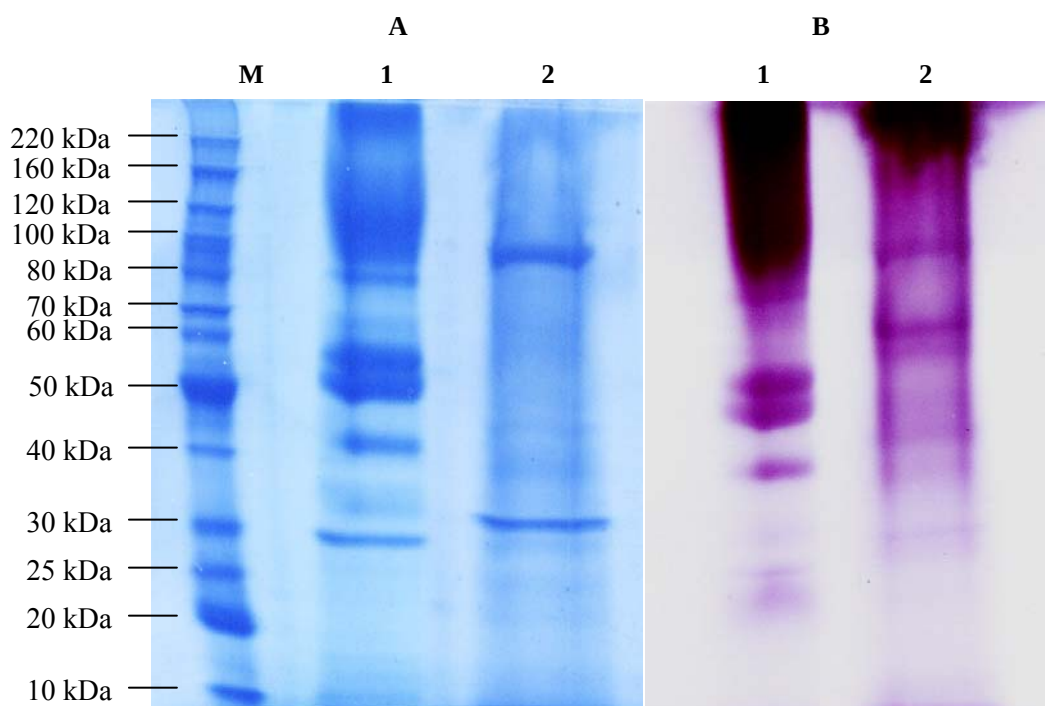


Figura 5 – **Perfil protéico extracelular em SDS-PAGE 5-15%.** **A** - Coloração coloidal com *Coomassie* Blue R-250. **B** - Coloração PAS. Canaleta M – Marcador de massa molecular Invitrogen®. Canaleta 1 – Amostra da cultura de *K. lactis* em crescimento a $0,09\text{ h}^{-1}$ (15 μg). Canaleta 2 – Amostra da cultura de *K. lactis* em crescimento a $0,03\text{ h}^{-1}$ (15 μg).

As amostras que foram aplicadas no gel de poliacrilamida após o tratamento de redução e alquilação também mostraram um perfil eletroforético bem distinto entre as amostras obtidas nas diferentes velocidades específicas de crescimento e perfil semelhante ao das amostras sem o tratamento de redução-alquilação (Figura 6). A proteína calicreína (Figura 6, canaletas 3 e 4) foi utilizada como controle positivo nesta análise e também passou pelo mesmo processo de alquilação e redução.

As bandas assinaladas na Figura 6 (**a**, **b** e de **a'** a **f'**) foram recortadas individualmente do gel e posteriormente tratadas com a enzima tripsina. Os peptídios resultantes da tripsinólise de cada amostra foram analisados por espectrometria de massa (PMF), utilizando-se o sistema MALDI-TOF-TOF MS.

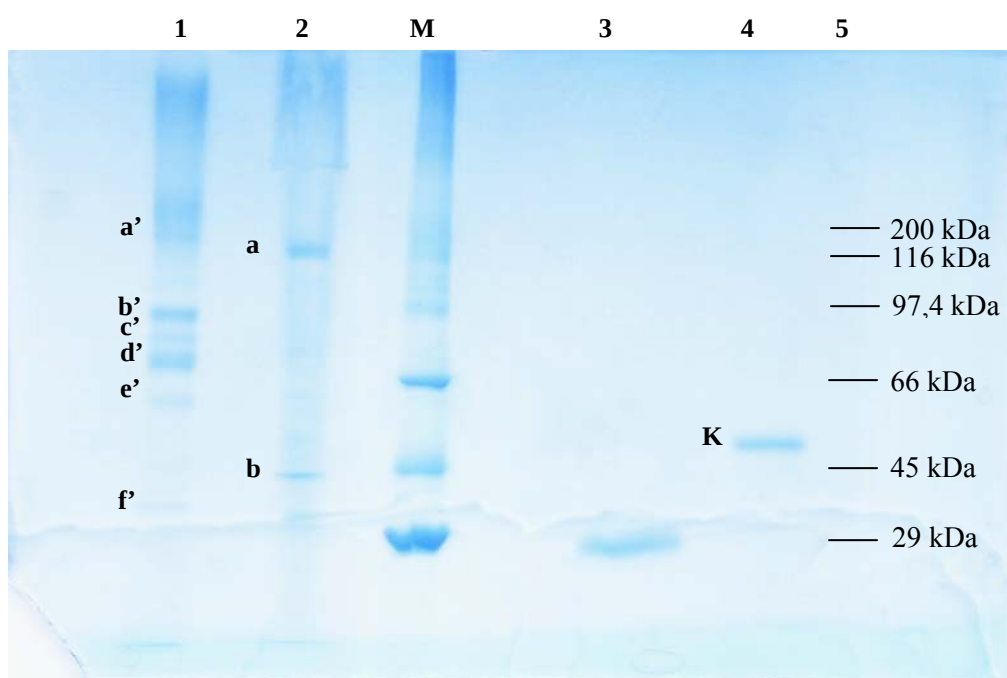


Figura 6 – **Perfil em SDS-PAGE 5-15% das proteínas extracelulares reduzidas e alquiladas.** Canaleta 1 – Amostra da cultura de *K. lactis* em crescimento a $0,09 \text{ h}^{-1}$ (15 μg , reduzida e alquilada). Canaleta 2 – Amostra da cultura de *K. lactis* em crescimento a $0,03 \text{ h}^{-1}$ (15 μg , reduzida e alquilada). Canaletas M e 5 – Marcador de massa molecular Sigma®. Canaleta 3 – calicreína (10 μg - controle). Canaleta 4 – calicreína (10 μg - controle, (15 μg , reduzida e alquilada). Em negrito, **a'** a **f'**; **a**, **b** e **K** indicam as amostras que foram excisadas do gel. Coloração coloidal com *Coomassie Blue R-250*.

Avaliando a amostra-controle, pode-se observar que, quando reduzida e alquilada, a massa molecular aparente da proteína é alterada, demonstrando que os ensaios realizados foram efetivos, e a identificação após MS e MS/MS, utilizando o *software* MASCOT[®], confirmou a identidade da proteína-controle.

As massas moleculares dos peptídios obtidas a partir das bandas do gel, após serem exisadas e tripsinolizadas individualmente, por espectrometria de massa com a técnica de PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*), foram analisadas com o *software* MASCOT[®] e estão relacionadas na Tabela 2 e no Anexo.

4.3. Caracterização das proteínas extracelulares por LC - 2D e MS

As amostras provenientes das duas velocidades específicas de crescimento ($0,03\text{ h}^{-1}$ e $0,09\text{ h}^{-1}$) também foram analisadas por técnicas diferentes de cromatografia líquida bi-dimensional (LC-2D) em sistema ÄKTA Explorer 100 (Amersham[®]). A análise consistiu de duas etapas de separação das proteínas extracelulares presentes nas amostras provenientes de cada velocidade específica de crescimento.

4.3.1. Análise das proteínas extracelulares das culturas em crescimento a $0,03\text{ h}^{-1}$

As amostras coletadas na cromatografia de troca iônica em coluna SOURCE 15Q foram reunidas em seis frações (Figura 7). A primeira fração (**F1**) é formada pelo grupo das proteínas eluídas no volume de 1,50 a 4,49 mL, a segunda fração (**F2**) pelas proteínas eluídas no volume de 4,50 a 8,99 mL, a terceira (**F3**) pelas proteínas eluídas no volume de 23,54 a 26,54 mL, a quarta (**F4**) pelas proteínas eluídas no volume de 26,55 a 29,54 mL, a quinta (**F5**) pelas proteínas eluídas no volume de 40,05 a 46,05 mL e a sexta (**F6**) pelas proteínas eluídas no volume de 54,19 a 57,20 mL. Cada fração foi submetida, separadamente, a uma cromatografia de fase reversa em coluna RESOURCE[™] RPC, para isolar um maior número de proteínas (Figuras 8, 9, 10, 12, 14 e 15).

Tabela 2 – Proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* retiradas do SDS-PAGE e identificadas por PMF em MALDI-TOF-TOF (análise pelo software MASCOT)

Amostra	Proteína	Score	Massa (Da)*	Convergência de sequência	Função Provável
0,03 h ⁻¹ -a	COX_CANGA (Cytochrome c oxidase assembly protein COX) de <i>Candida glabrata</i>	40	9.956	70%	no metabolismo respiratório
	CENPA_KLULA (Histone H3-like centromeric protein CSE4) de <i>K. lactis</i>	27	21.396	40%	na replicação e divisão celular
	MED21_KLULA (Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 21) de <i>K. lactis</i>	26	16.595	55%	regulatória da transcrição
0,03 h ⁻¹ -b	NAM7_YEAST (ATP-dependet Helicase NAM 7) de <i>S. cerevisiae</i>	47	110.445	13%	na transcrição
	SET2_KLULA (Histone- lysine N-methyltransferase) de <i>K. lactis</i>	28	82.212	14%	na elongação e repressão da transcrição
	RL24_KLULA (60S ribosomal protein L 24) de <i>K. lactis</i>	25	17.579	29%	—
0,09 h ⁻¹ -a'	PRP28_PHANO (Pre-mRNA splicing ATP-dependent RNA helicase PRP28) de <i>Phaeosphaeria nodorum</i>	36	83.484	ND	envolvida na transcrição
	PAN2_KLULA (PAB-dependent poly (A)-specific ribonuclease subunit PAN2) de <i>K. lactis</i>	27	130.769	4%	Como exonuclease e envolvimento na maturação pós-transcricional da cauda poli-A do mRNA
	G3P1_KLULA (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1) de <i>K. lactis</i>	25	35.416	7%	No metabolismo de carboidrato

Continua...

Tabela 2 – Cont.

Amostra	Proteína	Score	Massa (Da)*	Convergência de sequência	Função Provável
0,09 h ⁻¹ -b'	ATG11_NEUCR (<i>Autophagy-related protein 11</i>) de <i>Neurospora crassa</i>	33	147.641	ND	na degradação de proteínas
	ATG2_KLULA (<i>Autophagy-related protein 2</i>) de <i>K. lactis</i>	29	170.153	5%	no transporte vacuolar, na complementação de autofagossomas e na degradação peroxissomal
	PEX22_KLULA (<i>Peroxisome assembly protein 22</i>) de <i>K. lactis</i>	21	18.023	23%	na biogênese peroxissomal
	DPH1_KLULA (<i>Diphthamide biosynthesis protein 1</i>) de <i>K. lactis</i>	21	48.641	11%	na biossíntese de diftamida, a qual é uma modificação pós-traducional na histidina que ocorre na elongação
0,09 h ⁻¹ -c'	TCM62_YEAST (<i>Mitochondrial chaperone TCM62</i>) de <i>S. cerevisiae</i>	35	64.896	ND	Como chaperonina
	DUO1_KLULA (<i>DASH complex subunit DUO 1</i>) de <i>K. lactis</i>	34	23.624	23%	componente do complexo DASH, com função no ciclo celular
	DAM_KLULA (<i>DASH complex subunit DAM 1</i>) de <i>K. lactis</i>	28	34.621	9%	componente do complexo DASH com função no ciclo celular
	UBC12_KLULA (<i>NEDD8- conjugating enzyme UBC12</i>) de <i>K. lactis</i>	20	21.324	20%	relacionada à ubiquitinação de proteínas

Continua...

Tabela 2 – Cont.

Amostra	Proteína	Score	Massa (Da)*	Convergência de sequência	Função Provável
0,09 h ⁻¹ -d'	CCPR2_EMENI (<i>Putative heme-binding peroxidase</i>) de <i>Aspergillus nidulans</i>	53	34.556	ND	—
	THG1_KLULA (<i>tRNA (His) guanylyltransferase</i>) de <i>K. lactis</i>	33	28.356	32%	adiciona um GMP a ponta 5' do tRNA (His)
0,09 h ⁻¹ -e'	NAM7_YEAST (<i>ATP-dependet Helicase NAM 7</i>) de <i>S. cerevisiae</i>	41	110.445	ND	na transcrição
	DAM_KLULA (<i>DASH complex subunit DAM 1</i>) de <i>K. lactis</i>	24	34.621	9%	componente do complexo DASH, com função no ciclo celular
	DRS1_KLULA (<i>ATP-dependent RNA helicase DRS1</i>) de <i>K. lactis</i>	22	84.053	12%	na transcrição
	DUO1_KLULA (<i>DASH complex subunit DUO 1</i>) de <i>K. lactis</i>	21	23.624	19 %	componente do complexo DASH, com função no ciclo celular
	DPH1_KLULA (<i>Diphthamide biosynthesis protein 1</i>) de <i>K. lactis</i>	21	48.641	12 %	na biossíntese de diftamida, é uma modificação pós-traducional na histidina
0,09 h ⁻¹ -f'	ENT4_YEAST (<i>Epsin-4</i>) de <i>S. cerevisiae</i>	34	28.311	ND	—
	DUO1_KLULA (<i>DASH complex subunit DUO 1</i>) de <i>K. lactis</i>	26	23.624	18%	componente do complexo DASH, com função no ciclo celular
	UBC12_KLULA (<i>NEDD8- conjugating enzyme UBC12</i>) de <i>K. lactis</i>	22	21.324	20%	relacionada à ubiquitinação de proteínas

ND - Não determinado; * - Massa (Da) - Massa molecular deduzida.

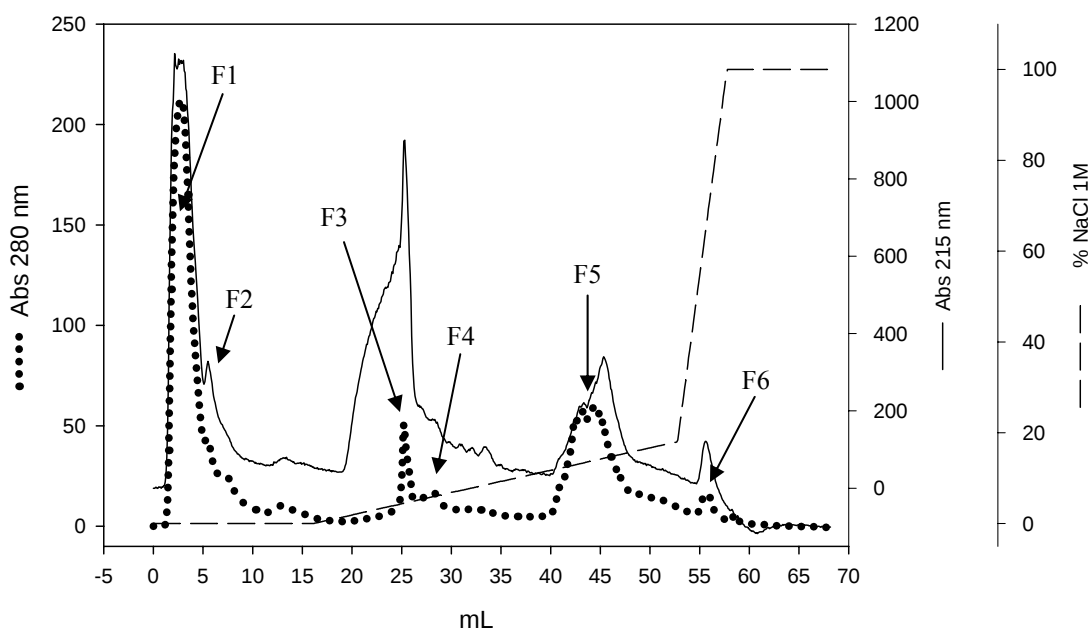


Figura 7 – **Cromatograma de troca iônica em coluna SOURCE 15Q de amostra de proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia foi conduzida na temperatura ambiente, utilizando tampão citrato 50 mM, pH 5,4. As amostras foram eluídas empregando-se tampão citrato 50 mM, pH 5,4, com 1 M de NaCl. O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de tampão contendo NaCl 1 M - indicada pela linha tracejada (---).

Dentre as massas moleculares observadas por MS (Tabela 3) da amostra **F1** da cromatografia de troca iônica após a cromatografia de fase reversa (Figura 8), foram identificadas, por análise comparativa com as massas moleculares do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis* (Anexo), apenas duas proteínas. Uma das proteínas denominadas “gnl_GLV_KLLA0E02156g” possui massa molecular deduzida de 12.255 Da, e a massa averiguada por MS foi de 12.212,49 Da, uma diferença de -42,18 Da. A diferença entre a massa deduzida e a averiguada pode ser atribuída a uma modificação da sequência protéica, uma mudança do aminoácido isoleucina ou leucina por uma alanina, a troca de uma valina por uma glicina ou, mesmo, uma arginina por uma asparagina, todas essas modificações apresentam valores tabelados (www.expasy.org, Anexo) próximos ao encontrado para essa diferença entre a massa deduzida e a averiguada. A outra proteína foi identificada como “gnl_GLV_KLLA0B06666g” com

massa deduzida de 8.557 Da e massa averiguada por MS de 8.599,71 Da, o que perfaz uma diferença de massas de 42,84 Da. Do mesmo modo, pode-se sugerir que essa diferença é devida a uma acetilação da proteína ou a uma mudança do aminoácido alanina por uma leucina ou isoleucina, uma troca de uma asparagina por uma arginina, ou de uma glicina por uma valina, em que todas essas modificações também apresentam valores tabelados próximos ao encontrado para essa diferença entre a massa deduzida e a averiguada.

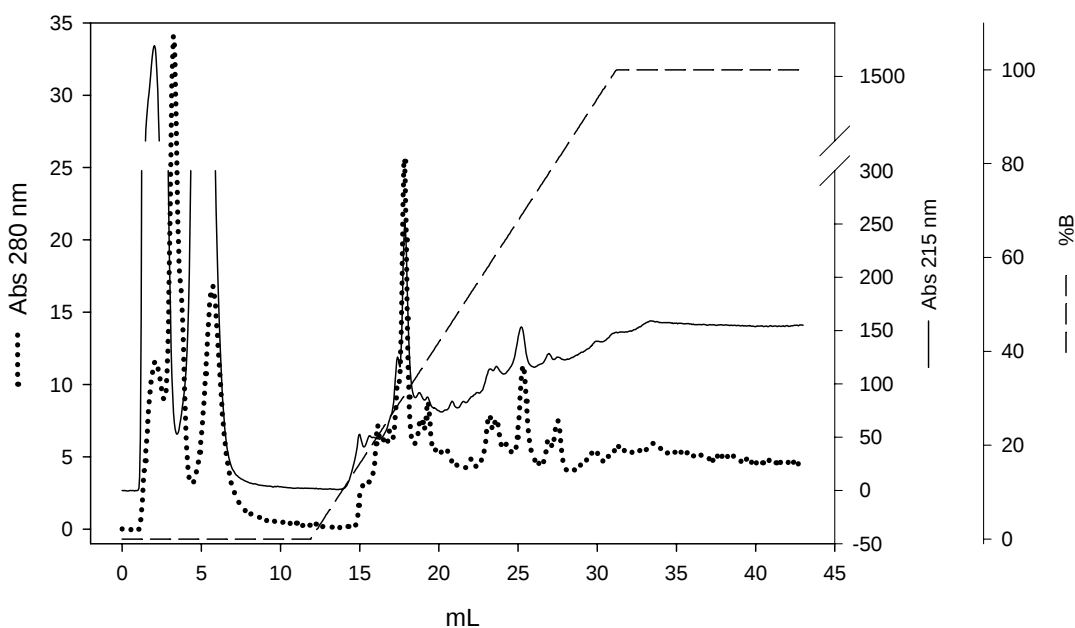


Figura 8 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F1 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando-se solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (•••), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

Tabela 3 – Massa averiguada por MS da **F1** da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
B12	25,85-26,84	7.603,70 / 8.317,133	CHCA
B4	17,85-18,84	7.555,032	CHCA
B5	18,85-19,84	5.964,248 / 12.212,486	CHCA
B11	24,85-25,84	6.347,319 / 7.946,143 / 9.544,821	CHCA
B4	18,85-19,84	7.558,041	DHB
B5	17,85-18,84	8.599,712	DHB

Nem todas as proteínas obtidas nas frações da fase reversa de **F1** tiveram a massa molecular determinada por espectrometria de massa (MS). Essas foram, então, alquiladas, reduzidas e submetidas ao processo de tripsinólise na tentativa de identificá-las pelos peptídios formados da digestão tríptica (PMF e CID). A análise dos espectros de massa combinados da proteína tripsinolizada (PMF) e dos peptídios fragmentados (CID) de massa molecular de 1.716,87, 1.307,70 e 1.082,027 Da, utilizando-se o programa MASCOT (ferramenta do Biotoools – análise de espectros de massa no MALDI), identifica a proteína B3 da F1 como uma das proteínas de *K. lactis*: COX10_KLULA (*Prothemo IX farnesyltransferase, mitochondrial precursor*), com função provável na conversão de protohemo IX e farnesil difosfato a heme como transferase, possui massa deduzida de 51.277 Da e *score* de 19; ACN9_KLULA possui função na regulação de enzimas envolvidas na assimilação acetato (gliconeogênese-like), metabolismo de acetil-CoA e no ciclo de glioxalato, com massa deduzida de 15.146 Da e *score* de 30; uma PYRF_KLULA, que possui função provável na biossíntese de pirimidina como descarboxilase, com massa molecular deduzida de 29.337Da e *score* de 24; e MED10_KLULA, uma proteína co-ativadora envolvida na regulação da transcrição, massa molecular deduzida de 18.571Da e com *score* de 22.

Entre as massas moleculares observadas por MS da amostra **F2** da troca iônica analisada na fase reversa (Figura 9), foi possível identificar apenas uma por análise comparativa entre as massas moleculares do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*, indentificada como “gnl_GLV_KLLA0F24959” (Tabela 4). Esta proteína possui massa molecular deduzida de 7.699 Da, e a massa averiguada por MS foi de

7872,08 Da, uma diferença de 173,22 Da. Tal diferença entre a massa deduzida e a averiguada pode ser atribuída a uma modificação pós-traducional na sequência protéica, tal como a inserção de uma propionamida no aminoácido cisteína (Anexo).

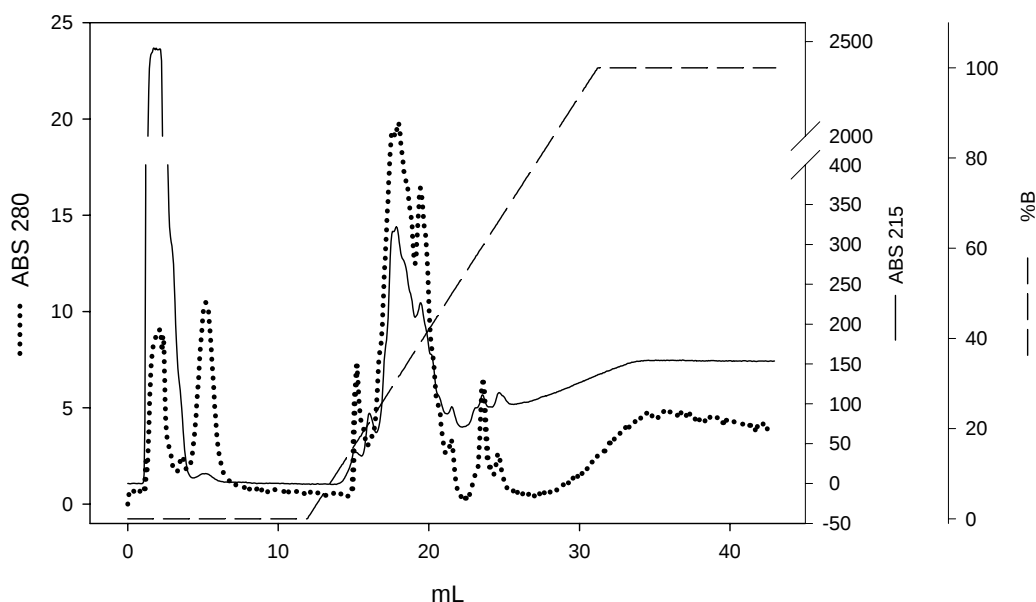


Figura 9 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F2 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A), sendo a eluição feita por meio de gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (•••), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

Tabela 4 – Massa averiguada por MS da F2 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
B7	20,85-21,84	6.980,242	CHCA
B4	17,85-18,84	7.546,706	CHCA
A4	3,00-3,99	6.978,804	CHCA
B3	16,85-17,84	7.545,910 / 7.872,086	DHB

Do mesmo modo que observado nas proteínas obtidas na fase reversa de **F1**, nem todas as proteínas obtidas nas frações da fase reversa de **F2** tiveram a massa molecular determinada por MS, razão pela qual elas foram alquiladas, reduzidas e submetidas ao processo de tripsinólise, na tentativa de identificá-las através dos peptídios formados pela digestão triptica (PMF e CID).

A análise dos espectros combinados da proteína da fração A6 da F2 tripsinolizada e do peptídio fragmentado de massa molecular de 1.307,70 Da, utilizando-se o programa MASCOT, indicou que as seqüências protéicas analisadas que retornaram não pertenciam à espécie *K. lactis*.

As proteínas que retornaram com maiores scores apresentadas e ranqueadas em primeiro lugar foram, principalmente, de *Yarrowia lipolytica*, uma RNA helicase dependente de ATP (DBP3_YARLI) com score de 31; de *Saccharomyces cerevisiae*, uma *Importin alpha re-exporter* (CSE1_YEAST), com score de 24, um ativador transcricional ARO80 (ARO80_YEAST) com score de 21; uma proteína END3 (END3_YEAST), com score de 23; de *Aspergillus fumigatus*, uma enzima superóxido dismutase (Cu-Zn) (SODC_ASPFU) com score de 21 e uma glicilpeptídio *N*-tetradecanoiltransferase (NMT_ASPFU), com score de 20.

A análise dos espectros combinados da proteína da fração B9 da F2 tripsinolizada e dos peptídios fragmentados de massa molecular de 1.235,60, 1.708,68 e 1.792,66Da, utilizando-se o programa MASCOT, correlacionou essa proteína com uma seqüência de uma *GPI-ethanolamide phosphate transferase 2* de *K. lactis* (GPI2_KLULA), com score de 20.

