



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas – ICEB
Departamento de Ciências Biológicas – DECBI



**IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES DE INOSITOL 1, 4, 5 - TRIFOSFATO (IP₃) E
O SEU PAPEL NA ATIVAÇÃO DA ENZIMA H⁺-ATPase DE MEMBRANA
CITOPLASMÁTICA EM *Saccharomyces cerevisiae***

Raquel Penido Damasceno

Ouro Preto

Minas Gerais - Brasil

2021



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas – ICEB
Departamento de Ciências Biológicas – DECBI



Raquel Penido Damasceno

**IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES DE INOSITOL 1, 4, 5 - TRIFOSFATO (IP₃) E
O SEU PAPEL NA ATIVAÇÃO DA ENZIMA H⁺-ATPase DE MEMBRANA
CITOPLASMÁTICA EM *Saccharomyces cerevisiae***

Monografia apresentada ao Instituto de Ciências exatas e
Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas

Área de concentração: Bioinformática

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Izinara Rosse

Co-orientador: Prof. Dr. Aureliano Claret da Cunha

Ouro Preto

Minas Gerais - Brasil

2021



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Raquel Penido Damasceno

Identificação de receptores de Inositol 1, 4, 5 - Trifosfato (IP₃) e o seu papel na ativação da enzima H⁺-ATPase de membrana citoplasmática em *Saccharomyces cerevisiae*

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 17 de dezembro de 2021

Membros da banca

Profa Dra Izinara Rosse da Cruz - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. Pablo Augusto de Souza Fonseca - University of Guelph/Canadá
Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão - Universidade Federal de Ouro Preto

Izinara Rosse da Cruz, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 11/01/2022



Documento assinado eletronicamente por **Izinara Rosse da Cruz, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 11/01/2022, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0267247** e o código CRC **C839CAF4**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.013292/2021-71

SEI nº 0267247

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591649 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

A UFOP pelo ensino de qualidade e o amparo na pesquisa.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas da UFOP e da UEMG, que me fizeram me apaixonar ainda mais pelo curso.

Aos programas de incentivo a Iniciação científica PIBIC E PIP.

As instituições de fomento: Capes, CNPQ e Fapemig.

A minha orientadora Dra. Izinara, por ter me ensinado tanto nos últimos anos. Por ter me dado a oportunidade de me apaixonar pela bioinformática e pela ciência e por ser um exemplo de professora e orientadora.

Ao co-orientador Dr. Aureliano C. Cunha, por seu profissionalismo e por todos os ensinamentos.

Ao colaborador Dr. Rogelio Brandão, que me deu a honra de poder fazer parte da sua pesquisa e aprender cada dia mais sobre ela.

Aos colaboradores Sayonara Quaresma e Cleberson dos Santos que me ajudaram a desenvolver as atividades realizadas durante todo o projeto. Ao LBCM e todos os integrantes que me proporcionaram momentos de muito aprendizado e que sempre se mantiveram dispostos a me ajudar.

A minha família que me deu todo apoio e suporte para concluir mais esta etapa na minha vida. Em especial aos meus pais William e Helenice que sempre me deram todo amor e amparo. As minhas irmãs Carol e Deborah que sempre me incentivaram a continuar firme na minha caminhada. Ao meu primo Ricardo por ter me encorajado a seguir meus sonhos. E aos meus sobrinhos Miguel e Maria Clara que me dão motivação para buscar um mundo melhor para eles. Ao Gabriel, que se manteve ao meu lado me apoiando.

A minha família de Ouro Preto, a minha amada República Tchu Tchu Tchu. As moradoras Karaóquê, Nuntem, Tantam, Filomena, Qually, D'angola e Arapu-k por estarem comigo nos meus melhores e piores momentos, por me encorajarem sempre e por me ensinarem cada dia mais sobre amizade. Afinal, só não passa o amor pela casa e a nossa amizade que nunca fracassa. Aos meus amigos de curso: Alzira, Ubiratan, Karol, Ana Clara, João, Diego e Laisy que juntos transformaram esses 4 anos de curso mais alegres. Que mesmo em momentos mais

díficeis sempre estiveram comigo e que nos momentos de felicidade e loucura das rocks nunca faltou companheirismo.

E a todos que de alguma forma me ajudaram e estiveram comigo durante toda minha caminhada.

“Às estrelas que ouvem e aos sonhos que são atendidos”

Sarah J. Mass

RESUMO

A enzima H^+ -ATPase de membrana citoplasmática apresenta um papel fundamental na fisiologia de *Saccharomyces cerevisiae* e no processo de fermentação. Esta enzima pode apresentar uma conexão com a sinalização de cálcio intracelular, porém esta via ainda não está bem elucidada. Evidências apontam uma relação do IP_3 com a ativação da H^+ -ATPase e a sinalização de cálcio, e que o canal de cálcio Yvc1p pode estar envolvido nesta relação através de um receptor. Neste estudo, com a intenção de identificar os possíveis receptores de IP_3 em leveduras, realizamos buscas, *in silico*, por sequências no genoma de *S. cerevisiae* que fossem similares aos receptores de IP_3 já depositados em bancos de dados públicos. Foi construído um banco de dados com estas sequências já identificadas de receptores de IP_3 em eucariotos e realizada a busca por similaridade contra o genoma da S288C utilizando a ferramenta BLASTn. Não foi observada similaridade entre as sequências de receptores descritas para as demais espécies e o genoma da *S. cerevisiae*. Entretanto, foi possível identificar a partir de um alinhamento múltiplo, diversas regiões conservadas entre as diferentes espécies de cada um dos três tipos de receptores. Em espécies de fungos que possuem o receptor de IP_3 já descrito, foi possível observar que estes apresentam, em alguns trechos, conservação dos padrões bem diferentes das demais espécies de eucariotos. Então, essas sequências foram selecionadas e comparadas com o banco de dados de sequências de proteínas do NCBI, utilizando BLASTp online, com o intuito de identificar sequências similares aos receptores de IP_3 de fungos ainda desconhecidos. Posteriormente, foi realizado um alinhamento múltiplo entre essas sequências e os motivos conservados foram identificados utilizando-se a ferramenta Pattcom. Para identificar, então, proteínas já descritas em *S. cerevisiae* que apresentam similaridades com os motivos conservados de receptores de IP_3 foi realizado um alinhamento par-a-par local, utilizando a ferramenta BLASTp, dos motivos contra o proteoma da cepa S288C. Foi possível observar que a proteína YER053C-A de *S. cerevisiae* apresenta similaridade com um dos motivos conservados em alinhamento de sequências de proteínas similares a receptores de IP_3 encontradas em fungos. Para verificar se a proteína candidata apresentava envolvimento no fenótipo de interesse foi verificada as interações já descritas da YER053C-A com outras proteínas na literatura utilizando a ferramenta STRING. Foi verificado que a YER053C-A não apresenta interações descritas com as proteínas da via de ativação da enzima H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, mas apresenta interação com proteínas responsáveis pela resposta ao etanol em levedura. Para validar se a YER053C-A interage com a molécula de IP_3 foi realizada a técnica de *Docking* molecular com as ferramentas Dockthor e Autodock Tools. Foi possível

observar que a molécula de IP₃ em ambas ferramentas se liga na mesma região da proteína, sugerindo o sítio de ligação. Por fim, para testar a técnica empregada neste trabalho, foi verificado se se outras proteínas, já descritas na literatura como candidatas a receptores de IP₃ em leveduras, apresentam similaridades com os motivos conservados identificados no presente trabalho. Foi realizado um alinhamento par-a-par local, utilizando a ferramenta BLASTp, dos motivos contra as proteínas candidatas Alg6p, Yvc1p, Sse2p e Swc3p. Verificou-se então, que estas proteínas apresentam similaridade com alguns motivos conservados, e que estas podem também serem receptores de IP₃ em *S. cerevisiae*. Este resultado indica que as proteínas YER053C-A, Alg6p, Yvc1p, Sse2p e Swc3p são fortes candidatas a serem um dos receptores de IP₃ em *S. cerevisiae*. Além disso, a estratégia de bioinformática estabelecida no presente trabalho, foi capaz de identificar receptores moleculares que até então não tinham sido descritos, podendo ser utilizada para identificação de outros receptores moleculares.

Palavras-Chave: Receptores de IP₃; Bioinformática; fermentação; leveduras; bomba próton-ATPase.

ABSTRACT

The plasma membrane enzyme H^+ -ATPase has a fundamental role in the physiology of *Saccharomyces cerevisiae* and in the fermentation process. This enzyme may have a connection to intracellular calcium signaling, but this pathway is not yet well elucidated. Evidence points to a relationship of IP_3 with H^+ -ATPase activation and calcium signaling, and that the calcium channel Yvc1p may be involved in this relationship via a receptor. In this study, with the intention of identifying possible IP_3 receptors in yeast, we performed *in silico* searches for sequences in the *S. cerevisiae* genome that were similar to IP_3 receptors already deposited in public databases. A database was constructed with these already identified IP_3 receptor sequences and a similarity search was performed against the S288C genome using the BLASTn tool. No similarity was observed between the receptor sequences described for the other species and the *S. cerevisiae* genome. However, it was possible to identify from multiple alignment, several preserved regions between the different species for each of the three receptor types. In fungal species having the IP_3 receptor already described, it was possible to observe that they show a conservation of patterns quite different from other eukaryotic species. Then, these sequences were selected and compared with the NCBI protein sequence database, using BLASTp online, in order to identify sequences similar to the IP_3 receptors of unknown fungi. Subsequently, a multiple alignment was performed between these sequences and conserved motifs were identified using a tool developed by the research group. To identify, then proteins already described in *S. cerevisiae* that present similarities with the conserved motifs of IP_3 receptors, a local pairwise alignment was performed, using the BLASTp tool. It was possible to observe that the YER053C-A protein from *S. cerevisiae* shows similarity to one of the conserved motifs in sequence alignment of IP_3 receptor-like proteins found in fungi. To validate that the candidate protein presents the phenotype of interest, already described interactions of YER053C-A with other proteins in the literature were checked using the STRING tool. YER053C-A have no described interactions with proteins from the cytoplasmic membrane H^+ -ATPase enzyme activation pathway, but does interact with proteins responsible for the ethanol response in yeast. To verify whether YER053C-A interacts with the IP_3 molecule, the molecular docking technique was performed using DockThor and Autodock Tools. It was possible to observe that the IP_3 molecule in both tools binds in the same region of the protein, suggesting the binding site. This result indicates that the YER053C-A protein is a strong candidate to be one of the IP_3 receptors in *S. cerevisiae*. Finally, to test the technique employed in this work, it was verified if other proteins already described in the literature as candidate IP_3 receptors in

yeast present similarities with the conserved motifs identified in the present work. A local pairwise alignment was performed, using the BLASTp tool, of the motifs against the Alg6p, Yvc1p, Sse2p and Swc3p. It was found that these proteins show similarity with some conserved motifs, and that these proteins may also be IP₃ receptors. And that the bioinformatics strategy established in the present work, was able to identify molecular receptors that had not been described until then. And that it can be used to identify other molecular receptors.

