



**Cláudia Patrícia Santos
Ribeiro**

Análise por RMN do perfil metabólico de proteínas que sofrem agregação e *unfolding* num sistema modelo de levedura para doenças neurodegenerativas.

NMR metabolic profiling of protein aggregation and unfolding in a yeast neurodegenerative disease model system



**Cláudia Patrícia Santos
Ribeiro**

Análise por RMN do perfil metabolómico de proteínas que sofrem agregação e *unfolding* num sistema modelo de levedura para doenças neurodegenerativas.

NMR metabolic profiling of protein aggregation and unfolding in a yeast neurodegenerative disease model system

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biomedicina Molecular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Brian James Goodfellow, professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Júri

Presidente

Professora Doutora Luisa Alejandra Helguero

Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

Arguente

Doutora Carla Alexandra Pina da Cruz Nunes

Professora Auxiliar Convidada, Universidade de Aveiro

Orientador

Professor Doutor Brian James Goodfellow

Professor Auxiliar, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Aos meus pais pelo apoio, pela paciência, carinho e dedicação dado, não só ao longo do mestrado, mas ao longo de toda a vida.

A minha irmã pelas mesmas razões, mas também por me ajudar a distrair nos momentos de maior tensão

Aos meus amigos, em especial:

Andreia marinho e ao João Gomes porque direta ou indiretamente sempre me motivarem e acreditarem, muitas sem se aperceberem.

Por todas as mensagens e chamadas de incentivo

As quatro pessoas fantásticas que conheci neste mestrado e que sempre me apoiaram na realização deste projeto

O Professor Brian Goodfellow, pela orientação dada neste projeto

À Sandra Magalhães por todo o apoio prestado

Por fim, mas não menos importante, à Professora Sandra Ribeiro, do Instituto de Investigação e Inovação para a saúde, por dispensar o seu equipamento e o seu tempo para a realização das curvas de crescimento

Resumo

O processo de *folding* das proteínas é vital para a homeostase celular, por isso os organismos têm sistemas altamente desenvolvidos para degradação de proteínas *misfolded*. No entanto, quando esses sistemas funcionam mal a viabilidade celular e do organismo podem ser comprometidas, levando ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, caracterizadas pela presença de agregados proteicos. Atualmente, uma parte da investigação nesta área está focada no estudo da base molecular deste tipo de agregados e consequente identificação de novos alvos terapêuticos com vista ao desenvolvimento de soluções terapêuticas inovadoras.

Estudos anteriores mostraram que a sobre-expressão de proteínas relacionadas a ELA (OPTN, TDP e FUS) num sistema modelo de levedura resulta num crescimento mais lento em comparação aos controlos. Além disso foram também verificadas diferenças nos perfis metabólicos. Para determinar se as respostas metabólicas são devido a perturbações específicas do metaboloma das proteínas relacionadas com ELA ou se são respostas gerais não específicas a qualquer proteína agregada ou *unfolded* sobre-expressa, neste projeto foram usadas 3 variantes de lisozima humana sobre-expressa em *S. cerevisiae* Y7092 (*wild-type*, no estado *unfolded* (T70N) e no estado propenso à agregação (I56T)) e obtidos os respetivos perfis metabólicos por RMN.

Os resultados da sequenciação indicaram que a variante T70N não tinha sido inserida no plasmídeo de expressão. A toxicidade da lisozima sobre-expressa foi determinada usando *spot tests*. Nas curvas de crescimento verificou-se que existia uma diferença entre as variantes. Para obter o perfil metabólico por RMN, as células foram cultivadas a 30°C em galactose e recolhidas após 72h. Foram utilizados extratos de fase aquosa e os perfis mostraram diferenças metabólicas entre as variantes WT e I56T.

Abstract

The protein folding process is vital for cellular homeostasis, so organisms have highly developed systems for the degradation of misfolded proteins. However, the malfunction of these systems compromises the viability of the cell and the organism, leading to the development of neurodegenerative diseases, characterized by the presence of protein aggregates. Currently, part of the research in the area of neurodegenerative diseases is focused on the study of the molecular basis of this type of aggregates and the consequent identification of new therapeutic targets for the development of innovative therapeutic solutions.

Previous experiments have found that overexpressing proteins related to ALS (OPTN, and TDP while FUS), in a yeast model system, results in slower growth compared to controls. Differences in metabolic profiles are also seen. In order to determine whether metabolic responses are due to ALS protein-specific perturbations of the metabolome or due to general non-specific responses to any overexpressed aggregated or unfolded protein, in this project we used 3 forms of human lysozyme overexpressed in *S. Cerevisiae* Y7092 (folded wild-type state, an unfolded state (T70N) and an unfolded, aggregation prone state (I56T)) and metabolic profiles were obtained by NMR.

Sequencing indicated that the T70N sequence had not been inserted into the expression plasmid. The toxicity of overexpressed lysozyme was determined using spot tests. In the growth curves it was verified that there was difference between the variants. For NMR metabolic profiling cells were grown at 30°C in galactose and harvested at 72hr. Aqueous phase extracts were used and the profiles indicated that there were subtle metabolic differences between the WT and I56T overexpressing strains.

Índice

Resumo	II
Abstract.....	III
Índice	IV
Lista de Abreviaturas.....	VI
Índice de Figuras	VII
Lista de Tabelas	VIII
1-Introdução.....	9
1.3 Agregação Proteica	12
1.4 Esclerose Lateral Amiotrófica	16
1.4.1 Agregados proteicos na ELA	18
1.6 A Lisozima como proteína para o estudo de neurodegeneração.....	19
1.7 Estudo do perfil metabólico	21
1.9 Objetivos.....	23
2- Métodos.....	25
2.1 Construção dos Clones de expressão	26
2.2 Transformação para <i>Escherichia coli</i>	26
2.3 Transformação para <i>S.cerevisiae</i> e Spot test.....	26
2.4 Curvas de crescimento	27
2.5 Extração e <i>Quenching</i> do endometaboloma	27
2.7 Processamento dos espectros	28
2.8 Análise Multivariada.....	28
3-Resultados & Discussão	29
3.1 Reação LR e Transformação para <i>E.Coli</i>	30
3.2 Transformação para <i>S. Cerevisiae</i>	31
3.3 <i>Spot Tests</i>	31
3.4 Curvas de crescimento	32
3.5 Análise do perfil metabólico por RMN	33
3.6 Análise Multivariada dos espectros de RMN	34
3.6.1 Análise de componentes Principais (PCA).....	35
3.6.1.1 Scores	35
3.6.1.2 Loadings	35
3.6.2.1 VIPs	37

3.7 Análise de Metabolitos	38
3.8 Lisozima WT e I56T vs OPTN.....	39
3.9 Problemas e Perspetivas Futuras.....	41
4-Conclusões	43
5-Referências	45
6-Anexos.....	51
6.1 Protocolo da Transformação para <i>Escherichia coli</i>	52
6.2 Resultados Obtidos por MVA em ensaio anterior	53

Lista de Abreviaturas

<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
FUS	RNA-binding protein <i>Fused in sarcoma</i>
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GlcNAc	N-acetilglucosamina
I56T	Variante Agregada da Lisozima
IPOD	Depósito de proteína insolúvel
JUNQ	Compartimento de controlo de qualidade nuclear JUxta
LB	Meio de cultura <i>Lysogeny</i>
LC	Cromatografia líquida
MS	Espectrometria de massa
MVA	Análise multivariada
OD	Densidade ótica
OPTN	Optineurina
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA	<i>Partial least squares Discriminant Analysis</i>
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
SNC	Sistema nervoso central
SOD1	Superóxido Dismutase 1
T70N	Variante <i>unfolded</i> da lisozima
TDP-43	TAR DNA <i>binding protein</i> 43
VIP's	Importância Variável de Projeção
WT	Variante <i>Wild-Type</i> da lisozima
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

Índice de Figuras

Figura 1.1 Via representativa da formação de fibras, agregados amorfos e oligómeros. Adaptado de.....	13
Figura.1.2 Modelo geral de uma cinética de agregação de uma fibra.....	15
Figura 1.3 Classes gerais do mecanismo de formação de fibras.....	16
Figura 1.4 Localização dos Agregados	16
Figura 1.5 Estrutura secundária da lisozima humana (Wild Type), onde são identificadas as mutações conhecidas e o ano da sua descoberta.	20
Figura 3.1 Reação LR.....	30
Figura 3.2 Plasmídeos utilizados na Reação LR	30
Figura 3.3 Placa da transformação de <i>S. cerevisiae</i> com o plasmídeo de interesse.	31
Figura 3.4 Placas do Spot Test	32
Figura 3.5 Curva de crescimento das variantes da lisozima.....	33
Figura 3.6 Identificação de metabolitos num espectro de Lisozima I56T	34
Figura 3.7 Gráfico PCA, Pareto, usado para a separação dos metabolitos.	35
Figura 3.8 Loadings do PCA.....	36
Figura 3.9 Identificação de Metabolitos através dos VIPs	37
Figura 3.10 Boxplots dos metabolitos Galactose(A) e Lisina (B).....	38
Figura 3.11 Espectros de RMN da OPTN.....	40

Lista de Tabelas

Tabela 1	Números de réplicas em cada ensaio de aquisição dos espectros	38
Tabela 2	Valores de <i>VIP</i> dos metabolitos	41

1-Introdução

1.1 Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson, Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), demência frontotemporal e a doença de Huntington estão associadas a várias condições patológicas relacionadas com o envelhecimento e caracterizam-se por uma progressiva disfunção e deterioração do Sistema Nervoso Central (SNC)⁽¹⁾. Esta deterioração leva a defeitos funcionais irremediáveis e, normalmente, fatais. Em cada doença referida, os sintomas clínicos estão relacionados com a área do SNC na qual é prevalente a morte de células neuronais⁽¹⁾. Estas doenças são classificadas com base nos sintomas clínicos determinados pela anatomia da região disfuncional e nas proteínas com modificações bioquímicas acumuladas em neurónios ou em células da glia. Assim, os padrões de vulnerabilidade anatómica, celular e proteica podem ser definidos em condições neurodegenerativas⁽²⁾. A idade avançada é o maior fator de risco para o desenvolvimento de alterações neurodegenerativas e, devido ao aumento da esperança média de vida das pessoas, o tratamento dos pacientes com estas doenças tem como consequência um aumento significativo do impacto socioeconómico. Para além disso, estas doenças englobam uma variedade de distúrbios neuropsiquiátricos e neurológicos com opções terapêuticas limitadas. Assim, tanto em termos médicos como económicos, é urgente a necessidade de identificar os mecanismos de neurodegeneração e desenvolver novos tratamentos para proteger os neurónios contra as alterações patológicas.⁽¹⁾

Em geral, a maior parte destas doenças apresenta uma grande diversidade de fenótipos clínicos, porém partilham uma característica comum, que se relaciona com a acumulação de proteínas específicas em agregados insolúveis com propriedades físico-químicas alteradas. A título de exemplo referem-se a proteína β -amiloide, que se acumula em placas senis, e a proteína tau, que se acumula em emaranhados neurofibrilares, no caso da doença de Alzheimer, a α -sinucleína, que se acumula em corpos e neuritos de Lewy na doença de Parkinson, agregados de TDP-43, característicos da ELA e na degeneração dos lobos frontotemporais, inclusões ricas em poliglutamina na doença de Huntington e placas de prião na doença de Creutzfeldt-Jakob⁽³⁾. Assim, a identificação da base molecular destes agregados pode levar à identificação de novos alvos terapêuticos e ao desenvolvimento de soluções terapêuticas inovadoras para estas doenças.

1.2 Processo de *fold*ing das proteínas

As proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes e também as mais complexas em termos conformacionais. A sua atividade biológica depende da capacidade da cadeia polipeptídica em adquirir uma estrutura tridimensional única. Para adquirirem essa estrutura, é necessário que ocorra o processo de *fold*ing. O *fold*ing proteico é o processo físico através do qual a cadeia polipeptídica adquire uma estrutura tridimensional nativa, uma conformação biologicamente funcional, estabelecendo várias interações, ditadas pela composição da sequência primária da proteína⁽⁴⁾. Ao iniciar-se a tradução proteica, inicia-se paralelamente o *fold*ing proteico. Os aminoácidos traduzidos começam a interagir entre si e formam uma estrutura tridimensional bem definida, conhecido como estado nativo, o estado mais estável da proteína.⁽⁵⁾ O *fold*ing das proteínas é um processo fundamental em todas as células, uma vez que os processos biológicos são dependentes da maquinaria proteica⁽⁶⁾.

Apesar do processo de *fold*ing das proteínas ser altamente regulado na célula, existe uma fração de proteínas sintetizadas que falha neste processo e que não consegue atingir a forma nativa necessária para a sua função biológica. Normalmente estas proteínas são depois eliminadas por mecanismos celulares, no entanto algumas conseguem evitar *checkpoints* e não são eliminadas pelas células, podendo ser tóxicas para o organismo⁽⁷⁾. Pensa-se que estas modificações podem levar a severas consequências biológicas e a doenças conformacionais causadas por má conformação das proteínas, tal como o Alzheimer, o Parkinson e a ELA⁽⁸⁾. No entanto, os erros neste processo não estão só relacionados com as doenças neurodegenerativas: muitos problemas imunológicos também se encontram relacionados com as alterações no processo de *fold*ing proteico, pois o sistema imunitário não reconhece as células modificadas e não produz os anticorpos para combater as mesmas⁽⁹⁾.