A massa molecular observada na análise por MS da amostra da **F3** da troca iônica após a fase reversa (Figura 10) apresentou massa molecular (Tabela 5) compatível com o banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*, e a proteína identificada foi a “gnl_GLV_KLLA0F24959g”, que possui massa molecular deduzida de 7.699 Da, e a massa averiguada por MS foi de 7.921,62 Da, uma diferença de 222.75 Da. A diferença entre a massa deduzida e a averiguada pode ser atribuída a uma modificação S-12-hidroxifarnesil cisteína. Esta proteína se mostrou glicosilada, podendo apresentar até 12 hexoses em sua estrutura, como pode ser visto na Figura 11.

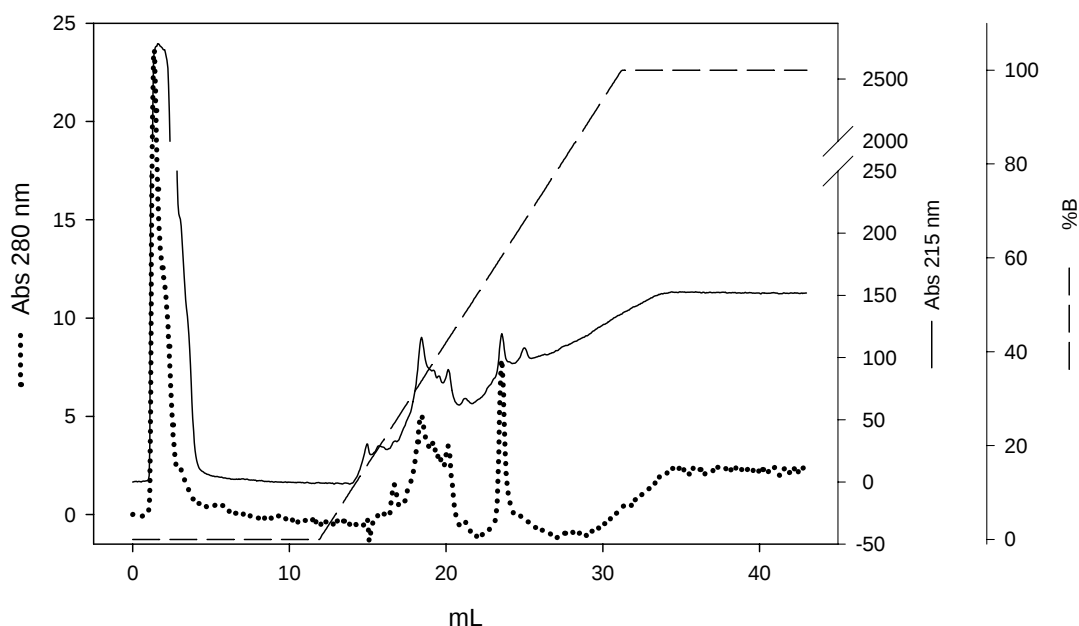


Figura 10 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F3** proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,03\text{ h}^{-1}$. A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (•••), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

Tabela 5 – Massa averiguada por MS da **F3** da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a $0,03\text{ h}^{-1}$

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
B6	19,85-20,84	7921.622	DHB

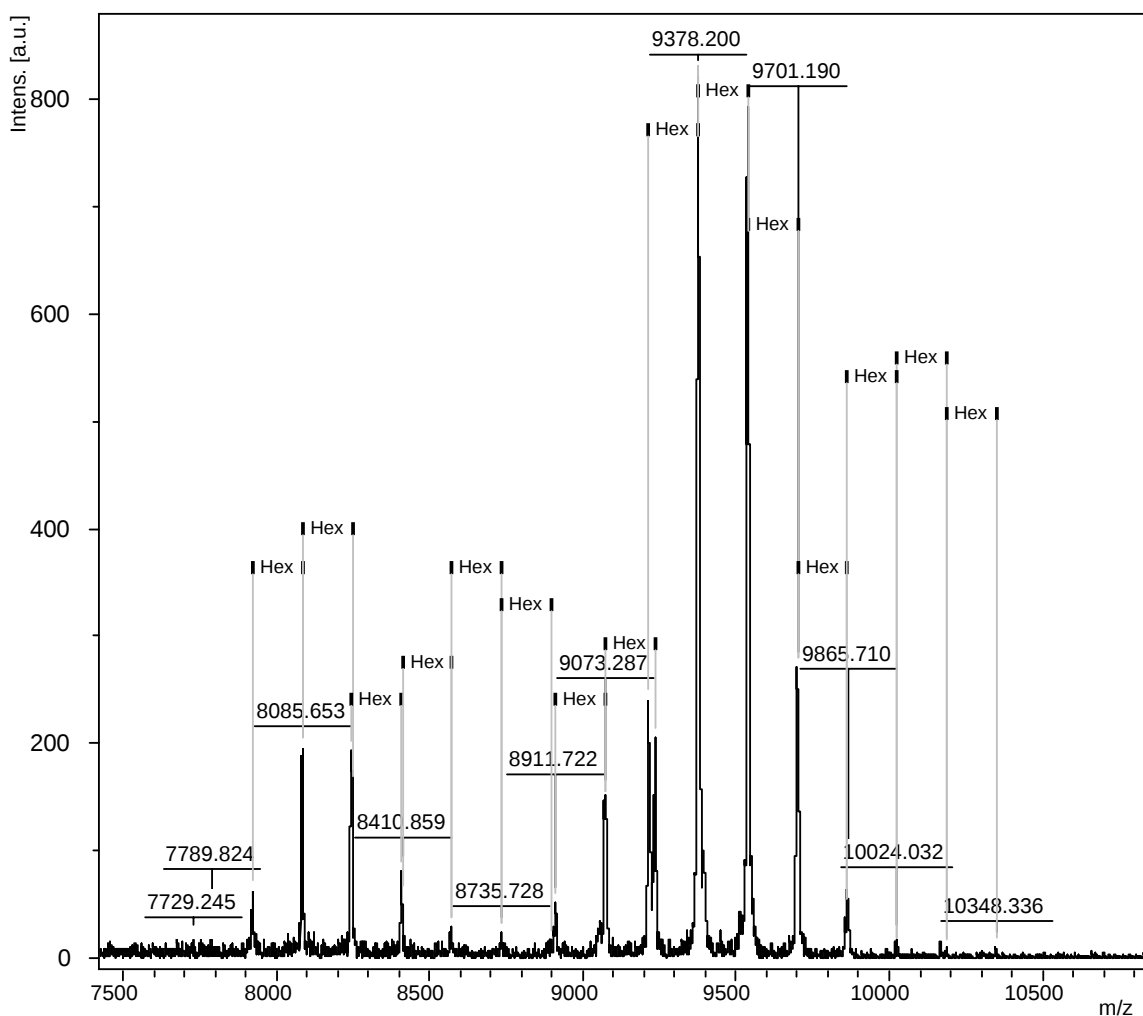


Figura 11 – **Espectro de massa evidenciando glicosilações da fração B6 da F3 – 0,03 h⁻¹.** O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido da fração **B6**, obtida na fase reversa da fração **F3** proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹. A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz DHB em placa MTP *AnchorChip* 800/384, Hex- hexose.

As massas moleculares observadas na análise por MS (Tabela 6), da amostra eluída na fase reversa da fração **F4** da troca iônica (Figura 12), mostraram-se compatíveis com o banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*. A proteína identificada foi a “gnl_GLV_KLLA0E08217g”, que possui massa molecular deduzida de 5.149,96 Da, e a massa averiguada por MS foi de 5.360,67 Da, uma diferença de 210 Da entre as massas. Essa diferença entre a massa deduzida e a averiguada pode ser atribuída a uma miristilação (Anexo); essa modificação apresenta valor tabelado próximo ao encontrado da diferença entre a massa deduzida e a averiguada. Essa proteína também se mostrou glicosilada, como pode ser observado na Figura 13.

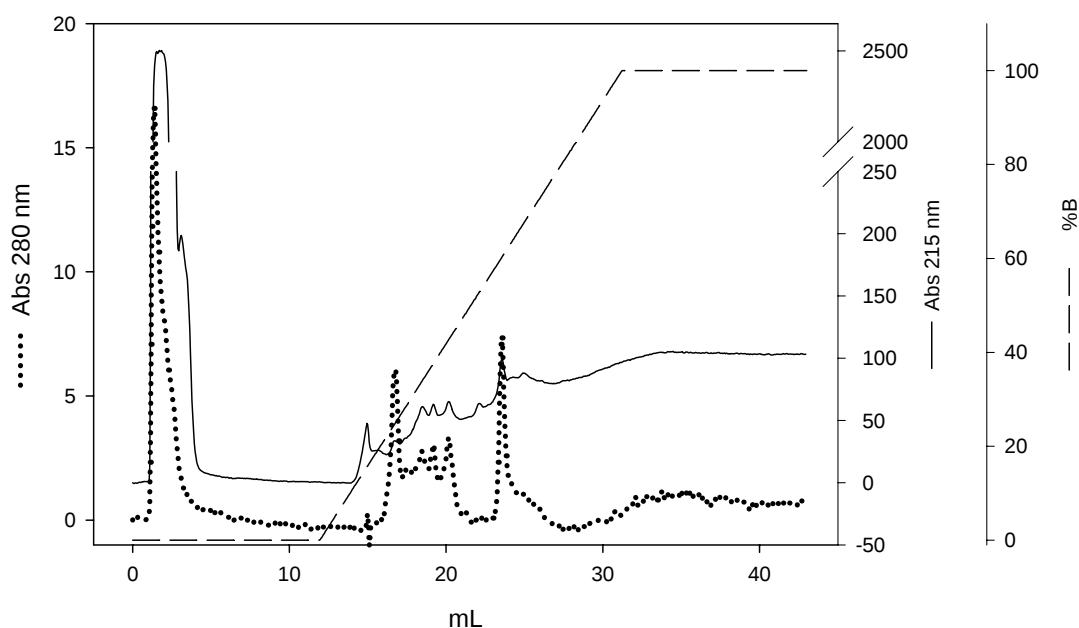


Figura 12 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F4 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A), sendo a eluição feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

Tabela 6 – Massa averiguada por MS da F4 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
B4	17,85-18,84	5.360,678/6.039,896	DHB

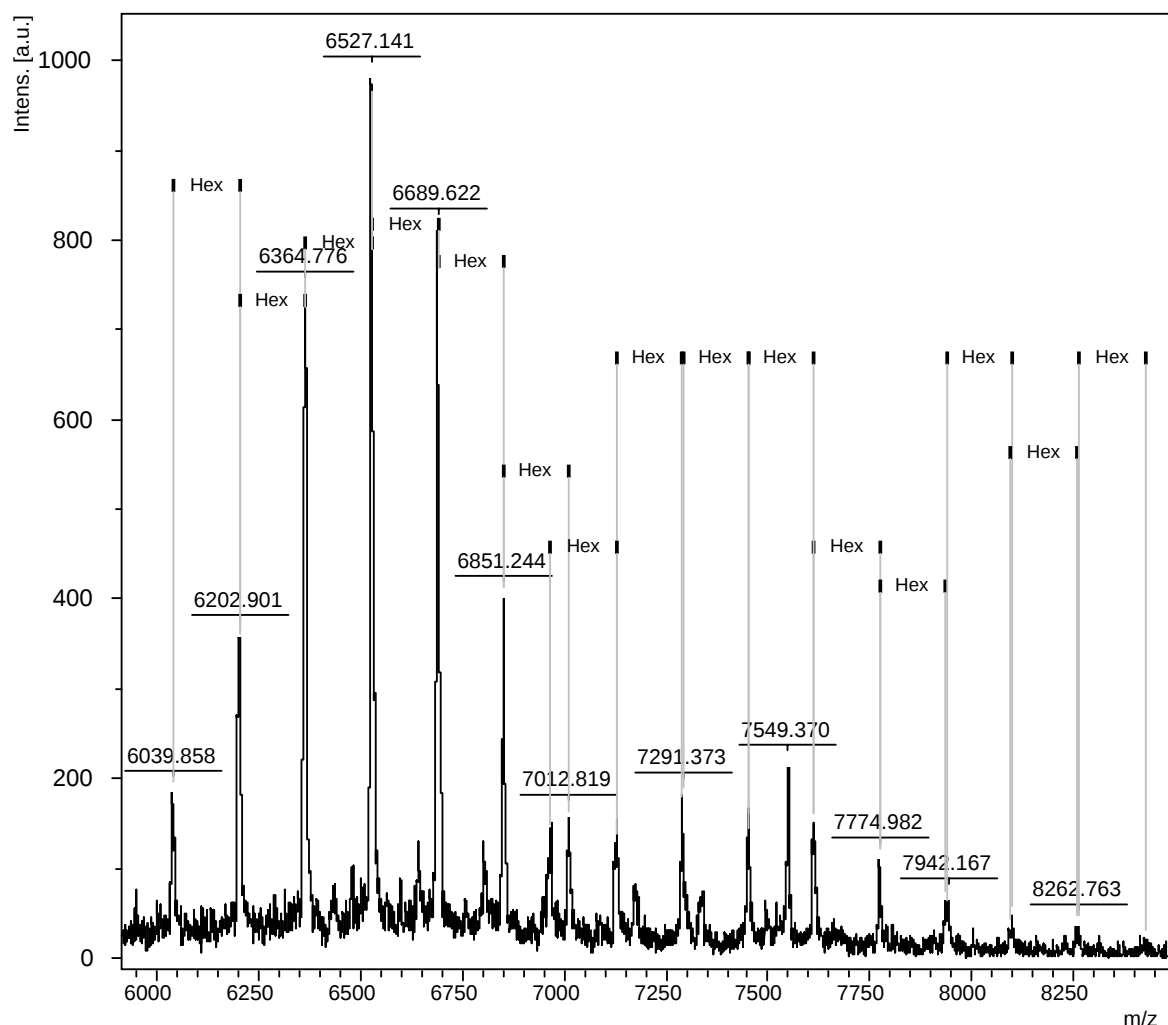


Figura 13 – **Espectro de massa evidenciando glicosilações da fração B4 da F4 – 0,03 h⁻¹.** O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido da fração **B4** (Tabela 6), obtida na fase reversa da fração **F4** proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹. A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz DHB em placa MTP *AnchorChip* 800/384, Hex-hexose.

Entre as massas moleculares observadas por MS (Tabela 7) da amostra eluída da fase reversa da fração **F5** da troca iônica (Figura 14), foi possível identificar, por análise comparativa com as massas moleculares do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*, apenas duas proteínas. Uma das proteínas identificadas é a “gnl_GLV_KLLA0C04928g”, que teve massa averiguada por MS de 15.475,00 Da, e a sua massa deduzida foi de 15.542 Da, sendo a diferença entre as massas de -67 Da. Essa

diferença pode ser atribuída a uma modificação da sequência protéica, uma mudança do aminoácido histidina por uma alanina ou a troca de uma tirosina por uma prolina, e todas essas modificações apresentam valores tabelados próximos ao encontrado para essa diferença entre a massa deduzida e a averiguada. Outra proteína identificada foi a “gnl_GLV_KLLA0D07942g”, que teve massa averiguada por MS de 26.021,55 Da e possui massa deduzida de 25.999 Da, sendo a diferença entre as massas de 22,73, que também pode ser atribuída a uma modificação da sequência protéica como uma mudança do aminoácido aspartato por uma histidina.

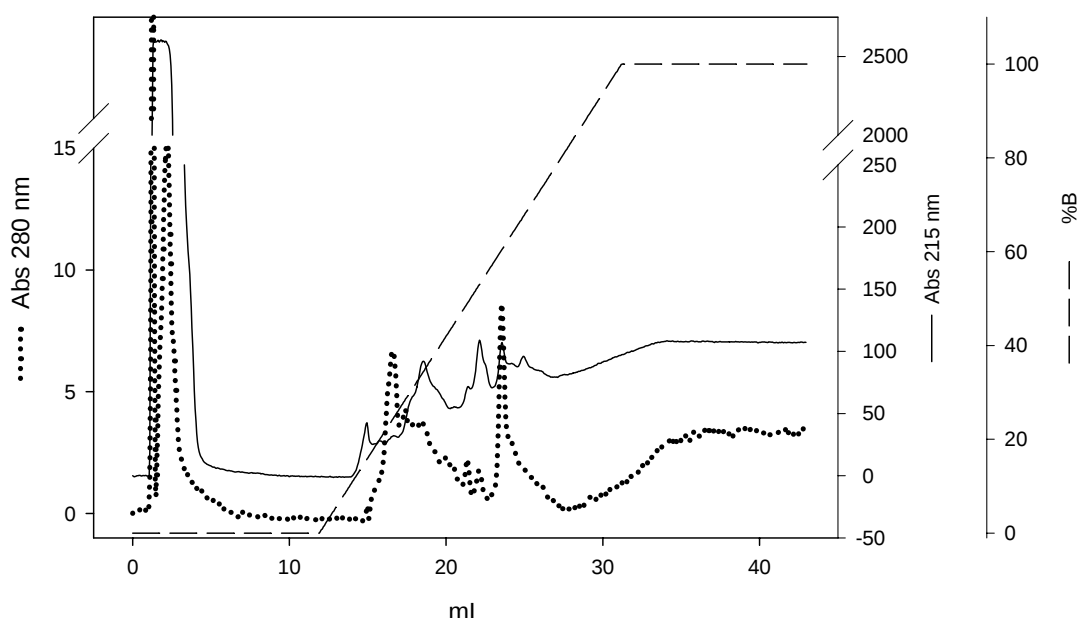


Figura 14 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F5 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,03 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (•••), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

Tabela 7 – Massa averiguada por MS da **F5** da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a $0,03\text{ h}^{-1}$

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada	Matriz
B10	23,85-24,84	6.169,073/5.989,626	CHCA
B8	21-85-22,84	14.084,317/14.405,139/15.475,004	CHCA
B6	19,85-20,84	26.021,548/25.146,974	CHCA
B4	17,85-18,84	5.594,243/5.945,849/6.953,021	DHB
B10	23,85-24,84	6.168,029	DHB

Das amostras analisadas por MS provenientes da fase reversa da fração **F6** da troca iônica (Figura 15), não foi possível observar nenhum valor de massa molecular por espectrometria de massa.

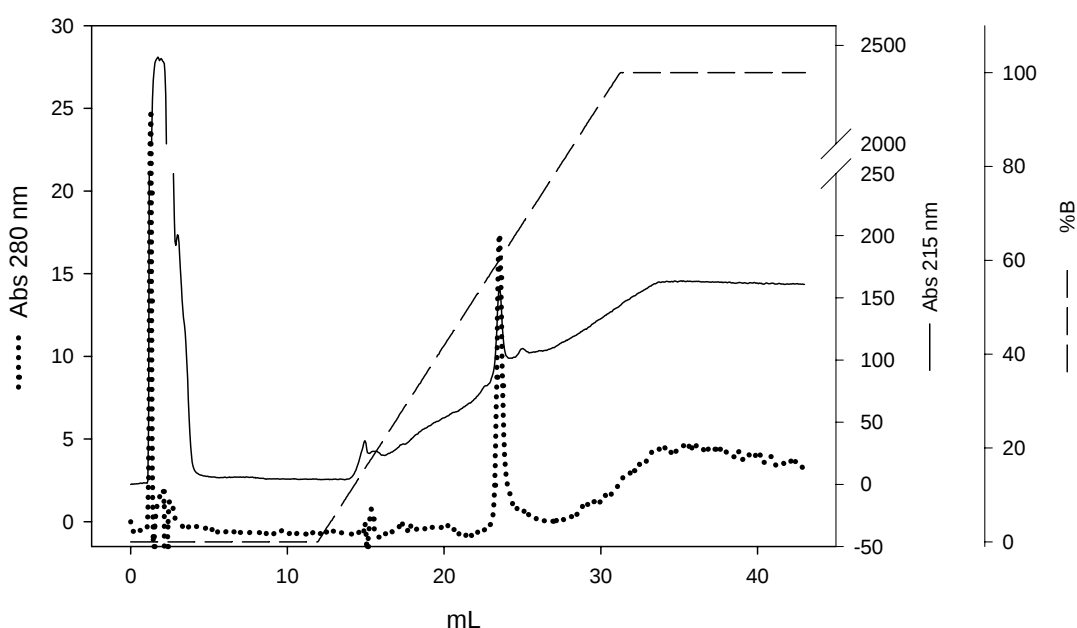


Figura 15 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F6 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,03\text{ h}^{-1}$.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

4.3.2. Análise das proteínas extracelulares das culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹

As amostras coletadas na cromatografia de troca iônica em coluna SOURCE 15Q foram reunidas em oito frações (Figura 16): o primeiro grupo das proteínas eluídas no volume de 1,49 a 2,99 mL (**F1**), o segundo das proteínas eluídas no volume de 3,00 a 5,99 mL (**F2**), o terceiro das proteínas eluídas no volume de 6,07 a 9,07 mL (**F3**), o quarto das proteínas eluídas no volume de 23,55 a 26,55 mL (**F4**), o quinto das proteínas eluídas no volume de 28,05 a 29,55 mL (**F5**), o sexto das proteínas eluídas no volume de 29,55 a 38,55 mL (**F6**), o sétimo das proteínas eluídas no volume de 44,55 a 46,05 mL (**F7**) e o oitavo das proteínas eluídas no volume de 54,18 a 59,25 mL (**F8**). Cada um dos grupos foi submetido individualmente a uma cromatografia de fase reversa em coluna RESOURCETM RPC.

Dentre as massas moleculares observadas por MS (Tabela 8) das amostras eluídas na fase reversa da fração **F1** da troca iônica (Figura 17), foi possível identificar, por análise comparativa com as massas moleculares do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*, duas proteínas. As duas proteínas denominadas “gnl_GLV_KLLA0B06666g” e “gnl_GLV_KLLA0D13112g” possuem massas deduzidas de 8.557 Da e 8.505 Da, respectivamente, e essas proteínas podem estar relacionadas à proteína observada que teve massa averiguada de 8.561,209 Da, e as diferenças de massas foram de 4,33 e 56,56 Da, respectivamente. A diferença entre a massa deduzida e a averiguada de 4,33 Da pode ser atribuída a uma modificação da seqüência protéica, uma mudança do aminoácido prolina por uma treonina ou a troca de uma valina por uma cisteína, e a diferença de massa de 56,56 pode estar relacionada a uma mudança de uma glicina para uma leucina ou isoleucina. Outra proteína de massa molecular averiguada por MS de 12.547,30 Da, dessa mesma fração, não pode ser relacionada com as massas deduzidas do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*, mas se apresentou glicosilada na análise por MS (Figura 18), mostrando oito moléculas de hexose.

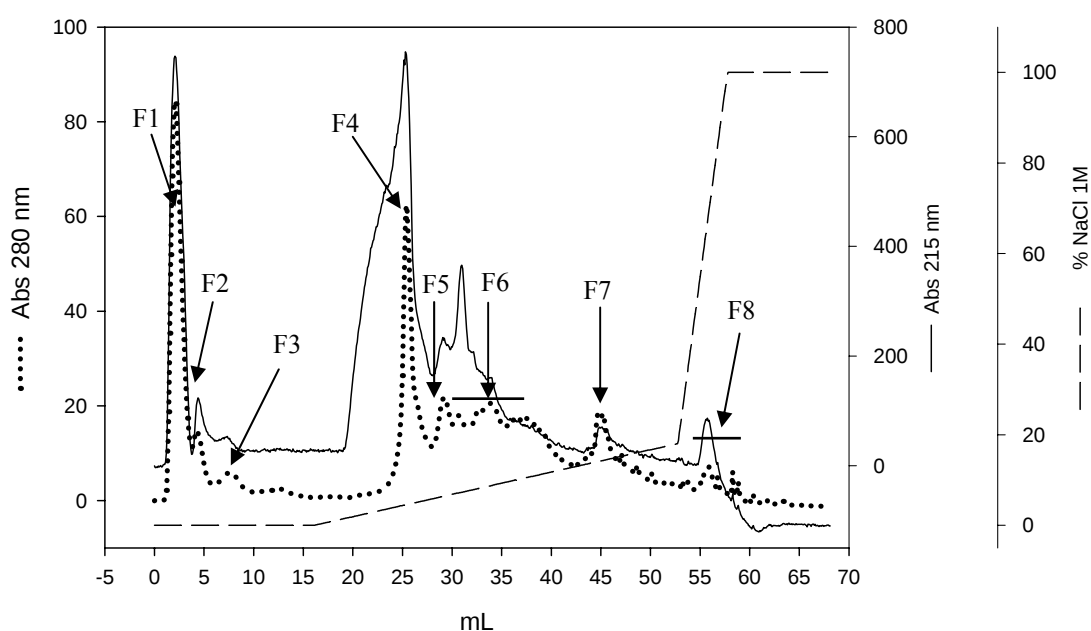


Figura 16 – **Cromatograma de troca iônica em coluna SOURCE 15Q de amostra de proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,09 \text{ h}^{-1}$.** A cromatografia foi conduzida à temperatura ambiente utilizando tampão citrato 50 mM, pH 5,4, sendo as amostras eluídas utilizando-se tampão citrato 50 mM, pH 5,4, com 1 M de NaCl. O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de tampão contendo NaCl 1 M - indicada pela linha tracejada (---).