Keywords: IP₃ receptors; Bioinformatics; Fermentation; Yeast; Proton-ATPase Pump.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via hipotética de ativação da enzima H ⁺ -ATPase induzida por glicose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
Figura 2: Alinhamento múltiplo entre as sequências do receptor de IP ₃ tipo 1 descritas na literatura.	16
Figura 3: Alinhamento múltiplo entre as sequências do receptor de IP ₃ tipo 2 descritas na literatura	17
Figura 4: Alinhamento múltiplo entre as sequências do receptor de IP ₃ tipo 3 descritas na literatura	18
Figura 5: Alinhamento múltiplo entre as sequências do receptor de IP ₃ tipo 1 descritas na literatura com ênfase na observação das sequências de fungos	19
Figura 6: Alinhamento múltiplo entre as sequências do receptor de IP ₃ tipo 3 descritas na literatura com ênfase na observação das sequências de fungos	20
Figura 7: Alinhamento múltiplo entre as sequências similares a sequência de receptor de IP ₃ de <i>Choanephora cucurbitarum</i>	22
Figura 8: Alinhamento múltiplo entre as sequências similares à sequência de receptor de IP ₃ de <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	23
Figura 9: Alinhamento múltiplo das sequências similares a sequência de receptor de IP ₃ de <i>Rhizoctonia solani</i>	24
Figura 10: Alinhamento múltiplo das sequências similares à sequência de receptor de IP ₃ <i>Talaromyces marneffe</i>	25
Figura 11: Rede de interação realizada entre a proteína candidata YER053C-A com as proteínas descritas como atuantes na via de ativação da enzima H ⁺ -ATPase.	30
Figura 12: Interações descritas da proteína candidata YER053C-A com outras proteínas descritas na literatura	31
Figura 13: <i>Docking</i> molecular entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP ₃ de <i>S. cerevisiae</i> realizado pela ferramenta DockThor	33
Figura 14: <i>Docking</i> Molecular, <i>Gridbox</i> 1, entre a Proteína YER053C-A e a Molécula de IP ₃ de <i>S. cerevisiae</i> realizado pela ferramenta Autodock Tools	35

Figura 15: <i>Docking</i> Molecular, <i>Gridbox</i> 2, entre a Proteína YER053C-A e a Molécula de IP ₃ de <i>S. cerevisiae</i> realizado pela ferramenta Autodock Tools	37
Figura 16: Posição de ancoragem da molécula de IP ₃ de <i>S. cerevisiae</i> na proteína YER053C-A nas duas estratégias utilizadas	39
Figura 17: Similaridade entre a proteína Yvc1p e os motivos conservados de receptores de IP ₃	43
Figura 18: Similaridade entre a proteína Alg6p e os motivos conservados de receptores de IP ₃	44
Figura 19: Similaridade entre a proteína Sse2p e os motivos conservados de receptores de IP ₃	45
Figura 20: Similaridade entre a proteína Swc3p e os motivos conservados de receptores de IP ₃	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência das proteínas apontadas pela literatura como candidatas a receptores de IP ₃ em <i>S. cerevisiae</i>	13
Tabela 2: Similaridades entre motivos conservados e proteínas de <i>S. cerevisiae</i>	29
Tabela 3: Resultado da ancoragem molecular na ferramenta DockThor entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP ₃ de <i>S. cerevisiae</i>	34
Tabela 4: Resultado da posição 1 da <i>Gridbox</i> na ferramenta AutoDock Tools entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP ₃ de <i>S. cerevisiae</i>	36
Tabela 5: Resultado da posição 2 da <i>Gridbox</i> na ferramenta AutoDock Tools entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP ₃ de <i>S. cerevisiae</i>	38
Tabela 6: Similaridades entre motivos conservados e as proteínas Alg6p, Sse2p, Swc3p e Yvc1p	42

LISTA DE ABREVIATURAS

2-APB - Aminoetoxifenilborato

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn – Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotide

BLASTp – Basic Local Alignment Search Tool for Protein

CA – Cobertura de Alinhamento

Ca²⁺ – Cálcio

DAG – Diacilglicerol

ID – Identidade

IP₃ – Inositol 1, 4, 5-Trifosfato

ITPR1 – Receptor de Inositol 1, 4, 5-Trifosfato Tipo 1

ITPR2 – Receptor de Inositol 1, 4, 5-Trifosfato Tipo 2

ITPR3 – Receptor de Inositol 1, 4, 5-Trifosfato Tipo 1

KDa – Quilodáltons

MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis

NCBI – Nacional Center of Biotechnology Information

PDB – Protein Data Base

pH – Potencial Hidrogeniônico

PMA1 – Plasma Membrane ATPase

RE – Reticulo Endoplasmático

RMSD – Root Mean Square Deviation

YMDB – Yeast Metabolome Data Base

INDICE

INTRODUÇÃO	1
1.1 Via hipotética de estudo da ativação da enzima H ⁺ -ATPase	2
1.2 Receptores de IP ₃	5
1.3 Busca pelos receptores de IP ₃ em leveduras ao longo dos anos.....	6
OBJETIVOS	8
2.1 Objetivos gerais	8
2.2 Objetivos específicos	8
MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1 - Construção do banco de dados de receptores de IP ₃	9
3.2 – Identificação dos receptores de IP ₃ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
3.3 – Identificação de proteínas similares a receptores de IP ₃ em fungos	10
3.4 – Detecção dos motivos conservados de sequências submetidas ao alinhamento múltiplo	10
3.5 – Busca por similaridades entre o proteoma de <i>S. cerevisiae</i> e os motivos conservados	11
3.6 – Ancoragem molecular da molécula de IP ₃ nas proteínas candidatas	11
3.7 - Busca por similaridade entre as proteínas Alg6p, Yvc1p, Sse2p e Swc3p e os motivos conservados.....	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4.1 - Composição do banco de dados de sequências de receptores de IP ₃ descritas na literatura	14
4.2 - Similaridade entre as sequências de receptores de IP ₃ descritas em eucariotos e genoma e proteoma de <i>S. cerevisiae</i>	14
4.3 - Similaridade entre proteínas similares a receptores de IP ₃ em fungos e o proteoma de <i>S. cerevisiae</i>	21
4.4 - Similaridades entre os motivos conservados e o proteoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
4.5 - Ancoragem molecular da molécula de IP ₃ na proteína candidata, YER053C-A.....	32
4.6 - Similaridade entre os motivos conservados de receptores de IP ₃ e as proteínas Alg6p, Sse2p, Swc3p e Yvc1p.	40
CONCLUSÃO	47
PERSPECTIVAS	48
REFERÊNCIAS	49

INTRODUÇÃO

A *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo, também conhecido popularmente como levedura. Embora diversos estudos tenham sido realizados para a sua caracterização, foi o médico e botânico Franz Meyen em 1837 que descreveu e nomeou a levedura. Sua nomenclatura é proveniente da sua alta afinidade com o açúcar (*Saccharo-*), por se tratar de um fungo (*-myces*) e por ser amplamente utilizada para a produção de cervejas (*cerevisiae*) (FEYDER et al., 2015).

A levedura é também utilizada em processos industriais para produção de vários produtos de consumo humano, como a produção de pães, de bebidas alcoólicas assim como vinhos, cervejas e cachaça. A fermentação realizada pela *S. cerevisiae* também tem grande relevância na produção de biocombustíveis como o etanol. Adicionalmente, é bastante utilizada em processos biotecnológicos, para a fabricação de enzimas, proteínas recombinantes e compostos como ácido succínico láctico, málico e fumárico. Este fato deve-se ao fato de sua forma unicelular permitir que ela seja cultivada mais facilmente e que se realize escalonamento dos processos biotecnológicos de forma mais eficiente através de diferentes cepas (DOMINGUES et al., 2000; BORODINA; NIELSEN, 2014; RILEY et al., 2016; CASTANHEIRA et al., 2018).

Por se tratar de um organismo que apresenta uma organização intracelular bem elucidada, possuir um genoma relativamente curto (com cerca de 6000 genes descritos), predisposição a manipulação (dado que seu ciclo de geração é curto) e por possuir uma maquinaria celular similar à de eucariotos superiores, a *S. cerevisiae* é considerada um organismo modelo (GOFFEAU et al., 1996). Estas implicações possibilitaram que mecanismos celulares de outros organismos, como por exemplo o ciclo celular, replicação e reparo de DNA, transcrição e tradução de RNA, bem como a síntese de proteínas e a sinalização celular fossem descobertos e caracterizados (ENGELBERG; PERLMAN; LEVITZKI, 2014; CASTANHEIRA et al., 2018).

Quando se pensa nas vias de sinalização identificadas em *S. cerevisiae* sabe-se que estas são ortólogas a eucariotos superiores, e apresentam uma semelhança na função dos componentes envolvidos (ENGELBERG; PERLMAN; LEVITZKI, 2014). Porém, assim como algumas proteínas necessárias para o metabolismo das leveduras não estão presentes em metazoários, também ocorre o inverso quando trata-se dos componentes importantes para vias

de sinalização intracelular. Assim, as leveduras podem ser utilizadas como modelo para compreensão das vias de sinalização de eucariotos superiores (ENGELBERG; PERLMAN; LEVITZKI, 2014).

1.1 Via hipotética de estudo da ativação da enzima H^+ -ATPase

A H^+ -ATPase de membrana citoplasmática é uma proteína encontrada em grandes quantidades em membranas citoplasmáticas de plantas e fungos e é de grande importância para seus processos fisiológicos (SERRANO, 1988). Esta enzima é responsável por bombear prótons para o exterior das células, mantendo um gradiente eletroquímico que é necessário para promover vários processos celulares, dentre estes o acúmulo de nutrientes contra o gradiente de concentração e regulação do pH intracelular (GOFFEAU; SLAYMAN, 1981; KÜHLBRANDT, 2004).

Em *S. cerevisiae* o gene responsável por codificar a H^+ -ATPase de membrana citoplasmática é denominado de Plasma Membrane ATPase (*PMA1*), que foi caracterizado por MALPARTIDA; SERRANO, 1980. Segundo SERRANO, 1988, a alta expressão deste gene e a meia-vida da proteína sugere que os mecanismos de regulação da expressão do gene podem ocorrer em nível pós-traducional.

A regulação da enzima se dá por diversos estímulos ambientais, sendo a presença de glicose o mais importante dentre os estímulos. Esta regulação propiciada pela glicose pode se dar em dois níveis: o transcricional e o pós-traducional (BENITO; MORENO; LAGUNAS, 1991). No nível transcricional a presença de glicose no meio aumenta a síntese do mRNA do gene da H^+ -ATPase (*PMA1*). Em nível pós-traducional, a presença de glicose induz a ativação da enzima. Outros compostos, como etanol, que promovem um estresse químico na célula, também pode propiciar um aumento da atividade da enzima, porém, a glicose continua sendo a principal responsável pela ativação dessa enzima (PORTILLO, 2000).

Estudos com intuito de elucidar as vias para ativação pós-traducional da enzima H^+ -ATPase e aumentar a capacidade de fermentação das leveduras vêm sendo realizados. Ao longo dos anos, o presente grupo de pesquisa (Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM)/UFOP), vem desenvolvendo pesquisas e ajudado a elucidar esta via. Até o presente momento, o modelo mais bem visto é a ativação proveniente da fosforilação catalisada pelas proteínas quinases que devem possuir sítios alvos da fosforilação na cauda C-terminal da

enzima H^+ -ATPase de membrana citoplasmática (PORTILLO, 2000). Dentre as proteínas quinases responsáveis pela ativação da enzima apenas a Ptk2p foi caracterizada por hora, assim ainda se faz necessária a identificação dos demais elementos que compõem esse processo complexo (PEREIRA et al., 2015).