As alterações no *fold*ing proteico são largamente debatidas na comunidade científica e podem desvendar o mecanismo de várias doenças. A proteína apesar de conter toda a informação necessária para o *fold*ing na sua estrutura primária, contém vários graus de liberdade conformacional na natureza da cadeia polipeptídica, heterogeneidade na sequência de aminoácidos e diferentes interações que estabilizam a conformação, que torna difícil a previsão do mecanismo da formação da sua estrutura.

1.3 Agregação Proteica

A agregação proteica resulta da associação entre conformações proteicas não nativas, através de contatos intermoleculares, no interior ou no exterior da célula^(10, 11), podendo resultar na formação de oligómeros, agregados amorfos ou agregados fibrilares altamente ordenados, chamados amilóides. A formação de fibras amilóides é, na grande maioria dos casos, tóxica para as células e dá origem à maior parte das doenças neurodegenerativas⁽¹²⁾.

Após a síntese, as proteínas dobram-se numa conformação tridimensional específica que é a mais termodinamicamente favorável⁽¹³⁾. O processo de *folding* é estimulado pelo efeito hidrofóbico, uma tendência em que as regiões hidrofóbicas da proteína se protegem do ambiente hidrofílico da célula, voltando-se para o interior da proteína. Assim, o exterior de uma proteína é tipicamente hidrofílico, enquanto o interior é tipicamente hidrofóbico. As proteínas que não se encontram no seu estado nativo têm regiões hidrofóbicas expostas^(14, 15).

Numa célula existem cerca de 300-400g/L de proteínas e outras macromoléculas que aumentam substancialmente a afinidade para interações entre proteínas, proporcionando um ambiente ótimo para a agregação. As formas não nativas e proteínas parcialmente *folded* têm mais propensão para agregar, uma vez que têm as regiões hidrofóbicas mais expostas e têm a cadeia polipeptídica pouco estruturada, o que promove as ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre as diferentes cadeias polipeptídicas⁽¹²⁾. Os *molten globule* são um dos intermediários na via do *folding* das proteínas. Estes intermediários são compactos, com elevada estrutura secundária nativa, mas com pouca ou nenhuma estrutura terciária, contendo zonas hidrofóbicas expostas⁽¹⁶⁾. Foi demonstrado que este tipo de intermediários pode potenciar a agregação na neurodegeneração⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Como exemplo, a ligação do cobre e ferro à α -sinucleína leva à formação de um *molten globule*, o que resulta num aumento da cinética de agregação e na doença neurodegenerativa⁽¹⁹⁾. A deteção e caracterização de intermediários conformacionais é um dos pré-requisitos para descobrir o mecanismo de várias doenças caracterizadas pela agregação proteica⁽¹²⁾.

1.3.1 Agregação proteica na neurodegeneração

As doenças neurodegenerativas são, geralmente, caracterizadas pela presença de diferentes tipos de agregados, incluindo fibras amilóides e agregados amorfos. Porém a principal questão é saber qual o processo que inicia a agregação⁽²⁰⁾. O início da agregação

pode ser causado por vários fatores como (i) mutações nas proteínas; (ii) modificações covalentes da proteína, tal como fosforilações e (iii) modificações oxidativas da proteína, associadas com o processo de envelhecimento⁽²⁰⁾.

Inicialmente apenas as fibras amilóides maduras encontradas em doentes com doenças neurodegenerativas eram identificadas como entidades tóxicas. Contudo este conceito tem-se vindo a alterar, uma vez que já foram encontrados pequenos oligómeros tão tóxicos como as fibras⁽²¹⁾. Existe uma corrente científica que sugere que a deposição proteica poderá ter início em oligómeros não-fibrilares, que resultam na formação posterior de fibras. Estes precursores podem ser potencialmente tóxicos e constituir espécies primárias que irão contribuir para a doença. Contudo, a relação entre a neurotoxicidade e os agentes que despoletam a toxicidade ainda estão em discussão⁽²²⁾.

Estudos sugerem que o processo de agregação envolve vários intermediários e resulta em diferentes tipos de fibras. A figura 1.1 descreve uma possível via para a formação de fibras e outra via para a formação de agregados e oligómeros.

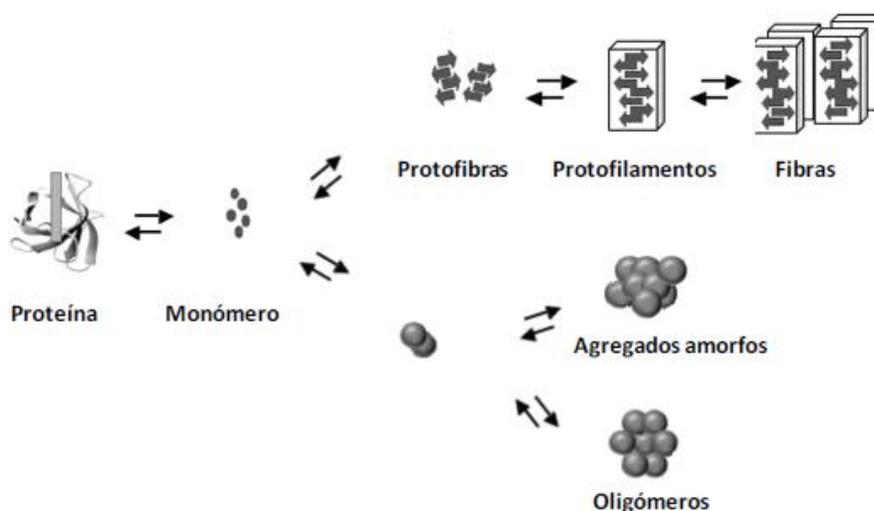


Figura 1.1 Via representativa da formação de fibras, agregados amorfos e oligómeros. Adaptado de

As fibras amilóides são fibras ordenadas, sem ramificações, com uma espessura de cerca de 7 a 12 nm. Têm uma estrutura constituída principalmente por folhas β . As cadeias β associam-se à fibra existente perpendicularmente, formando ligações de hidrogénio intramoleculares, construindo uma estrutura *cross- β* . A morfologia das fibras e consequentemente a sua patologia podem variar dependendo das condições celulares, sendo os iões metálicos um dos agentes que podem afetar a morfologia das fibras⁽²¹⁾.

Em oposição às fibras, os oligómeros são altamente heterogéneos e estruturalmente desorganizados, permitindo a exposição de sequências de aminoácidos que participam em interações aberrantes com outros componentes celulares. Exemplos

incluem: (i) exposição de frações amiloidogénicas com potencial de potenciar a agregação de outras proteínas; (ii) ligação aberrante de iões metálicos e (iii) a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS). Contudo estes oligómeros podem ser precursores de fibras amilóides ou podem ser resultado de fragmentação de fibras⁽²²⁾.

Um dos desafios no estudo da agregação proteica é relacionar medidas experimentais *in vitro* com o mecanismo de agregação dentro da célula, visto que cada sistema contém um grande número de espécies moleculares com diferentes estratégias de polimerização que se podem converter em múltiplos processos. Um grande avanço para a compreensão da formação das fibras está a ser alcançado através do estudo das cinéticas que governam as vias de agregação⁽²³⁾. A cinética de formação das fibras amilóides é descrita como uma reação de polimerização, dependente da nucleação. Este processo envolve geralmente várias etapas. Primeiramente existe a formação de um núcleo através da agregação de monómeros, a chamada nucleação. Segue-se um crescimento rápido, onde o final da fibra existente recruta espécies monoméricas, aumentando o comprimento da fibra, a alongação. E poderá ainda existir o processo de dissociação ou degradação, que leva à diminuição ou ao desaparecimento dos agregados⁽²³⁾.

A cinética de formação de fibras *in vitro* segue uma curva de crescimento sigmoidal. Esta curva de crescimento inclui uma *lag phase*, correspondente à nucleação, e uma velocidade máxima de crescimento, que corresponde à alongação. O crescimento das fibras depois da alongação chega a um equilíbrio, onde estão presentes quantidades mínimas de monómero. Uma característica fundamental da reação de polimerização dependente da nucleação é a capacidade de pequenas quantidades de fibra pré-formadas realizarem um *seeding* da reação, reduzindo significativamente a *lag phase* (figura 1.2)⁽²³⁾.

O processo de agregação difere entre proteínas. Existem proteínas cujo processo de nucleação consiste na ligação de monómeros ao agregado já existente, a chamada nucleação homogénea (primária). O estudo da polimerização linear da actina, por Oosawa⁽²⁴⁾, foi um dos estudos mais relevantes para descrever este tipo de nucleação. Porém também existe a nucleação heterogénea e fragmentação de filamentos, que permite que novos agregados possam ser formados através de um processo que envolve agregados já existentes. Este conceito foi revelado por Eaton, Ferrone e Hofrichter aquando o estudo da polimerização da Hemoglobina S (Figura 1.3)⁽²³⁾.

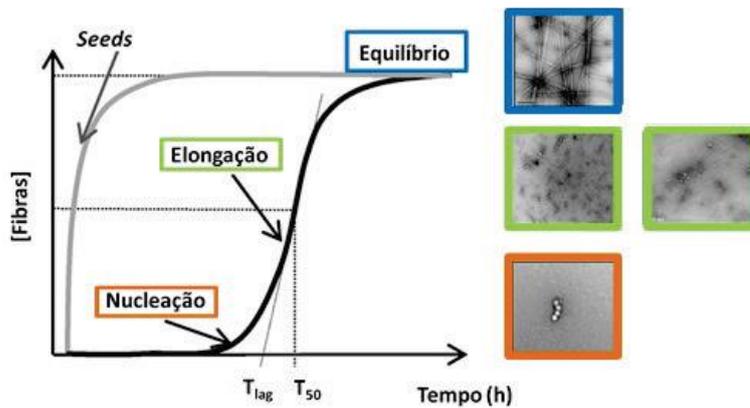


Figura.1.2 Modelo geral de uma cinética de agregação de uma fibra.

Reação de nucleação-polimerização é caracterizada por uma curva de crescimento sigmoideal, com uma fase de nucleação e de alongação. A formação da fibra é iniciada muito lentamente, contudo a adição de um agente *seed* pode formar rapidamente fibras, até chegar um equilíbrio, com pequenas quantidades de monómero em solução. Na figura estão demonstradas imagens de TEM dos agregados formados nas diferentes etapas da agregação. Adaptado de [17, 19].

1.3.2. Localização dos Agregados

Vários estudos mostraram que as respostas celulares à agregação proteica são bem reguladas e organizadas. Os agregados localizam-se em áreas específicas da célula, e foram realizados estudos em diferentes seres vivos, como em procariontes (*E. coli*) e eucariotes (levedura, células de mamíferos), para estudarem essas áreas.

Nas leveduras, a maioria dos agregados são *refolded* por chaperonas moleculares. No entanto, alguns agregados, como as proteínas oxidadas ou as proteínas marcadas para degradação, não podem sofrer *refolding*, por isso estes agregados estão localizados num compartimento de controle de qualidade nuclear (JUNQ), próximo da membrana nuclear, ou então no depósito de proteínas insolúveis (IPOD) perto do vacúolo⁽²⁵⁾. Quando os agregados são ubiquitinados localizam-se no JUNQ, por sua vez as proteínas agregadas insolúveis localizam-se no IPOD. Estas duas vias funcionam em simultâneo⁽²⁶⁾.

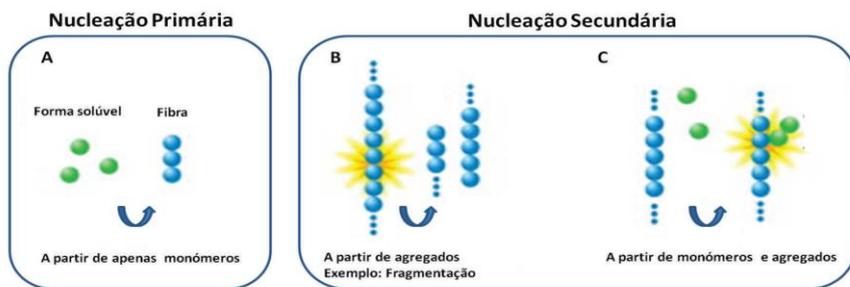


Figura 1.3 Classes gerais do mecanismo de formação de fibras.

A – Nucleação primária, resulta na formação de novos agregados a partir de interações apenas entre monómeros solúveis; B – Processos secundários independentes do monómero, como a fragmentação, geram novos agregados a uma velocidade dependente apenas da concentração de agregados; C – Processos secundários dependentes do monómero criam agregados a uma velocidade dependente da concentração do monómero e de agregados já existentes. Adaptado de [18].