Tabela 8 – Massa averiguada por MS da **F1** da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a $0,09 \text{ h}^{-1}$

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
B5	18,85-19,84	5.815,624/5.944,637/6.306,743	DHB
B6	19,85-20,84	12.547,30	DHB
B8	21,85-22,84	8.561,209	DHB

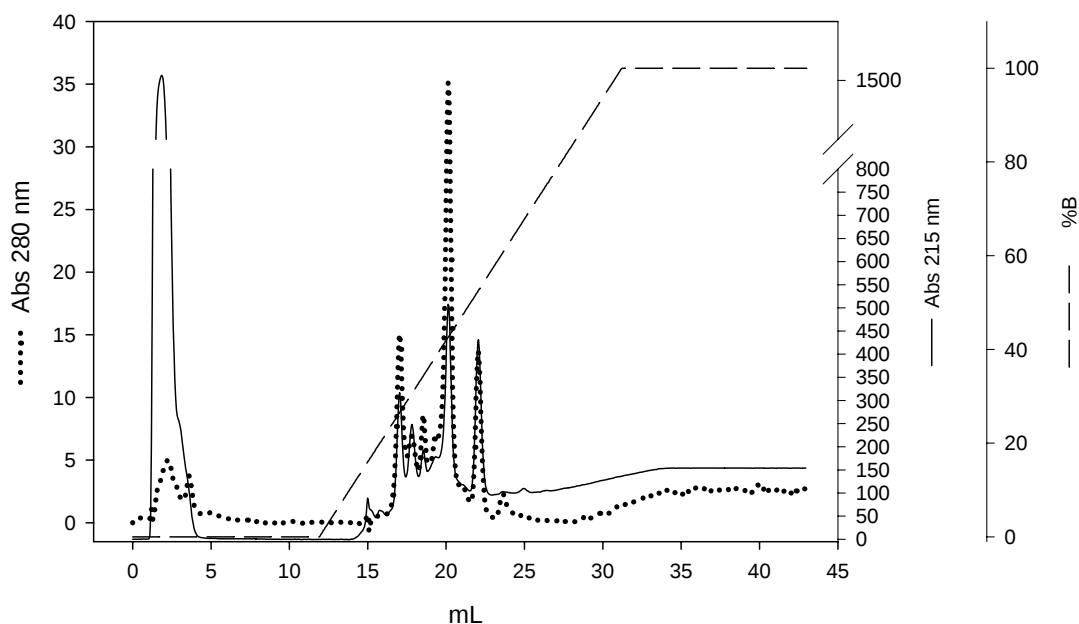


Figura 17 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F1 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (•••), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

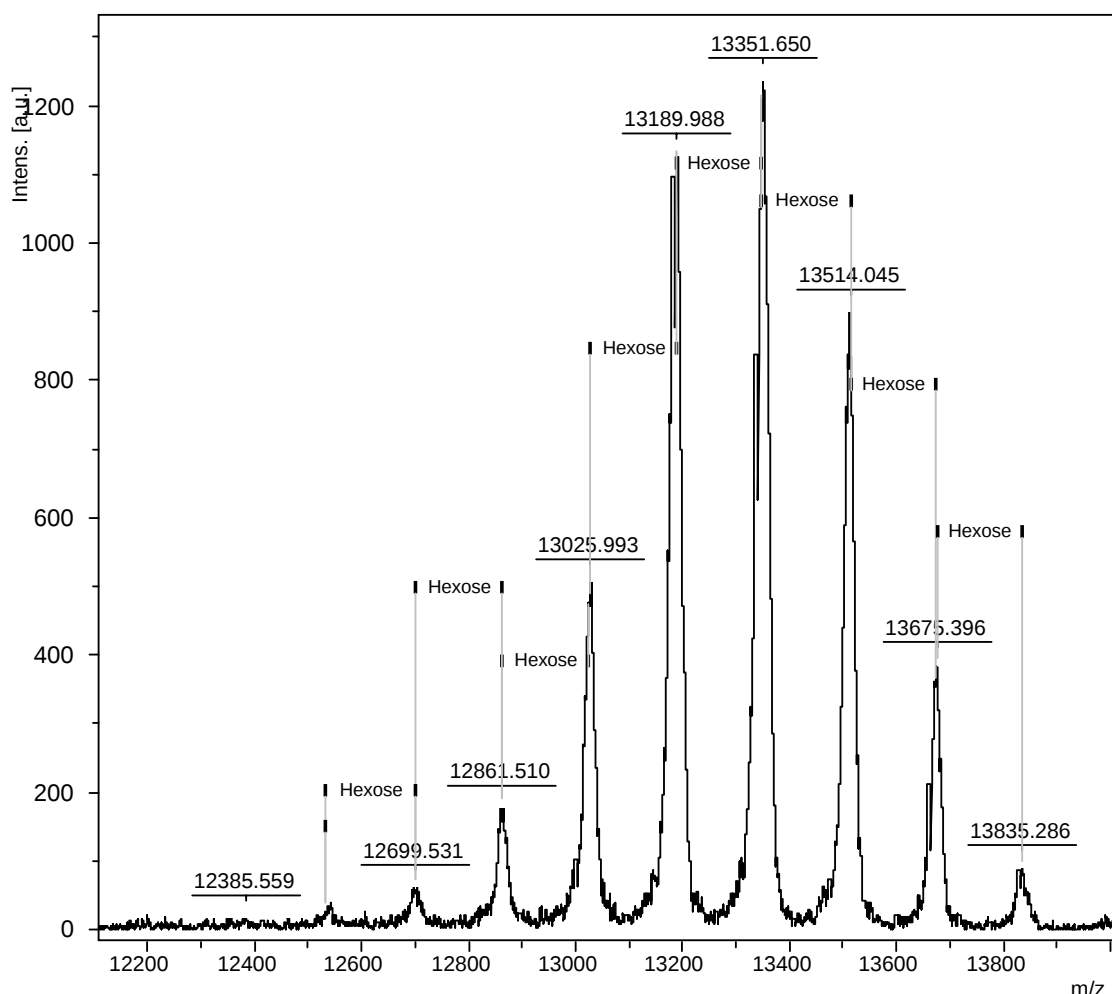


Figura 18 – **Espectro de massa evidenciando glicosilações da fração B6 da F1 – 0,09 h⁻¹.** O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido da fração **B6** (Tabela 7), obtida na fase reversa da fração **F1** proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹. A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz DHB em placa MTP *AnchorChip* 800/384, Hex-hexose.

Das massas identificadas na análise por MS (Tabela 9) e da fase reversa da fração **F2** da troca iônica (Figura 19), pode-se relacionar a massa averiguada de 7.952,49 Da à proteína “gnl_GLV_KLLA0D17468g”, do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis* (Anexo), que possui massa deduzida de 8.138 Da, e a diferença de massa deve ser atribuída à ausência de um triptofano. A massa observada de 8.071,25 Da pode estar relacionada à proteína “gnl_GLV_KLLA0D17468g” de massa deduzida de 8.138 Da, e a diferença entre essas massas pode estar relacionada a uma

modificação da sequência protéica, uma mudança do aminoácido histidina por uma alanina ou a mudança de uma tirosina por uma prolina.

A proteína identificada como “gnl_GLV_KLLA0B06666g” de massa deduzida de 8.557 Da pode estar relacionada com três massas averiguadas de 8.601,284, 8.603,921 e 8.607,38 Da, a diferença entre massas averiguadas e a deduzida apresenta valores de diferenças de 44,14; 47,05; e 50,51 Da, respectivamente. A diferença de 44,41 Da pode ser relacionada a uma adição de ácido gama carboxi-glutâmico ou a uma mudança de uma alanina por um aspartato ou a mudança de uma cisteína por uma fenilalanina ou a uma mudança de uma glicina por um treonina; a diferença de 47,05 Da está relacionada a uma mudança do aminoácido tirosina por uma fenilalanina, a mudança de uma glicina por uma cisteína, a mudança de uma valina por uma fenilalanina ou a uma mudança do aminoácido aspartato por uma tirosina; e a diferença de massa de 50,51 Da pode ser atribuída à mudança do aminoácido leucina ou isoleucina por uma tirosina ou a uma mudança de uma prolina por uma fenilalanina ou a mudança do aminoácido serina pelo aminoácido histidina.

Outra proteína sugerida pela análise, a “gnl_GLV_KLLA0F24959g”, com massa deduzida de 7.699 Da pode estar relacionada com três massas averiguadas no MS, 7.615,92, 7.619,72 e 7.858,79 Da, respectivamente, e as diferenças observadas entre as massas averiguadas e a deduzidas são de -82,94, -79,14, 159,93, respectivamente. A diferença de -82,94 Da pode ser atribuída a uma modificação da sequência protéica, uma mudança do aminoácido triptofano por uma cisteína. A diferença de -79,14 Da pode ser atribuída a uma mudança do aminoácido histidina por uma glicina. A diferença de 159,93 Da pode ser atribuída à presença de uma carboxi-metilcisteína.

A massa averiguada no MS de 5.323,927 Da apresenta uma diferença de 173,97 Da para a proteína sugerida, do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*, “gnl_GLV_KLLA0E08217g”, e a diferença entre as massas pode ser atribuída à adição de uma propionamida-cisteína. A massa averiguada de 8.607,38 Da apresenta uma diferença 469,16 Da para a proteína sugerida “gnl_GLV_KLLA0D17468g”, podendo essa diferença ser atribuída a uma adição de triodotirosina. A massa averiguada de 10.003,66 Da apresenta a diferença de 634,55 Da para a proteína “gnl_GLV_KLLA0E02794g”, e essa diferença pode ser atribuída a uma modificação S-archael.

A proteína com massa averiguada de 14.225,90 Da foi a única que apresentou diversas glicosilações na análise por MS (Figura 20).

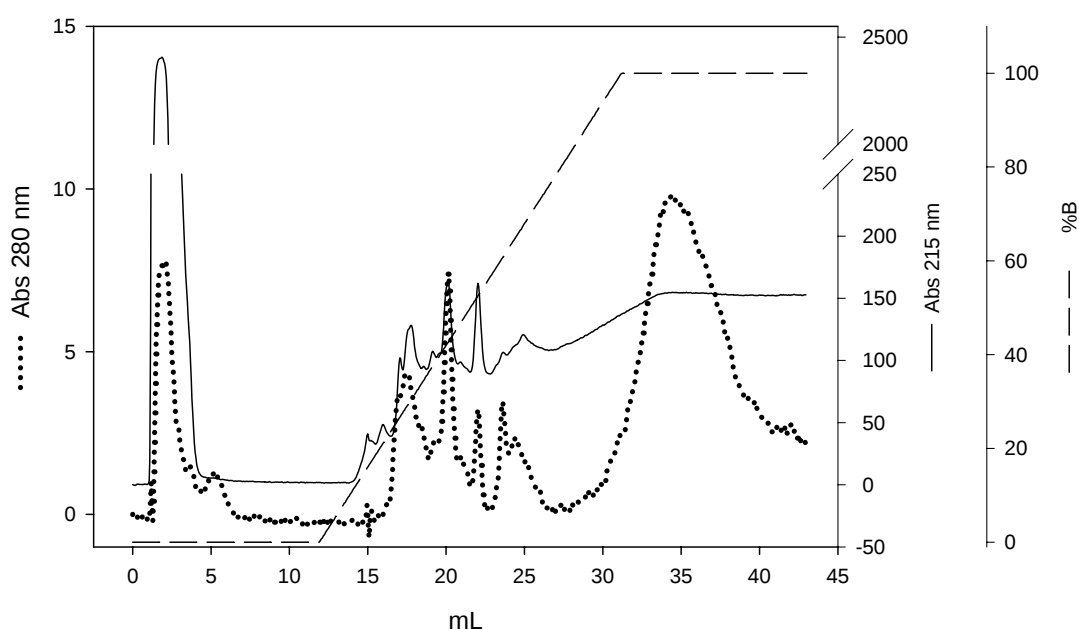


Figura 19 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F2 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (•••), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

Tabela 9 – Massa averiguada por MS da **F2** da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a $0,09\text{ h}^{-1}$

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
B9	22,85-23,84	7.615,929 / 8.336,000	CHCA
B10	23,85-24,84	7.489,915 / 7.619,725 / 7.858,798	CHCA
A5	4,00-4,99	5.964,928 / 7.493,626 / 18.207,694	CHCA
B8	21,85-22,84	5.893,685 / 7.404,881 / 8.071,249	AS
A5	4,00-4,99	6.954,392 / 8.607,380 / 14.225,920	DHB
B4	17,85-18,84	5.315,044 / 5.819,321 / 6.949,745 / 7.548,912 / 8.601,284 / 10.003,656	DHB
B5	18,85-19,84	5.323,927 / 5.995,098 / 6.878,389 / 7.952,490	DHB
B6	19,85-20,84	7.965,640	DHB
B8	21,85-22,84	5.899,960	DHB
“Pool” – C4, C5, C6, C7, C8 e C9	32,33-37,23	8.603,921	DHB

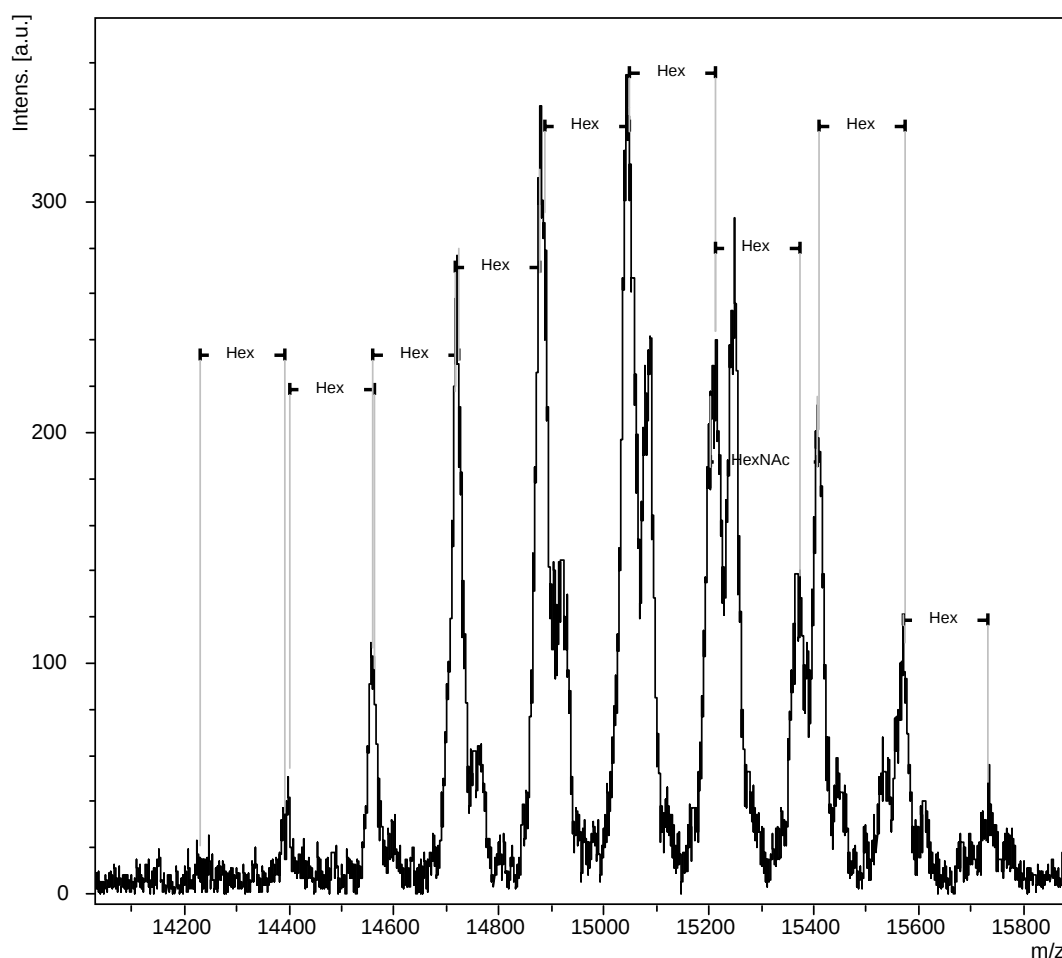


Figura 20 – **Espectro de massa evidenciando glicosilações da fração A5 da F2 - 0,09 h⁻¹.** O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido da fração A5 (Tabela 9), obtida na fase reversa da fração F2 proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹. A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz DHB em placa MTP *AnchorChip* 800/384, Hex-hexose, HexNAc - N-acetilglicosamina.

Entre as massas moleculares observadas por MS para as amostras da fase reversa de F3 (Figura 21 e Tabela 10), foi possível identificar apenas uma proteína denominada “gnl_GLV_KLLA0B05951g”, com massa deduzida de 6.561 Da e massa averiguada 7.014,799 Da, apresentando uma diferença de 454,11 Da entre as massas; essa diferença pode ser atribuída a uma modificação “farnesil conjugada a uma histidina” (FMNH).

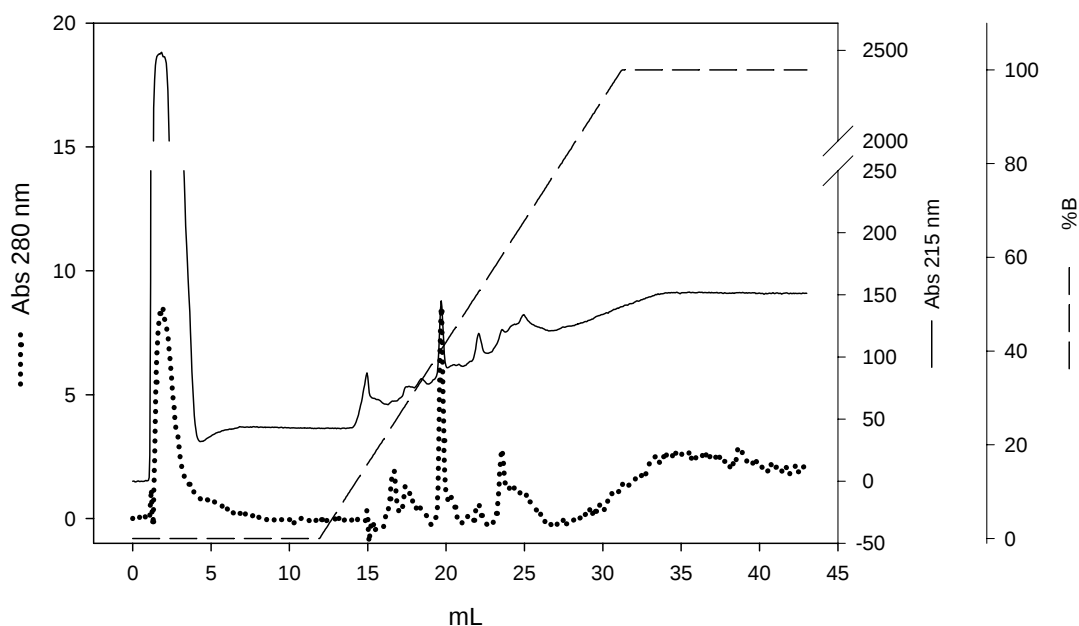


Figura 21 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F3 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

Tabela 10 – Massa averiguada por MS da F3 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
B9	22,85-23,84	24.687,632 / 27.269,344 / 31.959,036	CHCA
B6	19,85-20,84	7.005,547 / 8.255,715	CHCA
B5	18,85-19,84	7.007,230	DHB
B6	19,85-20,84	5.629,919/6.858,911/7.014,799/7.962,499/8.262,085	DHB
B8	21,85-22,84	5.898,947	DHB

A fração B9 da fase reversa da amostra **F3** teve a massa molecular determinada por MS. Essa mesma proteína foi também analisada por PMF, na tentativa de identificá-la através dos peptídios formados pela digestão triptica e por fragmentação por CID. A análise dos espectros combinados da proteína tripsinolizada e dos peptídios fragmentados de massa molecular de 1.707,74; 1.716,66; e 1.765,71 Da, utilizando-se o programa MASCOT, identificou a proteína B9 como provavelmente uma metaloprotease ARX1 de *K. lactis* (ARX1_KLULA), com um score de 26 e massa molecular deduzida de 63.905 Da.

Da análise por MS da amostra da fase reversa proveniente da **F4** da troca iônica (Figura 22) não foi possível, com o valor de massa molecular averiguada (Tabela 11), identificar nenhuma proteína por análise comparativa com as massas moleculares do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*.

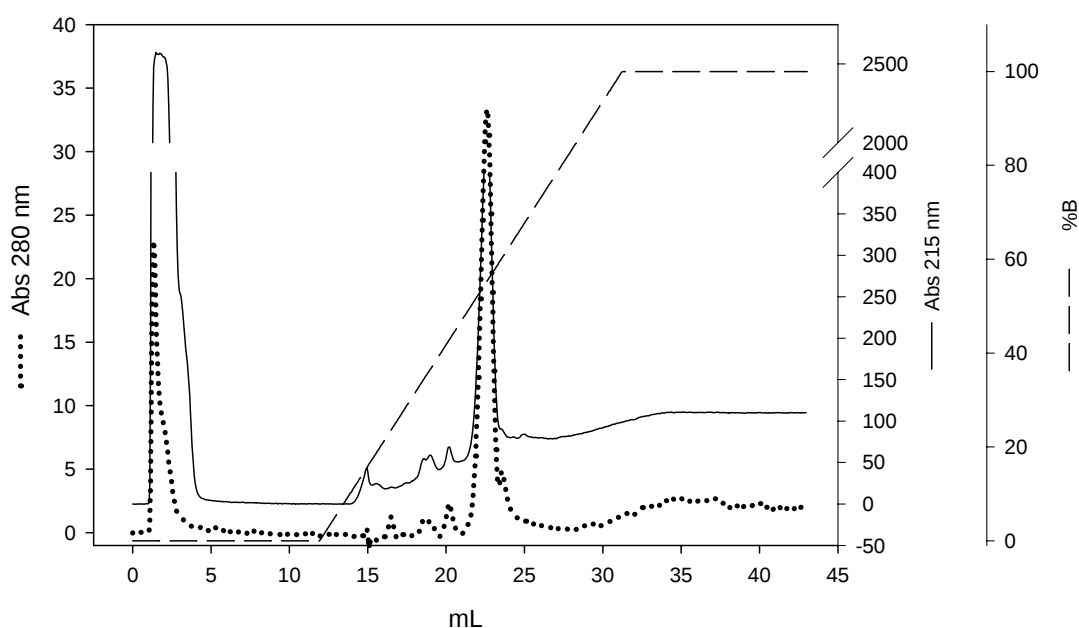


Figura 22 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F4 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹. A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio de gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).**

Tabela 11 – Massa averiguada por MS da **F4** da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
B8	21,85-22,84	6.993,956	AS

Na tentativa de identificar a fração B8 da amostra **F4**, uma análise de PMF foi realizada através dos peptídios formados pela digestão triptica e também por fragmentação por CID. A análise dos espectros combinados da proteína tripsinolizada e do peptídio fragmentado de massa molecular de 1.607,69 Da, utilizando-se o programa MASCOT, identificou a proteína B8 com uma sequência da cadeia gama da ATP sintase de *K. lactis* (ATPG_KLULA) com um *score* de 22 e massa deduzida de 31.628 Da, bem como também relacionou a proteína B8 com a proteína bifuncional GAL10 de *K. lactis* (GAL10_KLULA) com um *score* de 31 e massa molecular deduzida de 77.110 Da.

Entre as massas moleculares observadas por MS das amostras da fase reversa provenientes da **F5** da troca iônica (Figura 23), foi possível identificar, por análise comparativa com as massas moleculares do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis* (Tabela 12), apenas uma proteína denominada “gnl_GLV_KLLA0B14102g” (massa deduzida de 29.040 Da), que apresentou uma diferença de massa (massa averiguada de 28.933,69 Da) de – 106,1 Da. A diferença entre a massa deduzida e a averiguada pode ser atribuída a uma modificação da sequência protéica, uma mudança do aminoácido tirosina por uma fenilalanina.

A massa molecular da maioria das proteínas obtidas nas frações da fase reversa da fração **F5** não pôde ser determinada por espectrometria de massa. Essas proteínas foram então alquiladas, reduzidas e submetidas ao processo de tripsinólise, na tentativa de identificá-las através dos peptídios formados pela digestão triptica.

A análise dos espectros combinados da proteína da fração B9 da **F6** tripsinolizada e dos peptídios fragmentados de massa molecular de 1.765,74; 1.791,70; e 1.835,88 Da, utilizando-se o programa MASCOT, identificou a proteína B9 com provavelmente uma sequência de uma cinase, *Spindle assembly cinase*, de *K. lactis* (IPL1_KLULA) com um *score* de 20 e massa molecular deduzida de 42.094 Da.

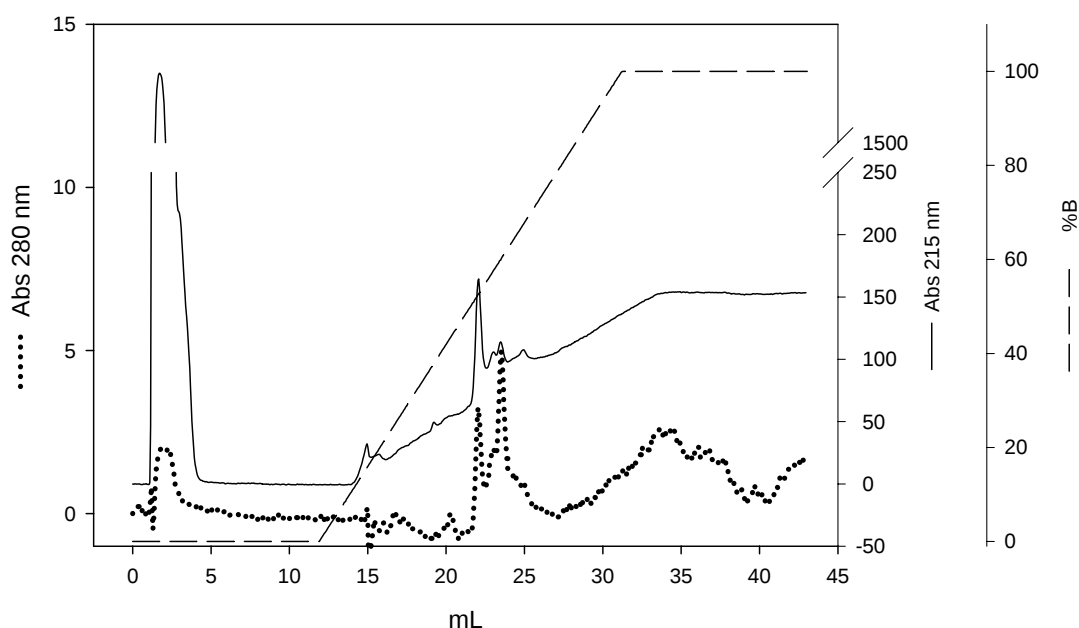


Figura 23 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F5 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (•••), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

Tabela 12 – Massa averiguada por MS da F5 da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
“Pool”-C4, C5, C6 e C7	32,33-35,22	28.933,692 / 33.481,192	CHCA

Entre as massas moleculares observadas por MS da fase reversa da fração **F6** (Figura 24 e Tabela 13), foi possível identificar, por análise comparativa com as massas moleculares do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*, várias proteínas. Uma das proteínas identificadas é denominada “gnl_GLV_KLLA0B05951g” e massa deduzida de 6.561 Da, que pode estar relacionada à massa averiguada por MS de 6.431,58 Da, sendo a diferença entre as massas de -129,10 Da. A diferença entre a massa deduzida e a averiguada pode ser atribuída a uma modificação da sequência protéica, uma mudança do aminoácido triptofano por uma glicina, ou a falta de um ácido glutâmico na proteína averiguada.

A proteína “gnl_GLV_KLLA0F24959g” possui massa deduzida de 7.699 Da, valor esse que pode estar relacionado a duas massas averiguadas de 7.611,73 e 7.677,811 Da, as quais apresentaram diferença com relação à massa deduzida de -87,14 e -21,06, respectivamente. A diferença entre a massa deduzida e a averiguada de -87,14 Da pode ser atribuída a uma modificação da sequência protéica, uma mudança do aminoácido triptofano por uma valina ou a falta de uma serina na proteína averiguada. E a diferença de -21,06 pode ser atribuída a uma mudança do aminoácido histidina por um aspartato, a uma mudança do aminoácido arginina por uma histidina, a uma mudança do aminoácido fenilalanina por uma glutamina ou a uma mudança do aminoácido triptofano por uma lisina.

A proteína identificada “gnl_GLV_KLLA0B06666g” com massa deduzida de 8.557 Da pode estar relacionada a duas massas averiguadas de 8.606,05 e 8.609,33 Da, que apresentaram diferença para a massa deduzida de 49,18 e 52,46, respectivamente. A diferença entre a massa deduzida e a averiguada de 49,18 Da pode ser atribuída a uma mudança do aminoácido histidina por um triptofano, ou uma mudança de uma asparagina por uma tirosina na proteína averiguada. E a diferença de 52,46 pode ser atribuída a uma mudança do aminoácido cisteína por uma arginina.

Outra proteína identificada e denominada “gnl_GLV_KLLA0D13112g”, com massa deduzida de 8.505 Da e massa averiguada por MS de 8.606,05 Da, sendo a diferença de massa de 101,41. A diferença entre a massa deduzida e a averiguada pode ser atribuída a uma modificação da sequência protéica como uma homoserina lactona ligada à proteína averiguada.