Pesquisas propõem uma relação entre a enzima H^+ -ATPase da membrana citoplasmática com a sinalização de cálcio intracelular (COCCETTI et al., 1998; TISI et al., 2002; TROPIA et al., 2006; PEREIRA et al., 2008; GROPPPI et al., 2011; BOUILLET et al., 2012). A *S. cerevisiae*, assim como os eucariotos, para controlar alguns processos celulares utilizam das vias de sinalização de cálcio (ANRAKU; OHYA; IIDA, 1991; GARRETT, 1997; DENIS; CYERT, 2002; PAIDHUNGAT; SERRANO et al., 2002). No citoplasma da *S. cerevisiae* as concentrações de Ca^{2+} livres são reguladas por diversos fatores tais como transportadores, canais, bombas e co-transportadores. Os íons de cálcio são geralmente armazenados em vacúolos os quais são regulados pela ação da Pmc1p e pela Vcx1p, estas proteínas possuem seu funcionamento controlado por estímulos ambientais (DUNN; GABLE; BEELER, 1994; MISETA et al., 1999; CUNNINGHAM, 2011; CYERT; PHILPOTT, 2013).

Ao que vem sendo estudado, a relação entre a sinalização de cálcio intracelular com a enzima H^+ -ATPase de membrana citoplasmática dá-se pela ocorrência da hidrólise glicose-induzida de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (Figura 1). Esta sinalização é mediada pela fosfolipase C, a qual é ativada pela proteína G (Gpa2p) após um estímulo ao consumo de glicose e fosforilação de açúcares quinases. A hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato pela fosfolipase C produz dois mensageiros intracelulares: o diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) (SHEARS, 2000; YORK et al., 1999). A Arg82p, uma quinase inositol responsável pela fosforilação de IP_3 , é encarregada da manutenção dos níveis de IP_3 intracelular, pois o converte em IP_4 e em IP_5 . Quando há uma deleção do gene que codifica a Arg82p em cepas de leveduras obtém-se um aumento significativo dos níveis de IP_3 glicose-induzido e da ativação da enzima H^+ -ATPase de membrana citoplasmática. Adicionalmente, a sinalização de cálcio é mais acentuada. Em complementaridade, BOUILLET et al., 2012 verificaram que ao utilizar 2-APB, um inibidor do receptor de IP_3 , houve uma redução da ativação da enzima e da sinalização de cálcio. Esses resultados evidenciam a existência de um receptor de IP_3 em *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, embora esse receptor já tenha sido descrito para outros eucariotos, ainda não foi em leveduras (TISI et al., 2004; TROPIA et al., 2006; BOUILLET et al., 2012).

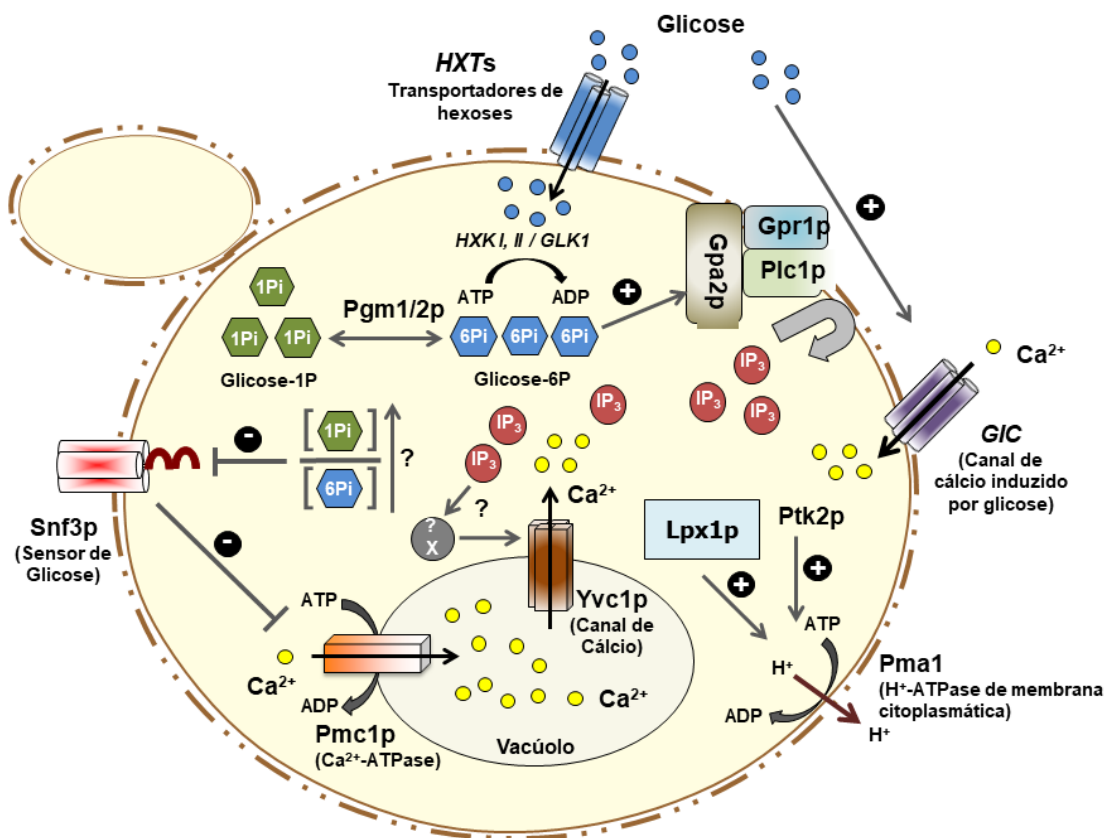
BOUILLET et al., 2012, demonstraram que pode haver uma relação entre o IP_3 com o canal vacuolar de Ca^{2+} (Yvc1p). Em seus resultados, eles sugerem que este canal, ao interagir diretamente ou indiretamente através de um receptor com IP_3 , pode estar envolvido na regulação da intensidade da sinalização e controle dos níveis do cálcio intracelular quando há uma adição de glicose no meio.

O canal de cálcio Yvc1p, quando há baixas concentrações de cálcio no citoplasma da célula, torna-se ainda mais importante para a sinalização de cálcio glicose-induzida e para a ativação da enzima H^+ -ATPase de membrana citoplasmática. Outro fator que se pressupõe é a relação da intensidade da sinalização de Ca^{2+} intracelular e a ativação da Yvc1p (BOUILLET et al., 2012) e o vínculo entre o IP_3 , a Yvc1p, a sinalização de cálcio e a ativação da enzima H^+ -ATPase de membrana citoplasmática em *S. cerevisiae* (TISI et al., 2004; TROPIA et al., 2006). A forma como o IP_3 e Yvc1p interagem ainda não foi bem esclarecida e, assim ainda há detalhes que precisam ser esclarecidos a respeito da via de transdução de sinal em *S. cerevisiae* (BOUILLET et al., 2012).

Ademais, a compreensão desta via tem impacto em diversos interesses humanos. Por exemplo, na indústria esta descoberta impactaria na modificação genética de cepas, podendo permitir uma maior eficiência nos processos fermentativos e, na saúde, implica no conhecimento de mecanismos fisiopatológicos de doenças relacionadas à bomba de H^+ -ATPase (BRANDÃO, 2014).

Todos esses fatores indicam uma necessidade de elucidar o papel desempenhado pelo IP_3 , como ele estaria envolvido com a sinalização de cálcio e na ativação da enzima H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, e qual seria o receptor molecular capaz de detectar a sua presença e permitir a modulação de níveis de cálcio.

Figura 1: Via hipotética de ativação da enzima H⁺-ATPase induzida por glicose em *Saccharomyces cerevisiae*



A via apresenta a transdução de sinal, que resulta na sinalização de cálcio intracelular. Esta transdução de sinal é instigada após a fosforilação da glicose presente no citoplasma, que estimula a proteína G (Gpa2p) induzindo a ativação da fosfolipase C. A fosfolipase C hidrolisa o Fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato em dois metabólitos: o Diacilglicerol (DAG) e o Inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃). O IP₃ interage de forma direta ou indireta, através de um receptor, com o canal de cálcio do vacúolo, a Yvc1p.

Fonte: BARBOSA, 2021.

1.2 Receptores de IP_3

Os estudos com receptores de IP₃ tiveram início em 1988 quando o primeiro receptor foi purificado e solubilizado pelo grupo Snyder, tendo como objetivo identificar os mecanismos do IP₃ na indução da sinalização de cálcio (TAYLOR; GENAZZANI; MORRIS, 1999). Atualmente, três tipos de receptores de IP₃ já foram descritos em diversos eucariotos. Estes tipos são denominados de Receptores de IP₃ do tipo 1 (ITPR1), Receptores de IP₃ do tipo 2 (ITPR2) e Receptores de IP₃ do tipo 3 (ITPR3). Destes, as formas mais comuns são o ITPR1 e ITPR3. Os receptores de IP₃ são comumente encontrados em diversos tipos celulares no envoltório nuclear, retículo nucleoplasmático, mas principalmente no Retículo Endoplasmático (RE) (PANTAZAKA; TAYLOR, 2011; LEMOS et al., 2019).

Esses receptores podem sofrer diversos níveis de regulação, principalmente regulação alostérica que são desencadeadas por fatores como ação de proteínas quinases, pH, ATP e cátions divalentes. A maior parte dessas regulações se dá pela sinalização de Ca^{2+} induzida por IP_3 , pois em baixas concentrações de cálcio intracelular esses receptores são ativados e quando há uma concentração alta de cálcio intracelular no citoplasma esses receptores são inibidos (IINO, 1990; BEZPROZVANNY; WATRAS; EHRLICH, 1991; TURNER; GOLDIN, 1991; BEZPROZVANNY, 2005; FINCH; FOSKETT et al., 2007; MIKOSHIBA, 2007; FEDORENKO et al., 2014).

Alguns estudos, demonstram que a ligação do IP_3 no seu respectivo receptor, condiciona a sinalização de cálcio intracelular. Os receptores de IP_3 em eucariotos são ativados pela ligação simultânea de IP_3 e Ca^{2+} . Quando essas duas moléculas interagem com o receptor provocam uma reação local de sinalização de cálcio, desencadeando a ativação de outros receptores de IP_3 e a abertura de canais de cálcio, acentuando a sinalização de cálcio intracelular (BERRIDGE, 2009; DECROCK et al., 2013).

Desta forma, a identificação de receptores de IP_3 em leveduras permitirá compreender os mecanismos da sinalização de cálcio intracelular na célula e como esta sinalização está interligada com a ativação da enzima H^+ -ATPase, elucidando então parte da via de estudo.

1.3 Busca pelos receptores de IP_3 em leveduras ao longo dos anos

Embora saiba-se que até o momento nenhum receptor de IP_3 já foi descrito para a *S. cerevisiae*, estudos já foram realizados na tentativa de encontrá-los. Em um estudo realizado por SANTANA, 2011, as análises *in silico* não identificaram similaridade entre as sequências de receptores de IP_3 descritas em eucariotos e as proteínas de *S. cerevisiae*.

SANTANA, 2011, buscou então por proteínas que apresentam interação com a proteína de canal de cálcio vacuolar, Yvc1p, já descrito como uma possível relação com receptor de IP_3 em *S. cerevisiae*. Após identificar essas proteínas, análises bioquímicas foram realizadas para tentar identificar se em cepas com deleção destas proteínas a ativação da enzima H^+ -ATPase e sinalização de Ca^{2+} foi aumentada. Além disso foi realizado um experimento com gel de perolas de agarose com IP_3 para verificar a afinidade dessas proteínas com a molécula de IP_3 .