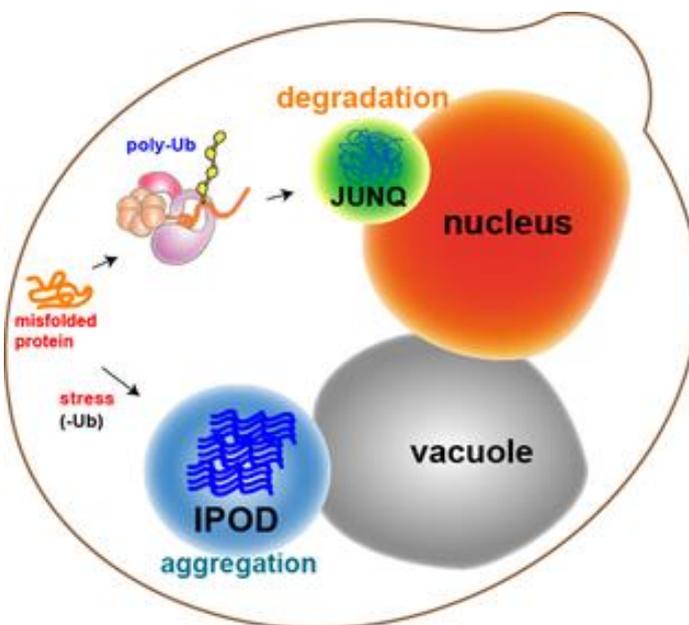


Figura 1.4 Localização dos Agregados

JUNQ compartimento de controlo de qualidade nuclear JUxta

IPOD depósito de proteína insolúvel

1.4 Esclerose Lateral Amiotrófica

Com uma incidência a nível mundial de 2,5 casos por 100,000 pessoas por ano e uma prevalência de 4-6 por 100,000, a ELA é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns e a mais corrente associada aos neurónios motores nos adultos⁽²⁷⁾. A causa mais referenciada para justificar o aparecimento dos sintomas de fraqueza muscular generalizada, atrofia, deficiência na fala e na deglutição e progressiva paralisia é a degeneração contínua dos neurónios motores superiores ao nível do córtex cerebral e

neurónios motores inferiores ao nível do tronco cerebral da medula espinhal e a presença de agregados proteicos no interior dos mesmos⁽²⁷⁾. Esta patologia resulta em paralisia completa, poupando apenas movimentos oculares e esfíncteres externos⁽²⁾. Salienta-se que ao longo deste processo de degeneração a capacidade intelectual e cognitiva do paciente é preservada^(28,29) e, por isso, a doença tem um grande impacto psicológico, tanto para os pacientes como para os cuidadores⁽²⁹⁾.

A causa subjacente da ELA permanece incerta, mas uma relação entre fatores endógenos (genéticos, metabólicos) e fatores exógenos (ambiental, estilo de vida), parece estar envolvida no desenvolvimento da doença⁽²⁹⁾. Desta forma, está descrita uma grande variedade de mecanismos que estão relacionados com a patogénese da doença. Estes incluem a disfunção mitocondrial e do transporte axonal, a excitotoxicidade do glutamato, o *stress* oxidativo associado a processos microinflamatórios de origem diversa, a agregação proteica, entre outros^(29,30). Todos estes processos estão associados à disfunção muscular característica da ELA.

O único medicamento usado no tratamento de pacientes com ELA, que apenas é capaz de prolongar a sobrevivência, é o antiglutamato, Riluzol⁽³¹⁾. Está descrito que o consumo oral diário de 100 mg deste fármaco prolonga a sobrevivência média dos pacientes por, aproximadamente, 2-3 meses e aumenta a probabilidade de sobrevivência, no primeiro ano, em 9%⁽³⁰⁾. Este fármaco pode diminuir a excitotoxicidade através da interrupção da transmissão glutamatérgica no SNC⁽³²⁾. O riluzol é uma pequena molécula que modula o canal de glutamato do tipo NMDA, regulando a pressão intra-neuronal devida à concentração de cálcio⁽²⁹⁾. Para além disso, possibilita a inibição da neurotransmissão glutamatérgica por interações com recetores de glutamato AMPA/cainato, melhoria da captação de glutamato da fenda sináptica e inibição da libertação de glutamato e aspartato⁽³²⁾.

O diagnóstico precoce da ELA ainda é um problema, uma vez que há falta de marcadores para a doença e é principalmente reconhecido pelo exame clínico⁽³³⁾. As causas da patologia da ELA não são totalmente compreendidas. A maior parte dos pacientes é diagnosticado com a forma esporádica ou idiopática da ELA e cerca de 10% dos pacientes apresentam a forma familiar ou hereditária. Ambas as formas têm em comum alguns fatores genéticos, como mutações na enzima Superóxido Dismutase 1 (SOD1), na TAR DNA *binding protein* 43 (TDP-43), na fusão no sarcoma (FUS), na Optineurina (OPTN) e no C9ORF72, entre outros^(1, 27, 29, 34). Os produtos destes genes têm diversas funções celulares: a SOD1 funciona no metabolismo de superóxido, OPTN no

tráfego de membrana, a proteína TDP-43, no produto do gene TARDBP, e proteína FUS no metabolismo do RNA⁽³⁵⁾. Sabe-se que os produtos dos alelos mutantes desses genes estão presentes nas inclusões neuronais de pacientes com ELA. No estudo de Neumann, Sampathu (36), foi identificada a proteína TDP-43 como o principal componente de agregados proteicos na ELA.

1.4.1 Agregados proteicos na ELA

A ELA é caracterizada pela agregação de proteínas ubiquitinadas nos neurónios motores afetados⁽³⁴⁾. Estudos recentes identificaram novos agregados celulares relacionados com a ELA, nomeadamente agregados de FUS, TDP-43, OPTN, UBQLN2 e o produto da tradução de repetições intrónicas no gene C9ORF72. As mutações nos genes que codificam estas proteínas são encontradas num subgrupo de pacientes com esta doença (ELA familiar), indicando uma relação de causalidade com a patogénese da doença⁽³⁴⁾. As características moleculares e distribuição de diferentes tipos de agregados proteicos na ELA foram também associadas a alterações genéticas específicas, as quais estão intimamente relacionadas com os efeitos dos processos celulares e patológicos subjacentes⁽³⁴⁾. Assim, sugere-se que a formação de grânulos alterados de ácido ribonucleico (RNA) e a disfunção do sistema de controlo de qualidade das proteínas contribuem para a agregação proteica na ELA⁽³⁴⁾.

1.5 Sistemas Modelo em biomedicina

Na ciência, para melhor conhecimento das doenças que afetam o ser humano, dos potenciais tratamentos e das suas possíveis curas, são utilizados sistemas modelo. Estes sistemas são usados para que essas doenças possam ser estudadas sem utilizar diretamente amostras humanas⁽³⁷⁾. Os organismos modelo são usados para compreender fenómenos biológicos, com a expectativa de que as descobertas feitas no organismo modelo forneçam informações sobre o funcionamento do organismo humano⁽³⁷⁾. Só é possível esta utilização devido à existência de um ancestral comum de todos os organismos vivos e pela conservação do metabolismo e do material genético ao longo da evolução.

Existem vários tipos de organismos utilizados nestes sistemas, como por exemplo leveduras, ratos, peixes, insetos, entre outros. O método de seleção do organismo modelo depende das características do estudo pretendido: as leveduras são muito utilizadas para o estudo do ciclo celular e do metabolismo, já os insetos, como a *Drosophila spp.*, são utilizados em estudos de evolução. A escolha de um organismo para a investigação científica é feita tendo por base diferentes características: o tamanho, o tempo de geração,

a acessibilidade, a manipulação, a genética, a conservação de mecanismos e o potencial benefício econômico. Apesar de serem muito utilizados no desenvolvimento de tratamentos ou mesmo para a cura, a translação de resultados obtidos em organismos modelos para humanos é ainda difícil e, por vezes, não é possível.

1.6 A Lisozima como proteína para o estudo de neurodegeneração

A lisozima humana é uma enzima bacteriolítica que está amplamente distribuída em tecidos e fluidos corporais, incluindo o fígado, cartilagem articular, plasma, saliva, lágrimas e leite⁽³⁸⁾. Hidrolisa as ligações glicosídicas entre o ácido *N*-acetilmurâmico e a *N*-acetilglucosamina que estão presentes na estrutura da parede celular de certos microorganismos, particularmente de bactérias Gram-positivas⁽³⁹⁾. A lisozima é altamente expressa em células hematopoiéticas e é encontrada em granulócitos, monócitos e macrófagos, bem como em precursores da medula óssea⁽³⁸⁾. A concentração normal de lisozima no plasma varia de 4 a 13 mg/L e apenas alguns vestígios são detetáveis na urina de indivíduos saudáveis. Estima-se que pelo menos 500 mg de lisozima são produzidos por dia por um indivíduo normal, mas o tempo de vida da proteína no plasma é muito curto (aproximadamente 75% é eliminado passado uma 1 h, por depuração através dos rins)⁽⁴⁰⁾. Concentrações muito superiores ao normal no plasma e na urina estão associadas a várias condições patológicas e têm sido usadas como marcadores de algumas doenças⁽⁴¹⁾.

A lisozima humana, juntamente com lisozima de clara de ovo de galinha, tem sido amplamente utilizada ao longo dos últimos 25 anos como um sistema modelo para estudar muitos aspectos da estrutura e função da proteína, incluindo o mecanismo de *fold*ing proteico^(42, 43). Um dos aspectos mais interessantes do *fold*ing da lisozima é a existência de múltiplas vias, envolvendo uma série de intermediários metaestáveis que formam domínios que permitem obter a proteína totalmente nativa^(42, 44). Além dessas percepções sobre a natureza do processo de *fold*ing de proteínas, a lisozima também tem sido um sistema extremamente importante para se compreender melhor os processos de *misfold*ing, agregação proteica e as potenciais consequências dos mesmos.

Nos últimos anos, foram descritas várias variantes da lisozima, que apresentam uma única mutação (I56T, F57I, W64R e D67H) ou duas mutações (F57I/T70N e T70N/W112R) no gene, que está localizado no cromossoma 12 e organizado em quatro exões e três intrões⁽⁴⁵⁾. Estas variantes mutantes estão associadas à amiloidose sistêmica não-neuropática, onde se observa a deposição de fibras em certos órgãos, tais como o

fígado, o baço, e o rim. As fibras extraídas dos fígados dos indivíduos afetados têm uma substituição da isoleucina 56 pela treonina (I56T) em relação à proteína WT⁽⁴⁶⁾. Todas as mutações identificadas encontram-se no domínio β ⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾, com exceção da mutação W112R associada à variante T70N que se localiza na hélice D do domínio α ⁽⁵⁰⁾ (figura 1.5).

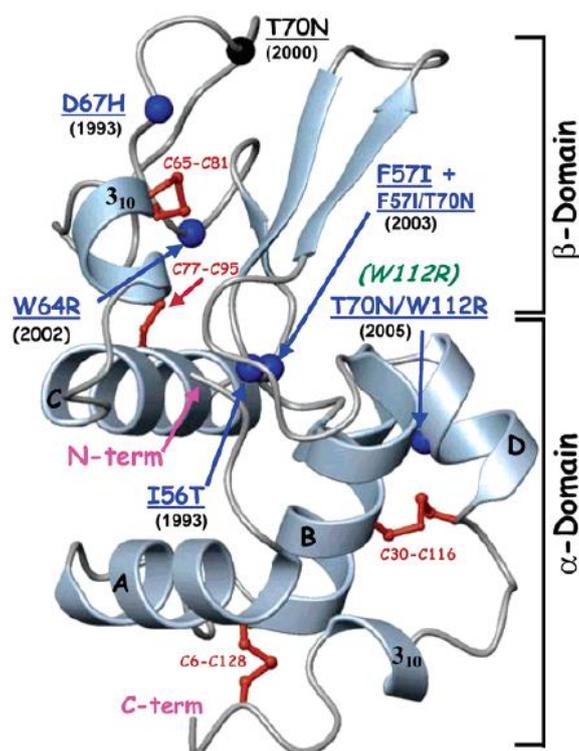


Figura 1.5 Estrutura secundária da lisozima humana (Wild Type), onde são identificadas as mutações conhecidas e o ano da sua descoberta.

As seis mutações amiloidogênicas estão representadas a azul e a variante não amiloidogênica encontra-se identificada a preto. As 4 hélices α no domínio α encontram-se identificadas de A a D. As quatro ligações persulfureto encontram-se representadas a vermelho. Adaptado [49].

A existência de variantes naturais da lisozima representa uma excelente oportunidade para investigar detalhadamente mutações específicas. A lisozima WT, bem como as variantes I56T, D67H e T70N foram expressas em grandes quantidades em vários sistemas, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*⁽⁵¹⁾, *baculovirus*^(47, 48) e *Aspergillus niger*⁽⁵²⁾. Isto permitiu uma comparação detalhada das propriedades das variantes, tais como a atividade, a estabilidade, o *fold*ing, a dinâmica e a agregação, com as propriedades da lisozima WT.

1.7 Estudo do perfil metabólico

O perfil metabólico é utilizado para identificar e/ou quantificar todas as pequenas moléculas relevantes (metabolitos) numa amostra biológica. Recentes avanços tecnológicos permitiram a caracterização de centenas de metabolitos a partir de uma pequena quantidade de sangue ou urina numa única experiência. O perfil metabólico de um paciente individual, um animal de laboratório ou mesmo uma cultura de células fornece uma leitura funcional do seu estado metabólico⁽⁵³⁾. A metabolômica pode, assim, ser vista como o equivalente a uma "abordagem de imagem" para os processos bioquímicos que ocorrem dentro do organismo, fornecendo uma ferramenta poderosa para obter informações sobre biologia funcional, toxicologia e farmacologia, auxiliando, portanto, no diagnóstico das doenças. Este é um estudo complementar à genómica e proteómica, uma vez que mede os desfasamentos metabólicos perturbados devido às influências genéticas, ambientais, farmacológicas ou patológicas⁽⁵⁴⁾.