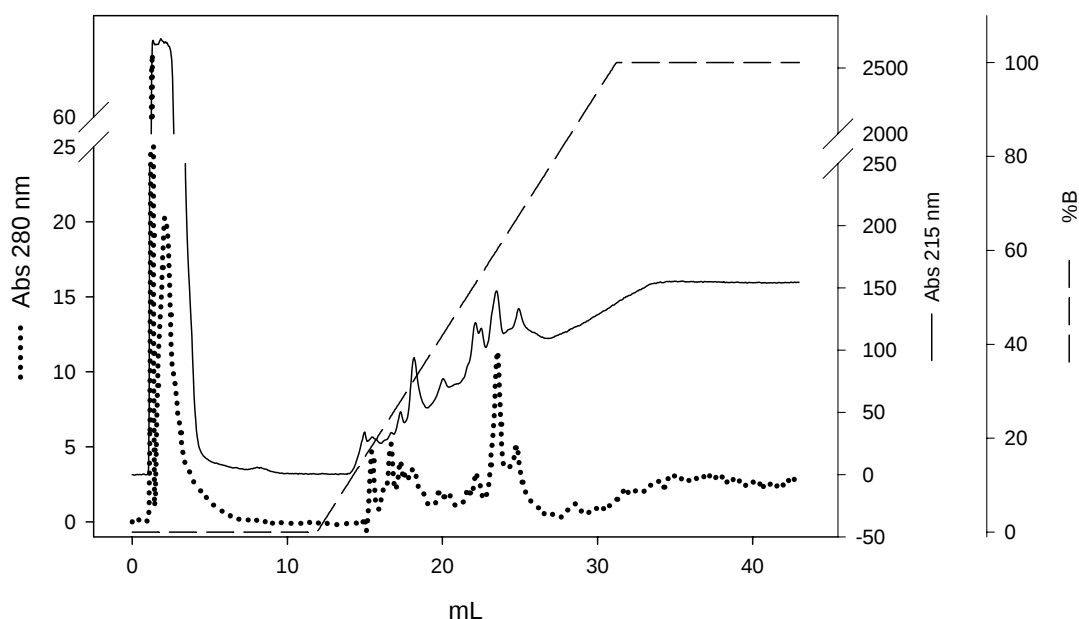


Figura 24 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F6 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (●●●), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

Tabela 13 – Massa averiguada por MS da **F6** da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
B2	15,85-16,84	22.630,727	CHCA
B4	17,85-18,84	5.593,733/5.946,638/6.952,145/8.606,050	DHB
B5	18,85-19,84	6.199,332/6.431,587/6.757,311/7.611,730/8.609,332	DHB
B6	19,85-20,84	6.093,925	DHB
B7	20,85-21,84	5.530,191/6.206,169/6.406,865/6.838,988/7.677,811	DHB
B8	21,85-22,84	5.794,347	DHB

Da amostra analisada por MS proveniente da fase reversa da **F7** da troca iônica (Figura 25), não foi possível obter valores de massa molecular e, conseqüentemente, identificar por análise comparativa com as massas moleculares do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*.

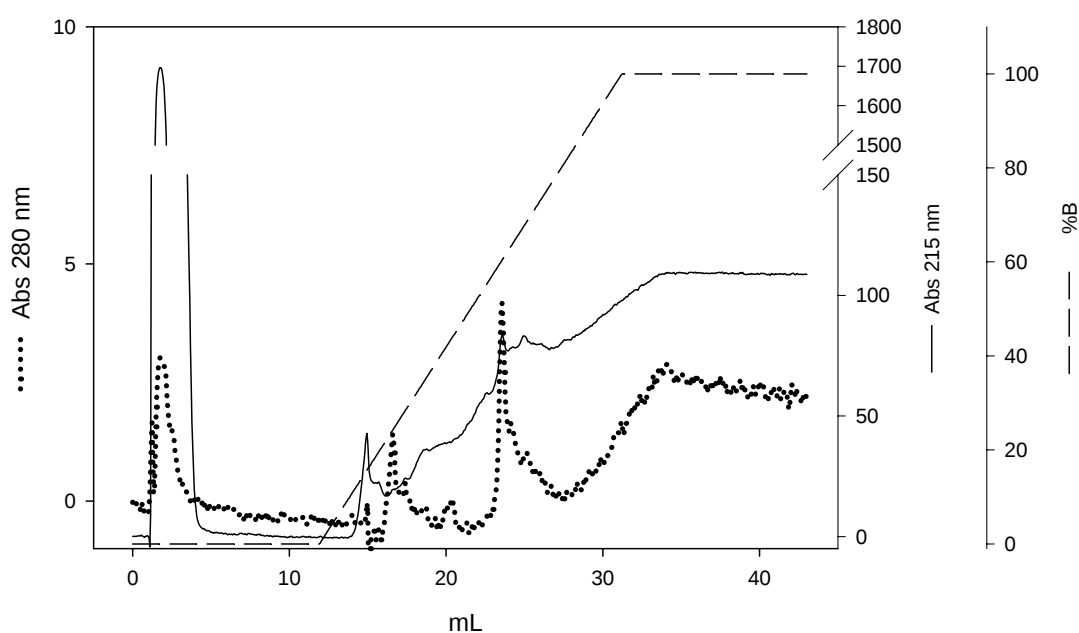


Figura 25 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F7 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹.** A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio do gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (•••), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).

Entre as massas moleculares observadas por MS da fase reversa da **F8** da troca iônica (Figura 26), foi possível identificar, por análise comparativa com as massas moleculares do banco de dados de proteínas secretadas de *K. lactis*, apenas duas proteínas (Tabela 14). Uma das proteínas identificadas é denominada “gnl_GLV_KLLA0E24959g”, possui massa deduzida de 31.321 Da e massa averiguada por MS de 31.247,80 Da, em que a diferença de massa de -73,18 pode ser atribuída à mudança de um aminoácido triptofano por uma leucina ou isoleucina.

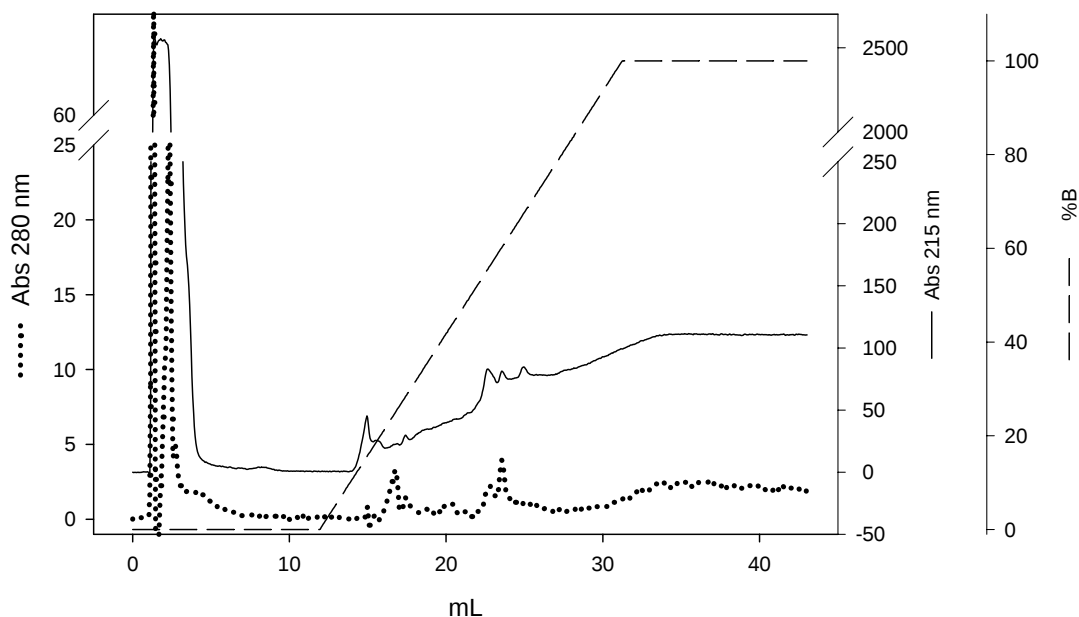


Figura 26 – **Cromatograma de fase reversa em coluna RESOURCE™ RPC da amostra F8 proveniente da cromatografia de troca iônica das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹. A cromatografia de fase reversa foi conduzida utilizando solução de TFA 0,1% (solução A) e a eluição, feita por meio de gradiente de solução de acetonitrila 80% e TFA 0,1% (solução B). O perfil cromatográfico foi acompanhado pela leitura de absorvância (Abs) a 280 nm - indicada pela linha pontilhada (•••), Abs a 215 nm - indicada pela linha contínua (—) e a porcentagem de solução B (%B) - indicada pela linha tracejada (---).**

Tabela 14 – Massa averiguada por MS da **F8** da LC-2D da amostra do meio extracelular da cultura de *K. lactis* em crescimento a 0,09 h⁻¹

Fração	Volume de Eluição (mL)	Massa Averiguada (Da)	Matriz
B6	19,85-20,84	31.247,802 / 28.587,169	CHCA

A massa averiguada de 28.587,17 pode estar relacionada com a massa deduzida de 28.648 Da para a proteína “gnl_GLV_KLLA0D19921g”, que apresenta uma diferença de massa de -60,53 Da. A diferença entre a massa deduzida e a averiguada pode ser atribuída a uma modificação da seqüência protéica, uma mudança do

aminoácido tirosina por uma cisteína, ou a troca de uma fenilalanina por uma serina ou uma metionina por uma alanina.

O perfil da cromatografia bi-dimensional das amostras nas taxas de crescimento de 0,03 e 0,09 h⁻¹ pode ser observado nas Figuras 27 e 28. Nesses perfis, observa-se, na vertical, a cromatografia de troca iônica e, na horizontal, as várias cromatografias de fase reversa para cada fração da troca iônica selecionada.

As diversas frações analisadas na fase reversa, de ambas as taxas de crescimento de 0,03 e 0,09 h⁻¹, mostraram um perfil heterogêneo dos picos protéicos tanto entre as taxas quanto entre as frações de cada taxa. Contudo, é possível notar picos de frações diferentes, de uma mesma taxa de crescimento analisada, que eluem em concentrações semelhantes de acetonitrila. Tal observação indica que essas proteínas podem pertencer a uma mesma família protéica ou apresentar funções fisiológicas semelhantes.

Ao comparar as Figuras 27 e 28, pode-se observar que as amostras provenientes da taxa de crescimento de 0,09 h⁻¹ apresentaram maior diversidade de picos eluídos do que as amostras provenientes da taxa de crescimento de 0,03 h⁻¹, evidenciando melhor as diferenças entre os perfis protéicos extracelulares, de cada taxa de crescimento avaliada, o que já foi destacado no SDS-PAGE (Figura 5). Do mesmo modo, na cromatografia líquida bi-dimensional também se observa maior diversidade de proteínas encontradas do que quando comparadas com as apresentadas na Figura 5 (SDS-PAGE), o que mostra que a cromatografia líquida bi-dimensional teve maior poder de resolução. Nas Tabelas 15 e 16, encontra-se uma visão geral das massas moleculares averiguadas e deduzidas de cada proteína extracelular identificada de *K. lactis* do banco de dados construído pra as proteínas possivelmente secretadas (Tabela 15) e utilizando o MASCOT (Tabela 16).

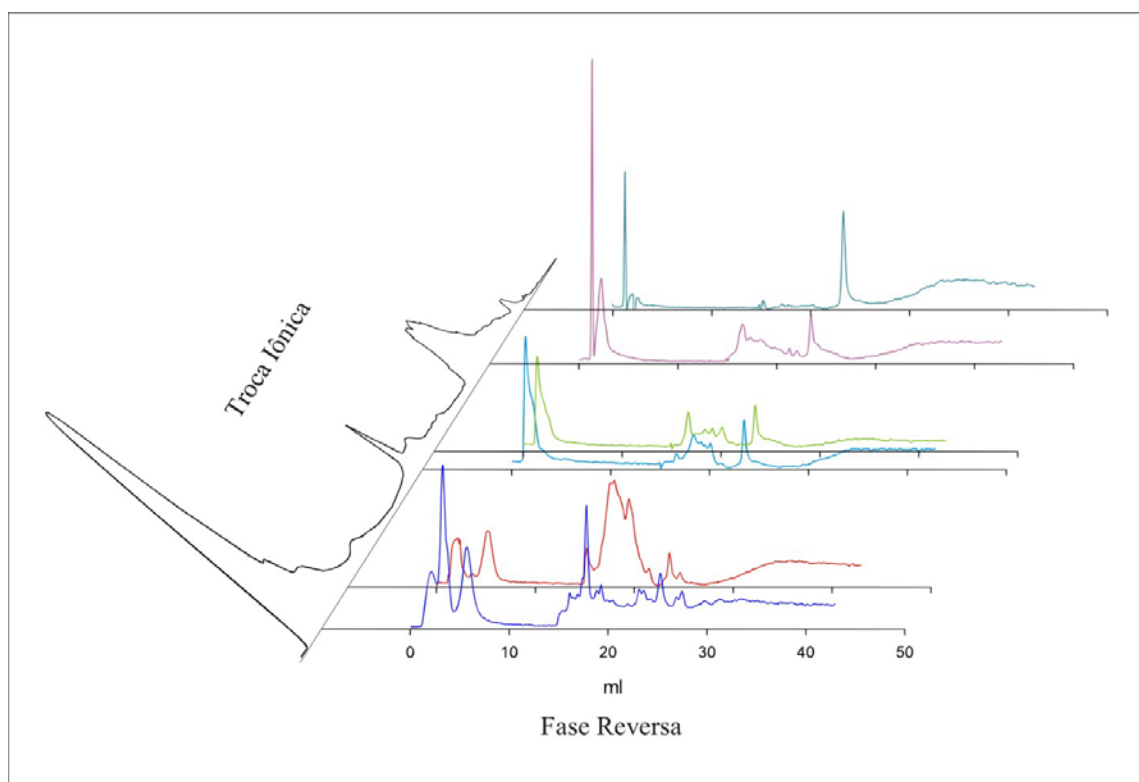


Figura 27 – **Perfil cromatográfico bidimensional de amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,03 \text{ h}^{-1}$.** O perfil cromatográfico indicado pelas linhas coloridas refere-se às cromatografias de fase reversa de **F1** (azul-turquesa), **F2** (vermelho), **F3** (ciano), **F4** (verde) **F5** (rosa) e **F6** (azul-celeste), e a linha preta refere-se à cromatografia de troca iônica da amostra cultivada na taxa de crescimento de $0,03 \text{ h}^{-1}$. Esses perfis foram delineados pela leitura da absorvância a 280 nm do material eluído.

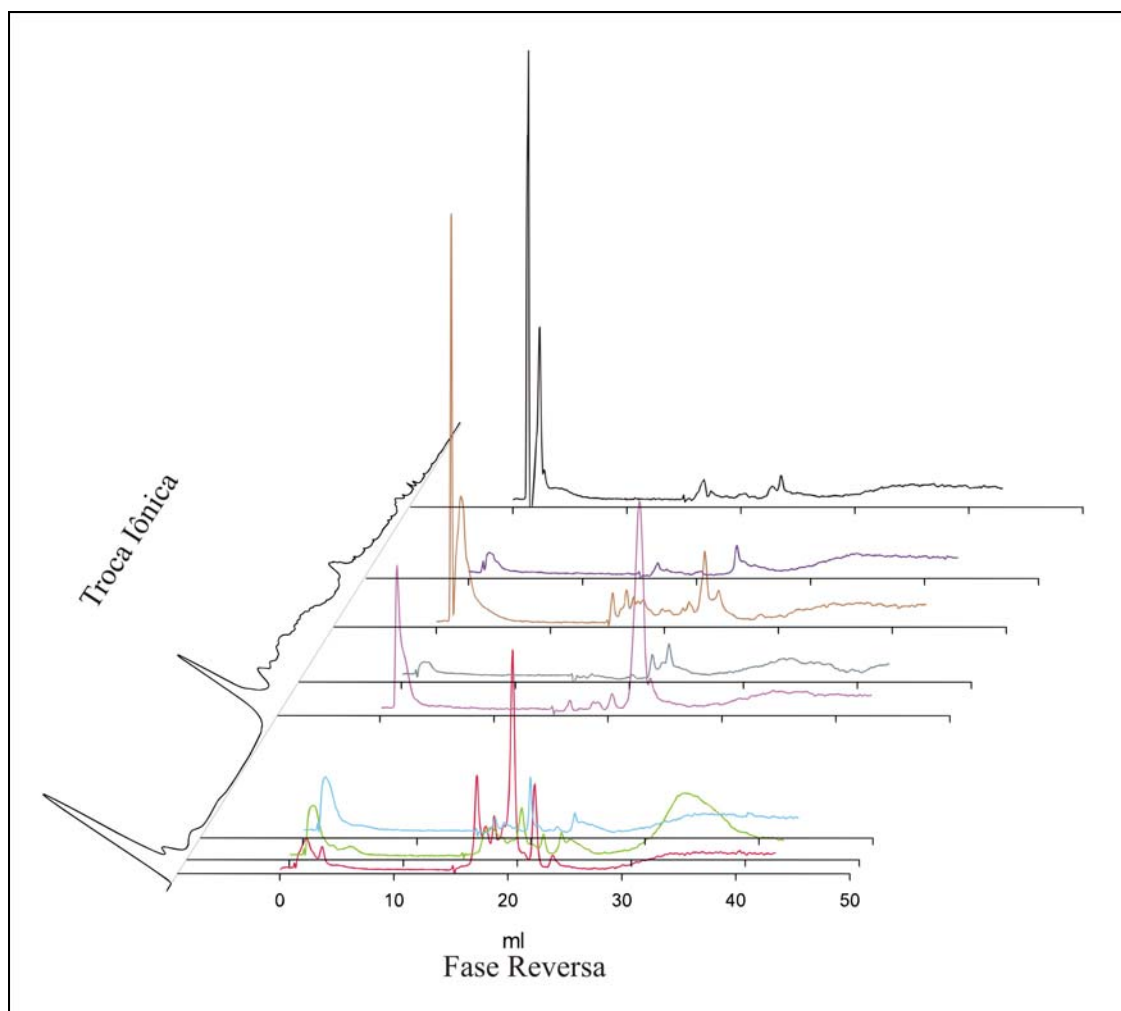


Figura 28 – **Perfil cromatográfico bidimensional de amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,09 \text{ h}^{-1}$.** O perfil cromatográfico indicado pelas linhas coloridas refere-se às cromatografias de fase reversa **F1** (magenta), **F2** (verde), **F3** (azul-celeste), **F4** (rosa), **F5** (marinho), **F6** (ocre), **F7** (roxo) e **F8** (preta), e a linha preta refere-se à cromatografia de troca iônica da amostra cultivada na taxa de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$. Esses perfis foram delineados pela leitura da absorvância a 280 nm do material eluído.

Tabela 15 – Massas identificadas das amostras de LC-2D de proteínas extracelulares de *K. lactis* pertencentes ao banco de dados de proteínas secretadas (Anexo 1)

Fração e μ (h ⁻¹)*	Nome da Sequência	Massa Predita [#]	Massa Averiguada	Diferença
F1-0,03	gnl_GLV_KLLA0E02156g	12.254,67 Da	12.212,49 Da,	42,18 Da
F1-0,03	gnl_GLV_KLLA0B06666g	8.556,87 Da	8.599,71 Da	42,84 Da
F2-0,03	gnl_GLV_KLLA0F24959g	7.698,87 Da	7.872,08 Da	173,22 Da
F3-0,03	gnl_GLV_KLLA0F24959g	7.698,87 Da	7.921,62 Da	222,75 Da
F4-0,03	gnl_GLV_KLLA0E08217g	5149,96 Da	5.360,67 Da	210,71 Da
F5-0,03	gnl_GLV_KLLA0C04928g	15.542,30 Da	15.475,00 Da	-67,30 Da
F5-0,03	gnl_GLV_KLLA0D07942g	25.998,81 Da	26.021,55 Da	22,73 Da
F1-0,09	gnl_GLV_KLLA0B06666g	8.556,87 Da	8.561,20 Da	4,33 Da
F1-0,09	gnl_GLV_KLLA0D13112g	8.504,64 Da	8.561,20 Da	56,56 Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0D17468g	8.138,22 Da	7.952,49 Da	-185,73 Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0D17468g	8.138,22 Da	8.071,25 Da	-66,97 Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0B06666g	8.556,87 Da	8.601,28 Da	44,14 Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0B06666g	8.556,87 Da	8.603,92 Da	47,05 Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0B06666g	8.556,87 Da	8.607,38 Da	50,51 Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0F24959g	7.698,87 Da	7.615,92 Da	-82,94, Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0F24959g	7.698,87 Da	7.619,72 Da	79,14 Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0F24959g	7.698,87 Da	7.858,79 Da	159,93 Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0E08217g	5.149,96 Da	5.323,92 Da	173,97 Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0D17468g	8.138,22 Da	8.607,38 Da	469,16 Da
F2-0,09	gnl_GLV_KLLA0E02794g	9.369,11 Da	10.003,66 Da	634,55 Da
F3-0,09	gnl_GLV_KLLA0B05951g	6.560,69 Da	7.014,80 Da	454,11 Da
F5-0,09	gnl_GLV_KLLA0B14102g	29.039,80 Da	28.933,69 Da	-106,10Da
F6-0,09	gnl_GLV_KLLA0B05951g	6.560,69 Da	6.431,58 Da	-129,10 Da
F6-0,09	gnl_GLV_KLLA0F24959g	7.698,87 Da	7.611,73Da	-87,14 Da
F6-0,09	gnl_GLV_KLLA0F24959g	7.698,87 Da	7.677,81 Da	-21,06 Da
F6-0,09	gnl_GLV_KLLA0B06666g	8.556,87 Da	8.606,05 Da	49,18 Da
F6-0,09	gnl_GLV_KLLA0B06666g	8.556,87 Da	8.609,33 Da	52,46 Da
F6-0,09	gnl_GLV_KLLA0D13112g	8.504,64 Da	8.606,05 Da	101,41 Da
F8-0,09	gnl_GLV_KLLA0E24959g	31.320,98 Da	31.247,80 Da	-73,18 Da
F8-0,09	gnl_GLV_KLLA0D19921g	28.647,70 Da	28.587,17 Da	-60,53 Da

* μ = velocidade específica de crescimento.

[#] Massa predita- na ausência do peptídio sinal.

Tabela 16 – Proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* identificadas por MALDI-TOF-TOF MS (análise pelo software MASCOT)

μ^*	Amostra	Proteína	score	Função Provável
SDS-PAGE				
0,03 h ⁻¹	a	CENPA_KLULA (<i>Histone H3-like centromeric protein CSE4</i>)	27	na replicação e divisão celular
	a	MED21_KLULA (<i>Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 21</i>)	26	na regulação da transcrição
	b	SET2_KLULA (<i>Histone- lysine N- methyltransferase</i>)	28	na elongação e repressão da transcrição
	b	RL24_KLULA (<i>60S ribosomal protein L 24</i>)	25	---
0,09 h ⁻¹	a'	G3P1_KLULA (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1</i>)	25	no metabolismo de carboidrato
	a'	PAN2_KLULA (<i>PAB-dependent poly (A)-specific ribonuclease subunit PAN2</i>)	27	como exonuclease e envolvimento na maturação pós-transcricional da cauda poli-A do mRNA
	b'	PEX22_KLULA (<i>Peroxisome assembly protein 22</i>)	21	na biogênese peroxissomal
	b'	ATG2_KLULA (<i>Autophaghy-related protein 2</i>)	29	no transporte vacuolar, na complementação de autofagossomas e na degradação peroxissomal
	b'	DPH1_KLULA (<i>Diphthamide biosynthesis protein 1</i>)	21	na biossíntese de diftamida
	c'	UBC12_KLULA (<i>NEDD8- conjugating enzyme UBC12</i>)	20	na ubiquitinação de proteínas
	c'	DUO1_KLULA (<i>DASH complex subunit DUO 1</i>)	34	componente do complexo DASH com função no ciclo celular
	c'	DAM_KLULA (<i>DASH complex subunit DAM 1</i>)	28	componente do complexo DASH com função no ciclo celular
	d'	THG1_KLULA (<i>tRNA (His) guanylyltransferase</i>)	33	na adição de GMP a ponta 5' do tRNA (His)
	e'	DUO1_KLULA (<i>DASH complex subunit DUO 1</i>)	21	componente do complexo DASH com função no ciclo celular
	e'	DPH1_KLULA (<i>Diphthamide biosynthesis protein 1</i>)	21	na biossíntese de diftamida
	e'	DAM_KLULA (<i>DASH complex subunit DAM 1</i>)	24	no ciclo celular
	e'	DRS1_KLULA (<i>ATP-dependent RNA helicase DRS1</i>)	22	na transcrição
	f'	DUO1_KLULA (<i>DASH complex subunit DUO 1</i>)	26	no ciclo celular
	f'	UBC12_KLULA (<i>NEDD8- conjugating enzyme UBC12</i>)	22	na ubiquitinação de proteínas

Continua...

Tabela 16 – Cont.

μ^*	Amostra	Proteína	score	Função Provável
LC-2D				
0,03 h ⁻¹	B3 da F1	COX10_KLULA (<i>Proteoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial precursor</i>)	19	na conversão de proto-heme IX e farnesil difosfato a heme, transferase, biossíntese de heme
	B3 da F1	ACN9_KLULA (<i>Acetate non-utilizing protein 9 mitochondrial precursor</i>)	30	na regulação de enzimas envolvidas na assimilação acetato (gliconeogênese-like), metabolismo de acetil-CoA, ciclo de glioxalato
	B3 da F1	PYRF_KLULA (<i>Orotidine 5'-phosphate decarboxylase</i>)	24	na biossíntese de pirimidina, descarboxilase, liase
	B3 da F1	MED10_KLULA (mediador da RNA polimerase II transcricional, subunidade 10)	22	proteína co-ativadora envolvida na regulação da transcrição
	B9 da F2	GPI2_KLULA (<i>GPI-ethanolamide phosphate transferase 2</i>)	20	transferase envolvida na biossíntese da âncora glicosilfosfatidilinositol, transfere etanolamina fosfato à segunda manose da GPI
0,09 h ⁻¹	B9 da F3	ARX1_KLULA (metaloprotease ARX1)	26	como metaloprotease envolvida na biogênese da subunidade ribossomal 60S, protease
	B8 da F4	ATPG_KLULA (cadeia gama da ATP sintase)	22	na regulação da atividade ATPase, síntese de ATP, transporte de íon hidrogênio
	B8 da F4	GAL10_KLULA (proteína bifuncional GAL10)	31	mutarrotase, isomerase, metabolismo de carboidrato, metabolismo de galactose, enzima multifuncional
	B9 da F5	IPL1_KLULA (<i>Spindle assembly cinase</i>)	20	proteína ligante de ATP, serina/treonina cinase, transferase, partição de cromossomo, ciclo celular

* μ = velocidade específica de crescimento.

5. DISCUSSÃO

A levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2359 foi cultivada em regime de cultura contínua em duas velocidades específicas de crescimento ($0,09 \text{ h}^{-1}$ e $0,03 \text{ h}^{-1}$) e mostrou comportamentos fisiológicos distintos com relação ao consumo de glicose, produção de biomassa e produção e perfil eletroforético de proteínas. As duas velocidades específicas de crescimento são numericamente próximas entre si e menores com relação ao valor da velocidade específica máxima observada ($\mu_{\text{max}} 0,34 \text{ h}^{-1}$), contudo a velocidade específica $0,09 \text{ h}^{-1}$ é 1,33 vez menor e a $0,03 \text{ h}^{-1}$, quatro vezes menor do que a velocidade de crescimento ideal sugerida por Blondeau et al. (1994), como $0,12 \text{ h}^{-1}$ para produção de biomassa e de proteínas heterólogas em cultura contínua de *K. lactis*, linhagem CBS 683.