A partir da comparação do resultado entre as técnicas utilizadas no estudo, SANTANA, 2011, identificou que o tamanho molecular do receptor de IP_3 deve apresentar um peso

molecular entre 66 e 97 kDa. Dentre as proteínas estudadas pelo autor, apenas 4 apresentaram peso molecular entre o valor demonstrado, essas proteínas foram: Alg6p, Yvc1p, Sse2p e Swc3p. E

Entretanto, até o momento não houve estudos que comprovaram se essas proteínas são algum tipo de receptor de IP_3 em leveduras. Além disso, nenhum outro estudo mostrou outras proteínas que podem ser candidatas a serem o receptor de IP_3 em *S. cerevisiae*. Devido a estes fatos, ainda é necessário continuar a busca pelos receptores em leveduras, bem como dar continuidade ao estudo de SANTANA, 2011 e verificar se as proteínas indicadas apresentam alguma similaridade com as regiões conservadas em receptores de IP_3 de outros eucariotos.

OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Identificar receptores de IP_3 presentes no genoma de *Saccharomyces cerevisiae* e elucidar o papel desempenhado pelo IP_3 na ativação da H^+ -ATPase da membrana citoplasmática e sua relação com a sinalização de cálcio.

2.2 Objetivos específicos

- Buscar por similaridade entre as sequências de receptores de IP_3 conhecidos e o genoma e proteoma de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Identificar a presença de regiões conservadas entre os receptores de IP_3 descritos na literatura;
- Identificar proteínas candidatas a serem receptores de IP_3 em *Saccharomyces cerevisiae* e se elas apresentam o fenótipo de interesse;
- Verificar se as proteínas já descritas na literatura como possíveis receptores de IP_3 em leveduras apresentam similaridades com os motivos conservados identificados no presente trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Construção do banco de dados de receptores de IP₃

Para a construção do banco de dados contendo as sequências de receptores de IP₃ já descritas na literatura foi utilizado o banco de dados GenBank® da plataforma NCBI (BENSON et al., 2004). As sequências gênicas e proteicas foram selecionadas utilizando os seguintes termos de busca: **Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 + Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 + Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3**.

Todas as sequências obtidas foram baixadas no formato fasta e armazenadas. Para retirar a redundância entre as sequências foi utilizada a plataforma CD-HIT (HUANG et al., 2010), eliminando as sequências que apresentavam porcentagem de identidade de 100% com outra sequência do banco de dados.

3.2 – Identificação dos receptores de IP₃ de *Saccharomyces cerevisiae*

Inicialmente, com o intuito de identificar os receptores de IP₃ presentes em *S. cerevisiae*, foi realizado uma busca por similaridade entre os receptores de IP₃ já descritos em outros organismos e o genoma de *S. cerevisiae*, utilizando a ferramenta de alinhamento par-a-par BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990), instalada no servidor da Fiocruz Minas. O banco de dados que continha o genoma da *S. cerevisiae* cepa S288C (R64-2-1) foi formatado utilizando o parâmetro **formatdb -i S288C.fasta -p F -o T**. Para a formatação tem-se a inserção do banco de dados que se quer ser formatado (-i + Nome do arquivo), o tipo do arquivo (-p) seguido do tipo da sequência (F para nucleotídeo e T para proteína) e as opções de análise (-o) para a sequência (T para análise de SeqID e F para não analisar SeqID).

Para realizar a comparação contra a referência foi utilizado o banco de dados construído no presente trabalho. A linha de comando utilizada foi:

```
blastn -query sequencias_receptoresIP3.fasta -db S288C.fasta -out  
blastn_sequenciasIP3XS288C.out -outfmt '6 qseqid qlen sseqid stitle slen qstart qend  
sstart send evalue qcovs length pident nident' -max_target_seqs 3 -num_threads 10
```

Os parâmetros utilizados retornaram à similaridade entre o genoma da *S. cerevisiae* com as sequências de receptores de IP₃ de eucariotos em um formato tabular (-outfmt '6') com a identificação do arquivo de entrada (*query*) (qseqid), o tamanho da *query* (qlen), a identificação da sequência do banco de dados (*subject*) (sseqid), o título da *subject* (stitle), o tamanho da

subject (slen), o início e o fim de onde ocorreu o alinhamento na *query* (qstart e qend), o início e o fim de onde ocorreu o alinhamento na *subject* (sstart e send), o valor de E (evalue), porcentagem de cobertura do alinhamento na *query* (qcovs), o tamanho do alinhamento (length), a porcentagem de correspondências idênticas (pident), o número de correspondências idênticas (nident'), o retorno de no máximo 3 resultados por query (max_target_seqs 3) e o número de processadores utilizados (-num_threads 10).

A fim de verificar se as sequências de receptores de IP₃ encontradas nos metazoários apresentavam similaridades entre si, foi realizado alinhamento múltiplo a nível de proteína utilizando o algoritmo Muscle (EDGAR, 2004) implementado na ferramenta MEGA versão X (KUMAR et al., 2018). Foram realizados um alinhamento para cada tipo de receptor de IP₃, totalizando 3 alinhamentos múltiplos.

3.3 – Identificação de proteínas similares a receptores de IP₃ em fungos

A etapa de construção do banco de dados de receptores de IP₃, descrita no subtítulo 3.1, permitiu identificar sequências de receptores de algumas espécies de fungos. Com o propósito de verificar a ocorrência de similaridade entre essas sequências e alguma outra proteína descrita em fungos, mas que não foi nomeada como receptor de IP₃, foi realizado um alinhamento par-a-par local de cada sequência destes receptores contra todo o banco de dados de proteínas do GenBank. Isso foi realizado utilizando a ferramenta BLASTp Online (MADDEN; TATUSOV; ZHANG, 1996). Foram selecionadas e baixadas para um arquivo fasta todas as sequências de proteínas que apresentaram uma cobertura de alinhamento em relação à *query* acima ou igual a 80% e identidade acima ou igual a 30% (ROST, 1999). Posteriormente, foi realizado um alinhamento múltiplo entre estas sequências utilizando o algoritmo Muscle, implementado na ferramenta MEGA, para identificar as regiões conservadas entre estas sequências.

3.4 – Detecção dos motivos conservados de sequências submetidas ao alinhamento múltiplo

Os motivos conservados encontrados nas sequências submetidas ao alinhamento múltiplo dos três tipos de receptores de IP₃ e entre as sequências de proteínas similares aos receptores de IP₃ de alguns fungos foram identificados utilizando-se a ferramenta Pattcon, a qual está sendo desenvolvida pelo grupo de pesquisa. Foram selecionados os motivos que apresentaram conservação maior ou igual a 60% entre as sequências.

3.5 – Busca por similaridades entre o proteoma de *S. cerevisiae* e os motivos conservados

Afim de verificar se alguma proteína de *Saccharomyces cerevisiae* apresentava similaridade com algum dos motivos conservados de receptores de IP₃ identificados no presente trabalho, foi realizado alinhamento par-a-par, utilizando a ferramenta local BLASTp, entre o proteoma da levedura e os arquivos dos motivos encontrados. Todas as sequências de proteínas que apresentaram cobertura de alinhamento acima ou igual a 80% e identidade acima ou igual a 30% foram selecionadas. Por fim, as proteínas indicadas, tiveram suas descrições e funções analisadas, utilizando a plataforma *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (CHERRY et al., 2012) e foram selecionadas as proteínas classificadas como funcionais por esse banco de dados.

Com o intuito de verificar se alguma das proteínas identificadas, se relacionava com o fenótipo de interesse e poderia ser o receptor de IP₃ em *S. cerevisiae*, foi realizada uma análise de interação utilizando a ferramenta STRING (SNEL et al., 2000). Primeiramente, foi verificado se a proteína candidata interagia com as proteínas Arg82p, Yvc1p, Lpx1p, Snf3p, Pmc1p, Plc1p, Ptk2p, Pma1p, que são proteínas já descritas como envolvidas na via de ativação da H⁺-ATPase de membrana citoplasmática. Posteriormente, foi verificado se já havia sido descrita alguma interação para a proteína candidata.

3.6 – Ancoragem molecular da molécula de IP₃ nas proteínas candidatas

Para verificar a existência de interação direta entre a proteína candidata e a molécula de IP₃ foi realizada análise de *Docking* Molecular. A estrutura tridimensional da proteína candidata foi baixada do Protein Data Bank (PDB) (BERNSTEIN et al., 1977) e a estrutura tridimensional da molécula de IP₃ foi baixada do Yeast Metabolome Database (YMDB) (RAMIREZ-GAONA et al., 2017).

A fim de garantir o melhor resultado de ancoragem foram utilizadas duas ferramentas: 1) a ferramenta online DockThor (MAGALHÃES et al., 2014), com o dimensionamento da caixa de interação nos tamanhos 40x40x40 Å e centrada em 0,2415, -2,1965 e 0.2315 (Direções de X, Y e Z); 2) e a ferramenta AutoDockTools 1.5.6 (MORRIS et al., 2009; TROTT; OLSON, 2010), utilizando duas caixas de interações. A primeira caixa de interação utilizada apresentava os tamanhos 74x62x48 Å e centrada em 12,976, -1,417 e -8,770 (Direções de X, Y e Z). A segunda caixa interação apresentava os tamanhos 70x62x66 Å e centrada em -11,514, -1,417 e 5,264 (Direções de X, Y e Z).

Para termos estruturas com boa resolução foram aceitos apenas os modelos que apresentaram valores de Root Mean Square Deviation (RMSD) abaixo de 2 Å para as duas ferramentas. A visualização da ancoragem dos modelos selecionados foi realizada utilizando a ferramenta Pymol (DELANO, 2002).

3.7 - Busca por similaridade entre as proteínas Alg6p, Yvc1p, Sse2p e Swc3p e os motivos conservados.