A abordagem metabolômica pode ser feita de duas formas: *targeted* e *non-targeted*. No perfil metabólico *targeted*, as alterações nos níveis de uma classe específica de metabolitos pertencentes a uma via metabólica específica são determinadas usando uma técnica analítica apropriada, já no perfil metabólico *non-targeted*, é adquirido um perfil metabolômico geral⁽⁵⁴⁾.

O estudo de biomarcadores de doenças neurodegenerativas tem-se focado nos metabolitos, uma vez que estes fornecem uma ligação mais próxima entre os mecanismos celulares e o fenótipo da doença. Mais especificamente, espera-se que não uma, mas sim, uma combinação de vários metabolitos possa servir como um indicador para o início e progressão da doença, dado que estas doenças, embora frequentemente descritas como "idiopáticas", surgem de patologias complexas que se expressam com um amplo espectro de fenótipos. Portanto, o perfil metabólico *non-targeted* parece oferecer um grande potencial para a descoberta de biomarcadores nessa área⁽⁵⁵⁾.

Várias técnicas analíticas são frequentemente utilizadas para determinação do perfil metabólico *non-targeted* de matrizes biológicas. As técnicas mais usadas para perfis metabólicos são o RMN e as técnicas baseadas em MS como GC-MS, LC-MS ou CE-MS. Além destas técnicas, existem outros métodos, como o FTIR e a LC com deteção ultravioleta, que também têm sido largamente utilizadas⁽⁵⁴⁾. A técnica utilizada neste projeto foi o RMN pois é uma das principais técnicas para o perfil metabólico *non-targeted* nas doenças neurodegenerativas⁽⁵⁵⁾. A interpretação dos espetros de RMN é feita com recurso a análise estatística multivariada.

1.8 Análise Multivariada

A análise multivariada (MVA) é a aplicação da estatística multivariada e envolve observação e análise de mais do que uma variável de resultados estatísticos de uma só vez. A técnica é usada em diversos estudos, tendo em conta os efeitos de todas as variáveis sobre as respostas de interesse. A normalização e o *Scaling* são técnicas de tratamento de dados utilizadas na MVA. A normalização consiste na transformação de variáveis medidas numa população padrão, este processo deve ter em conta as variações entre as amostras e algumas suposições subjacentes usadas durante o mesmo. O *Scaling* é um processo pelo qual as respostas normalizadas são convertidas de um padrão para outro⁽⁵⁶⁾.

1.9 Objetivos

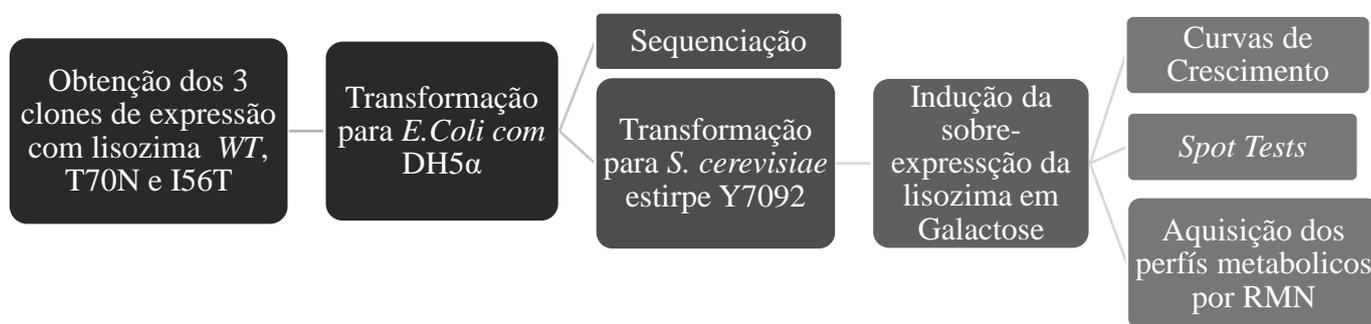
O projeto desenvolvido teve como principal objetivo a obtenção de perfis metabólicos de um sistema modelo de levedura que expressa lisozima *folded*, *unfolded* e agregada e compará-los com os perfis característicos da agregação proteica num sistema modelo de levedura para a ELA. Assim, pretendia-se perceber se as respostas metabólicas verificadas na levedura ocorrem devido a perturbações específicas do metaboloma das proteínas relacionadas com ELA ou se são respostas gerais não específicas a qualquer proteína agregada ou *unfolded* sobre-expressa.

Para obter o objetivo realizaram-se os seguintes passos:

1. Construção de plasmídeos dos 3 tipos de lisozima: *Wild Type (folded)*, T70N (*unfolded*) e I56T (propensão à agregação);
2. Transformação de *S. cerevisiae* Y7092 com os plasmídeos de interesse;
3. RMN para obtenção dos perfis metabólicos do endometaboloma de *S. cerevisiae*, após extração e *quenching* do endometaboloma;
4. Análise multivariada (MVA);

2- Métodos

Para atingir os objetivos propostos foram realizados os seguintes passos



2.1 Construção dos Clones de expressão

Para a construção dos clones de expressão foi usado o kit da *Gateway Clonase*. O plasmídeo pAG416GAL-ccdB foi utilizado para a construção dos plasmídeos de interesse, removendo a região entre o promotor GAL e o promotor T7 e inserindo a região de interesse do clone de entrada pDONR221LYZ de diferentes tipos de lisozima⁽⁵⁷⁾. Todos os plasmídeos foram depois sequenciados, usando o promotor T7.

2.2 Transformação para *Escherichia coli*

A estirpe de *Escherichia coli* usada para a transformação foi DH5a. Utilizou-se também o protocolo da *Gateway* (em anexo) para a realização da mesma⁽⁵⁷⁾. As bactérias foram cultivadas em placas de meio LB com ampicilina (50ug/ml) (37 °C, sem agitação) de acordo com Wood and Krieg (58).

2.3 Transformação para *S.cerevisiae* e Spot test

Utilizou-se a estirpe de *S. cerevisiae* Y7092 para todas as experiências⁽⁵⁹⁾. As culturas de ambas as estirpes de levedura foram realizadas em meio YPD (30°C, 200 rpm).

Para se obter o DNA dos plasmídeos de interesse, os que expressam as diferentes formas de lisozima, utilizou-se o protocolo do kit *NZYMiniprep* seguindo as instruções do fabricante. O rendimento de extração foi verificado usando o espectrômetro *NanoDrop, DeNovix DS-11 Spectrophotometer*. O protocolo de transformação para levedura usado foi o de Gietz (60), utilizando-se 2µL do plasmídeo⁽⁶⁰⁾. Plaqueou-se 100uL da suspensão celular em placas de YNB com glucose (30°C, sem agitação) e após

72h as placas foram guardadas a 4 °C. As experiências seguintes foram realizadas escolhendo as melhores colónias destas placas.

As colónias foram cultivadas primeiro em meio de glucose (24 h), depois diluídas (1:20) e cultivadas em meio de rafinose (meio de adaptação) (24 h). Posteriormente foram diluídas em $OD= 0,1; 0,2; 0,5; 1$ e realizaram-se 5 séries de diluições sucessivas para cada OD ; Feitas as diluições, colocou-se 5uL de cada em placas de YNB com glucose e YNB com galactose (48 h, 30°C), para testar a toxicidade das proteínas sobre-expressas na levedura.

As soluções e meios foram preparados de acordo com Burke (61) usando produtos químicos da Sigma Aldrich, BioRad e Formedium. Todas as soluções foram preparadas em dH₂O (água destilada, Millipore) e autoclavadas ou filtradas. As soluções contendo os açúcares (glucose, rafinose ou galactose) foram adicionadas ao meio após a autoclavagem de forma a se obter uma concentração final de 20% (Galactose e Rafinose) e 40% (glucose).

2.4 Curvas de crescimento

Para a realização das curvas de crescimento foi repetido o procedimento de crescimento do *Spot Test*, alterando apenas o crescimento em Galactose. O crescimento neste meio foi realizado numa placa de 96 poços, da marca Falcon. A placa foi colocada num leitor com agitação contínua e leituras da OD foram feitas de 10 em 10 minutos durante 72h. A experiência foi realizada no Instituto de Investigação e Inovação para a saúde, com um leitor de placas da marca Synergy/HTX.

2.5 Extração e *Quenching* do endometaboloma

As colónias transformadas foram cultivadas em 25 mL de meio com galactose ($OD = 0,05$) e foram colhidas após 72 h de incubação. Finda a incubação, mediu-se a OD final e iniciou-se o protocolo para a extração de metabolitos. O pellet foi lavado com 1.5mL de NaHPO₄ (100mM, pH=7.4), e seguidamente congelado em N₂ líquido e guardado a -80°C. Depois, os metabolitos foram extraídos com uma solução de metanol-clorofórmio (2:1, a 4°C) e com 5 ciclos de congelamento/descongelamento com N₂ líquido⁽⁶²⁾. Após a centrifugação final, as fases foram coletadas. A fase orgânica e a fase aquosa foram separadas e posteriormente secas numa SpeedVac. Os extratos foram armazenados a 4°C até análise por RMN.

Para a análise de RMN, os extratos aquosos foram reconstituídos em 650uL de uma solução de D₂O, 0,01% de TSP e de NaHPO₄100 mM pH 7,04. Os espectros de ¹H-RMN foram registados a 298K num espectrómetro Bruker Avance III 500 MHz no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Portugal.

2.7 Processamento dos espetros

Os espetros de RMN foram analisados com recurso ao software iNMR (*Nucleomatica, Molfetta, Italy*). Foi efetuado um processamento com preenchimento de zero para 64k pontos de dados e 0,3 Hz de ampliação. Os espectros foram manualmente faseados, corrigidos na linha de base e exportados na gama 0,5-9,5 ppm como uma matriz. A matriz foi processada no R-Studio (Boston, USA) usando bibliotecas internas e de *ropls* publicados⁽⁶³⁾. Os espectros foram normalizados usando a área do pico de TSP e de seguida as *OD's* obtidas antes da extração, sobrepostos e verificados no iNMR e alinhados usando scripts internos e *speaq* publicado. Foram excluídas do alinhamento as regiões de água (4,85-4,65 ppm) e clorofórmio.

2.8 Análise Multivariada

A MVA foi realizada em R usando a biblioteca *ropls*⁽⁶³⁾. As amostras foram separadas em grupos através da Análise Inicial de Componentes Principais (PCA). Os *VIP's* foram extraídos do PLS, da *scaling* Pareto e foram sobrepostos com os espectros normalizados no iNMR. A identificação dos metabolitos foi realizada através da comparação dos espectros com os compostos padrão do *Biological Magnetic Resonance Data Bank*, do *Yeast Metabolome Database* e do *Human Metabolome Database*. *Lipid. O Metabstuff* 3.2.R foi utilizado para processar o *heatmap* e os *boxplots* dos metabolitos identificados.

3-Resultados & Discussão

sucedida, ou seja, o clone de entrada (pDONR221LYZT70N) não foi inserido no vetor de destino (pAG416GA). Assim, não foi obtido o produto desejado, o que impossibilitou a continuação das restantes experiências com este tipo de lisozima. Nas restantes variantes (WT e T70N) a reação foi bem-sucedida.

3.2 Transformação para *S. Cerevisiae*

Enquanto esperávamos pelos resultados da sequenciação foi efetuada a transformação para *S. cerevisiae*, estirpe Y7092 (Figura 3.3), seguida de *spot tests*.

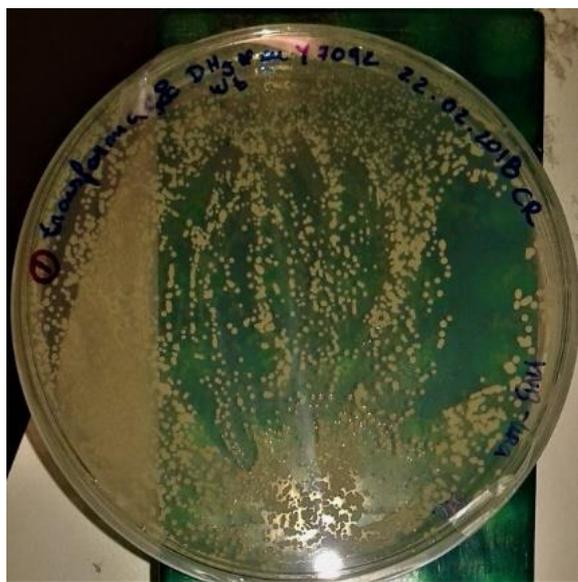


Figura 3.3 Placa da transformação de *S. cerevisiae* com o plasmídeo da lisozima WT. Estirpe usada foi a Y7092.

3.3 *Spot Tests*

Para realizar os *Spot Tests* fizeram-se crescimento em diferentes meios. O meio que foi usado em primeiro lugar foi a glucose, que é usado para crescer a *S. cerevisiae* sem expressão do plasmídeo. De seguida usa-se rafinose como adaptação para o último meio, a galactose, onde há indução da expressão do plasmídeo de interesse. Como os *Spot Tests* foram realizados antes da obtenção dos resultados da sequenciação, fez-se a também a experiência para a variante *unfolded* (T70N), no entanto como a sequenciação mostrou que a inserção do plasmídeo não foi bem sucedida, os resultados dessa não foram considerados na análise.