Os extratos extracelulares provenientes dos cultivos de *K. lactis* mostraram, quanto à produção de proteínas, os valores de $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ nas velocidades específicas de crescimento de $0,03 \text{ h}^{-1}$ e $0,09 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Van Ooyen et al. (2006), em estudos com *K. lactis*, relataram que a capacidade de produção de proteína por essa levedura está na faixa de $0,32 \text{ mg.L}^{-1}$ a $3,0 \text{ g.L}^{-1}$, em linhagens recombinantes, mostrando que os valores da produção de proteínas extracelulares obtidos neste trabalho são compatíveis com o observado anteriormente.

No regime permanente, o pH do cultivo manteve-se constante em 4,5, e observou-se uma produção de biomassa de $0,95$ e $0,57 \text{ mg.mL}^{-1}$ nas velocidades específicas de crescimento de $0,03 \text{ h}^{-1}$ e $0,09 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, sendo o valor ótimo descrito para *K. lactis*, linhagem JA6 de 2 mg.mL^{-1} de biomassa, quando cultivado em

batelada, a pH 6,0, em um meio mínimo com 2% de fonte de carbono e suplementado com aminoácidos (MERICO et al., 2004). O pH ótimo para produção de biomassa em *K. lactis* CBS 683 cultivada em cultura contínua é de 6,0 (BLONDEAU et al., 1994). Obteve-se um rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$) de $0,13 \text{ g.g}^{-1}$ na velocidade específica de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$, enquanto no de $0,03 \text{ h}^{-1}$ se observou um rendimento de biomassa de $0,08 \text{ g.g}^{-1}$, em cultivos em pH 4,5. Já Merico et al. (2004), ao cultivarem *K. lactis* em pH 6,0, conseguiram um rendimento de biomassa de $0,24 \text{ g.g}^{-1}$. Essa comparação de resultados mostra que foram obtidos 54% do rendimento na velocidade específica de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$ e 33% na velocidade específica de crescimento de $0,03 \text{ h}^{-1}$, com relação ao descrito pelos referidos autores em pH 6,0.

Observa-se maior eficiência na conversão de glicose em proteína extracelular e em biomassa nas amostras da taxa de diluição de $0,09 \text{ h}^{-1}$, ou seja, nessa velocidade foi necessária uma menor quantidade de glicose para se produzir 1 g de célula, e menor quantidade de glicose foi necessária para se produzir 1 g de proteína, o que demonstra que na taxa de diluição de $0,09 \text{ h}^{-1}$ houve melhor conversão de glicose em proteína extracelular.

As diferenças encontradas no proteoma das proteínas extracelulares de *K. lacis* cultivada nas velocidades específicas de crescimento de $0,03 \text{ h}^{-1}$ e $0,09 \text{ h}^{-1}$ puderam ser observadas tanto na eletroforese em condições desnaturantes (Figura 5) quanto na cromatografia líquida bi-dimensional (Figuras 27 e 28), e maior número de proteínas extracelulares foi verificado na velocidade específica de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$, em ambas as técnicas utilizadas.

A eletroforese das amostras nas diferentes velocidades específicas de crescimento mostrou, pela coloração PAS, que as proteínas extracelulares de *K. lactis* são, em sua maioria, glicosiladas. Essa observação foi confirmada posteriormente em análise por espectrometria de massa, na qual foi possível visualizar espectros de proteínas com várias moléculas de glicose presentes.

Comparando os resultados obtidos nos dois tipos de coloração PAS e *Coomassie* coloidal (Figura 5), observou-se que na faixa de massa molecular entre 10 e 30 kDa, nas duas velocidades específicas de crescimento, a presença de bandas coradas por *Coomassie* coloidal e não-coradas por PAS, o que indica que as proteínas dessa faixa de massa molecular não são glicosiladas. Na região do gel correspondente à faixa de massa molecular entre 40 e 70 kDa, das amostras da velocidade específica de crescimento de $0,03 \text{ h}^{-1}$, notam-se proteínas que não são coradas por *Coomassie* coloidal, mas coradas

por PAS. Esse fato pode ter ocorrido devido à baixa concentração de proteína na amostra utilizada, o que prejudica a coloração coloidal, apesar da sua boa sensibilidade, mas não interfere significativamente na coloração de PAS, pois esse método pode revelar uma banda “tênue” se cerca de 1 µg de proteína glicosilada for aplicado no gel, o que corresponde a uma cadeia de carboidrato, e a sensibilidade da reação de coloração está em torno de 50 ng de carboidrato (FAIRBANKS et al., 1971).

Na amostra correspondente à velocidade específica de crescimento de 0,09 h⁻¹, não foram observadas diferenças entre as bandas coradas pelos dois métodos, ou seja, todas coraram pelas duas colorações, pois são glicosiladas. Em bandas com valores de massa molecular acima de 80 kDa, diferenças não foram verificadas em ambos as velocidades específicas de crescimento, sendo todas glicosiladas. As amostras foram designadas dentro de faixas moleculares, já que o cálculo de massa molecular das bandas de interesse por meio de SDS-PAGE fica prejudicado devido à presença de glicosilações, e as proteínas glicosiladas migram mais lentamente no gel do que as não-glicosiladas, o que gera erro no cálculo (WESTERMEIER, 2001).

As proteínas extracelulares provenientes das culturas em ambas as velocidades de crescimento foram reduzidas e alquiladas com DTT e iodoacetamida (em condições térmicas desnaturantes) antes de serem aplicadas na eletroforese, para que as ligações dissulfídicas não interferissem na análise por espectrometria de massa, impedindo a separação de peptídios que poderiam estar interligados por essas ligações. As amostras depois do procedimento de redução e alquilação não mostraram perfis de banda diferente (Figura 6) do perfil obtido para o SDS-PAGE das amostras sem o tratamento (Figura 5A). Esse resultado evidencia que as proteínas extracelulares de *K. lactis* obtidas neste estudo não apresentariam pontes dissulfeto aparentemente. Entretanto, sabe-se que as ligações de sulfeto propiciam maior estabilidade estrutural das proteínas, o que é característica vantajosa para uma proteína secretada na manutenção de sua estabilidade em meio extracelular. Diante dessas observações, mais estudos devem ser realizados para averiguar a presença de ligações dissulfeto entre domínios e, ou, internamente nas proteínas extracelulares de *K. lactis*.

As proteínas de *K. lactis* para as quais se obteve baixo score pelo software MASCOT[®] nas análises de PMF, amostras tripsinolizadas provenientes do SDS-PAGE, como visto nos resultados descritos anteriormente, são proteínas que não possuem função fisiológica relacionada diretamente com as funções fisiológicas estabelecidas para proteínas extracelulares. As proteínas sugeridas pela análise como “extracelulares”

estão relacionadas, principalmente, a processos típicos de ciclo celular, replicação, transcrição, mudanças pós-traducionais, metabolismo de carboidrato ubiquitinação e degradação celular e são comumente encontradas no interior celular (Tabela 16).

Nas análises por LC-2D do mesmo material analisado anteriormente por SDS-PAGE, observou-se que, na cromatografia de troca iônica em coluna SOURCE Q (1ª dimensão) das amostras provenientes da velocidade específica de crescimento $0,03\text{ h}^{-1}$, seis picos foram separados (Figura 7), os quais posteriormente foram recromatografados em uma coluna RESOURCETM RPC (2ª dimensão - cromatografia de fase reversa) (Figura 27). Verificando os seis cromatogramas obtidos após a separação em coluna RESOURCETM RPC, pôde-se averiguar diferenças entre picos de cromatogramas diferentes. A fase reversa do terceiro pico e o quarto pico da troca iônica mostraram que os cromatogramas da fase reversa obtidos são bem semelhantes entre si, a não ser pelo material que é eluído nos volumes de 15 a 25 mL, em que há vários picos diferenciados dos demais. Nas outras frações obtidas, não se notaram semelhanças acentuadas, apenas o primeiro pico da fase reversa, cujo material não interage com a matriz da coluna RESOURCETM RPC.

Na cromatografia de troca iônica das amostras provenientes da velocidade específica de crescimento de $0,09\text{ h}^{-1}$ foram separados oito picos (Figura 16), que foram recromatografados por fase reversa (Figura 28). Nos oito cromatogramas da fase reversa, também se pôde observar diferenças de picos entre os cromatogramas, contudo não foram verificados cromatogramas com muitas semelhanças, como visto na cromatografia das amostras da velocidade específica de crescimento de $0,03\text{ h}^{-1}$. A semelhança observada entre os cromatogramas dessa fase reversa ocorreu no primeiro pico, referente ao material que não interage com a coluna RESOURCETM RPC.

Comparando os resultados obtidos na cromatografia líquida bi-dimensional, percebeu-se maior número de picos nos cromatogramas das amostras da velocidade específica de crescimento de $0,09\text{ h}^{-1}$ do que nas da velocidade específica de crescimento de $0,03\text{ h}^{-1}$, como já tinha sido observado na eletroforese em gel de gradiente dessas mesmas amostras (Figura 5A). Contudo, na comparação entre o SDS-PAGE e o LC-2D notou-se maior número de picos em cada amostra quando correlacionado com o número de bandas do gel, o que demonstra melhor fracionamento e maior possibilidade de identificar maior número de proteínas utilizando as técnicas de LC-2D e MS.

A matriz DHB mostrou-se mais eficiente, pois nas análises realizadas com as amostras desta pesquisa foram obtidos maior número de massas moleculares com essa matriz, além de permitir a visualização de glicosilações que não foram detectadas com o uso das outras matrizes. Nas várias análises feitas com as diferentes matrizes, obteve-se um total de 95 massas moleculares nas duas velocidades específicas de crescimento, e, dessas massas, aproximadamente 30% pertencem às amostras da velocidade específica de crescimento de $0,03\text{ h}^{-1}$ e 70% a velocidade específica de crescimento de $0,09\text{ h}^{-1}$. Do total verificado, tem-se que 20 valores de massa molecular estão dentro da faixa de 5,0 kDa a 6,0 kDa, 21 massas dentro da faixa de 6,01 kDa a 7,0 kDa, 23 dentro da faixa de 7,01 kDa a 8,0 kDa, nove dentro da faixa de 9,0 kDa a 20,0 kDa, sete dentro da faixa de 20,01 kDa a 30,0 kDa e três valores de massa molecular dentro da faixa de 30,01 kDa a 34,0 kDa. Esse resultado evidencia que só se obtiveram massas de moléculas intactas até 34,0 kDa. Isso pode ter ocorrido em razão do alto nível de glicosilações das proteínas de *K. lactis* e de outras mudanças pós-traducionais, como fosforilações, que prejudicam a ionização da proteína e, conseqüentemente, o vôle e detecção pelo equipamento.

Ao compararem as massas obtidas por espectrometria de massa com as massas deduzidas, mediante o uso de ferramentas de bioinformática, sugerem-se diversas trocas de aminoácidos na seqüência, mudanças pós-traducionais como acetilação, deaminação, farnesilação, miristilação, glicosilação, modificação de aminoácidos e também hidrólise pós-traducional do peptídeo sinal. Trost et al. (2005) relataram, no trabalho de análise das proteínas secretadas por espécies patogênicas e não-patogênicas de *Listeria* sp, proteólises pós-traducionais de diversas proteínas secretadas, quando comparadas com o genoma da bactéria, o que corrobora o encontrado pelos resultados do banco de dados deste estudo, com e sem peptídios sinal (Anexo).

Durante as análises do proteoma extracelular de *K. lactis* houve indicações da possível presença de diferentes modificações na estrutura polipeptídica das proteínas extracelulares. Contudo, devem-se ressaltar as várias glicosilações observadas durante as análises, nesta pesquisa, por SDS-PAGE coloração PAS e por espectrometria de massa. As proteínas secretadas estudadas se mostraram glicosiladas, com várias moléculas de hexoses ligadas às suas cadeias polipeptídicas.

As glicosilações foram observadas tanto nas amostras pertencentes às velocidades específicas de crescimento de $0,03\text{ h}^{-1}$ quanto a $0,09\text{ h}^{-1}$, por análise de MS em MALDI utilizando a matriz DHB. Observou-se, em uma análise inicial, a presença

de hexoses e *N*-acetilglicosamina em quatro amostras glicosiladas com diferentes quantidades de hexoses, duas da velocidade específica de crescimento de $0,03\text{ h}^{-1}$ que apresentaram, no mínimo, 15 hexoses detectadas pela técnica utilizada (Figuras 11 e 13) e duas da velocidade específica de crescimento de $0,09\text{ h}^{-1}$, uma que apresentou oito hexoses detectáveis (Figura 18) e outra que exibiu nove hexoses detectáveis e uma *N*-acetilglicosamina, pela técnica utilizada (Figura 20). Esse resultado está de acordo com o encontrado na literatura, pois as cadeias externas dos glicanos em leveduras consistem, principalmente, de oligômeros de manose (glicoproteínas *N*-ligadas: de parede celular – 100 a 200 resíduos por cadeia, secretadas – número de resíduos intermediário e variável, vacuolares – nove resíduos por cadeia; glicoproteínas *O*-ligadas: cinco resíduos por cadeia). Contudo, *K. lactis* adiciona no resíduo terminal da cadeia, moléculas de *N*-acetilglicosamina (SCHACHTER, 2001; TANNER; LEHLE, 1987; KUKURUZINSKA et al., 1987).

A glicosilação de proteínas é uma das importantes modificações pós-traducionais envolvidas em mecanismos de ajuste fino dos controles celulares (KUKURUZINSKA; LENNON, 1998). Entretanto, em sistemas de expressão fúngicos para produção de proteínas de interesse terapêutico a produção de proteínas glicosiladas pode afetar a imunogenicidade dessas proteínas. O sucesso de *K. lactis* como hospedeira na expressão de proteínas na indústria de alimentos indica que essa levedura também pode ser usada em grande escala para a produção de proteínas terapêuticas na indústria farmacêutica. Um dos problemas desta última aplicação é o modelo de glicosilação das proteínas secretadas de *K. lactis*, que são diferentes das glicosilações humanas. Grande número de estudos envolvendo mutantes isolados, que possuem defeitos em eventos de glicosilação e que super-secretam proteínas heterólogas, tem sido descrito para *K. lactis*, com o intuito de minimizar problemas de baixa expressão ou secreção e alterar o perfil glicídico das proteínas glicosiladas secretadas (VAN OUYEN et al., 2006). O maior conhecimento das proteínas extracelulares glicosiladas de *K. lactis* e o seu perfil glicídico em diferentes condições de cultivo são relevantes para a construção de sistema de expressão com essa levedura, em que as proteínas produzidas possam ter propriedades terapêuticas sem alterarem a distribuição tecido-específica, meia-vida e, principalmente, a imunogenicidade em humanos.

Com o objetivo de identificar algumas proteínas obtidas no LC-2D, as amostras foram reduzidas, alquiladas e tripsinolizadas, enquanto as massas moleculares dos peptídeos obtidos foram analisadas (PMF). Os mesmos peptídeos obtidos foram

fragmentados (por CID), utilizando-se o espectrômetro de massa MALDI-TOF-MS, sendo os dados obtidos analisados com o uso do *software* MASCOT[®] (PERKINS et al., 1999), do qual retornaram algumas proteínas com baixo *score*. Como discutido anteriormente nas análises de tripsinólise do material proveniente de SDS-PAGE e da LC-2D/MS, os *scores* estatisticamente significativos para as análises deste estudo fornecidos pelo programa devem estar acima do valor de 55 ($p < 0,05$). As proteínas que retornaram das análises de PMF após CID não apresentaram *score* significativo (> 55), pois todos foram menores que 55, sendo, assim, nenhuma das identificações protéicas conclusivas.

Para melhor compreensão de como ocorre a identificação e como uma proteína recebe um *score*, deve-se entender a técnica de PMF e como o programa MASCOT faz os alinhamentos. O PMF provê uma identificação virtual da seqüência de interesse pela comparação dos valores de massas dos fragmentos obtidos experimentalmente após a digestão trípica com fragmentos virtuais obtidos de uma simulação de hidrólise trípica de proteínas de um banco de dados, considerando-se os seguintes aspectos: 1) a combinação das seqüências de proteínas em um banco de dados possui um *score* e são “ranqueadas” de acordo com o número de combinações de massas de peptídios, a acurácia das massas e o tamanho da proteína; 2) se há uma identificação, a massa da seqüência peptídica é correlacionada com a seqüência protéica do banco; 3) geralmente, grande número de peptídios com alta acurácia de massa é encontrado, resultado que pode significar alto *score* e alta cobertura da seqüência protéica (PALMA et al., 2003).

O programa MASCOT faz alinhamentos de espectros de massa de peptídios ou proteínas obtidos experimentalmente com os deduzidos *in silico* a partir do genoma ou banco de proteínas, quando se tem um banco de dados não-consolidados, nos quais se apresentam erros, que podem afetar toda a análise proteômica, pois uma diferença de apenas um amonoácido em um único peptídio pode acarretar em erro de centenas de daltons, o que, em análise de espectrometria de massa, não é aceitável, posto que os maiores erros permitidos nas análises de proteômica estão na ordem de 1 Da. Os *scores* são fornecidos pelo programa através do cálculo de probabilidade baseada no modelo estatístico *Mowse Score*, sendo a combinação observada dos dados um evento aleatório (PERKINS et al., 1999).

Os *scores* estatisticamente significativos dos dados analisados foram fornecidos pelo programa com valor acima de 55 ($p < 0,05$). Desse modo, os baixos *scores* obtidos aqui podem ser devidos à presença de problemas na anotação ou na mineração das

ORFs do banco genômico da *K. lactis*. Assim, novas análises comparativas dos resultados deverão ser feitas quando a terceira publicação com correções dos dados do banco genômico da *K. lactis* forem publicados.

Os problemas na identificação de seqüências, em análise proteômica, estão relacionados à não-produção de *hits* significantes (ranqueamento) com os bancos de dados disponíveis, já que vários desses bancos estão incompletos ou não bem estabelecidos para diversos organismos do reino Fungi. Medina et al. (2005) e Zorn et al. (2005), em análise do secretoma de *Aspergillus flavus* e *Pleurotus sapidus*, respectivamente, evidenciaram esses problemas. Esses pesquisadores não conseguiram identificar todas as proteínas de interesse obtidas, mesmo analisadas por diferentes métodos (SDS-PAGE 1D e 2D, ESI-MS/MS e, ou, LC-MS/MS) e utilizando bancos de dados diferentes. Isso porque, com a falta do genoma específico ou genomas incompletos depositados, a análise se restringiu a bases de dados de organismos com proximidade filogenética, o que fatalmente retorna em dados de identificação definidos como proteínas hipotéticas ou de função desconhecida.

Pode-se verificar como um banco de dados consolidado é importante nas análises proteômicas, examinando o trabalho de Wymelenberg et al. (2006), no qual foram comparadas duas diferentes versões do banco de dados do genoma de *Phanerochaete chrysosporium*. Durante as análises dos dois bancos, observou-se que o número de genes anotados por grupo de proteínas ortólogas de eucariotos (KOG) na primeira versão era de 3.578 proteínas, e na segunda versão houve aumento para 7.220 proteínas; os genes anotados por classificação de enzimas pelo sistema EC na primeira versão eram de 1.673 enzimas, e na segunda versão esse número foi para 2.252, o que demonstra a possibilidade de modificações substanciais de uma versão para outra. Na segunda versão, um total de 10.048 genes foram predito e anotados contra 11.777 da primeira. Os citados autores analisaram os peptídios obtidos de proteínas secretadas em LC-MS/MS e os identificaram, separadamente, pela segunda versão do banco de dados do genoma de *Phanerochaete chrysosporium*. A 2ª versão predisse 769 proteínas secretadas (268 a mais do que na primeira), em que 43% não mostraram similaridade significativa com proteínas conhecidas, mas foram relacionadas estruturalmente com seqüências de proteínas hipotéticas, e 53% indicaram similaridade com proteínas conhecidas, sendo possível classificá-las por famílias, de acordo com a função (WYMELENBERG et al., 2006).

A identificação das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* por MS das amostras advindas do SDS-PAGE e das amostras provenientes de LC-2D/MS mostrou que as proteínas possuem função fisiológica e localização estabelecidas apenas por similaridade ao genoma e não estão relacionadas diretamente com as funções fisiológicas de proteínas extracelulares. Assim, foram observadas proteínas de *K. lactis* ligadas ao trânsito de peptídios, ao metabolismo de carboidrato (de hexoses), enzimas de transcrição (polimerases) e outras enzimas como transferases, cinases, hidrolases, descarboxilases, oxidases e mutarrotases (Tabela 16). Recordando-se o discutido, essas proteínas não obtiveram os *scores* mínimos para que a identificação por homologia seja considerada estatisticamente significativa.

Considerando que as proteínas extracelulares identificadas no proteoma de *K. lactis* demonstraram funções fisiológicas citoplasmáticas, pode-se sugerir a ocorrência de lise celular da levedura durante o cultivo sob estresse, e a lise pode ter ocorrido por processo como a apoptose, o que proporcionaria extravasamento e, conseqüentemente, a identificação de algumas dessas proteínas durante as análises. Corrêia (2007) relatou indícios de apoptose em culturas de *K. lactis* crescendo a $0,01\text{ h}^{-1}$, dados esses que poderiam explicar a presença de proteínas intracelulares no meio extracelular. Outro fator que poderia explicar a presença de proteínas originalmente intracelulares no meio extracelular são as rotas não clássicas de secreção ou rotas não clássicas de exportação (NCE) presentes em algumas leveduras (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *Y. lipolytica* e *K. lactis*), em que proteínas intracelulares podem ser secretadas ou integradas à membrana e apresentam funções diferenciadas das clássicas realizadas no citoplasma. Essas funções podem ser: enzimas glicolíticas, chaperoninas, fatores de tradução, enzimas de formação de peroxissomos, proteínas envolvidas na morfogênese e resposta a estresse, biossíntese de heme, transporte de prótons, metabolismo de mRNA e proteínas multifuncionais; entre os mecanismos alternativos de exportação de proteínas, ressaltam-se os transportadores de membrana ligados à ATP, que potencialmente dirigem a exportação não clássica de proteínas (NCE) em *S. cerevisiae* (NOMBELA et al., 2006; NICKEL, 2003 e 2005; BENDTSEN et al., 2004; CLEVES; KELLY, 1996). A existência de genes homólogos (*NCE101* e *NCE102*) dessa via em *K. lactis* indica que essa levedura também pode estar potencialmente exportando proteínas originalmente intracelulares.

Até o momento, os resultados aqui descritos não se mostram conclusivos na identificação das proteínas de *K. lactis*. Entretanto, a perspectiva é de que, com a

atualização do banco de dados do genoma de *K. lactis* prevista para acontecer em breve, será possível refazer as análises, melhorando os *scores* e os *hits* para se ter uma identificação confiável das proteínas secretadas de *K. lactis* sobre estresse de nitrogênio, bem como verificar quanto essa condição afeta diretamente a fisiologia e a secreção de proteínas.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, para a realização de estudos sobre o proteoma extracelular da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 2359 sob condições de estresse por nitrogênio foram utilizadas técnicas de cultivo em cultura contínua e técnicas de análise proteômica. Essas estratégias propiciaram a observação de diferenças no padrão de expressão de proteínas extracelulares da levedura sob limitação de nitrogênio:

- ✓ A velocidade de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$ mostrou o maior rendimento na produção de proteínas extracelulares ($1,54 \text{ mg.L}^{-1}$), maior conversão de glicose em produto ($3,3 \times 10^{-4} \text{ g.g}^{-1}$) e um maior rendimento de biomassa ($0,13 \text{ g.g}^{-1}$).
- ✓ A velocidade de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$ apresentou maior número de bandas no perfil protéico em SDS-PAGE gradiente quando comparada com o perfil obtido para a taxa de $0,03 \text{ h}^{-1}$.
- ✓ As proteínas sugeridas pela análise SDS-PAGE/MS estão relacionadas a processos de ciclo celular, replicação, transcrição, mudanças pós-traducionais, metabolismo de carboidrato, ubiquitinação e degradação celular e são comumente encontradas no interior celular.
- ✓ Os extratos extracelulares de *K. lactis* analisados por cromatografia líquida bi-dimensional (LC-2D) indicaram que:
 - o A velocidade específica de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$ apresenta maior número de picos cromatográficos, indicando a presença de maior número de proteínas em relação a $0,03 \text{ h}^{-1}$.

- ✓ Nas várias análises por espectrometria de massa em MALDI-TOF-TOF-MS, das amostras advindas de LC-2D obtiveram-se um total de 95 massas moleculares nas duas velocidades específicas de crescimento, sendo 30% e 70%, respectivamente, nas velocidades específicas de $0,03 \text{ h}^{-1}$ e $0,09 \text{ h}^{-1}$.
- ✓ A análise por espectrometria de massa também evidenciou a presença de glicosilações em amostras resultantes de LC-2D de ambas as velocidades específicas de crescimento:
 - o Moléculas de *N*-acetilglicosamina e de 8 a 15 moléculas de hexose por proteína.
- ✓ Com o auxílio de ferramentas de bioinformática foram sugeridas algumas mudanças pós-traducionais como acetilação, miristoilação, deaminação e proteólise pós-traducional, e inversões de aminoácidos nas proteínas extracelulares observadas com relação às seqüências do genoma de *K. lactis* disponíveis no momento.
- ✓ Na identificação das proteínas extracelulares das amostras nas duas velocidades específicas de crescimento por LC-2D/MS, elas foram tripsinolizadas e analisadas por PMF e CID:
 - o As proteínas sugeridas pela análise foram proteínas de *K. lactis* ligadas ao trânsito de peptídios e ao metabolismo de carboidrato, enzimas de transcrição e outras enzimas, como transferases, cinases, hidrolases, descarboxilases, oxidases e mutarotases.

7. PERSPECTIVAS

Os problemas na identificação das proteínas e seus peptídios determinados na análise proteômica estão diretamente relacionados à não-produção de *scores* e *hits* significantes com os bancos de dados disponíveis, principalmente com o banco de dados do genoma de *K. lactis*, o qual ainda não está bem estabelecido. Uma nova publicação, o terceiro *release* do banco, está para ser divulgada em breve.

Como perspectivas futuras de trabalho, assim que a última atualização do banco de dados do genoma de *K. lactis* for divulgada sugere-se refazer as análises, buscando melhorar os *scores* e os *hits* para se ter uma identificação confiável das proteínas secretadas de *K. lactis*, bem como fazer análises específicas para estudar as mudanças pós-traducionais presentes nessas proteínas. Posteriormente, também poder-se-ia estudar a interação proteína-proteína, mutantes e condições fisiológicas que diminua o nível de glicosilações indesejável nas proteínas secretadas por *K. lactis*, para aumentar a aplicação das proteínas heterólogas produzidas. Pode-se estudar, ainda, o proteoma extracelular em outras velocidades específicas de crescimento, como $0,18\text{ h}^{-1}$ e $0,27\text{ h}^{-1}$, tendo-se, assim, uma análise abrangente da resposta à restrição nutricional.