Para verificar se as proteínas presentes na *S. cerevisiae*, alg6p (Cadeia A, B, C), Yvc1p, Sse2p e Swc3p, apontadas na literatura como candidatas a receptores de IP₃, apresentavam similaridade com os motivos conservados de receptores de IP₃ identificados no presente estudo, foi realizado alinhamento par-a-par, utilizando a ferramenta BLASTp, entre as sequências destas proteínas e os arquivos dos motivos identificados. Todos os motivos conservados que apresentaram uma cobertura de alinhamento acima ou igual a 80% e com identidade acima ou igual a 30% com as proteínas foram selecionados. As sequências das proteínas estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência das proteínas apontadas pela literatura como candidatas a receptores de IP₃ em *S. cerevisiae*

Proteína	Sequência
Alg6p chain A	GPGGSTGRLAGAGGEFVDMAIGKRLLVNKPAAESFYASPMYDFLYPFRPVGNQWLPEYIIFVCAVILRCTIGLGPYSGKGSPLYGDFEAQRHWMETQHLPLSK WYWYDLQYWGLDYPPLTAFHSYLLGLIGSFFNPSWFALEKSRGFESPDNGLKTYMRSTVIISDILFYFPAVIYFTKWLGRYRNQSPIGQSIAASAILFQPSLMLIDH GHFQYNSVMLGLTAYAINNLLDEYYAMAAVCFVLSICFKQMALYYAPIFFAYLLSRSLFPKFNIARLTIVIAFATLATFAIIFAPLYFLGGGLKNIHQCIHRIFPFAR GIFEDKVANFWCVTNVVFVKYKERFTIQQQLYSLIATVIGFLPAMIMTLLHPKKHLLPYVLIACSMSSFFLFSFQVHEKTILIPLLPITLLYSSTDWNVLSLVSWINNV ALFTLWPLLKKDGLHLQYAVSFLSNWLIGNFSFITPRFLPKSLTPGPSISSINSYDRRRSLPYNVVWKSFIIGTYIAMGFYHFLDQFVAPPSKYPDWVLLNCAV GFICFSIFWLWSYYKIFTSKSKSMKDL
Alg6p chain B	EISEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNVYSSSIHWVRQAPGKGLEWVASISSYSGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYW SWYSYSYGIDYWQGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
Alg6p chain C	SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYWVGYPITFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDSQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
Sse2p	MSTPFGLDLGNNSVLAVARNRGIDVVVNEVSNRSTPSLVGFGPRNRYLGESGKTKQTSNVKNTVENLKRIIGLKFKDPEFDIENKFFTSLVQLKNGKVGVEVE FGGKTHVFSATQLTAMFIDKVKHTVQEETKSSITDVLAVPVWYSEEQRYNIADAARIAGLNPVRIVNDVTAADVSYGVFKNDLPGPEEKPRIIGLVDIGHSTYT CSIMAFRKGMKVLGTAYDKHFGRDFDRAITEHFADQFKDKYKIDIRKNPKAYNRILIAAEKLLKVLANTTAPFSVESVMDDIDVSSQLSREELEELVEPLLK RVTPITNALAQAKLTVNDIDFVEIIGGTTRIPVLKKSISDVFGKPLSSTLNQDEAVAKGAAFICAIHSPTLRVRPFKFEDIDPYSVSYTWQDQVDEDRLEVFPANS SYPSTKLITLHRTGDFSMKAVYTHPSKLPKGTSTTIKWSFTGVKVPKDQDFIPVKVKLRCDPSGLHIIENAYTTEDITVQEPVPLPEDAPEDAEPQFKEVTKTIKK DVLGMTAKTFALNPVELNDLIEKENELRNQDKLVAETEDRKNAL EYIYTLRAKLDDEYSDFASDAEKEKLNMLATTENWLYGDGDDSTKAKYIAKYEELAS LGNIIRGRYLAKEEEKRQALRANQETSKMNDIAEKLAEQRRARAASDDSDNNNDENMDLD
Swc3p	MPAVLRTRSKESSIEQKPARTRTRSRRGKRGRDDDDDDDEESDDAYDEVGNDYDEYASRAKLATNRPFEIVAGLPASVELPNYNSSLTHPQSIKNSGVLYDSL VSSRRTWVQGEMFELYWRRPKKIVSESTPAATESPTSGTIPLIRDKMQKMCDCVMSGGPHTFKVRLFILKNDKIEQKWQDEQELKKKEKELKRKNDAAEAKRLR MEERKRQQMQKKIAKEQLQLQKENKAKQKLEQALKLKRKEEMKKLKEQNKNKQSPSSSMHDPRMIMNLLMAQEDPKLNTLMTVAKGLANNSQLEE FKKFIEIAKKRSLEENPVNKRPSVTTTRPAPPKAKDVAEDHRLNSITLVKSSKTAATEPEPKKADDENAEKQQSKEAKTTAESTQVDVKKEEDVKEKGVKSED TQKKEDNQVVPKRKRKRNAIKEDKDMQLTAFQQKYVQGAIEILEYLEFTHSRYLPKKSVEFLEDTEIIISWIVIHNSKEIEKFKTKKIKAKLKADQKLNKEDA KPGSDVEKEVSFNPLFEADCPTPLYTPMTMKLSGIHKRFNQIIRNSVSPMEEVVKEMEKLQIGTRLSGYNLWYQLDGYDDEALSESRLFELNEWEHAMRSRRHK R
Yvc1p	MVSANGDLHLPISNEQCMPENNGLSGFEAPTQRILRVTLNLKYLIDKVVPIVYDPNDIVCDHSEILSPKVVKLAYEACGGNPKDKANKRKYQSVIIFSLKVCW YSILATMEVHNAKLYETRNLASQQLCKLLIEREETRDQLFLMQLLRRYVINENDEDDQELPNALELATDMHCTTVIGSSGFQRCLKWIWRGWIVQNGLDPTTFI KDDSLAEVSLISHFNPVRLKAPVYQNYLQMIFSFLFLGLYTLVVNGKDSERVQSFDDLSEIFYVFNTGFILDELTKLYYIGYAHLSFWNLFNDDTTYLIITFAMGFRA MSVTPLNAKYSSDWDKISYRVLSCAAPFVWSRLLLYLESQRFIGIMLVILKHMMEKESIVFFLLFLIMIGFTQGFLGLDSADGKRITGPILGNLTITVLGLGSFDV FEFAPPYAAILYYGYFIVSVILLNIALYSTAYQKVIDNADDEYMALMSQKTLRYIRAPDEDVYVSPLNLIEVFMTPIFRILPPKRAKDLSTVMTIVYSPFLLLI SVKETREARRIKYNRMKRLNDDANEYDTPWDLTDGYLDDDDGLFSDNRNSGMRATQLKNSRSLKLQRTAEQEDVHFKVPKKWYKNVKKCSPSFEQYDNDT EDDAGEDKDEVKELTKKVENLTAVITDLLEKLDIKDKKE

Fonte: Elaborado pelo autor

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Composição do banco de dados de sequências de receptores de IP₃ descritas na literatura

Foram encontradas, no total, 729 sequências de receptores de IP₃ descritas na literatura, das quais:

- 184 sequências eram pertencentes ao receptor de tipo 1 – destas, duas sequências são pertencentes ao Reino *Fungi* (*Rhizoctonia solani* e *Talaromyces marneffei*), uma ao Reino *Plantae* (*Tetrabaena socialis*), e as demais sequências pertencentes ao Reino *Animalia*.
- 264 sequências eram pertencentes ao receptor de tipo 2 – destas, uma sequência pertencia ao Reino *Plantae* (*Tetrabaena socialis*), e as demais sequências pertenciam ao Reino *Animalia*.
- 281 sequências eram pertencentes ao receptor de tipo 3 – destas, uma sequência pertencia ao Reino *Fungi* (*Choanephora cucurbitarum*), duas ao Reino *Plantae* (*Gossypium australe* e *Gossypium arboreum*), e as demais sequências pertencentes ao Reino *Animalia*.

4.2 - Similaridade entre as sequências de receptores de IP₃ descritas em eucariotos e genoma e proteoma de *S. cerevisiae*

Não foi identificada similaridade entre o genoma completo da *S. cerevisiae* e as sequências de receptores de IP₃ utilizando-se a ferramenta BLASTn. Este resultado corrobora o que já havia sido demonstrado em revisão por WERA et al., 2001, de que não há no genoma da levedura nenhum receptor de IP₃ cuja sequência seja idêntica a aquelas identificadas em outras espécies de eucariotos.

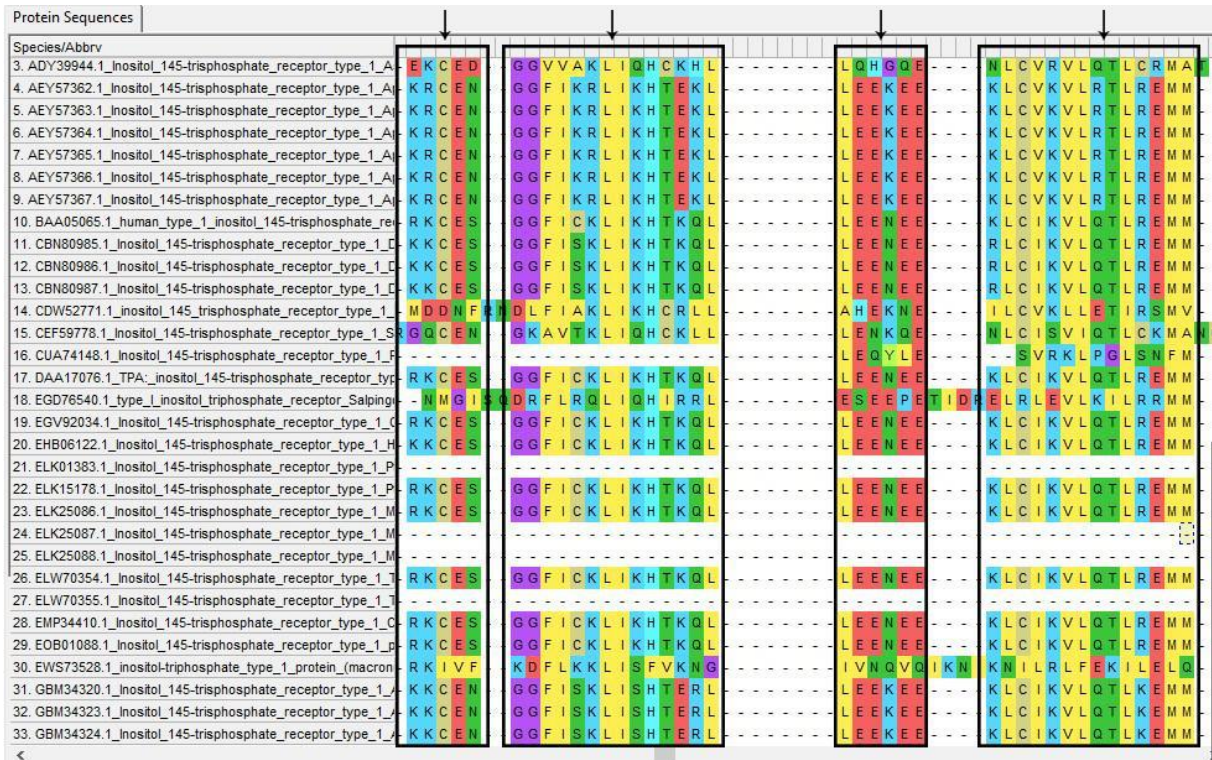
Entretanto, a porcentagem de similaridade entre as sequências proteicas de diferentes espécies pode ser muito baixa. E nesses casos, torna-se interessante, procurar por pequenas regiões de conservação entre essas sequências (LODISH, 2012). Essas regiões conservadas são denominadas de motivos conservados. Estes, por estarem envolvidos com a função e estrutura terciária de proteínas, são conservados evolutivamente. Desta maneira a comparação das sequências entre si, utilizando técnicas de alinhamento múltiplo, pode nos permitir identificar esses motivos conservados (KAYA, 2009; GARBELINI, 2017) e, conseqüentemente, identificar os receptores.

Desta forma, com intuito de identificar esses motivos conservados nas sequências dos três tipos de receptores de IP_3 já descritos na literatura, foi realizado um alinhamento múltiplo entre essas sequências.

Nas figuras 2, 3 e 4 é possível observar a existência de perfis conservados ao longo das sequências de todos os tipos de receptores, evidenciando um perfil comum para cada um dos três tipos de receptores que pode ter sido preservado também em leveduras.