O *spot tests* foram utilizados para averiguar a toxicidade da sobre-expressão da lisozima em *S. cerevisiae* (figura 3.4). Todas as experiências foram conduzidas através da sobre-expressão da lisozima WT, *unfolded* (T70N) e agregada (I56T) utilizando o

promotor GAL. Esperava-se que a toxicidade da sobre-expressão dependesse da indução da sobre-expressão do plasmídeo pela galactose (expressão "ON") e que o nível de toxicidade no controlo com glucose (expressão "OFF") fosse inexistente⁽⁶⁴⁾. Os resultados mostram que há maior toxicidade na placa com expressão "ON" em relação à placa com expressão "OFF", como era espectável, no entanto essa sobre-expressão não é significativamente tóxica para as células (Figura 3.4).

A análise do *spot test* mostra ainda que existe uma diferença entre a toxicidade da lisozima WT e da variante I56T. A partir desse resultado pode-se concluir que ou a variante agregada da lisozima não produz mais *stress* sobre as células, ou existe uma diferença de crescimento entre as variantes.

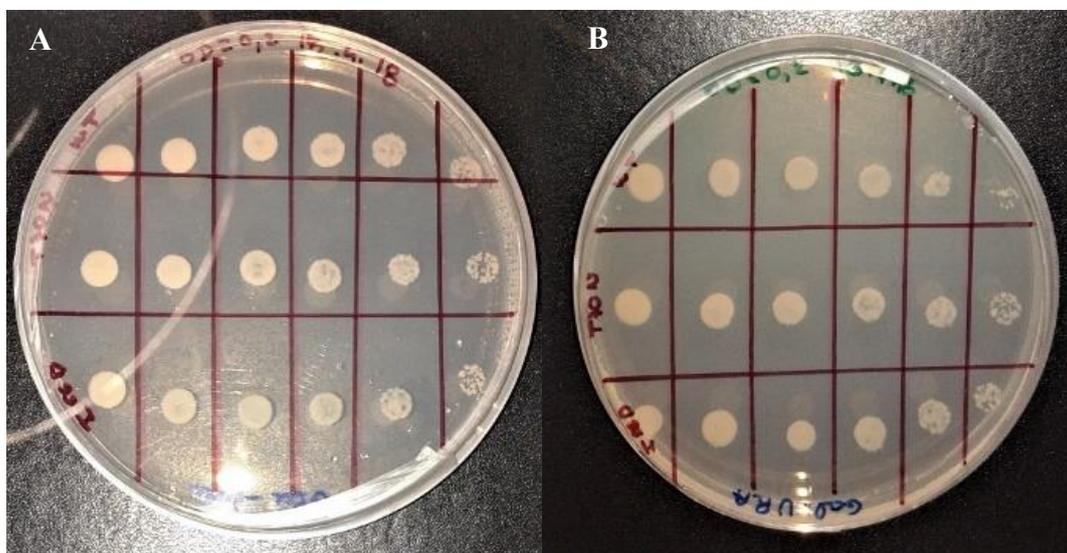


Figura 3.4 Placas do Spot Test

- A- Placa de glucose expressão "OFF"
- B- Placa de Galactose expressão "ON"

3.4 Curvas de crescimento

Depois da realização dos primeiros *spots tests* e de se verificar que poderia existir uma diferença significativa entre as taxas de crescimento das estirpes transformadas com WT e I56T, foram realizadas curvas de crescimento em meio com galactose, com medições espaçadas em intervalos de 10 minutos durante 72h.

Os resultados mostram que nenhuma das duas variantes atingiu a fase estacionária durante as 72h do teste (Figura 3.5). No entanto, a estirpe WT inicia a fase de desaceleração pós-exponencial antes da estirpe I56T. É ainda possível observar que não existem diferenças significativas na taxa de crescimento das duas estirpes estudadas.

Como referido na secção 2.6, as curvas de crescimento foram realizadas numa placa de 96 poços, logo o volume colocado no poço (200 μ L) foi muito reduzido. Esse fator pode ter tido uma forte contribuição para que ambas as variantes da lisozima não atingissem a fase estacionária como era espectável ao fim desse tempo.

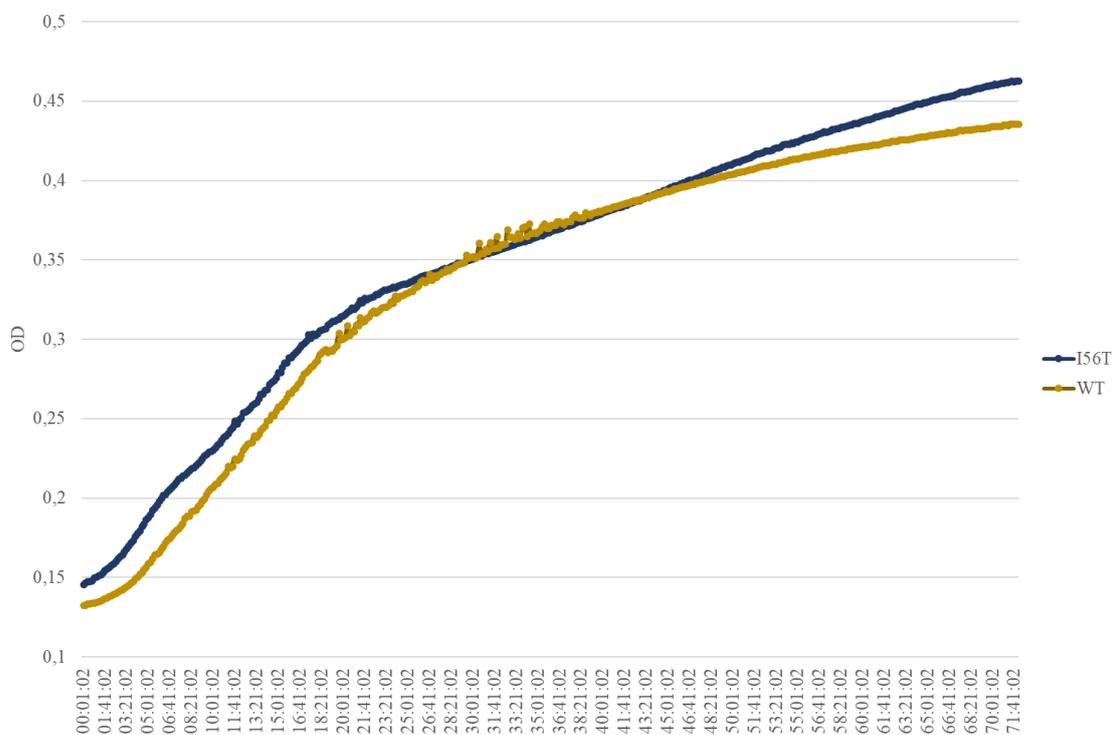


Figura 3.5 Curva de crescimento das variantes da lisozima

Amarelo- WT

Azul – I56T

3.5 Análise do perfil metabólico por RMN

Os extratos do endometaboloma da fase aquosa foram recolhidos após 72h de crescimento em Galactose. Depois da recolha e obtenção dos metabolitos adquiriam-se os espetros de RMN, usando uma sequência noesypr1d (Figura 3.6). Para cada uma das estirpes foram realizadas entre 3 a 5 réplicas técnicas.

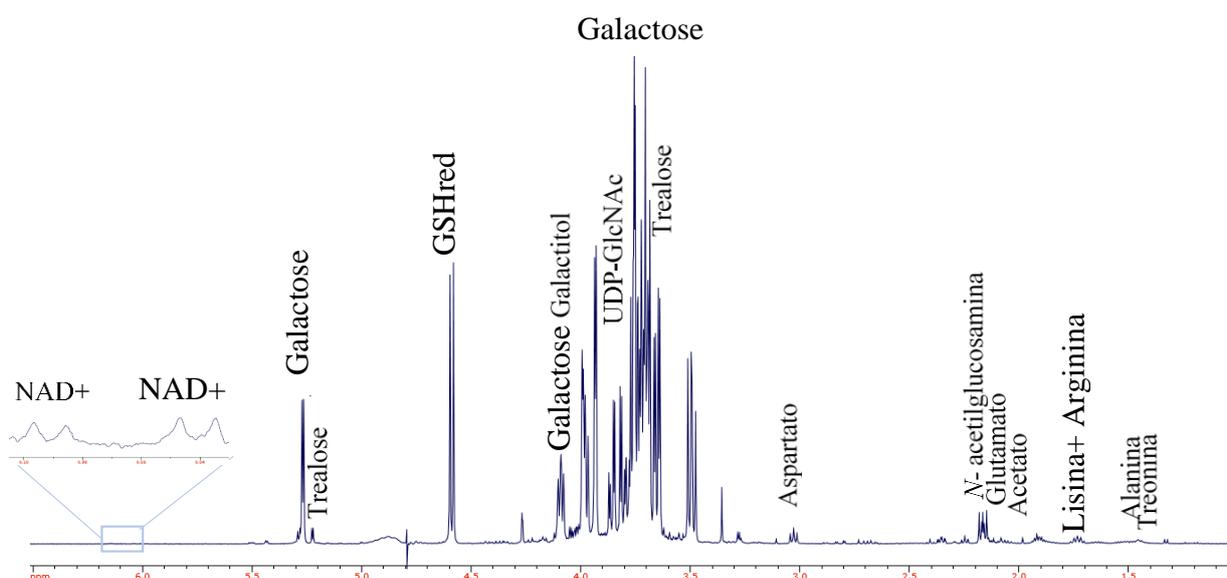


Figura 3.6 Identificação de metabolitos num espectro de Lisozima I56T

As transformações e crescimentos em galactose foram repetidos várias vezes ao longo do projeto. No entanto, a extração do endometaboloma e aquisição dos espectros foram realizadas apenas três vezes. Aquando da última aquisição também foram adquiridos os espectros da OPTN, FUS, TDP-43 e pAG (Controlo) (Tabela 1). Em anexo, encontram-se os espectros e a análise das restantes experiências.

Tabela 1 Números de réplicas em cada ensaio de aquisição dos espectros

Ensaio	WT	I56T	OPTN	FUS	TDP-43	pAG (Controlo)
1	3	3	-	-	-	-
2	5	5	-	-	-	-
3	3	3	3	3	3	3

Usando as bases de dados *The Human Metabolome Database* e *Yeast Metabolome Database*, foi possível identificar 11 metabolitos nos espectros do endometaboloma.

3.6 Análise Multivariada dos espectros de RMN

Para garantir que não existam diferenças de crescimento e para minimizar quaisquer fatores que pudessem contribuir negativamente para as separações dos grupos durante a análise multivariada, todos os tipos de lisozima foram recolhidos após 72 h de crescimento. Na normalização da estirpe WT usou-se OD=0.286 e TSP= 2760204286,34375, para o I56T OD=0.369 e TSP= 72069410,19177. Foi utilizado o *scaling pareto* para dar a todos os picos a mesma importância.

3.6.1 Análise de componentes Principais (PCA)

3.6.1.1 Scores

Os resultados apresentados nos scores do PCA (*Principal component analysis*) mostram uma clara separação das variantes WT e I56T. Essa separação é indicada pelo gráfico de *Pareto* PCA. (Figura 3.7).

O eixo t1 apresenta a melhor separação entre os grupos, representando 96% da variância entre as amostras. Na figura 3.7, é visível a separação da lisozima WT (<0), da Lisozima I56T (≥ 0). Em relação ao eixo t2, horizontal, a separação não foi tão eficiente, como verificamos na figura 3.7.

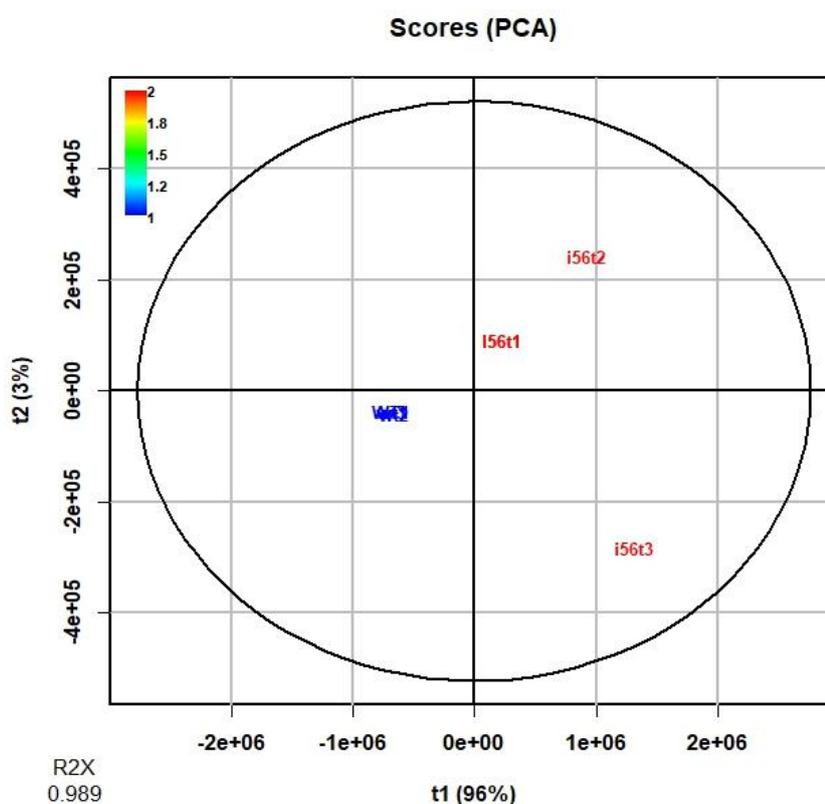


Figura 3.7 Gráfico PCA, Pareto, usado para a separação dos metabolitos.