8. REFERÊNCIAS

- ARVAN, P.; ZHAO, X.; RAMOS-CASTANEDA, J.; CHANG, A. Secretory pathway quality control operating in golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. **Traffic**, Blackwell Munksgaard, v. 3, p. 771-780, 2002.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2nd. New York : McGraw-Hill, 1986.
- BARRETO, E.S. **Atividade de beta-galactosidase e caracterização de mutantes de *Kluyveromyces lactis* resistentes a geneticina**. Viçosa, MG: UFV, 1998. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BENDTSEN, J.D.; JENSEN, L.J.; BLOM, N.; HEIJNE, G.V.; BRUNAK, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. **Protein Engineering, Design & Selection: PEDS**, v. 17, p. 349-356, 2004.
- BLOM, N.; SICHERITZ-PONTEN, T.; GUPTA, R.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from amino acid sequence. **Proteomics**, v. 4, p. 1633-1649, 2004.
- BLONDEAU, K.; BOZE, H.; JUNG, G.; MOULIN, G.; GALZY, P. Physiological approach to heterologous human serum albumin production by *Kluyveromyces lactis* in chemostat culture. **Yeast**, v. 10, p. 1297-1303, 1994.
- BOER, V.M.; DE WINDE, J.H.; PRONK, J.T.; PIPER, M.D. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 3265-3274, 2003.

BOLOTIN-FUKUHARA, M.; TOFFANO-NIOCHE, C.; ARTIGUENAVE, F.; DUCHATEAU-NGUYEN, G.; LEMAIRE, M.; MARMEISSE, R.; MONTROCHER, R.; ROBERT, C.; TERMIER, M.; WINCKER, P.; WESOLOWISKI-LOUVEL, M. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 11. *Kluyveromyces lactis*. **FEBS Letters**, v. 487, p. 66-70, 2000.

BONEKAMP, F.J.; OOSTERON, J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n.1, p. 1-3, 1994.

BOWERS, K.; STEVENS, T.H. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1744, p. 438-454, 2005.

BRADFORD, M.M. An rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.

BRENJNING, J.; JESPERSEN, L. Protein expression during lag phase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.75, p. 27-38, 2002.

BREUNIG, K.D.; FUKUHARA, M.B.; BIANCHI, M.M.; BOURGAREL, D.; FALCONE, C.; FERRERO, I.; FRONTALI, L.; GOFFRINI, P.; KRIJGER, J.J.; MAZZONI, C.; MILKOWSKI, C.; STEENSMA, H.Y.; WESOLOWSKI-LOUVEL, M.; ZEEMAN, A.M. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 771-180, 2000.

BRUNO, L.M. **Secreção de proteínas nativas por *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae***. Viçosa, MG: UFV, 1998. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BRUSTOLINI, O.J.B.; SANTOS, A.V.; OLIVEIRA, A.B.N.; MAFRA, C.L.; PASSOS, F.M.L. Computational Prediction of Extracellular Proteins in *Kluyveromyces lactis*. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR – SBBq, 34., 2005. **Anais...** [S.l.: s.n.], 2005.

BURKOVSKI, A. Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. **FEMS**, v. 27, p. 617-628, 2003.

CAMPOS, L.L. **Obtenção e caracterização de mutantes de *Kluyveromyces lactis* selecionados em cultura contínua utilizando soro de queijo ultrafiltrado**. Viçosa, MG: UFV, 2001. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CARGNEY, G.; AMIRI, S.; PREMAWARADENA, T.; LINDO, M.; EMILI, A. *In silico* proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Science**, v. 1, p. 1-5, 2003.

CHEN, E.J.; KAISER, C.A. Amino acids regulate the intracellular trafficking of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA (PNAS)**, v. 99, n. 23, p. 14837-14842, 2002.

CHEN, H.; XUE, Y.; HUANG, N.; YAO, X.; SUN, Z. MeMo: a web tool for prediction of protein methylation modifications. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. W249-W253, 2006.

CLEVES, A.E.; KELLY, R.B. Rehearsing the ABCs. Protein translocation. **Current Biology**, v. 6, p. 276-278, 1996.

COOPER, T.G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERM, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. (Eds.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: metabolism and gene expression**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, 1982. p. 39-99.

CORRÊIA, L.F.M. **Cinética de crescimento e longevidade de culturas de *Kluyveromyces lactis* sob estresse por nitrogênio**. Viçosa, MG : UFV, 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CRESPO, J.L.; POWERS, T.; FOWLER, B.; HALL, M.N. The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA (PNAS)**, v. 99, p. 6784-6789, 2002.

DARAN-LAPUJADE, P.; JANSEN, M.L.; DARAN, J.M.; VAN GULIK, W.; DE WINDE, J.H.; PRONK, J.T. Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 9125-9138, 2004.

DICKINSON, J.; SCHWEIZER, R. **The metabolism and Molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. 2nd ed. New York : CRC Press LLC, 2004.

DURAND, R.; RASCLE, C.; FEVRE, M. Expression of a catalytic domain of a *Neocallimastix frontalis* endoxylanase gene (*xin3*) in *Kluyveromyces lactis* and *Penicillium roqueforti*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 208-214, 1999.

DUTT, M.J.; LEE, K.H. Proteomic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 176-179, 2000.

ESTEBAN, P.F.; VARQUEZ DE ALDANA, C.R.; DEL REY, F. Cloning and characterization of 1,3-beta-glucanase-encoding genes from non-conventional yeasts. **Yeast**, v. 15, n. 2, p. 91-109, 1999.

FAIRBANKS, G.; STECK, T.L.; WALLACH, D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. **Biochemistry**, v. 10, n. 13, p. 2606-2617, 1971.

FARINA, F.; UCCELLETTI, D.; GOFFRINI, P.; BUTOW, R.A.; ABEIJON, C.; PALLESCHI, C. Alterations of O-glycosylation, cell wall, and mitochondrial metabolism in *Kluyveromyces lactis* cells defective in KIPmr1p, the Golgi Ca⁺²-ATPase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318, p. 1031-1038, 2004.

FICKERS, P.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 742-9, 2004.

FLEER, R.; YEH, P.; AMELLAL, N.; MAURI, I.; FOURNIER, A.; BACCHETA, F.; BADUEL, P.; JUNG, G.; L'HOTE, H.; BECQUART, J.; FUKUHARA, H.; MAYAUX, J-F. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeast. **BioTechnology**, v. 9, p. 968-975, 1991.

FORSBERG, H.; GILSTRING, C.F.; ZARGARI, A.; MARTINEZ, P.; LJUNGDAHL, P.O. The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. **Molecular Microbiology**, v. 42, p. 215-228, 2001.

FORSBERG, H.; LJUNGDAHL, P.O. Genetic and Biochemical Analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 814-826, 2001.

FORSBERG, H.; LJUNGDAHL, P.O. Sensor of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 40, p. 91-109, 2001a.

FRANZUSOFF, A.; ROTHBLATT, J.; SCHECKMEN, R. Analysis of polypeptide transit through yeast secretory pathway. **Methods in enzymology**, v. 194, p. 662-675, 1991.

GARBIS, S.; LUBEC, G.; FOUNTOLAKIS, M. Limitations of current proteomics technologies. **Journal of Chromatography A**, n. 1077, p. 1-18, 2005.

GONZALEZ-LOPEZ, C.I.; SZABO, R.; BLANCHIN-ROLAND, S.; GAILLARDIN, C. Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Genetics**, v. 160, p. 417-427, 2002.

GÖRGENS, J.F.; VAN ZYL, W.H.; KNOETZE, J.H.; HAHN-HÄGERDAL, B. Amino acid supplementation improves heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 684-91, 2005.

GRIFFIN, T.J.; AEBERSOLD, R. Advances in proteome analysis by mass Spectrometry. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 45497-45500, 2001.

INOKI, K.; OUYANG, H.; LI, Y.; GUAN, K-L. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n.1, p. 79-100, 2005.

JOUBERT, R.; BRIGNON, P.; LEHMANN, C.; MONRIBOT, C.; GENDRE, F.; BOUCHERIE, H. Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. **Yeast**, v. 16, p. 511-522, 2000.

KAMINSKI, N.; FRIEDMAN, N. Practical approaches to analyzing results of microarray experiments. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 27, p. 125-132, 2002.

KANG, D.; GHO, Y.S.; SUH, M.; KANG, C. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 23, p.1511, 2002.

KAWAI, M.; NAKASHIMA, A.; UENO, M.; USHIMARU, T.; AIBA, K.; DOI, H.; URITANI, M. Fission yeast *tor1* functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. **Current Genetics**, v.39, n. 3, p. 166-174, 2001.

KOLKMAN, A.; OLSTHOORN, M.M.A.; HEEREMANS, C.E.M.; HECK A.J.R.; SLIJPER, M. Comparative proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostat cultures limited for glucose or ethanol. **Molecular Cell Proteomics**, v. 4, p. 1-11, 2005.

KUKURUZINSKA, M. A.; BERGH, M. L. E.; JACKSON, B. J. Protein glycosylation in yeast. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 56, p. 915-944, 1987.

KUKURUZINSKA, M.A.; LENNON, K. Protein N-glycosylation: Molecular genetics an functional significance. **Critical Review Oral and Biological Medicine**, v. 9, n. 4, p. 415-448, 1998.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALOUX, O.; CASSART, J.P.; DELCOUR, J.; VAN BEEUMEN, J.; VANDENHAUTE, J. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. **FEBS Letters**, v. 289, n.1, p. 64-8, 1991.

LEE, T.Y.; HUANG, H.D.; HUNG, J.H.; HUANG, H.Y.; YANG, Y.S.; WANG, T.H. dbPTM: an information respository of protein post-traslational modification. **Nucleic Acids Research**, v. 34, D622-D627, 2006.

LOPEZ-AVALOS, M.D.; UCCELLETTI, D.; ABEIJON, C.; HIRSCHBERG, C.B. The UDPase activity of the *Kluyveromyces lactis* Golgi GDPase has a role in uridine nucleotide sugar transport into Golgi vesicles. **Glycobiology**, v. 11, p. 413-422, 2001.

LOTTSPEICH, F. Proteome analysis: a pathway to the functional analysis of proteins. **Angewandte Chemie (International Edition in English)**, v. 38, n. 17, p. 2476-2492, 1999.

MAGASANIK, B.; KAISER, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, p. 1-18, 2002.

MARTIN, D.E.; HALL, M.N. The expanding TOR signaling network. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, p.158-166, 2005.

MATTANOVICH, D.; GASSER, B.; HOHENBLUM, H.; SAUER, M. Stress in recombinant protein producing yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 121-135, 2004.

MAYNARD, D.M.; MASUDA, J.; YANG, X.; KOWALAK, J.A.; MARKEY, S.P. Characterizing complex peptide mixtures using a multi-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry system: *Saccharomyces cerevisiae* as a model system **Journal of Chromatography**, B 810, p. 69-76, 2004.

MEDINA, M.L.; HAYNES, P.A.; BRECI, L.; FRANCISCO, W.A. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Proteomics**, v. 5, p. 3153-3161, 2005.

MERICO, A.; CAPITANIO, D.; VIGENTINI, I.; RANZI, B.M.; COMPAGNO, C. How physiological and cultural conditions influence heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Biotechnology**, v. 109, p. 139-146, 2004.

MO, W.; KARGER, B.L. Analytical aspects of mass spectrometry and proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 666-675, 2002.

MONDÉSERT, G.; CLARKE, D.J.; REED, S.I. Identification of genes controlling growth polarity in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a possible role of N-glycosylation and involvement of the exocyst complex. **Genetics**, v. 147, p. 421-434, 1997.

MONOD, J. The growt of bacterial cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, p. 371-394, 1949.

MUSTILLI, A.C.; IZZO, E.; HOUGHTON, M.; GALEOTTI, C.L. Comparison of secretion of a hepatitis C virus glicoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. **Research in Microbiology**, v. 150, p. 179-187, 1999.

NEIDHART, F.C.; INGRAHAM, J.L.; SCHAECHTER, M. **Physiology of the bacterial cell**. A molecular approach. [S.l.]: Ed. Publlishers Sundeland, 1990.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.

NICKEL, W. The mystery of nonclassical protein secretion. **European Journal Biochemistry**, v. 270, p. 2109-2119, 2003.

NICKEL, W. Unconventional Secretory Routes: Direct Protein Export Across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. **Traffic**, v. 6, p. 607-614, 2005.

NOMBELA, C.; GIL, C.; CHAFFIN, L. Non-convencional protein secretion in yeast. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 15-21, 2006.

OHLMEIER, S.; KASTANIOTIS, A.J.; HILTUNEN, J.K.; BERGMANN, U. The yeast mitochondrial proteome, a Study of fermentative and respiratory growth. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 3956-3979, 2004.

OISHI, H.; MORIMOTO, T.; WATANABE, Y. Purification and characterization of phospholipase B from *Kluyveromyces Lactis*, and cloning of phospholipase B gene. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n.1, p. 83-90, 1999.

ORNELAS, A.P.; SILVEIRA, W.B.; SAMPAIO, F.C.; PASSOS, F.M.L. The activity of β -galactosidase and lactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* cultured in cheese whey as a function of growth rate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1008-1013, 2008.

PALMA, M.S.; MENDE, M.A.; SOUZA, B.M.; MARQUES, M.R. **MALDI-ToF-MS: Theory and Practice**. Rio Claro, SP-Brasil: Laboratory of Structural Biology and Zoochemistry, UNESP, 2003.

PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. **Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science**, v. 771, p. 3-31, 2002.

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.C.; CREASY, D.M.; COTTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3551-3567, 1999.

PIPER, M.D.W.; DARAN-LAPUJADE, P.; BRO, C.; REGENBERG, B.; KNUDSEN, S.; NIELSEN, J.; PRONK, J.T. Reproducibility of oligonucleotide microarray transcriptome analyses – An interlaboratory comparison using chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 37001-37008, 2002.

REGENBERG, B.; DURING-OLSEN, L.; KIELLAND-BRANDT, M.C.; HOLMMBERG, S. Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 36, p.317-328, 1999.

REINDERS, J.; SICKMANN, A. Modificomics: Post-translational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation. **Biomolecular Engineering**, v. 24, p. 169-177, 2007.

ROUWENHORST, R.J.; HENSING, M.; VERBAKEL, J.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied in Environmental Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 3337-3345, 1990.

SALIOLA, M.; MAZZONI, C.; SOLIMANDO, N.; CRISAM, A.; FALCONEM, C.; JUNG, G.; FLEER, R. Use of the *KIADH4* promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*. **Applied in Environmental Microbiology**, v. 65, p. 53-60, 1999.

SANTOS, A.V. **Seleção de leveduras proteolíticas de laticínio e caracterização parcial de proteases extracelulares**. Viçosa, MG: UFV, 2003. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SCHACHTER, H. Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 58, p. 1085-1104, 2001.

SCHRÖEDER, M.; CHANG, J.S.; KAUFMAN, R.J. The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast. **Genes & Development**, v. 14, p. 2962-2975, 2000.

SCHRÖEDER, M.; KAUFMAN, R.J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutation Research**, v. 569, p. 29-63, 2005.

SCRAFFRATH, R.; BREUNIG, K.D. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 30, p. 173-190, 2000.

SICKMANN, A.; MREYEN, H.E. Identification of modified proteins by mass spectrometry. **IUBMB Life**, v. 54, p. 51-57, 2002.

SILVEIRA, W.B. **Influência do metabolismo de carbono e do nível de oxigênio sobre a localização da permease de lactose em *Kluyveromyces lactis***. Viçosa, MG: UFV, 2007. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

STONE, K.L.; WILLIAMS, K.R. Enzymatic digestion of proteins in solution and SDS polyacrylamide gel. In: WALKER, J.M. (Ed.). **The protein protocol handbook**. Totowa, Nj: Human press Inc., 1996. p. 415-421.

STRAUSS, M.L.A.; JOLLY, N.P.; LAMBRECHTS, M.G.; VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-saccharomyces wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 182-190, 2001.

STRITMATTER, E.F.; FERGUSON, P.L.; TANG, K.; SMITH, R.D. Proteome Analyses Using Accurate Mass and Elution Time Peptide Tags with capillary LC Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Journal of American Society Mass Spectrometry**, v. 14, p. 980-991, 2003.

TANNER, W.; LEHLE, L. Protein glycosylation in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 906, p. 81-99, 1987.

TER SCHURE, E. G.; SILLJÉ, H. H. W.; RAEVEN, L. J. R. M.; BOONSTRA, J. VERKLEIJ, A. J.; THEO VERRIPS, C. Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 141, p. 1101-1108, 1995.

TER SCHURE, E.G.; SILLJÉ, H.H.; VERKLEIJ, A.J.; BOONSTRA, J.; VERRIPS, C.T. The concentration of ammonia regulates nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 22, p. 6672-6675, 1995a.

TER SCHURE, E.G.; VAN RIEL, N.A.W.; VERRIPS, C.T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 67-83, 2000.

TOKUNAGA, M.; ISHIBASHI, M.; TATSUDA, D.; TOKUNAGA, H. Secretion of α -amylase from *Kluyveromyces lactis*. **Yeast**, v. 13, p. 699-706, 1997.

TOLL, H.; OBERACHER, H.; SWART, R.; HUBER, C.G. Separation, detection, and identification of ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry at high and low pH. **Journal of Chromatography A**, v. 1079, p. 274-286, 2005.

TRABALZINI, L.; PAFFETTI, A.; SCALONI, A.; TALAMO, F.; FERRO, E.; CORATZA, G.; BOVALINI, L.; LUSINI, P.; MARTELLI, P.; SANTUCCI, A. Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 35-46, 2003.

TROST, M.; WEHMHNER, D.; KÄRST, U.; DIETERICH, G.; WEHLAND, J.; JÄNSCH, J. Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and non pathogenic *Listeria* species. **Proteomics**, v. 5, p. 1544-1557, 2005.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, p. 193-197, 2003.

UCCELLETTI, D.; ANTICOLI, S.; PALLESCHI, C. The apyrase KLYnd1p of *Kluyveromyces lactis* affects glycosylation, secretion, and cell wall properties **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 731-739, 2007.

UCCELLETTI, D.; FARINA, F.; MANCINI, P.; PALLESCHI, C. *KIPMR1* inactivation and calcium addition enhance secretion of non-hyperglycosylated heterologous proteins in *Kluyveromyces latidis*. **Journal of Biotechnology**, v. 109, p. 93-101, 2004.

UCCELLETTI, D.; FARINA, F.; MORLUPI, A.; PALLESCHI, C. Mutants of *Kluyveromyces lactis* with altered protein glycosylation are affected in cell wall morphogenesis. **Research in Microbiology**, v. 150, p. 5-12, 1999.

UCCELLETTI, D.; FARINA, F.; PINTON, P.; GOFFRINI, P.; MANCINI, P.; TALORA, C.; RIZZUTO, R.; PALLESCHI, C. The Golgi Ca^{2+} -ATPase KIPmr1p Function Is Required for Oxidative Stress Response by Controlling the Expression of the Heat-Shock Element *HSP60* in *Kluyveromyces lactis*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 4636-4647, 2005.

UCCELLETTI, D.; FARINA, F.; RUFINI, S.; MAGNELLI, P.; ABEIJON, C.; PALLESCHI, C. The *Kluyveromyces lactis* α 1,6-mannosyltransferase KIOch1p is required for cell-wall organization and proper functioning of the secretory pathway. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 449-457, 2006.

UCCELLETTI, D.; PACELLI, V.; MANCINI, P.; PALLESCHI, C. vga mutants of *Kluyveromyces lactis* show cell integrity defects. **Yeast**, v. 16, p. 1161-1171, 2000.

VAN OUYEN, A.J.J.; DEKKER, P.; HUANG, M.; OLSTHOORN, M.M.A.; JACOBS, D.I.; COLUSSI, P.A.; TARON, C. H. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 381-392, 2006.

WALSH, D.J.; GIBBS, M.D.; BERGQUIST, P.L. Expression and secretion of a xylanase from the extreme thermophile, *Thermotoga* strain FjSSB.1, in *Kluyveromyces lactis*. **Extremophiles**, v. 2, p. 9-14, 1998.

WEI, J.; SUN, J.; YU, W.; JONES, A.; OELLER, P.; KELLER, M.; WOODNUTT, G.; SHORT, J.M. Global proteome discovery using an online three-dimensional LC-MS/MS. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 801-808, 2005.

WERNER-WASHBURN, M.; BRAUN, E.; JOHNSTON, G.C.; SINGER, R.A. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v. 57, p. 383-401, 1993.

WERNER-WASHBURN, M.; BRAUN, E.L.; CRAWFORD, M.E.; PECK, V.M. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 19, p. 1159-1166, 1996.

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice**: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. Third edition. Weinheim: Wiley-vch verlag-gmbh, 2001.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in practice**: a laboratory manual of proteome analysis. Weinheim: Wiley-vch verlag-gmbh, 2002.

WIEDEMUTH, C.; BREUNIG, K.D. Role of Snf1p in regulation of intracellular sorting of the lactose and galactose transporter Lac12p in *Kluyveromyces lactis*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p. 716-721, 2005.

WINDERICKX, J.; HOLSBECKS, I.; LAGATIE, O.; THEVELEIN, J.; DE WINDE, H. 7 from feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast. **Topics in Current Genetics**, v. 1, p. 305-386, 2003.

WYMELENBERG, A.V.; MINGES, P.; SABAT, G.; MARTINEZ, D.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; GRIGORIEV, I.; SHAPIRO, H.; PUTMAM, N.; BELINKY, P.; DORORETZ, C.; GASKELL, J.; KERSTEN, P.; CULLEN, D. Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 343-356, 2006.

XUE, Y.; ZHOU, F.; FU, C.; XU, Y.; YAO, X. SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. **Nucleic Acid Research**, v. 34, W254-W257, 2006.

YODA, K.; NODA, Y. Vesicular transport and the Golgi apparatus in yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n.1, p. 1-11, 2001.

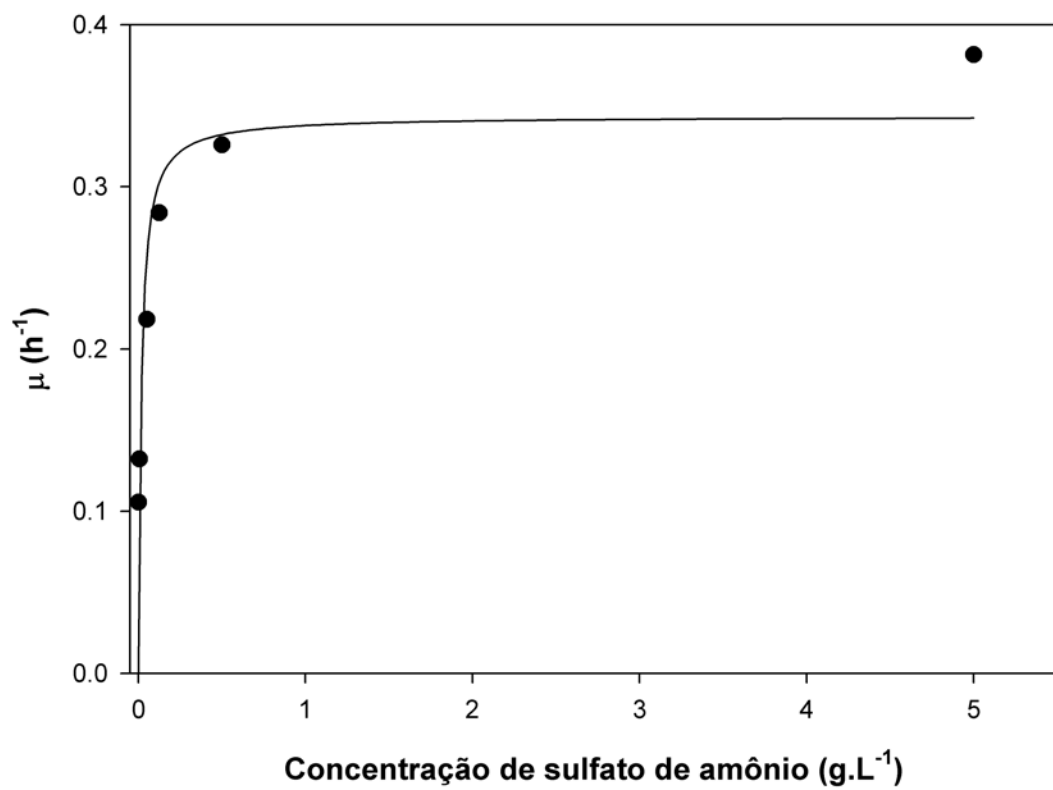
ZHONG, X.; MALHOTRA, R.; GUIDOTTI, G. ATP uptake in the Golgi and extracellular release require Mcd4 protein and the vacuolar H⁺-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 33436-33434, 2003.

ZHONG, X.; MALHOTRA, R.; GUIDOTTI, G. Regulation of yeast ectoapyrase ynd1p activity by activator subunit Vma13p of vacuolar H⁺-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 35592-35599, 2000.

ZORN, H.; PETERS, T.; NITMTZ, M.; BERGER, R.G. The secretome of *Pleurotus sapidus*. **Proteomics**, v. 5, p. 4832-4838, 2005.

ANEXOS

Cinética de Crescimento de *K. lactis* em Função da Concentração de Sulfato de Amônio.



Cinética de crescimento de *K. lactis* em função da concentração de sulfato de amônio ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$) em meio YCB, ajustada conforme o modelo de Monod: $\mu = \mu_{\text{máx.}} \cdot S / (K_s + S)$.

Tabela 1A – Massa molecular das proteínas extracelulares de *K. lactis* com ou sem peptídio sinal contruida apartir dos dados de BRUSTOLINI et., al. 2005.

Nome da Sequência	Nº AA	Massa Molecular Deduzida	
		Com Peptídio Sinal	Sem Peptídio Sinal
gnl_GLV_KLLA0A00693g	49	5318.2	3511.04
gnl_GLV_KLLA0C06820g	62	6617.7	5068.93
gnl_GLV_KLLA0E08217g	72	8108.5	5149.96
gnl_GLV_KLLA0B05951g	77	8632.3	6560.69
gnl_GLV_KLLA0F24959g	94	10149.8	7698.87
gnl_GLV_KLLA0D17468g	95	10300.7	8138.22
gnl_GLV_KLLA0D13112g	96	10421.9	8504.64
gnl_GLV_KLLA0B06666g	94	10705.3	8556.87
gnl_GLV_KLLA0A07315g	107	10920.1	8981.87
gnl_GLV_KLLA0E22121g	106	10845	9124.06
gnl_GLV_KLLA0F05863g	101	11417.1	9268.64
gnl_GLV_KLLA0E02794g	109	11178.2	9369.11
gnl_GLV_KLLA0D08789g	109	12281.5	10252.06
gnl_GLV_KLLA0F20031g	124	12465.8	10770.91
gnl_GLV_KLLA0C10824g	109	13435.9	11406.43
gnl_GLV_KLLA0E05159g	125	14399.4	11465.05
gnl_GLV_KLLA0F20614g	131	14959.1	12015.64
gnl_GLV_KLLA0E02156g	123	14068.7	12254.67
gnl_GLV_KLLA0C05038g	130	15046.4	12857.84
gnl_GLV_KLLA0B03245g	141	14982.6	13020.25
gnl_GLV_KLLA0F27775g	136	15676.1	13079.09
gnl_GLV_KLLA0C01045g	140	15255.4	13111.8
gnl_GLV_KLLA0F19844g	134	15135.1	13199.75
gnl_GLV_KLLA0A00154g	151	16387.3	13559.98
gnl_GLV_KLLA0E00154g	146	15942.8	13559.98
gnl_GLV_KLLA0F00220g	146	15942.8	13559.98
gnl_GLV_KLLA0D00187g	151	16423.3	13596.01
gnl_GLV_KLLA0C00176g	146	16005.9	13623.03
gnl_GLV_KLLA0D19965g	151	16450.3	13623.03
gnl_GLV_KLLA0C06402g	136	15809.3	13660.88
gnl_GLV_KLLA0C05016g	159	15724.9	13964.85
gnl_GLV_KLLA0A04367g	161	16063.4	14019.12
gnl_GLV_KLLA0E18326g	169	18986.8	15125.24
gnl_GLV_KLLA0E01023g	161	16948.8	15239.81
gnl_GLV_KLLA0C04928g	174	17277.3	15542.3
gnl_GLV_KLLA0B05731g	164	18549.8	16223.09
gnl_GLV_KLLA0D08624g	171	18395	16601.84

Continua...