Também foi possível observar que algumas porções das sequências de receptores de IP_3 descritas em fungos diferem das sequências descritas para eucariotos (Figura 5 e Figura 6). Esses resultados, corroboram com os achados de MENGPIPING et al., 2006 que relataram que 76% dos genes essenciais de leveduras não são similares aos genes de humanos. E, adicionalmente, evidenciam a necessidade de se buscar por similaridade exclusivamente entre as sequências de fungos. Assim, no presente trabalho também foi feita uma busca por regiões conservadas em proteínas de outras espécies de fungos, depositadas nos bancos de dados, que não foram anotadas como receptores de IP_3 ou que se tratavam de proteínas com função desconhecida. Para isso, foram identificadas proteínas similares a receptores de IP_3 em espécies de fungos.

Figura 2: Alinhamento múltiplo entre as sequências do receptor de IP₃ tipo 1 descritas na literatura.

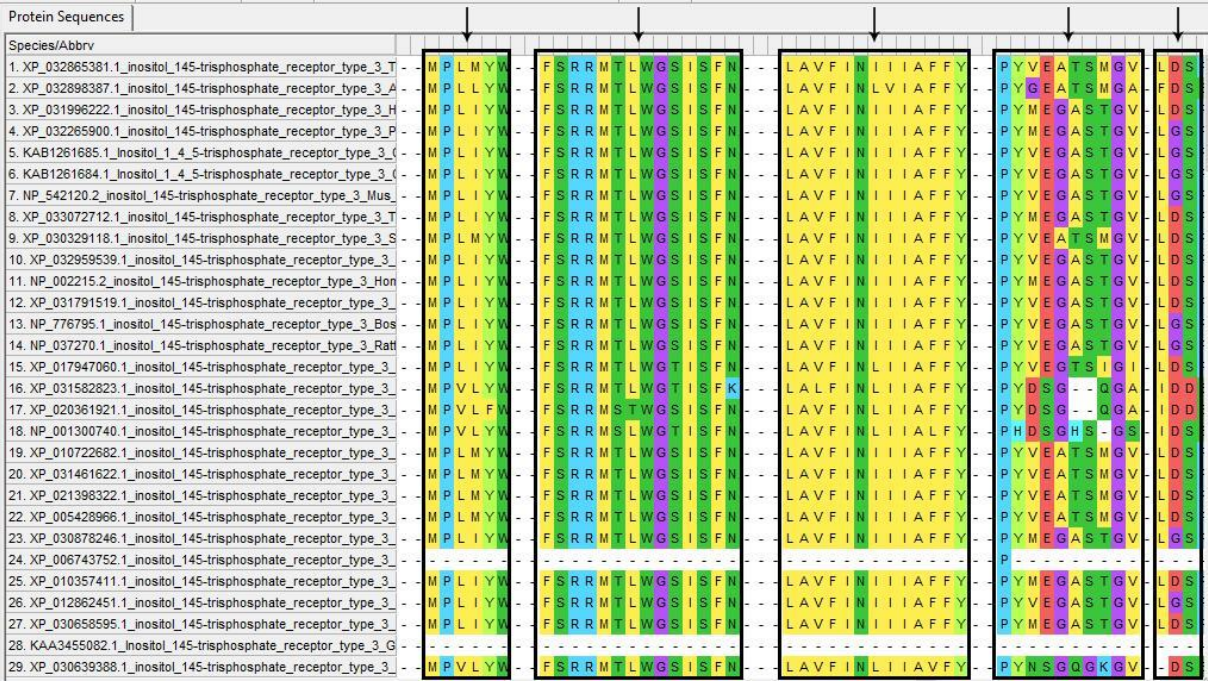


O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o algoritmo Muscle, implementado no MEGA versão X. É possível observar regiões conservadas entre os receptores de IP₃ tipo 1. Estas regiões são demonstradas pelas demarcações (retângulos pretos). Ao todo, nesta imagem, foram exemplificadas 4 (quatro) regiões conservadas.

Fonte: Elaborado pelo autor

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4: Alinhamento múltiplo entre as sequências do receptor de IP₃ tipo 3 descritas na literatura



O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o algoritmo Muscle, implementado no MEGA versão X. É possível observar regiões conservadas entre os receptores de IP₃ tipo 3. Estas regiões são demonstradas pelas demarcações (retângulos pretos). Ao todo, nesta imagem, foram exemplificadas 5 (cinco) regiões conservadas.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5: Alinhamento múltiplo entre as sequências do receptor de IP₃ tipo 1 descritas na literatura com ênfase na observação das sequências de fungos

[illegible]

O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o algoritmo Muscle, implementado no MEGA versão X. É possível observar que algumas das regiões em que as sequências de receptores de IP₃ descritas em fungos diferem consideravelmente das encontradas nos demais eucariotos. Essas sequências são demonstradas pelo retângulo vermelho.

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3 - Similaridade entre proteínas similares a receptores de IP₃ em fungos e o proteoma de *S. cerevisiae*

Fazendo o uso da plataforma BLASTp online, foi realizado um alinhamento par-a-par das sequências de receptores de IP₃ descritas em fungos contra todo o banco de dados de proteínas do GenBank do NCBI. Conforme mencionado anteriormente, esta etapa foi realizada para identificar proteínas descritas em outras espécies de fungos que são similares a receptores de IP₃ em fungos, mas que foram depositadas como proteína de função desconhecida ou cujo nome não especificava se tratar de receptores de IP₃. Foram, então, recuperadas 63 sequências de proteínas de espécies de fungos que apresentaram uma cobertura de alinhamento igual ou superior a 80% e identidade igual ou superior a 30% com as sequências descritas como receptores de IP₃ de fungos, das quais:

- 31 sequências são similares à sequência de receptor de IP₃ descrita para a espécie *Talaromyces marneffei*.
- 5 sequências são similares à sequência de receptor de IP₃ descrita para a espécie *Rhizoctonia solani*.
- 12 sequências são similares à sequência de receptor de IP₃ descrita para a espécie *Choanephora cucurbitarum*.
- 15 sequências são similares à sequência de receptor de IP₃ descrita para a espécie *Phycomyces blakesleeanus*.

Com o intuito de identificar regiões conservadas entre essas sequências foi realizado um alinhamento múltiplo utilizando o algoritmo Muscle.

Nas figuras 7, 8, 9 e 10 é possível observar a existência de perfis conservados ao longo das sequências de proteínas similares a receptores de IP₃ de fungos.

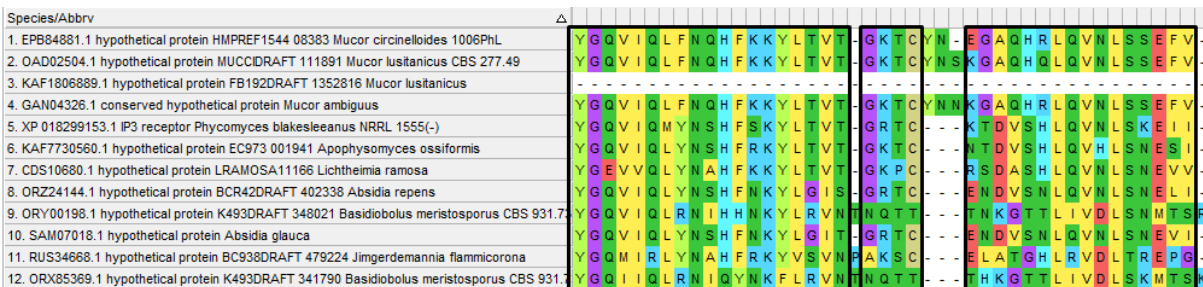
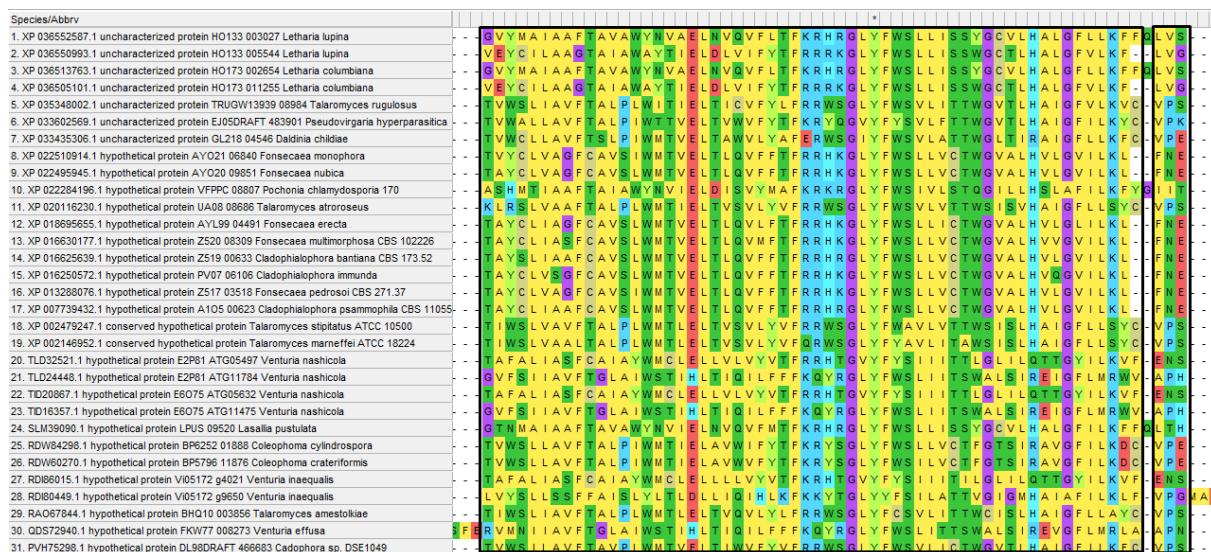


Figura 10: Alinhamento múltiplo das sequências similares à sequência de receptor de IP₃ *Talaromyces marneffei*



O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o algoritmo Muscle, implementado no MEGA versão X. É possível observar que algumas das regiões que se mantiveram conservadas em proteínas similares ao receptor de IP₃ encontrado na espécie de fungo *T. marneffei*, estas regiões são demonstradas pelas demarcações (retângulos pretos). Ao todo, nesta imagem, foram exemplificadas 32 (duas) regiões conservadas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esta etapa indica que essas proteínas são similares a receptores de IP₃, mas anteriormente não haviam sido selecionadas pela forma com que foram descritas. E estas proteínas apresentam regiões conservadas com os receptores de IP₃ em fungos. Estes resultados evidenciando a importância de se realizar a busca a nível de sequências de forma complementar à busca pelos identificadores.

Como o intuito do presente trabalho era identificar proteínas de levedura que apresentam similaridades com regiões conservadas em receptores de IP₃ em eucarioto, foi necessário selecionar quais foram os motivos conservados nos alinhamentos múltiplos e buscar por similaridades entre esses motivos e as proteínas expressas pela levedura.

4.4 - Similaridades entre os motivos conservados e o proteoma de *Saccharomyces cerevisiae*

Para recuperar os motivos conservados, identificados a partir dos alinhamentos múltiplos, tanto entre as sequências dos três tipos de receptores de IP₃ descritas na literatura quanto entre as proteínas similares a receptores de IP₃ em fungos, foi utilizada uma ferramenta desenvolvida pelo grupo de pesquisa, denominada Pattcon:

Foram identificados 799 motivos, dos quais:

- 205 motivos são oriundos do alinhamento de receptores de IP₃ do tipo I descritos em eucariotos;
- 97 motivos são oriundos do alinhamento de receptores de IP₃ do tipo II descritos em eucariotos;
- 284 motivos são oriundos do alinhamento de receptores de IP₃ do tipo III descritos em eucariotos;
- 25 motivos são oriundos do alinhamento de proteínas similares a receptores de IP₃ em *T. marneffe*;
- 118 motivos são oriundos do alinhamento de receptores de IP₃ em *P. blakeslee*;
- 70 motivos são oriundos do alinhamento de receptores de IP₃ em *C. cucurbitarum*.