Ensaio 3

3.6.1.2 Loadings

A figura 3.8 representa os *loadings* referentes à separação dos metabolitos apresentada na figura 3.7. Na figura 3.8A verificamos que existe uma maior quantidade de determinados metabolitos na parte positiva, referente à estirpe I56T, tendo a estirpe WT uma quantidade pouco significativa. Já na figura 3.8B, a quantidade de picos

positivos é inferior à quantidade de picos negativos, verificando assim, que a estirpe *WT* apresenta uma maior quantidade de outros metabolitos do que a estirpe I56T.

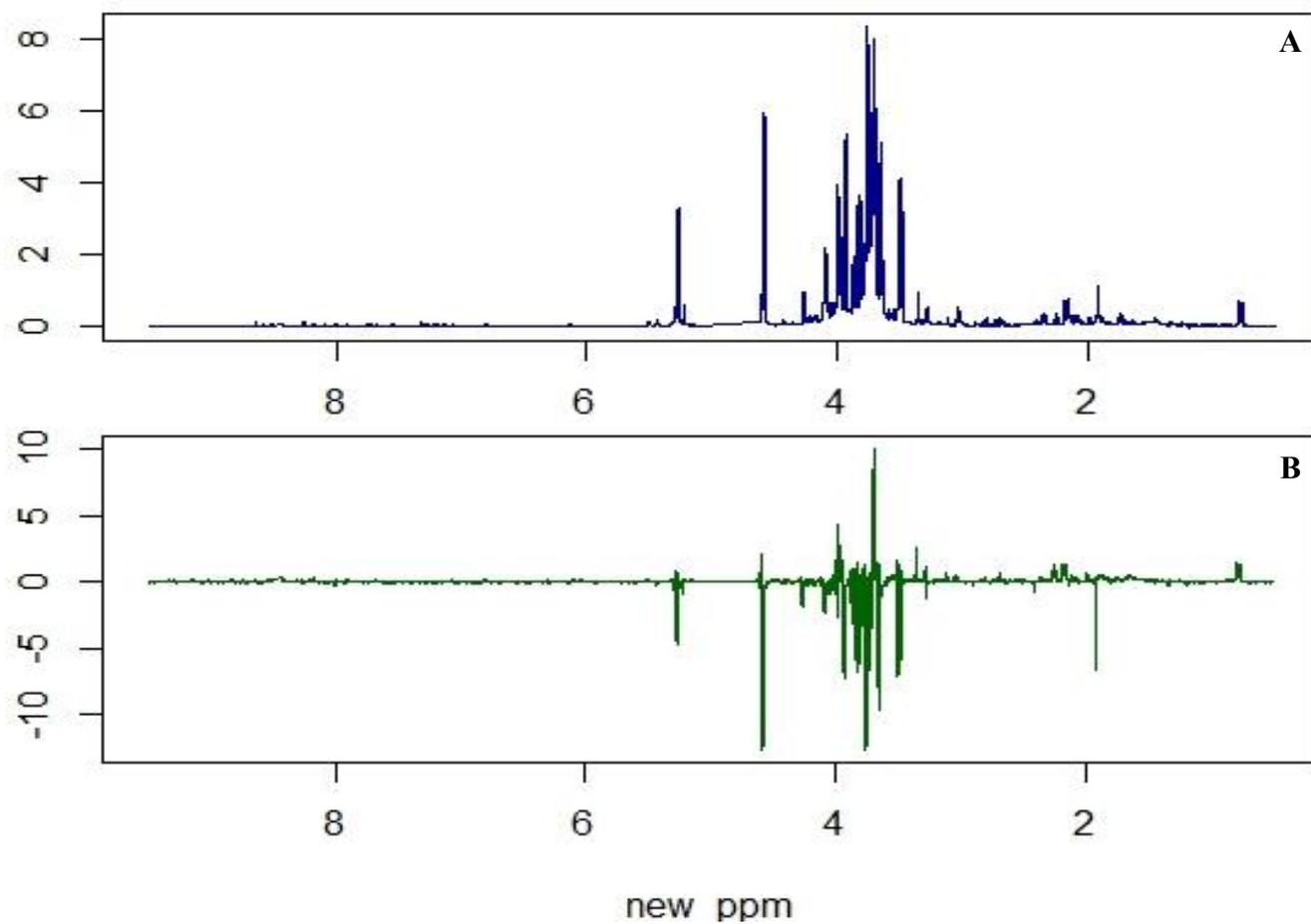


Figura 3.8 Loadings do PCA

- A- *Loadings* referentes ao eixo vertical da figura 3.7
- B- *Loadings* referentes ao eixo horizontal da figura 3.7

3.6.2 PLS-DA

3.6.2.1 VIPs

Os metabolitos que mais contribuem para a separação verificada no PLS-DA estão representados na figura 3.9, que representa o gráfico da importância variável de projeção (VIP) com o *scaling Pareto*. Na figura verificamos que os metabolitos que mais contribuem para a separação são os que se encontram na região entre 3.7 e 5, e estão representados pelas cores azul e violeta.

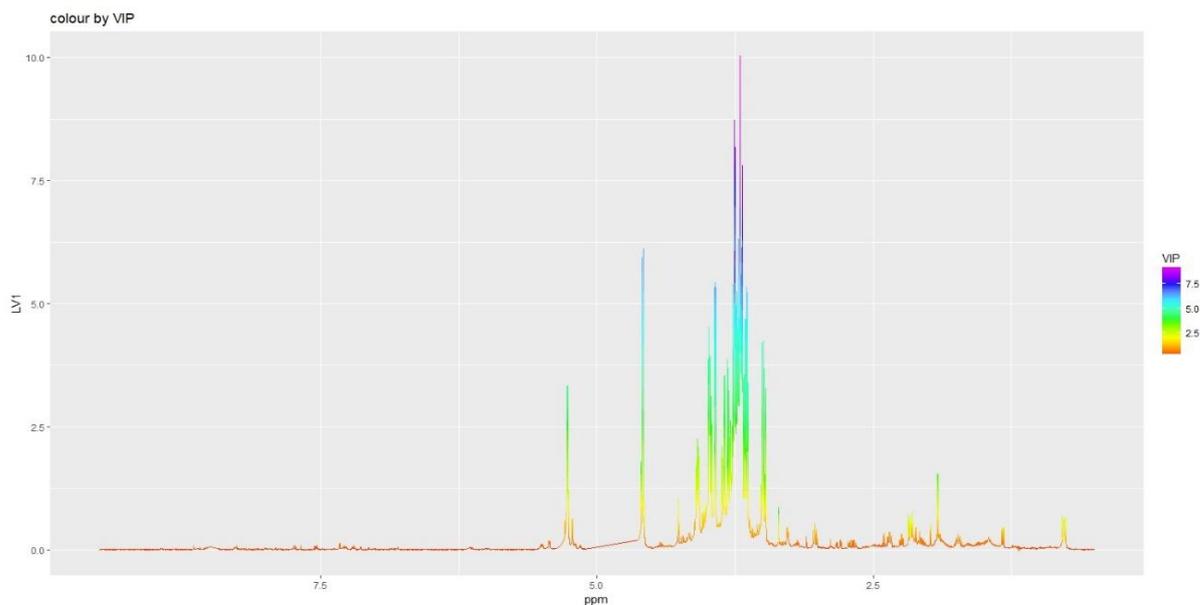


Figura 3.9 Identificação de Metabolitos através dos VIPs

Os valores dos metabolitos que mais contribuem para a separação dos grupos estão representados na Tabela 2. O valor 3,7051 é o que mais contribui para a separação, corroborando a análise feita ao gráfico da figura 3.9.

Tabela 2 Valores de VIP dos metabolitos

	ppm	p1	p2	VIP	Metabolito
1	3,7051	10,0353	-12,5415	9,4772	Galactose
2	3,7049	9,8383	-12,9831	9,3996	Galactose
3	3,7053	9,9768	-11,7991	9,3634	Galactose
4	3,7047	9,4361	-13,2588	9,1794	Galactose
5	3,7055	9,6643	-10,8127	9,0832	Galactose
6	3,7045	8,8664	-13,4077	8,8541	Galactose
7	3,7057	9,1501	-9,2103	8,6386	Galactose

8	3,7042	8,2464	-13,4257	8,4990	Galactose
9	3,7557	8,7226	5,3498	8,3762	Lisina
10	3,7559	8,6316	5,7568	8,3730	Lisina

3.7 Análise de Metabolitos

Após análise dos perfis metabólicos das variantes da lisozima, verificou-se que a Galactose e a Lisina eram os metabolitos que apresentavam uma maior importância no metabolismo da levedura.

Na análise dos boxplots verifica-se que existe uma diferença significativa entre a área destes metabolitos na variante com a proteína nativa e a proteína agregada (figura 3.10).

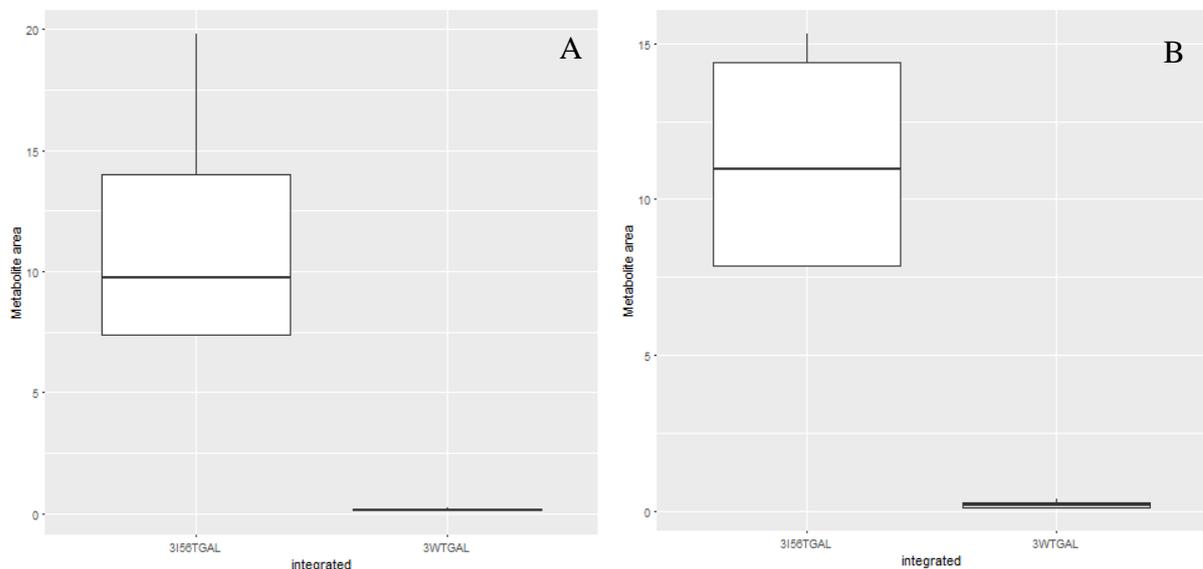


Figura 3.10 Boxplots dos metabolitos Galactose(A) e Lisina (B)

A galactose é um açúcar de seis carbonos (aldohexose), epímero C-4 da glucose. Apenas os isómeros *D* existem na natureza. A *D*-galactose é um componente dos cerebrosídeos, gangliosídeos e mucoproteínas e está presente no citoplasma da *S. cerevisiae*. Nas células humanas a galactose está presente no citoplasma e nos lisossomas e é um nutriente que fornece energia e também um substrato básico necessário para a biossíntese de muitas macromoléculas no corpo. As vias metabólicas da *D*-Galactose são também importantes na prevenção da acumulação de Galactitol. A desregulação da via metabólica da galactose já foi associada a algumas doenças, no entanto, ainda não foi associada diretamente a doenças degenerativas. Apesar da falta de evidências do

envolvimento da galactose na neurodegeneração, alguns metabolitos das suas vias metabólicas, como o galactitol, já foram associados a certas patologias⁽⁶⁵⁾.

A Lisina é um aminoácido essencial. Em *S. cerevisiae*, a lisina é sintetizada a partir do ácido aspártico (aspartato) e está presente nas mitocôndrias e no citoplasma da levedura. Existem vários erros inatos do metabolismo da lisina que estão associados a défices cognitivos em humanos. A lisina foi associada também a doenças neurodegenerativas como o Parkinson e Alzheimer, onde pacientes com essas patologias apresentam défices deste aminoácido⁽⁶⁶⁾.

A *N*-acetilglucosamina é um monossacarídeo derivado da glucose, que faz parte da composição da parede celular da *S. cerevisiae* e influencia a sua formação⁽⁶⁷⁾. Já o galactitol é um álcool e um produto de degradação metabólica da galactose que está presente nas membranas da *S. cerevisiae*. Em células humanas este metabolito está presente na membrana celular e tem várias funções, incluindo atuar como estabilizador da membrana. Quando presente em altas concentrações, o galactitol pode atuar como uma neurotoxina, com potencial para atacar as células neurais e o tecido neural. O excesso de consumo de lactose em indivíduos com intolerância à galactose ativa a redutase da aldose para produzir galactitol, diminuindo a quantidade de NADPH com consequente diminuição da atividade da glutathione redutase. Isto resulta na acumulação de peróxido de hidrogénio e outros radicais livres, causando sérios danos oxidativos a várias células e tecidos. Vários estudos demonstram a ligação do galactitol a algumas doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer⁽⁶⁵⁾.