Tabela 1A – Cont.

Nome da Sequência	Nº AA	Massa Molecular Deduzida	
		Com Peptídio Sinal	Sem Peptídio Sinal
gnl_GLV_KLLA0E13321g	173	18816.2	16695.8
gnl_GLV_KLLA0C12727g	169	19127.4	16770.65
gnl_GLV_KLLA0E10384g	185	19776.8	17062.55
gnl_GLV_KLLA0E24937g	184	20194	17787.2
gnl_GLV_KLLA0E19173g	187	20380	18443.61
gnl_GLV_KLLA0E19657g	200	21066.9	18517.77
gnl_GLV_KLLA0A04323g	203	20364.2	18584.21
gnl_GLV_KLLA0B13772g	180	20837.7	18609.06
gnl_GLV_KLLA0E12661g	190	21426.8	19108.75
gnl_GLV_KLLA0C10208g	201	22237	20122.37
gnl_GLV_KLLA0E24893g	222	23362.1	20996.24
gnl_GLV_KLLA0F17182g	213	23196.1	21040.45
gnl_GLV_KLLA0E20119g	214	23261.2	21071.61
gnl_GLV_KLLA0D09416g	197	23182.8	21230.47
gnl_GLV_KLLA0F12518g	199	23043.1	21294.91
gnl_GLV_KLLA0A04796g	213	24285.5	21546.19
gnl_GLV_KLLA0E04939g	248	24054.5	21830.91
gnl_GLV_KLLA0F12254g	224	25249	22896.1
gnl_GLV_KLLA0B06347g	248	25073.3	22918.67
gnl_GLV_KLLA0C10054g	235	25021.2	23226.99
gnl_GLV_KLLA0E13816g	244	24929.6	23285.58
gnl_GLV_KLLA0F06336g	223	25422.1	23301.44
gnl_GLV_KLLA0E21131g	261	25744.9	23561.3
gnl_GLV_KLLA0B11055g	272	25695.9	23599.33
gnl_GLV_KLLA0E04301g	259	27304.3	24821.32
gnl_GLV_KLLA0F06468g	241	26626	24971.01
gnl_GLV_KLLA0D07942g	264	28408.7	25998.81
gnl_GLV_KLLA0B07447g	275	28104.6	26259.46
gnl_GLV_KLLA0E01298g	261	28834.4	26992.02
gnl_GLV_KLLA0E16841g	266	30015.9	27880.25
gnl_GLV_KLLA0A06468g	273	30601.9	27967.61
gnl_GLV_KLLA0D10736g	285	30164	28198.67
gnl_GLV_KLLA0F02794g	260	29893	28237.89
gnl_GLV_KLLA0D19921g	283	31011.5	28647.7
gnl_GLV_KLLA0A04345g	301	30579.5	28799.45
gnl_GLV_KLLA0B14102g	271	30681.7	29039.8
gnl_GLV_KLLA0B07370g	298	30977.4	29044.17
gnl_GLV_KLLA0F24486g	283	31161.3	29200
gnl_GLV_KLLA0E10967g	298	31295.4	29328.1
gnl_GLV_KLLA0E24959g	324	33805.9	31320.98
gnl_GLV_KLLA0F03036g	311	34157.8	32208.58
gnl_GLV_KLLA0E25113g	338	36170.6	34092.08
gnl_GLV_KLLA0C17226g	322	36773.6	34708.09

Continua...

Tabela 1A – Cont.

Nome da Sequência	Nº AA	Massa Molecular Deduzida	
		Com Peptídio Sinal	Sem Peptídio Sinal
gnl GLV KLLA0B07392g	362	36787.5	34966.36
gnl GLV KLLA0F08745g	353	38027.2	35630.28
gnl GLV KLLA0D02486g	328	37923.6	35676.89
gnl GLV KLLA0D04576g	335	38410.7	36181.92
gnl GLV KLLA0A00979g	343	38944.8	36302.91
gnl GLV KLLA0A03201g	378	39275.9	37257.46
gnl GLV KLLA0C01276g	373	39397.6	37290.13
gnl GLV KLLA0C14047g	378	39276.2	37561.18
gnl GLV KLLA0D11022g	359	40077.3	37626.37
gnl GLV KLLA0D11000g	359	40167.4	37716.46
gnl GLV KLLA0E14982g	398	41240.7	39310.42
gnl GLV KLLA0C07260g	368	41461.7	39449.17
gnl GLV KLLA0E05544g	369	42423.8	39685.36
gnl GLV KLLA0D00275g	391	41919.5	39905.95
gnl GLV KLLA0A11748g	419	42466.4	40160.73
gnl GLV KLLA0D07568g	370	41802.6	40356.86
gnl GLV KLLA0F04433g	413	43025.3	40383.28
gnl GLV KLLA0D10934g	376	43178.4	40556.27
gnl GLV KLLA0A02013g	373	42188.8	40694.98
gnl GLV KLLA0C14454g	417	42733.3	40744
gnl GLV KLLA0A06556g	399	42838.3	40952.04
gnl GLV KLLA0D05929g	409	44514.8	41931.83
gnl GLV KLLA0D11638g	391	44761.6	42967.55
gnl GLV KLLA0F27995g	410	45549.5	43572.15
gnl GLV KLLA0E17105g	408	46451.4	44081.51
gnl GLV KLLA0D10890g	432	46640.1	44271.29
gnl GLV KLLA0D19470g	419	48227.8	44844.8
gnl GLV KLLA0B14839g	421	47193.8	44900.19
gnl GLV KLLA0C01496g	456	46783.3	44951.14
gnl GLV KLLA0A05709g	410	47078.3	45056.88
gnl GLV KLLA0C01001g	429	47076	45114.99
gnl GLV KLLA0B09746g	457	47466.4	45693.35
gnl GLV KLLA0D06567g	425	48137.1	46260.83
gnl GLV KLLA0F02860g	433	48904.9	46354
gnl GLV KLLA0C18744g	445	48656.6	46515.07
gnl GLV KLLA0F22671g	466	48581.1	46668.84
gnl GLV KLLA0F16907g	452	48784.8	46757.32
gnl GLV KLLA0F21164g	420	48780.2	46861.9
gnl GLV KLLA0F04235g	447	49242.3	46920.59
gnl GLV KLLA0C07403g	428	49292	47373.67
gnl GLV KLLA0C12903g	437	50115.9	47384.55
gnl GLV KLLA0E03685g	428	49788.4	47767.98
gnl GLV KLLA0C05324g	429	49811.3	47822.81

Continua...

Tabela 1A – Cont.

Nome da Sequência	Nº AA	Massa Molecular Deduzida	
		Com Peptídio Sinal	Sem Peptídio Sinal
gnl GLV KLLA0D14421g	470	50484.2	48366.67
gnl GLV KLLA0F27929g	442	51216.5	48688.5
gnl GLV KLLA0C17490g	452	50483.8	48699.66
gnl GLV KLLA0E12639g	457	51621.3	49251.48
gnl GLV KLLA0E10703g	504	52302	49648.83
gnl GLV KLLA0F01441g	471	51943.4	49715.79
gnl GLV KLLA0B00286g	469	52505.2	50867.25
gnl GLV KLLA0A00176g	469	52612.7	50898.65
gnl GLV KLLA0E07326g	470	52887.8	51003.5
gnl GLV KLLA0C19338g	469	53113	51646.17
gnl GLV KLLA0C11517g	520	54550.5	52204.71
gnl GLV KLLA0C07238g	499	54520.9	52609.61
gnl GLV KLLA0F07931g	490	55892	53129.54
gnl GLV KLLA0D15917g	511	55775	53831.53
gnl GLV KLLA0D10439g	485	56129.5	54176.12
gnl GLV KLLA0F04906g	496	56154	54202.63
gnl GLV KLLA0A10109g	509	56475.2	55027.48
gnl GLV KLLA0C04730g	551	58193.6	56045.96
gnl GLV KLLA0C01111g	527	59275.2	56719.28
gnl GLV KLLA0B05808g	526	59514.1	57104.15
gnl GLV KLLA0D00979g	561	60095.9	58088.61
gnl GLV KLLA0A09977g	535	60252.7	58745.89
gnl GLV KLLA0E13211g	550	61443.9	59064.92
gnl GLV KLLA0E03938g	589	61739	60007.95
gnl GLV KLLA0B04356g	551	63266.5	61140.93
gnl GLV KLLA0F01903g	578	64814.1	61362.02
gnl GLV KLLA0C19151g	595	64083.7	61750.81
gnl GLV KLLA0C04994g	608	63649	61905
gnl GLV KLLA0F01595g	653	65041.6	62804.01
gnl GLV KLLA0D10241g	561	64953.8	63008.35
gnl GLV KLLA0C02211g	566	65001.5	63119.14
gnl GLV KLLA0C05236g	601	65970.3	64321.29
gnl GLV KLLA0A10417g	609	68348.9	66880.02
gnl GLV KLLA0C01694g	612	68932.2	67014.86
gnl GLV KLLA0C05940g	640	69982.8	67210.57
gnl GLV KLLA0A02871g	630	69494.3	67667.05
gnl GLV KLLA0D06402g	631	73704.4	70731.92
gnl GLV KLLA0A01177g	636	73596.7	71010.41
gnl GLV KLLA0B14498g	766	73708.6	71639.13
gnl GLV KLLA0F14300g	669	75416.1	73238.54
gnl GLV KLLA0F13178g	662	75968.6	73818.9
gnl GLV KLLA0F12232g	680	77374.4	75260.67
gnl GLV KLLA0E09658g	782	84080.8	81807.09

Continua...

Tabela 1A – Cont.

Nome da Sequência	Nº AA	Massa Molecular Deduzida	
		Com Peptídio Sinal	Sem Peptídio Sinal
gnl_GLV_KLLA0C19437g	795	84368.1	81921.19
gnl_GLV_KLLA0B03608g	764	88576.4	85883.16
gnl_GLV_KLLA0B02563g	808	91982.2	88394.78
gnl_GLV_KLLA0F12232g	680	77374.4	75260.67
gnl_GLV_KLLA0E05137g	817	91812.3	90114.32
gnl_GLV_KLLA0E10681g	818	94559.8	92238.98
gnl_GLV_KLLA0E09570g	836	95631.4	93580.88
gnl_GLV_KLLA0F24222g	826	95979.9	93683.25
gnl_GLV_KLLA0F18238g	844	96738.6	94540.1
gnl_GLV_KLLA0E07227g	896	101653.9	99495.49
gnl_GLV_KLLA0F09735g	910	104840.6	102624.86
gnl_GLV_KLLA0A00869g	969	108737.6	106480.11
gnl_GLV_KLLA0F11704g	1013	110464.2	108283.73
gnl_GLV_KLLA0E14586g	1224	117188.3	114604.27
gnl_GLV_KLLA0A11935g	1118	121664.4	119122.36
gnl_GLV_KLLA0F02409g	1247	142428.8	139850.52
gnl_GLV_KLLA0D06446g	1423	147736.4	145756.01
gnl_GLV_KLLA0E01001g	1878	194551.8	192387.18

AA- Aminoácidos.

Modificações Pós-Traducionais

1- Post-translational modifications

	Abbreviation	Monoisotopic	average	UniProtKB/Swiss-Prot annotation (controlled vocabulary)
Acetylation	ACET	42.0106	42.0373	N-acetylalanine N2-acetylarginine N-acetylaspartate N-acetylcysteine N-acetylglutamate N-acetylglutamine N6-acetyllysine N-acetylmethionine N-acetylproline N-acetylserine N-acetylthreonine N-acetyltyrosine N-acetylvaline
ADP-ribosylation	ADP	541.0610	541.30	ADP-ribosylarginine ADP-ribosylasparagine ADP-ribosylcysteine ADP-ribosylserine PolyADP-ribosyl glutamic acid ‡
Allysine	ALLYS	-1.0316	-1.03	
Amidation	AMID	-0.9840	-0.9847	Alanine amide Arginine amide Aspartic acid 1-amide Asparagine amide Cysteine amide Glutamic acid 1-amide Glutamine amide Glycine amide Histidine amide Isoleucine amide Leucine amide Lysine amide Methionine amide Phenylalanine amide Proline amide Serine amide Threonine amide Tryptophan amide Tyrosine amide Valine amide
S-archaeol	ARCH	634.6628	635.14	S-archaeol cysteine
Beta-methylthiolation	BMTH	45.9877118	46.08688	3-methylthioaspartic acid
Biotin	BIOT	226.0776	226.2934	
Bromination	BROM	77.9105	78.9	Bromohistidine 6'-bromotryptophan
N6-l-carboxyethyl lysine	CETH	72.0211	72.06	
Cholesterol	CHOL	368.3443	368.64	Cholesterol glycine ester
Cis-14-hydroxy-10,13-dioxo-7-heptadecenoic acid aspartate ester	CHDH	294.1831	294.39	
Citrullination	CITR	0.9840276	0.98476	Citrulline
C-Mannosylation	CMAN	162.052823	162.1424	
Cysteine sulfenic acid (-SOH)	CSEA	15.9949146	15.9994	
Cysteine sulfinic acid (-SO ₂ H)	CSIA	31.9898292	31.9988	
Cysteine persulfide	CYSP	31.9721	32.06	
Deamidation	DEAM	0.9840	0.9847	Deamidated asparagine Deamidated glutamine
Deamidation followed by a methylation	DEAME	14.9997	15.01	Glutamate methyl ester (Gln)
n-Decanoate	DECA	241.1678	241.33	O-decanoyl serine O-decanoyl threonine
2,3-didehydroalanine (Ser)	DHAS	-18.0106	-18.02	

2,3-didehydrobutyryne	DHB	-18.0106	-18.02	
(Z)-2,3-didehydrotyrosine	DHY	-2.0156	-2.02	
S-diacylglycerol cysteine	DIAC	576.5117 ¹	576.94 ¹	S-diacylglycerol cysteine
Dihydroxylation	DIHYDR	31.9898	32.00	3,4-dihydroxyarginine 3,4-dihydroxyproline 4,5-dihydroxylysine
3',4'-dihydroxyphenylalanine	DOPA	15.9949	16	
Dimethylation	DIMETH	28.0314	28.0538	Asymmetric dimethylarginine N4,N4-dimethylasparagine N6,N6-dimethyllysine Omega-N-methylated arginine [†] Symmetric dimethylarginine
Dimethylation of proline	DIMETP	29.0391	29.06	N,N-dimethylproline
Diphthamide	DIPH	143.1184	143.21	
FAD	FAD	783.1415	783.542	O-8alpha-FAD tyrosine Pros-8alpha-FAD histidine S-8alpha-FAD cysteine Tele-8alpha-FAD histidine
S-farnesyl cysteine	FARN	204.1878	204.3556	
S-12-hydroxyfarnesyl cysteine	FAR0	220.1827	220.35	
3-phenyllactic acid	FLAC	0.9840	0.98	
FMN conjugation (Cys)	FMNC	456.1046	456.34	S-4a-FMN cysteine S-6-FMN cysteine
FMN conjugation (Ser/Thr)	FMN	438.0940	438.33	FMN phosphoryl serine FMN phosphoryl threonine
FMN conjugation (His)	FMNH	454.0889	454.33	Tele-8alpha-FMN histidine
Formylation	FORM	27.9949	28.0104	N-formylmethionine N-formylglycine N6-formyllysine
Geranyl-geranylation	GERA	272.2504	272.4741	S-geranylgeranyl cysteine
Gamma-carboxyglutamic acid	GGLU	43.98983	44.0098	4-carboxyglutamate
O-GlcNAc	GLCN	203.0794	203.1950	
Glucosylation (Glycation)	GLUC	162.0528	162.1424	
Glutathionylation	GLUT	305.0680814	305.3056	glutathione
Hydroxylation	HYDR	15.9949	15.9994	3',4'-dihydroxyphenylalanine 3-hydroxyasparagine 3-hydroxyaspartate 3-hydroxyproline 3-hydroxytryptophan 4-hydroxyarginine 4-hydroxyproline 5-hydroxylysine Hydroxyproline
Hypusine	HYPY	87.0684	87.12	
Lipoyl	LIPY	188.033	188.3027	
Methylation	METH	14.0157	14.0269	5-methylarginine 2-methylglutamine Cysteine methyl ester Glutamate methyl ester (Glu) Leucine methyl ester Lysine methyl ester Methylhistidine N-methylalanine N-methylisoleucine N-methylleucine N-methylmethionine N-methylphenylalanine N-methyltyrosine N4-methylasparagine N5-methylarginine N5-methylglutamine N6-methyllysine Omega-N-methylarginine Pros-methylhistidine S-methylcysteine

				Tele-methylhistidine
Methionine sulfone	MSONE	32.00	31.9898	
Myristoylation	MYRI	210.1984	210.3598	N-myristoyl glycine N(6)-myristoyl lysine S-myristoyl cysteine
S-Nitrosylation	NTRY	28.99017	28.99816	S-nitrosocysteine
n-Octanoate	OCTA	126.1044	126.1986	O-octanoyl serine O-octanoyl threonine
Omega-hydroxyceramide glutamate ester	OHC	760.7308 ²	761.3 ²	
3-oxoalanine (Cys)	OXOAC	-17.9928	-18.08	
3-oxoalanine (Ser)	OXOAS	-2.0156	-2.02	
2-oxobutanoic acid	OXOB	-17.0265	-17.03	
Palmitoylation	PALM	238.2297	238.4136	N-palmitoyl cysteine N(6)-palmitoyl lysine O-palmitoyl serine O-palmitoyl threonine S-palmitoyl cysteine
S-palmitoleyl cysteine	PALE	236.2140	236.39	
Phosphatidylethanolamine amidated glycine	PE	699.5203 ³	699.98 ³	
Phosphorylation	PHOS	79.9663	79.9799	4-aspartylphosphate Phosphoarginine Phosphocysteine Phosphohistidine Phosphoserine Phosphothreonine Phosphotyrosine Pros-phosphohistidine Tele-phosphohistidine
Pyridoxal phosphate	PLP	229.014	229.129	
N6-poly(methylaminopropyl) lysine	POLYM	426.4410	426.73	
Phosphopantetheine	PPAN	339.078	339.3234	
Pyrrolidone carboxylic acid (Glu)	PYRE	-18.0106	-18.02	
Pyrrolysine	PYRK	109.0528	109.13	
Pyrrolidone carboxylic acid	PYRR	-17.0266	-17.0306	
Pyruvic acid (Cys)	PYRUC	-33.0037	-33.10	
Pyruvic acid (Ser)	PYRUS	-17.0265	-17.03	
Sulfation	SULF	79.9568	80.0642	Sulfoserine Sulfothreonine Sulfotyrosine
1-thioglycine	THIOG	15.9772	16.06	
Thyroxine	THRX	595.6123	595.68	
2',4',5'-topaquinone	TOPA	29.9742	29.98	
Triiodothyronine	THRN	469.7158	469.78	
Trimethylation	TRIMETH	43.0548	43.09	N6-methylated lysine [†] N6,N6,N6-trimethyllysine N,N,N-trimethylalanine
N6,N6,N6-trimethyl-5- hydroxylysine	TRIMETK	59.0497	59.09	

(¹) Representative structure (palmitate- and oleate-substituted glycerol).

(²) Representative structure (triacontanoate-substituted icosasphingosine).

(³) Representative structure (palmitate- and oleate-substituted glycerol bound to phosphoethanolamine).

(‡) Polymer of ribosylglutamic acid.

(†) Ambiguous description used in the cases where the exact methylation type has not been characterized yet.

http://expasy.org/tools/findmod/findmod_masses.html

2- Amino acids

	Monoisotopic	Average
Alanine (A)	71.03711	71.0788
Arginine (R)	156.10111	156.1875
Asparagine (N)	114.04293	114.1038
Aspartic acid (D)	115.02694	115.0886
Cysteine (C)	103.00919	103.1388
Glutamic acid (E)	129.04259	129.1155
Glutamine (Q)	128.05858	128.1307
Glycine (G)	57.02146	57.0519
Histidine (H)	137.05891	137.1411
Isoleucine (I)	113.08406	113.1594
Leucine (L)	113.08406	113.1594
Lysine (K)	128.09496	128.1741
Methionine (M)	131.04049	131.1926
Phenylalanine (F)	147.06841	147.1766
Proline (P)	97.05276	97.1167
Serine (S)	87.03203	87.0782
Threonine (T)	101.04768	101.1051
Tryptophan (W)	186.07931	186.2132
Tyrosine (Y)	163.06333	163.1760
Valine (V)	99.06841	99.1326

http://expasy.org/tools/findmod/findmod_masses.html

3- Mass differences due to amino acid substitutions (average mass values):

Example: To look up the mass difference caused by "E->Q" (a glutamic acid is replaced by a glutamine), go to the line of the table labeled "E" and follow this line until you get to the column labeled "Q": -0.98. The substitution "E->Q" decreases the mass of your peptide by 0.98.

You may also access the corresponding table based on [monoisotopic mass values](#) for the amino acid masses

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	
A	-	32.06	44.01	58.04	76.10	-14.03	66.06	42.08	57.10	42.08	60.11	43.03	26.04	57.05	85.11	16.00	30.03	28.05	115.13	92.10	A
C	-32.06	-	11.95	25.98	44.04	-46.09	34.00	10.02	25.04	10.02	28.05	10.97	-6.02	24.99	53.05	-16.06	-2.03	-4.01	83.07	60.04	C
D	-44.01	-11.95	-	14.03	32.09	-58.04	22.05	-1.93	13.09	-1.93	16.10	-0.98	-17.97	13.04	41.10	-28.01	-13.98	-15.96	71.12	48.09	D
E	-58.04	-25.98	-14.03	-	18.06	-72.06	8.03	-15.96	-0.94	-15.96	2.08	-15.01	-32.00	-0.98	27.07	-42.04	-28.01	-29.98	57.10	34.06	E
F	-76.10	-44.04	-32.09	-18.06	-	-90.12	-10.04	-34.02	-19.00	-34.02	-15.98	-33.07	-50.06	-19.05	9.01	-60.10	-46.07	-48.04	39.04	16.00	F
G	14.03	46.09	58.04	72.06	90.12	-	80.09	56.11	71.12	56.11	74.14	57.05	40.06	71.08	99.14	30.03	44.05	42.08	129.16	106.12	G
H	-66.06	-34.00	-22.05	-8.03	10.04	-80.09	-	-23.98	-8.97	-23.98	-5.95	-23.04	-40.02	-9.01	19.05	-50.06	-36.04	-38.01	49.07	26.03	H
I	-42.08	-10.02	1.93	15.96	34.02	-56.11	23.98	-	15.01	0.00	18.03	0.94	-16.04	14.97	43.03	-26.08	-12.05	-14.03	73.05	50.02	I
K	-57.10	-25.04	-13.09	0.94	19.00	-71.12	8.97	-15.01	-	-15.01	3.02	-14.07	-31.06	-0.04	28.01	-41.10	-27.07	-29.04	58.04	35.00	K
L	-42.08	-10.02	1.93	15.96	34.02	-56.11	23.98	0.00	15.01	-	18.03	0.94	-16.04	14.97	43.03	-26.08	-12.05	-14.03	73.05	50.02	L
M	-60.11	-28.05	-16.10	-2.08	15.98	-74.14	5.95	-18.03	-3.02	-18.03	-	-17.09	-34.08	-3.06	24.99	-44.11	-30.09	-32.06	55.02	31.98	M
N	-43.03	-10.97	0.98	15.01	33.07	-57.05	23.04	-0.94	14.07	-0.94	17.09	-	-16.99	14.03	42.08	-27.03	-13.00	-14.97	72.11	49.07	N
P	-26.04	6.02	17.97	32.00	50.06	-40.06	40.02	16.04	31.06	16.04	34.08	16.99	-	31.01	59.07	-10.04	3.99	2.02	89.10	66.06	P
Q	-57.05	-24.99	-13.04	0.98	19.05	-71.08	9.01	-14.97	0.04	-14.97	3.06	-14.03	-31.01	-	28.06	-41.05	-27.03	-29.00	58.08	35.05	Q
R	-85.11	-53.05	-41.10	-27.07	-9.01	-99.14	-19.05	-43.03	-28.01	-43.03	-24.99	-42.08	-59.07	-28.06	-	-69.11	-55.08	-57.05	30.03	6.99	R
S	-16.00	16.06	28.01	42.04	60.10	-30.03	50.06	26.08	41.10	26.08	44.11	27.03	10.04	41.05	69.11	-	14.03	12.05	99.14	76.10	S
T	-30.03	2.03	13.98	28.01	46.07	-44.05	36.04	12.05	27.07	12.05	30.09	13.00	-3.99	27.03	55.08	-14.03	-	-1.97	85.11	62.07	T
V	-28.05	4.01	15.96	29.98	48.04	-42.08	38.01	14.03	29.04	14.03	32.06	14.97	-2.02	29.00	57.05	-12.05	1.97	-	87.08	64.04	V
W	-115.13	-83.07	-71.12	-57.10	-39.04	-129.16	-49.07	-73.05	-58.04	-73.05	-55.02	-72.11	-89.10	-58.08	-30.03	-99.14	-85.11	-87.08	-	-23.04	W
Y	-92.10	-60.04	-48.09	-34.06	-16.00	-106.12	-26.03	-50.02	-35.00	-50.02	-31.98	-49.07	-66.06	-35.05	-6.99	-76.10	-62.07	-64.04	23.04	-	Y

Last modified 5/Jun/1998 by ELG http://expasy.org/tools/findmod/aa_subst_average.html