Não foi identificado nenhum motivo conservado a partir do alinhamento múltiplo realizado entre as proteínas similares a receptores de IP₃ em *R. solani*.

Para verificar a similaridade entre os motivos conservados e o proteoma da levedura, foi realizado um BLASTp. Como demonstrado na Tabela 2 foram encontradas similaridades entre os motivos e 5 proteínas de *S. cerevisiae*, sendo elas YNL103W-A, YER053C-A, YKL162C-A, YBR141W-A e YDL240C-A. A proteína YKL162C-A apresentou similaridade com dois motivos de diferentes alinhamentos, sendo um do alinhamento de *C. cucurbitarum* e o outro de alinhamento de *P. blakesleeana* (Tabela 2).

Dentre as proteínas com similaridade a algum dos motivos identificados, apenas a proteína YER053C-A foi apontada como candidata a ser um receptor de IP₃. De acordo com o descrito no SGD, de todas as 5 proteínas identificadas nesta etapa, a YER053C-A é a única descrita como possível de caracterizar uma proteína funcional. Além disso a YER053C-A apresentou similaridade com um motivo conservado do alinhamento múltiplo de proteínas similares a receptores de IP₃ *C. cucurbitarum*, reforçando a nossa hipótese de que as regiões conservadas em espécies de fungos são mais similares entre si do que com os demais eucariotos.

Além disso, como este trabalho está em busca de um receptor de IP₃ para a *S. cerevisiae* seria necessário que a proteína fosse descrita como funcional já que a presença do receptor está relacionada à modulação de processos na via de ativação da enzima H⁺-ATPase. A YER053C-A é descrita na plataforma como uma proteína de função desconhecida que apresenta fluorescência verde, foi localizada no retículo endoplasmático e tem um aumento da sua expressão em resposta ao estresse de replicação do DNA (HUH et al., 2003; RAMIREZ-CÓRDOVA et al., 2012; TKACH et al., 2012).

Para verificar se já havia sido descrita interação da YER053C-A com outras proteínas envolvidas na via de ativação da H⁺-ATPase foi necessário realizar um interatoma. Como é possível observar na Figura 11 a YER053C-A não apresentou nenhuma interação com as proteínas já identificadas como atuantes na via de ativação da H⁺-ATPase.

Porém, quando foi verificado se já havia sido descrita alguma interação para a proteína candidata foi observado que a YER053C-A interage com proteínas responsáveis pela resposta ao etanol em leveduras (Figura 12). RAMIREZ-CÓRDOVA et al., 2012 relataram que, estes genes estão relacionados a tolerância ao álcool em processos fermentativos, e que o papel da YER053C-A nesse processo ainda não foi elucidado. Além disso, estudos demonstram que a IP₃ na célula aumenta a sinalização de cálcio intracelular e a ativação da enzima H⁺-ATPase em um meio com a adição de glicose (COCCETTI et al., 1998; TROPIA et al., 2006). Relatam, também, que tanto a sinalização de cálcio quanto a ativação da enzima têm papéis fundamentais

nos processos fermentativos da levedura, embora esta relação ainda não esteja bem elucidada (LI et al., 2010; BOUILLET et al., 2012). Diante disto, a YER053C-A pode ser uma candidata ao receptor de IP₃ em leveduras.

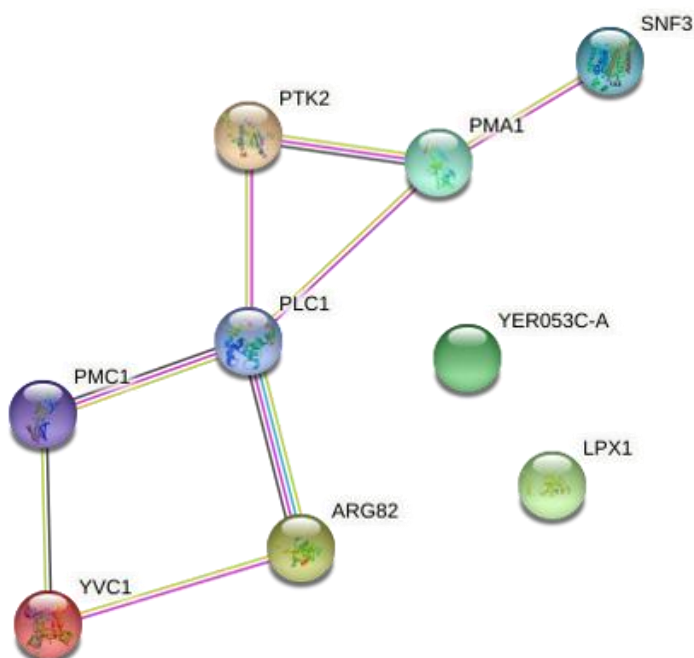
Para verificar se essa proteína interage diretamente com a molécula de IP₃ foi realizada uma análise de ancoragem proteína-ligante a partir de *Docking* molecular.

Tabela 2: Similaridades entre motivos conservados e proteínas de *S. cerevisiae*

Alinhamento de referência	Motivo conservado	Proteína	Sequência proteína	Cobertura de alinhamento	Identidade
Proteínas similares a receptores de IP ₃ de <i>C. cucurbitarum</i>	IELIIQVLDTITELAQGCLQNQVTIFNNKIINPVNTI LREAYSSCDHQLVNELKSKVVTCLLSLLEGGIEN SETIYKEMIESLDLATVKSNDMAIYNENLASLNS KNVYEKLECGFLYAILVMTLAPAIKDQEQS	YNL103W-A	MLSksnntLfnhdcslsfc KEKVYSKLLV	80%	36%
Proteínas similares a receptores de IP ₃ de <i>C. cucurbitarum</i>	EFFQSLKRWIFRFLDIRHHEFIENSDDIQLSSVLQ LVHTQLRLGFFQKTRDVSILFRALVHVLGDGRD ARNEEHY	YER053C-A	MQDLEIFLSIFAFIFVFYFGA HRTVMNRNKSdVPYLQ	84%	31,25%
Proteínas similares a receptores de IP ₃ de <i>C. cucurbitarum</i>	VNKRVEYYQVATIKLLEEVSrKYIRQRSETDPNA NPSRYEALEKKKVKAQNALNDLGCTLVAQNLL SSPRRRIFDAALKLLISLLDGGNKNVQDKLEEYF YSIREERFFYSFHQLQSGINSSKDAQIYLTRRM YKMNRRQHMLDN	YKL162C-A	MTLHHKLVLsMLLGLSITPE GDLPLSGQDIFYQYSFSSFY NIHDERIREQ	80%	34,15%
Proteínas similares a receptores de IP ₃ de <i>P. blakesleeanus</i>	YQVATIKLLEEVSrKYIRQRSETDPNANPSRYEA LEKKKVKAQNALNDLGCTLVAQNLLSSPRRRIF DAALKLLISLLDGGNKNVQDKLEEYFYSIREERF FYSFHQLQSGINSSKDAQIYLTRRM YKMNRRQ HMLDNVLQQ	YKL162C-A	MTLHHKLVLsMLLGLSITPE GDLPLSGQDIFYQYSFSSFY NIHDERIREQ	80%	34,15%
Receptores de IP ₃ tipo II em eucariotos	AGPEAGNAEDRSTEEVTMSPAIaimQPISRFLQLL CENHNRELQHFLRNQNNKTNYNLVCETLQFLDC ICGSTTGGLGLGLYINEKNVVLVNQTLESLEY CQGPCHENQTCIATHEsNGIDIIIALILNDINPLGK YRMDLVLQLKNNAPKLLLAIMESRHDSENAERI LFNMRPRELVDVMKNAYNQGLECDH	YBR141W-A	MSPIEPRRFCNSVLSQYLEC VTQACGRTIKM	88%	46,15%
Receptores de IP ₃ tipo II em eucariotos	VNKRVEYYQVATIKLLEEVSrKYIRQRSETDPNA NPSRYEALEKKKVKAQNALNDLGCTLVAQNLL SSPRRRIFDAALKLLISLLDGGNKNVQDKLEEYF YSIREERFFYSFHQLQSGINSSKDAQIYLTRRM YKMNRRQHML	YDL240C-A	MTFQILFLVFHFVYIFRAH QYPAYFEDEKDTYIKIRIYS PRsis	87%	35%

Fonte: Elaborado pelo autor

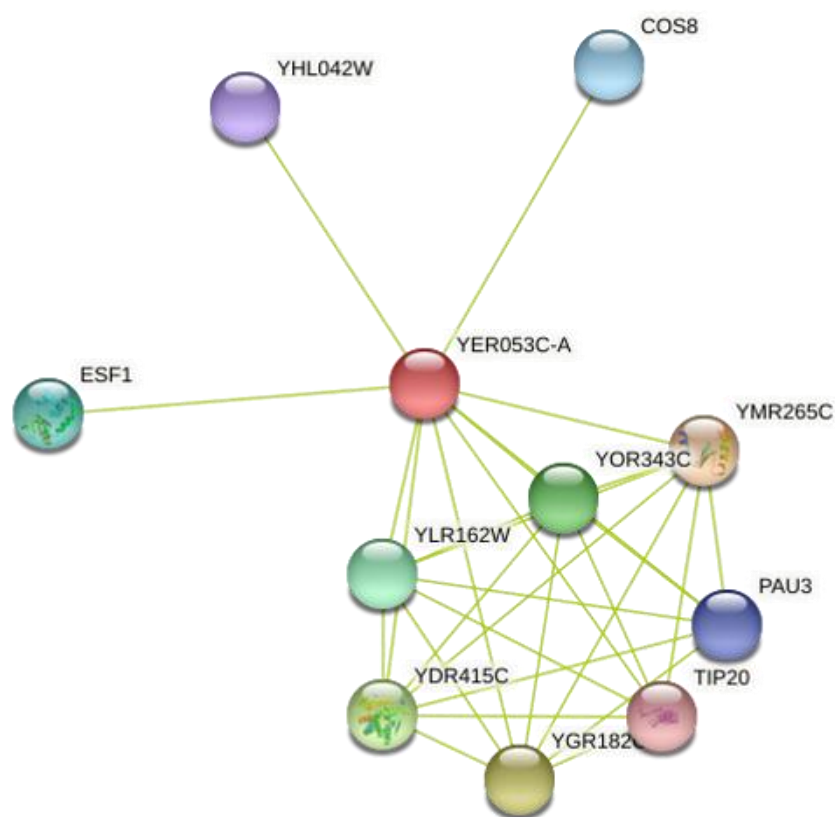
Figura 11: Rede de interação realizada entre a proteína candidata YER053C-A com as proteínas descritas como atuantes na via de ativação da enzima H^+ -ATPase.