3.8 Lisozima WT e I56T vs OPTN

Experiências anteriormente desenvolvidas por membros do nosso grupo de investigação mostraram que a sobre-expressão de optineurina (OPTN) no mesmo sistema modelo, *Saccharomyces cerevisiae*, é tóxica para levedura e leva a um crescimento mais lento. Descobriu-se também, após a análise do metaboloma, que as respostas ao stress oxidativo e as vias de adaptação ao stress são ativadas durante a sobre-expressão de OPTN.

Neste projeto realizaram-se as mesmas experiências, na mesma estirpe (Y7092), mas com diferentes tipos de lisozima para verificar se as respostas metabólicas desencadeadas às diferentes proteínas agregadas são resultado de perturbações específicas do metaboloma das proteínas ELA ou se são respostas não específicas para qualquer proteína sobre-expressa, agregada ou *unfolded*.

Os estudos de toxicidade, feitos através do *spot test*, demonstram que a sobre-expressão do plasmídeo com lisozima também é tóxica para levedura. No entanto, as respostas metabólicas revelaram-se bastantes díspares. Os metabolitos que apareceram significativamente aumentados no estudo anterior para a OPTN, referente a ELA, como é o caso da trealose, mostraram-se significativamente irrelevantes neste estudo. Em oposição, outros metabolitos revelaram-se significativamente aumentados, como por exemplo o galactitol.

Após análise destes resultados, decidiu-se repetir o estudo com a proteína OPTN. Os resultados não foram concordantes com os anteriores, como se verifica na figura 3.11. A disparidade de resultados pode dever-se ao facto das células não terem atingido a fase estacionária na experiência mais recente, provocando uma alteração completa do perfil metabólico.

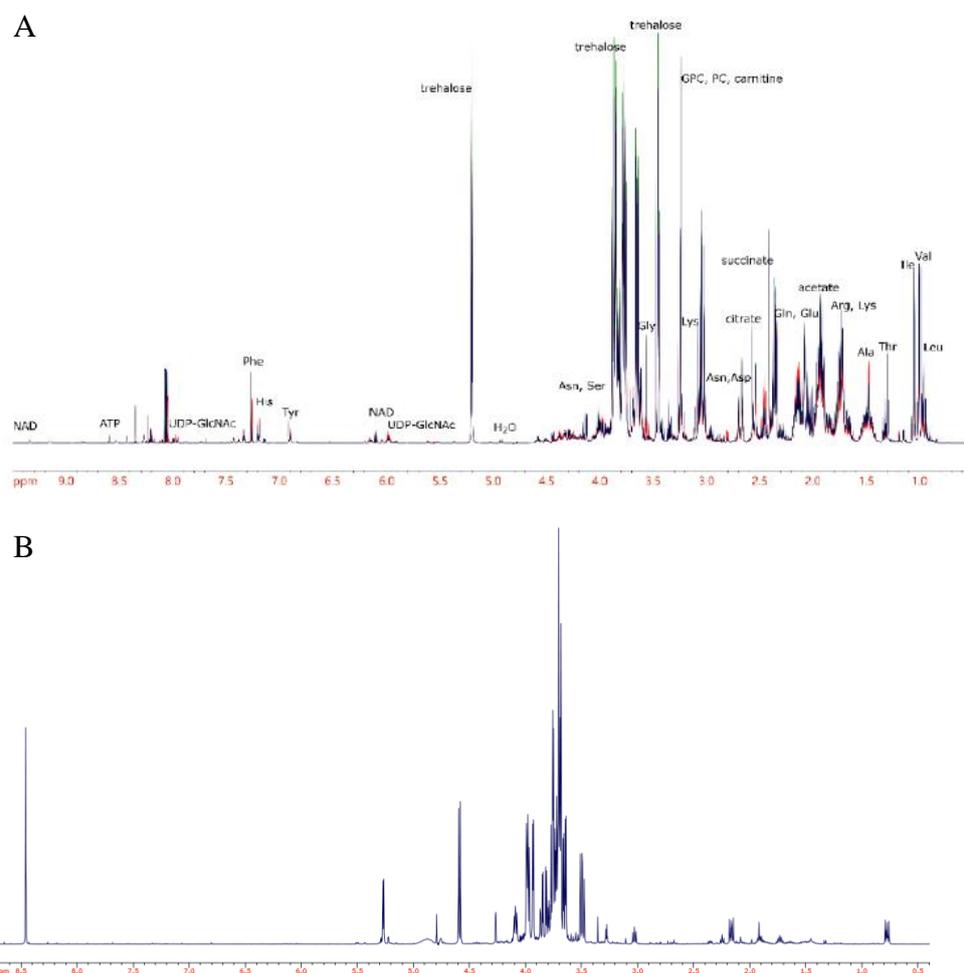


Figura 3.11 Espetros de RMN da OPTN

- A- Espetro de uma experiência anterior
- B- Espetro da OPTN obtido em julho

3.9 Problemas e Perspetivas Futuras

Inicialmente, neste projeto, pretendiam-se criar plasmídeos com o vetor de destino pAG416GAL-ccdB com e sem EYFP, para identificar a localização intracelular de possível agregados. A criação de ambos os plasmídeos tinha também como objetivo permitir a comparação dos resultados entre eles e verificar se existiam diferenças entre os perfis metabólicos. No entanto não foi possível realizar as experiências com o vetor com EYFP porque o clone de entrada foi desenhado com um codão stop no C-terminal. Portanto, como o vetor de destino pAG416GAL-ccd-EYFP tem o EYFP no C-terminal da proteína em estudo esta não seria traduzida. Futuramente, pretende-se alterar o codão terminal e retirar o codão stop, permitindo assim criar plasmídeos alterando apenas o vetor de destino, utilizando o pAG416GAL-ccdB-EYFP e comparar com os metabolitos obtidos neste projeto, para verificar se há uma alteração significativa que potencie novos estudos sobre vias metabólicas já existentes, fornecendo um maior conhecimento sobre as mesmas ou a descoberta de novas vias.

Outra das limitações deste estudo foi a falta de um controlo, sendo que as variantes da lisozima foram apenas comparadas entre si, uma vez que não se conseguiu obter um plasmídeo sem as variantes da lisozima. Para futuras experiências, seria importante a presença dos mesmo para se obter melhores conclusões.

Durante o projeto tentou-se por várias vezes, sem sucesso, a realização da reação LR para a lisozima T70N, e, por isso, não foi possível a análise de resultados com esta variante. Ao longo do projeto houve, também, algumas irregularidades nas colónias de levedura. Em algumas transformações não se obtiveram colónias típicas de levedura, como as da figura 3.3, que se assemelharam a um biofilme. Este problema aconteceu também quando transformamos as células com a variante OPTN. Apesar de não conseguirmos encontrar uma explicação para o sucedido, pensamos o stock existente da estirpe utilizada (Y7092) já não estará nas melhores condições para utilizar, o que pode ter enviesado os resultados do estudo.

Os *Spot Tests* foram apenas analisados de forma qualitativa. Por isso, no futuro pode-se fazer uma análise quantitativa, através da contagem das unidades formadoras de colónias.

Para as curvas de crescimento, as células cresceram em galactose num volume total de 200 μ L e verificou-se que não foi atingida a fase estacionária. Uma vez que o volume utilizado pode ter contribuído para este facto, no futuro as curvas de crescimento

poderão ser repetidas num volume maior (25mL), para verificar se o volume de crescimento influenciou ou não os resultados deste trabalho.

Para fazer face aos problemas descritos o primeiro passo poderá ser uma nova tentativa para a obtenção do plasmídeo com a lisozima T70N, utilizando outro tipo de células competentes. De seguida transformar as 3 variantes (WT, T70N e I56T) numa nova estirpe de *S. cerevisiae* para repetir a caracterização do endometaboloma por RMN. Para este ponto sugere-se a utilização da estirpe BY4347⁽⁶⁸⁾.

Para uma melhor identificação dos metabolitos envolvidos neste processo podem também usar-se técnicas de identificação complementares ao RMN, como GC-MS, ou o FTIR.

4-Conclusões

Neste trabalho, os metabólitos Galactose e Lisina apresentam uma grande importância no metabolismo de *S. cerevisiae* e mostraram diferenças significativas entre as estirpes com expressão de lisozima nativa e lisozima agregada.

Pretendia-se saber se a resposta celular era a mesma para a todos as proteínas agregadas ou se era específica para alguma proteína agregada. Para isso, compararam-se os resultados deste trabalho com os resultados de estudos anteriores que usaram a OPTN, proteína agregada relacionada com a ELA, e verificou-se que existiam diferenças significativas entre os estudos. Após a repetição das experiências com OPTN, com as mesmas condições, verificou-se que o perfil metabólico era diferente e uma das razões que pode ter causado essa diferença é a fase de crescimento em que as células se encontram, sendo que as células usadas neste trabalho poderiam não estar em fase estacionária. Esta conclusão pode ser provada pela ausência de alguns metabólitos característicos de *S. cerevisiae* em fase estacionária, como a trealose.

No segundo ensaio realizado foram identificados os metabólitos GlcNAc e Galactitol como importantes para o metabolismo da levedura, no entanto não se verificaram diferenças entre a quantidade destes metabólitos nas estirpes com lisozima nativa e lisozima agregada.

5-Referências

1. Hargus G, Ehrlich M, Hallmann A-L, Kuhlmann T. Human stem cell models of neurodegeneration: a novel approach to study mechanisms of disease development. *Acta neuropathologica*. 2014;127(2):151-73.
2. Kovacs GG. Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *Handbook of clinical neurology*. 145: Elsevier; 2017. p. 301-7.
3. Guo JL, Lee VM. Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nature medicine*. 2014;20(2):130.
4. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 1973;181(4096):223-30.
5. Anfinsen CB. The formation and stabilization of protein structure. *Biochem J*. 1972;128(4):737-49.
6. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Web content by Neil D. Clarke (2002)." 3. Protein Structure and Function. *Biochemistry* San Francisco: WH Free-man ISBN 0-7167-4684-0.
7. Selkoe DJ. Folding proteins in fatal ways. *Nature*. 2003;426(6968):900.
8. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:333-66.
9. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. Protein structure and function. New York: Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC. 2010:120-70.
10. Aguzzi A, O'connor T. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nature reviews Drug discovery*. 2010;9(3):237.
11. Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of molecular medicine*. 2003;81(11):678-99.
12. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature structural & molecular biology*. 2009;16(6):574.
13. Brüning A, Jückstock J. Misfolded proteins: from little villains to little helpers in the fight against cancer. *Frontiers in oncology*. 2015;5:47.
14. Gething M-J, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature*. 1992;355(6355):33.
15. Roberts CJ. Non-native protein aggregation kinetics. *Biotechnology and bioengineering*. 2007;98(5):927-38.
16. Yon J. Protein folding: concepts and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 1997;53(7):557-67.

17. Mahley R, Huang Y. Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2006;114:8-14.
18. Skora L, Becker S, Zweckstetter M. Molten globule precursor states are conformationally correlated to amyloid fibrils of human β -2-microglobulin. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(27):9223-5.
19. Uversky VN, Li J, Fink AL. Evidence for a partially folded intermediate in α -synuclein fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(14):10737-44.
20. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*. 2004;10:S10.
21. Viles JH. Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases. *Coordination Chemistry Reviews*. 2012;256(19-20):2271-84.
22. Leal SS, Botelho HM, Gomes CM. Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration. *Coordination Chemistry Reviews*. 2012;256(19-20):2253-70.
23. Cohen SI, Vendruscolo M, Dobson CM, Knowles TP. From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation. *Journal of molecular biology*. 2012;421(2-3):160-71.
24. Pollard TD. Tribute to Fumio Oosawa the pioneer in actin biophysics. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)*. 2017;74(12):446-9.
25. Tyedmers J, Mogk A, Bukau B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(11):777.
26. Takalo M, Salminen A, Soininen H, Hiltunen M, Haapasalo A. Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *American journal of neurodegenerative disease*. 2013;2(1):1.
27. Cozzolino M, Carrì MT. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Progress in neurobiology*. 2012;97(2):54-66.
28. Pagnini F. Psychological wellbeing and quality of life in amyotrophic lateral sclerosis: a review. *International Journal of Psychology*. 2013;48(3):194-205.
29. Palomo V, I Perez D, Gil C, Martínez A. The potential role of glycogen synthase kinase 3 inhibitors as amyotrophic lateral sclerosis pharmacological therapy. *Current medicinal chemistry*. 2011;18(20):3028-34.
30. Gianforcaro A, Hamadeh MJ. Vitamin D as a potential therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2014;20(2):101-11.