4- Other mass values

	monoisotopic	average
Alkylation	14.01564	14.02688
Carbamylation	43.00581	43.02502
Carboxymethyl cysteine (Cys_CM)	161.01466	161.1755
Carboxyamidomethyl cysteine (Cys_CAM)	160.03065	160.1908
Pyridyl-ethyl cysteine (Cys_PE)	208.067039	208.284
Propionamide cysteine (Cys_PAM)	174.04631	174.2176
Methionine sulfoxide (MSO)	147.0354	147.1920
Homoserine Lactone (HSL)	100.03985	100.09714
H	1.00783	1.00794
H+	1.00728	1.00739
O	15.9949146	15.9994
H2O	18.01056	18.01524

http://expasy.org/tools/findmod/findmod_masses.html

Espectros do *Peptide Mass Fingerprinting*

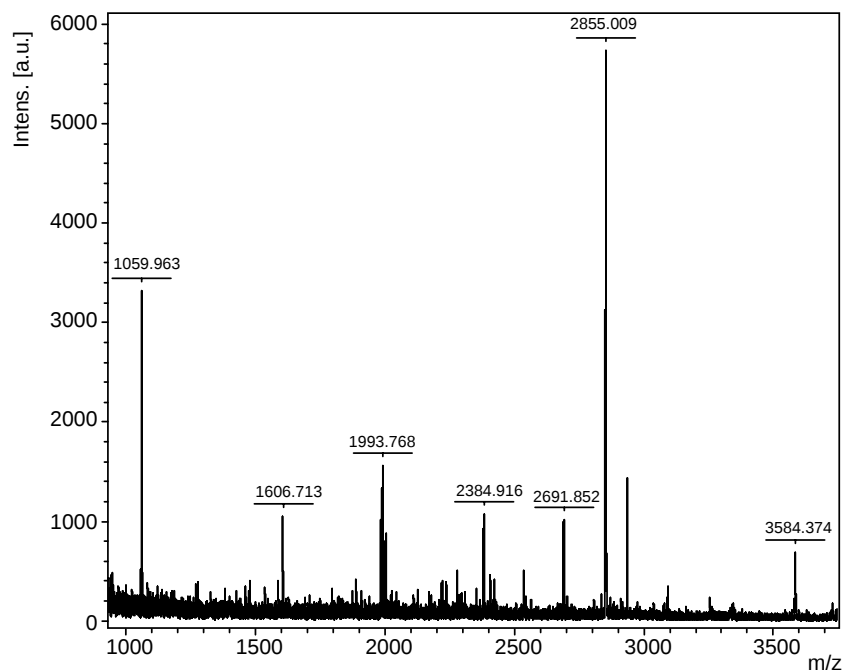


Figura 1 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise da amostra 0,03 h⁻¹-**a** excisada do SDS-PAGE 5-15% (Figura 6). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

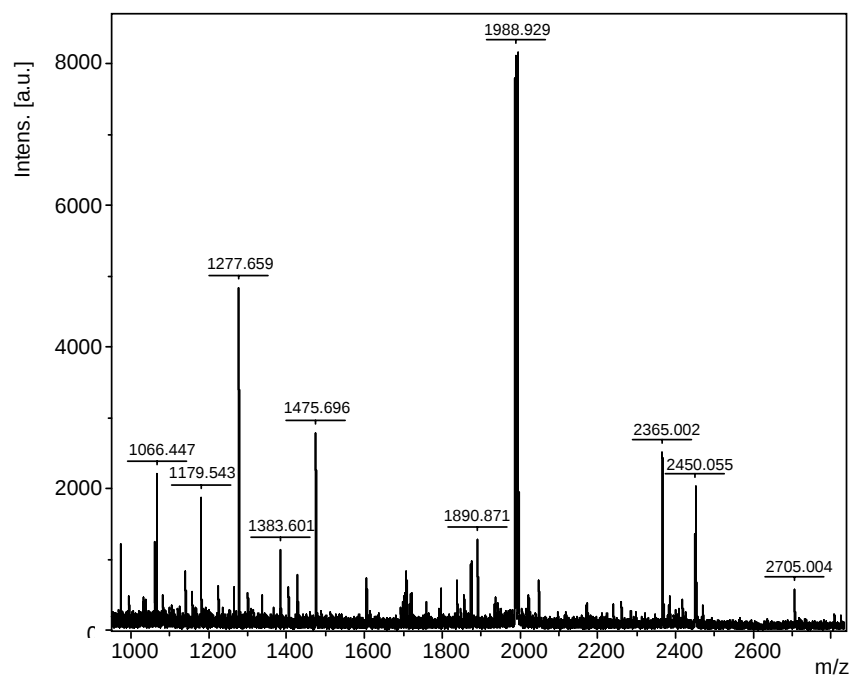


Figura 2 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise da amostra 0,03 h⁻¹-**b** excisada do SDS-PAGE 5-15% (Figura 6). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

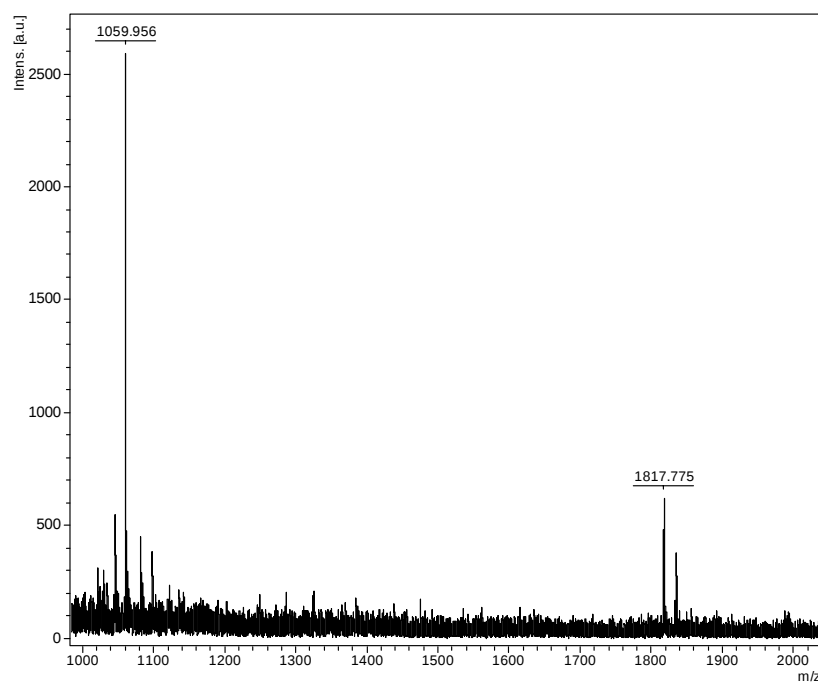


Figura 3 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise da amostra 0,09 h⁻¹-**a'** excisada do SDS-PAGE 5-15% (Figura 6). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

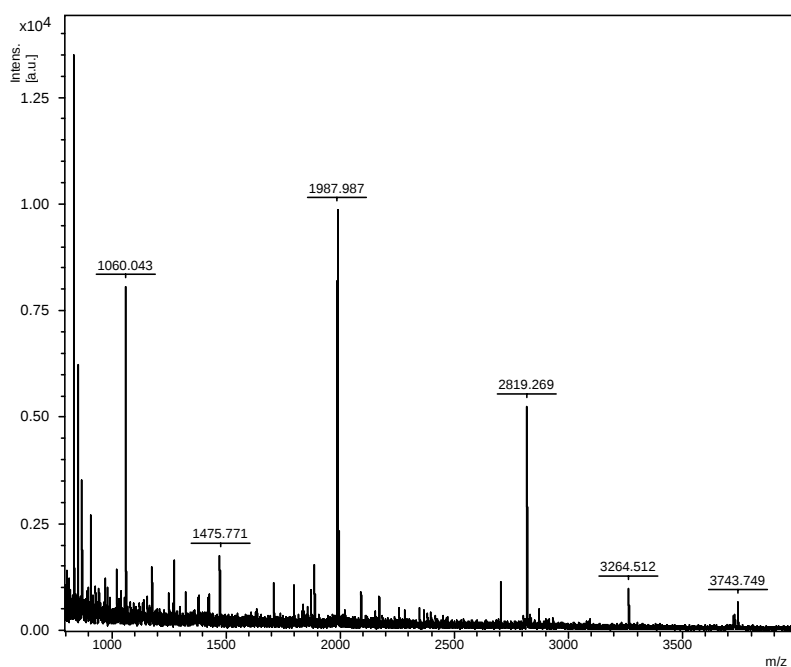


Figura 4 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise da amostra 0,09 h⁻¹-**b'** excisada do SDS-PAGE 5-15% (Figura 6). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

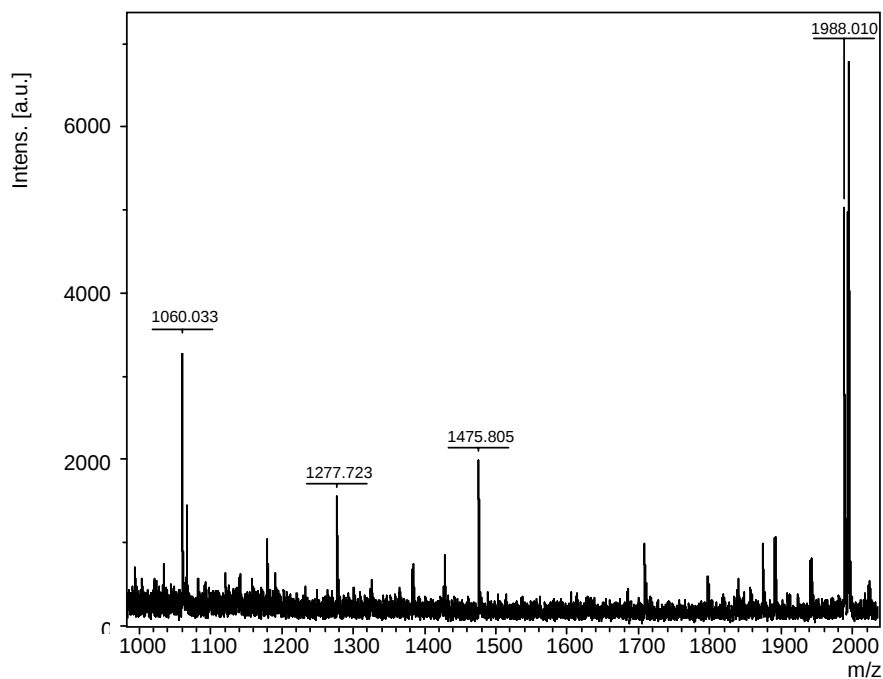


Figura 5 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise da amostra 0,09h⁻¹-c' excisada do SDS-PAGE 5-15% (Figura 6). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

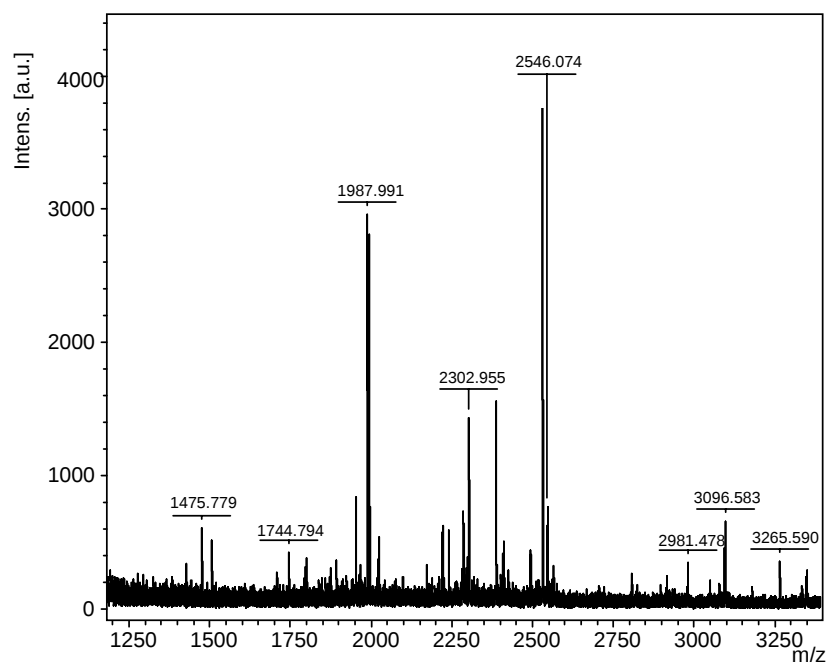


Figura 6 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise da amostra 0,09 h⁻¹-d' excisada do SDS-PAGE 5-15% (Figura 6). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

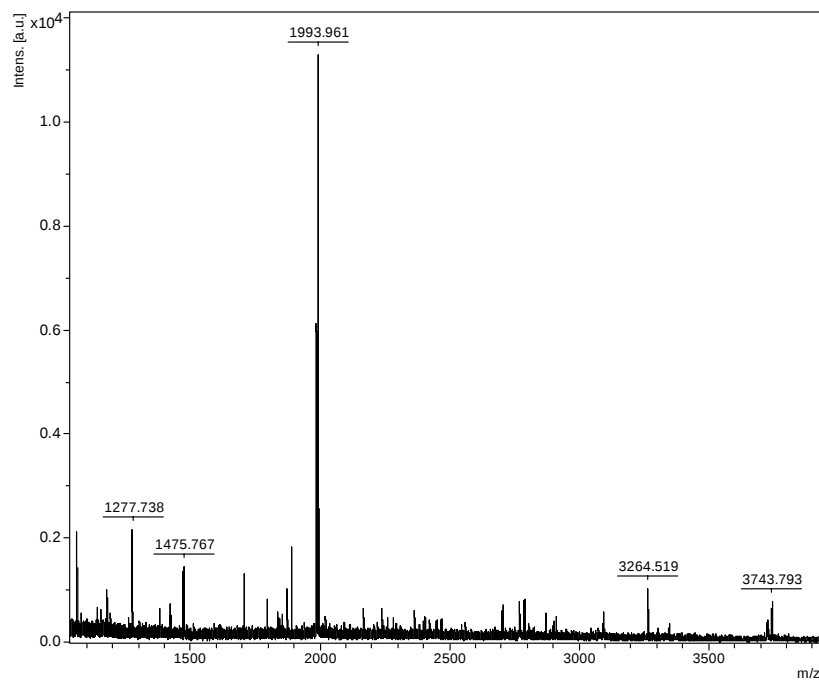


Figura 7 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise da amostra 0,09 h⁻¹-e' excisada do SDS-PAGE 5-15% (Figura 6). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

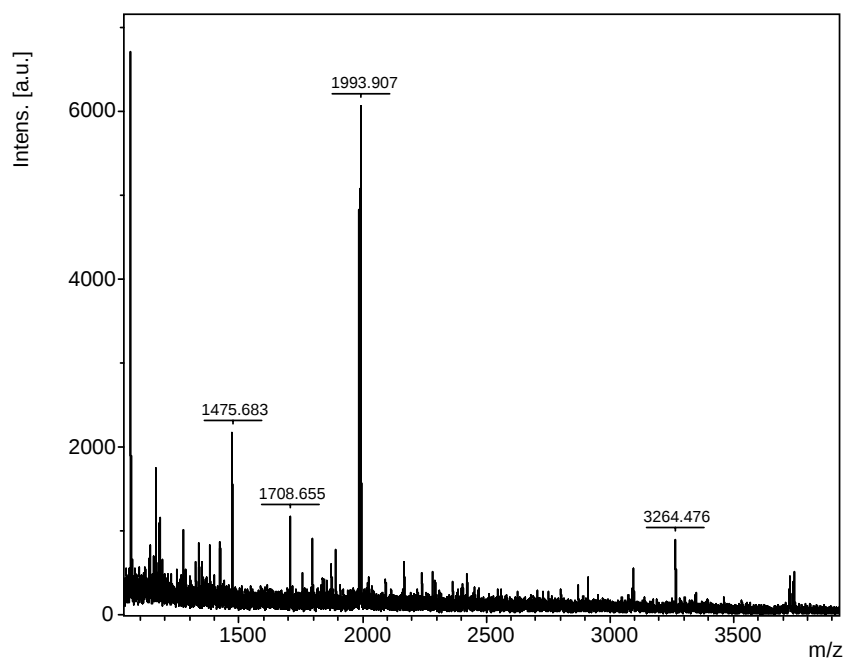


Figura 8 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise da amostra 0,09 h⁻¹-f' excisada do SDS-PAGE 5-15% (Figura 6). A análise foi realizada com a aplicação de 0,5 µL de amostra e 0,5 µL de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

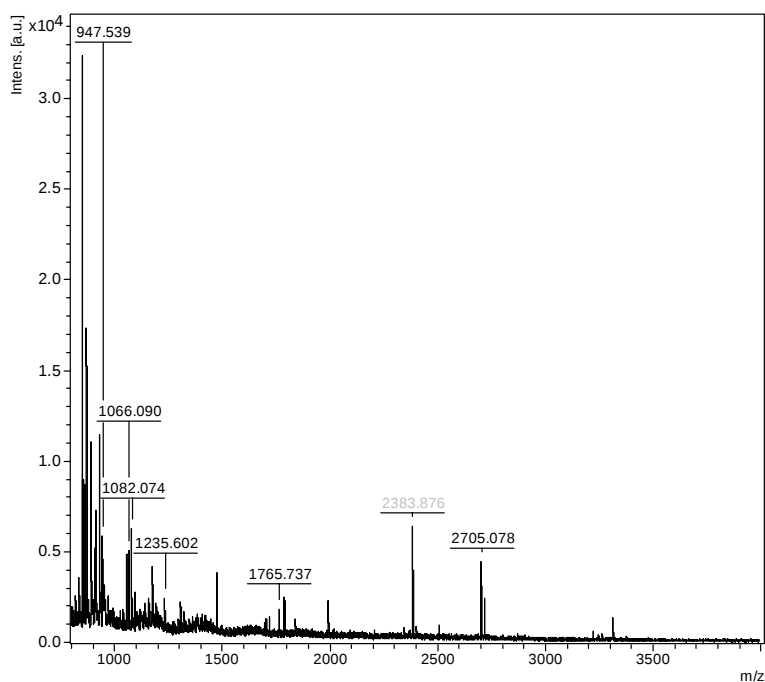


Figura 9 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise (PMF) da fração **B3** (Tabela 2), obtida na fase reversa da fração **F1** proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,03\text{ h}^{-1}$. A análise foi realizada com a aplicação de $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de amostra e $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

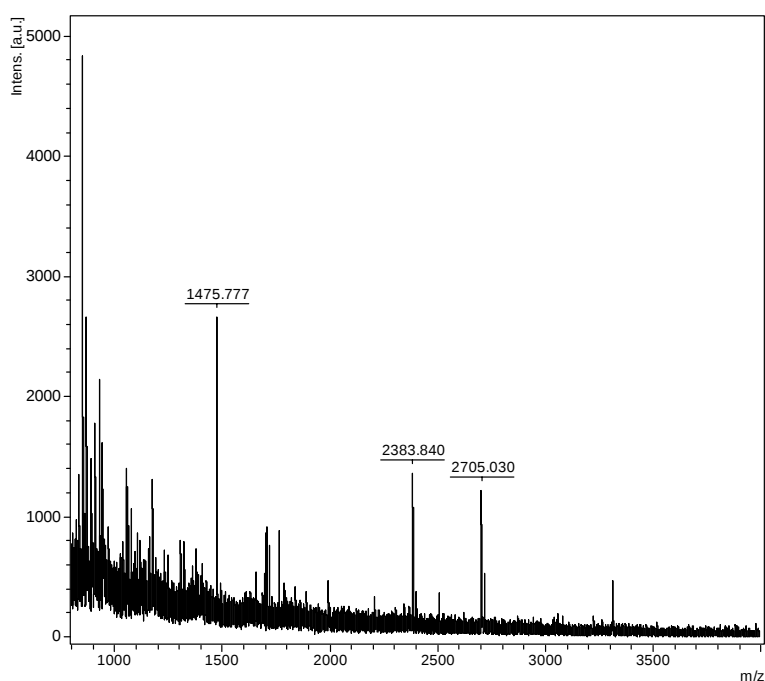


Figura 10 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após a tripsinólise (PMF) da fração **A6** (Tabela 3), obtida na fase reversa da fração **F2** proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,03\text{ h}^{-1}$. A análise foi realizada com a aplicação de $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de amostra e $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de matriz CHCA, em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

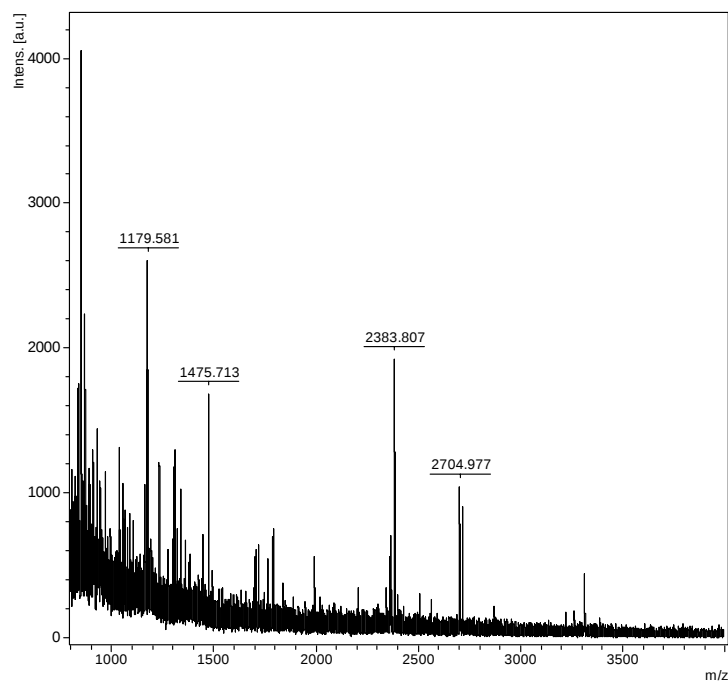


Figura 11 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após a tripsinólise (PMF) da fração **B9** (Tabela 3), obtida na fase reversa da fração **F2** proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,03 \text{ h}^{-1}$. A análise foi realizada com a aplicação de $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra e $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ de matriz CHCA, em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

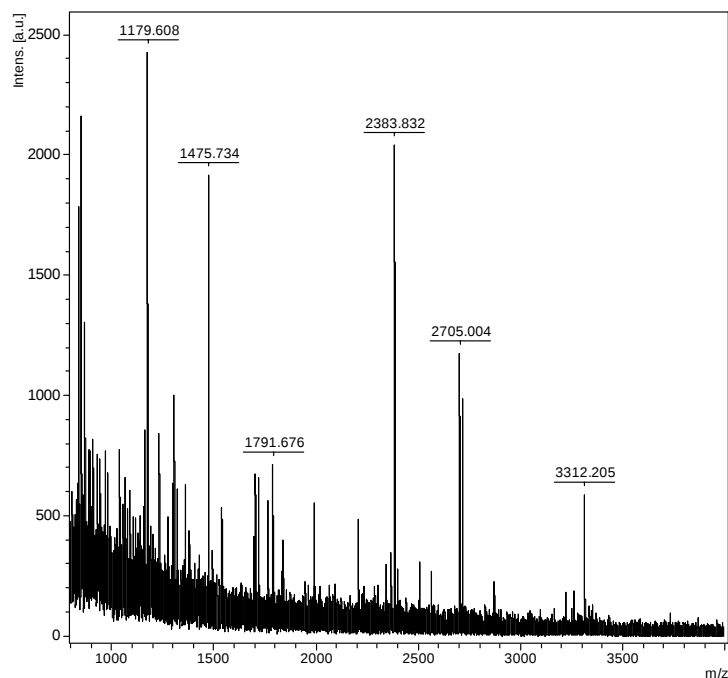


Figura 12 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise (PMF) da fração **B9** (Tabela 9), obtida na fase reversa da fração **F3** proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,09 \text{ h}^{-1}$. A análise foi realizada com a aplicação de $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra e $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

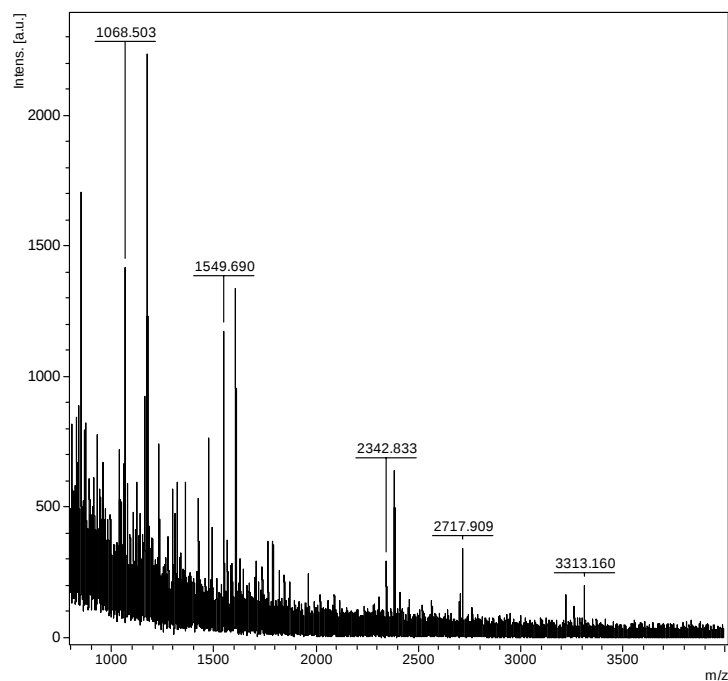


Figura 13 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise (PMF) da fração **B8** (Tabela 10), obtida na fase reversa da fração **F4** proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,09\text{ h}^{-1}$. A análise foi realizada com a aplicação de $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de amostra e $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.

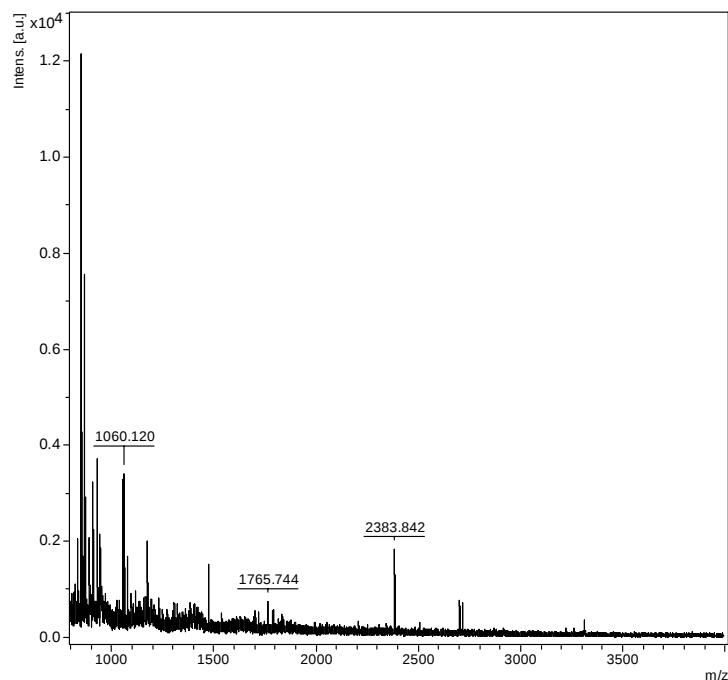


Figura 14 – Espectro de massa em sistema MALDI-TOF-TOF MS. O perfil de massas moleculares apresentado foi obtido após tripsinólise (PMF) da fração **B9** (Tabela 11), obtida na fase reversa da fração **F5** proveniente da troca iônica da amostra das proteínas extracelulares de culturas de *K. lactis* em crescimento a $0,09\text{ h}^{-1}$. A análise foi realizada com a aplicação de $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de amostra e $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de matriz CHCA em placa MTP *AnchorChip* 800/384.