31. Orrell RW. Motor neuron disease: Systematic reviews of treatment for ALS and SMA. *British medical bulletin*. 2010;93(1).
32. Cheah B, Vucic S, Krishnan A, Kiernan M. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Current medicinal chemistry*. 2010;17(18):1942-59.
33. Blasco H, Patin F, Madji Hounoum B, Gordon P, Vourc'h P, Andres C, et al. Metabolomics in amyotrophic lateral sclerosis: how far can it take us? *European journal of neurology*. 2016;23(3):447-54.
34. Blokhuis AM, Groen EJ, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*. 2013;125(6):777-94.
35. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature neuroscience*. 2014;17(1):17.
36. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006;314(5796):130-3.
37. Fields S, Johnston M. Whither model organism research? *Science*. 2005;307(5717):1885-6.
38. Reitamo S, Klockars M, Adinolfi M, Osserman E. Human lysozyme (origin and distribution in health and disease). *La Ricerca in clinica e in laboratorio*. 1978;8(4):211-31.
39. Jollès P, Jollès J. What's new in lysozyme research? *Molecular and cellular biochemistry*. 1984;63(2):165-89.
40. Hansen N, Karle HA, V. Olgaard, K. Lysozyme turnover in man *J Clin Invest*. 1972;51:1146-55.
41. Osserman EF, Lawlor DP. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*. 1966;124(5):921-52.
42. Matagne A, Jamin M, Chung EW, Robinson CV, Radford SE, Dobson CM. Thermal unfolding of an intermediate is associated with non-arrhenius kinetics in the folding of hen lysozyme1. *Journal of molecular biology*. 2000;297(1):193-210.
43. Takano K, Funahashi J, Yutani K. The stability and folding process of amyloidogenic mutant human lysozymes. *European journal of biochemistry*. 2001;268(1):155-9.
44. Dobson CM, Evans PA, Radford SE. Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far. *Trends in biochemical sciences*. 1994;19(1):31-7.
45. PETERS CWB, KRUSE U, POLLWEIN R, GRZESCHIK K-H, SIPPEL AE. The human lysozyme gene. *European Journal of Biochemistry*. 1989;182(3):507-16.

46. Chamberlain AK, Receveur V, Spencer A, Redfield C, Dobson CM. Characterization of the structure and dynamics of amyloidogenic variants of human lysozyme by NMR spectroscopy. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 2001;10(12):2525-30.
47. Booth DR, Pepys MB, Hawkins PN. A novel variant of human lysozyme (T70N) is common in the normal population. *Human mutation*. 2000;16(2):180.
48. Esposito G, Garcia J, Mangione P, Giorgetti S, Corazza A, Viglino P, et al. Structural and folding dynamic properties of the T70N variant of human lysozyme. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(28):25910-8.
49. Pepys M, Hawkins P, Booth D, Vigushin D, Tennent G, Soutar A, et al. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature*. 1993;362(6420):553.
50. Dumoulin M, Kumita JR, Dobson CM. Normal and aberrant biological self-assembly: insights from studies of human lysozyme and its amyloidogenic variants. *Accounts of chemical research*. 2006;39(9):603-10.
51. Funahashi J, Takano K, Ogasahara K, Yamagata Y, Yutani K. The Structure, Stability, and Folding Process of Amyloidogenic Mutant Human Lysozyme. *The Journal of Biochemistry*. 1996;120(6):1216-23.
52. Spencer A, Morozov-Roche LA, Noppe W, MacKenzie DA, Jeenes DJ, Joniau M, et al. Expression, Purification, and Characterization of the Recombinant Calcium-Binding Equine Lysozyme Secreted by the Filamentous Fungus *Aspergillus niger*: Comparisons with the Production of Hen and Human Lysozymes. *Protein Expression and Purification*. 1999;16(1):171-80.
53. Suhre K. Metabolic profiling in diabetes. *Journal of endocrinology*. 2014;221(3):R75-R85.
54. Mal M. Noninvasive metabolic profiling for painless diagnosis of human diseases and disorders. *Future science OA*. 2016;2(2).
55. C Geiszler P, P Auer D, A Daykin C. The journey from metabolic profiling to biomarkers: The potential of NMR spectroscopy based metabolomics in neurodegenerative disease research. *Current Metabolomics*. 2013;1(2):160-79.
56. Yoganandan N, Arun MW, Pintar FA. Normalizing and scaling of data to derive human response corridors from impact tests. *Journal of biomechanics*. 2014;47(8):1749-56.
57. Alberti S, Gitler AD, Lindquist S. A suite of Gateway® cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2007;24(10):913-9.

58. Wood WA, Krieg NR. Methods for general and molecular bacteriology. Am Soc Microbiol; 1989.
59. Baryshnikova A, Costanzo M, Kim Y, Ding H, Koh J, Toufighi K, et al. Quantitative analysis of fitness and genetic interactions in yeast on a genome scale. Nature methods. 2010;7(12):1017.
60. Gietz RD. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Yeast Protocols: Springer; 2014. p. 33-44.
61. Burke D. Methods in yeast genetics. A cold spring harbor laboratory course manual. 2000.
62. Palomino-Schätzlein M, Molina-Navarro MM, Tormos-Pérez M, Rodríguez-Navarro S, Pineda-Lucena A. Optimised protocols for the metabolic profiling of *S. cerevisiae* by ¹H-NMR and HRMAS spectroscopy. Analytical and bioanalytical chemistry. 2013;405(26):8431-41.
63. Thévenot EA, Roux A, Xu Y, Ezan E, Junot C. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. Journal of proteome research. 2015;14(8):3322-35.
64. de Jongh WA, Bro C, Ostergaard S, Regenber B, Olsson L, Nielsen J. The roles of galactitol, galactose-1-phosphate, and phosphoglucosyltransferase in galactose-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and bioengineering. 2008;101(2):317-26.
65. Shetty H, Holloway H, Schapiro M. Cerebrospinal fluid and plasma distribution of myo-inositol and other polyols in Alzheimer disease. Clinical chemistry. 1996;42(2):298-302.
66. Fonteh A, Harrington R, Tsai A, Liao P, Harrington M. Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects. Amino acids. 2007;32(2):213-24.
67. Lesage G, Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2006;70(2):317-43.
68. Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. Yeast. 1998;14(2):115-32.

6-Anexos

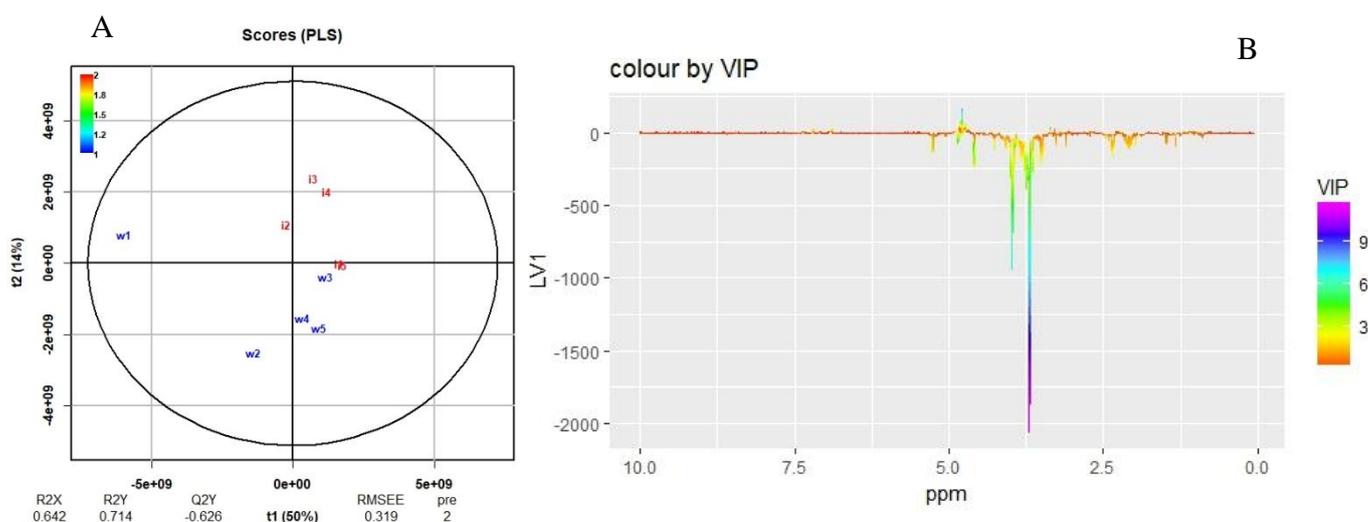
6.1 Protocolo da Transformação para *Escherichia coli*

- 1) Adicionar 1µL da reação LR, no microtubo que contém 50 µL de DH5α, misturar suavemente
 - **Nota:** Não fazer *up and down* com a pipeta
- 2) Incubar no gelo durante 30 minutos
- 3) *Heat-shock* durante 30s, a 42°C, sem agitação
- 4) Transferir, imediatamente, o tubo no gelo
- 5) Adicionar 450 µL de *SOC médium* à temperatura ambiente
- 6) Colocar o tubo na incubadora, horizontalmente, durante 1h, a 37°C e a 200rpm
- 7) Distribuir 20 µL e 100 µL, da transformação, em diferentes placas seletivas (meio LB+ Antibiótico) pré-aquecidas.
- 8) Incubar O.N. a 37°C

6.2 Resultados Obtidos por MVA em ensaio anterior

Estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados em cima referentes às experiências do ensaio 2, no entanto pensa-se que as leveduras possam não ter atingido a fase estacionária.

É possível também verificar que os metabolitos Galactitol e *N*-acetilglucosamina são importantes para o metabolismo da levedura, no entanto não se verificaram diferenças significativas na quantidade destes metabolitos entre as estirpes com a lisozima nativa e com a lisozima agregada.

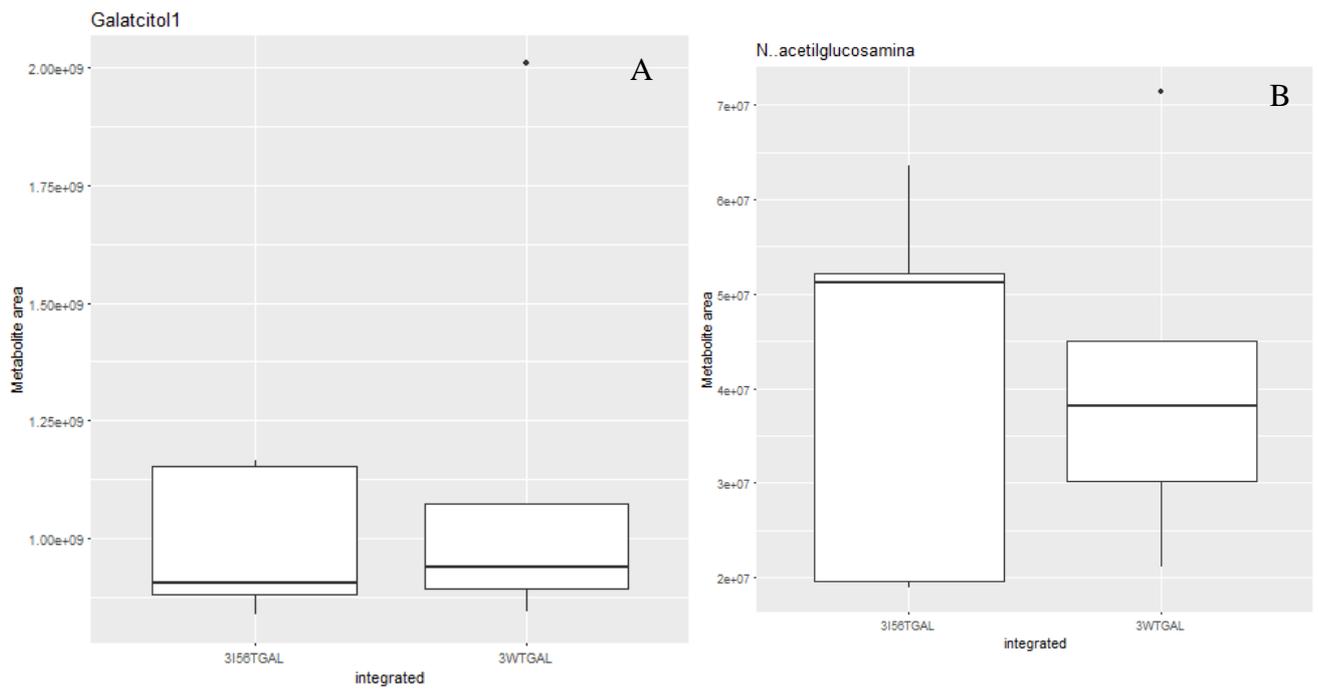


A- Grafico PLS demonstra a identificação dos metabolitos

B- VIPs demonstra os metabolitos que influenciam a separação

Tabela 3 Valores de *VIP* dos metabolitos

	ppm	p1	p2	VIPs	Metabolitos
1	3.70697	-1427.368	743.3397	9.881029	Galactitol
2	3.68688	-1338.562	780.4376	9.876813	Galactitol
3	3.68389	-1587.636	574.885	9.820389	Galactitol
4	3.7044	-1568.63	499.8649	9.764922	Galactitol
5	3.6871	-1238.555	744.8384	9.662987	Galactitol
6	3.68368	-1491.518	534.2283	9.420714	Galactitol
7	3.68731	-1141.996	704.2843	9.420282	Galactitol
8	3.70718	-1313.504	676.7624	9.356505	Galactitol
9	3.70419	-1442.118	468.7414	9.209334	Galactitol
10	3.68753	-1056.332	659.3629	9.106454	Galactitol



Boxplots dos metabolitos Galactitol (A) e *N*-acetilglucosamina (B)