Rede de interação proteína-proteína, realizado utilizando o STRING, demonstra que não houve interações entre as proteínas da via de ativação da H^+ -ATPase (Arg82p, Yvc1p, Lpx1p, Snf3p, Pmc1p, Plc1p, Ptk2p, Pma1p) com a proteína YER053C-A. As linhas com coloração rosa representam interações determinadas experimentalmente. As linhas pretas representam proteínas com co-expressão. As linhas azul-claras representam proteínas com algum grau de homologia. As linhas verde-claras representam interações descritas na literatura.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12: Interações descritas da proteína candidata YER053C-A com outras proteínas descritas na literatura



Rede de interação proteína-proteína, realizada utilizando o STRING, demonstra as interações entre a proteína YER053C-A com as proteínas YMR265C, YOR343C, YLR162W, PAU3, TIP20, YGR182C, YDR415C, ESF1, COS8 e YHL042W. As proteínas que interagem com a proteína candidata estão relacionadas a resposta celular ao etanol na levedura. As linhas verde-claras representam interações descritas na literatura.

Fonte: Elaborado pelo autor

4.5 - Ancoragem molecular da molécula de IP₃ na proteína candidata, YER053C-A

Com o intuito de verificar se a proteína candidata YER053C-A interage com a molécula de IP₃, podendo ser seu receptor molecular, foram realizadas análises de *Docking* molecular.

Na primeira estratégia (Figura 13) com o uso da ferramenta online Dockthor foi encontrada interação da molécula de IP₃ com a proteína YER053C-A em duas diferentes poses, a pose 1 (Figura 13-A) apresentou valor de RMSD igual a 0,000. Já a pose 2 (Figura 13-B) apresentou valor de RMSD igual a 1,283. Os resíduos de aminoácidos que permitiram as ligações foram: Phe19; His22; Arg23; Met26; Asn27; Lys30; Leu36 e Gln37. Além disso, a energia de ligação nas duas posições foi muito próxima entre si.

Na segunda estratégia, foi utilizado a ferramenta Autodock Tools, com duas diferentes posições da *Grid Box*. Na primeira posição da *GridBox* (Figura 14) as poses encontradas com melhor valor de RMSD foram as poses 1 (Figura 14A), 2 (Figura 14B), 3 (Figura 14C), 5 (Figura 14D), 6 (Figura 14E), 8 (Figura 14F) e 9 (Figura 14G), com valores de RMSD de 0,000, 1,638, 1,722, 1,769, 1,975, 1,769 e 1,951, respectivamente (Tabela 3). Os resíduos de aminoácidos que permitiram a ligação entre molécula e proteína foram Phe19; His22; Arg23; Thr24; Met26; Asn27; Lys30; Tyr35; Leu36 e Gln37.

Na segunda posição da *GridBox* (Figura 15) as poses encontradas com melhor valor de RMSD foram as poses 1 (Figura 15A), 2 (Figura 15B), 5 (Figura 15C) e 6 (Figura 15D). Os valores de RMSD foram 0,000, 1,808, 1,405 e 1,746, respectivamente (Tabela 4). Os resíduos de aminoácidos que permitiram as ligações foram: Phe19, His22, Arg23, Thr24, Val25, Met26, Asn27, Lys30, Tyr35, Val33, Leu36 e Gln37.

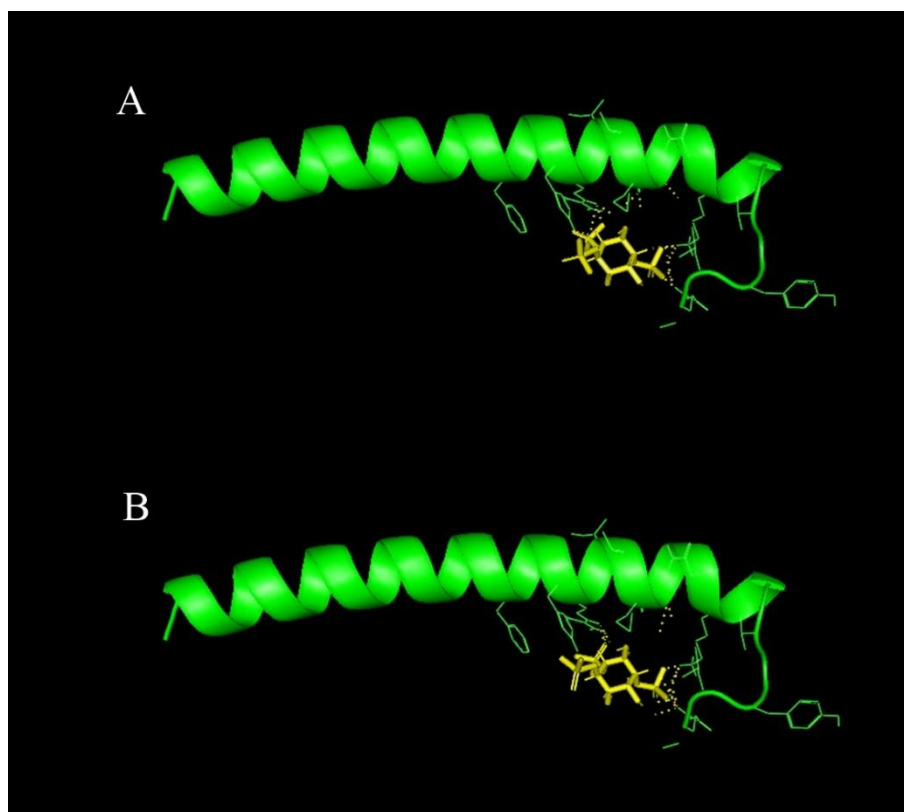
Em ambas posições da *GridBox* utilizadas na estratégia com a ferramenta Autodock Tools as energias de ligação das posições que apresentaram valores de RMSD menores que 2 Å foram muito próximas entre si, podendo considerar todas as posições selecionadas como sítios de ligação à molécula de IP₃.

Além disso, foi verificado que a molécula de IP₃ se ligou na mesma região da proteína nos 3 resultados obtidos (Figura 16). Esses resultados sugerem que a proteína candidata, YER053C-A, interage com a molécula de IP₃ e que esta interação é visualizada nas duas ferramentas utilizadas, estabelecendo uma única região de ancoragem da molécula de IP₃ na proteína.

Podemos, então considerar que, com os resultados já obtidos nas etapas anteriores e os resultados obtidos nesta etapa, a proteína YER053C-A tem o potencial de ser o receptor de IP₃

em leveduras. Porém ainda é necessário algumas análises como a de dinâmica molecular e experimentação em bancada.

Figura 13: *Docking* molecular entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP₃ de *S. cerevisiae* realizado pela ferramenta Dockthor



Visualização, utilizando a ferramenta Pymol, da ancoragem entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP₃ de *S. cerevisiae*, a partir do *Docking* molecular realizado pelo Dockthor. **A)** Pose 1 de ligação entre a proteína YER053C-A (Verde) com a molécula de IP₃ (Amarelo) com o valor de RMSD de 0,000 Å. **B)** Visualização da Pose 2 de ligação entre a proteína YER053C-A (verde) com a molécula de IP₃(Amarelo) com o valor de RMSD de 1,283 Å.

Fonte: Elaborado pelo autor.

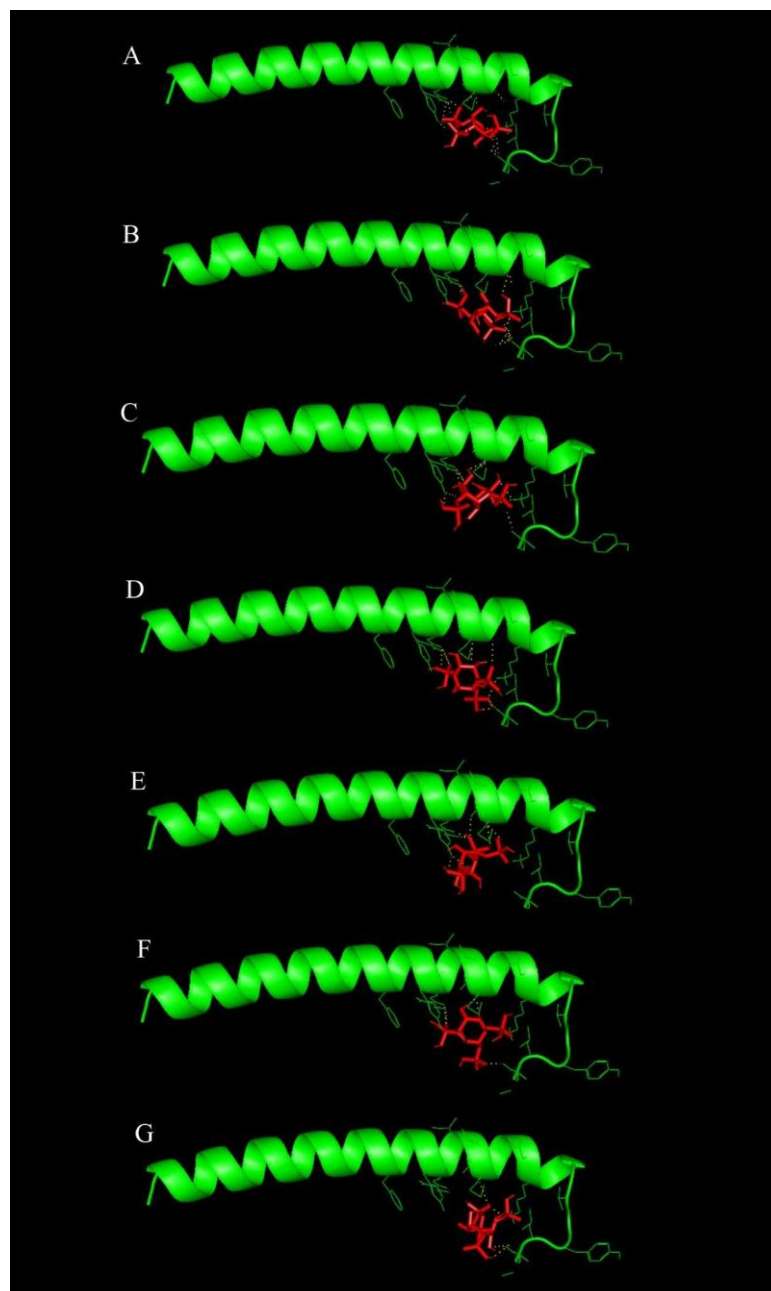
Tabela 3: Resultado da ancoragem molecular na ferramenta Dockthor entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP₃ de *S. cerevisiae*

Pose	Energia de Afinidade (kcal/mol)	RMSD (Å)
1	-27,980	0,000*
2	-28,183	1,283*
3	-29,119	5,995
4	-33,004	6,127
5	-34,170	6,214
6	-35,109	5,965
7	-35,133	4,625
8	-35,294	5,478
9	-36,816	6,177
10	-37,551	5,719

*: Valores de RMSD aceites (<2 Å)

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 14: *Docking Molecular, Gridbox 1, entre a Proteína YER053C-A e a Molécula de IP₃ de S. cerevisiae realizado pela ferramenta Autodock Tools*



Visualização, utilizando a ferramenta Pymol, da ancoragem entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP₃ de *S. cerevisiae*, na posição 1 da *Grid Box* a partir do *Docking* molecular realizado pela ferramenta Autodock Tools. **A)** Pose 1 de ligação entre a proteína YER053C-A (Verde) com a molécula de IP₃ (Vermelho) com o valor de RMSD de 0,000 Å. **B)** Pose 2 de ligação entre a proteína YER053C-A (verde) com a molécula de IP₃(Vermelho) com o valor de RMSD de 1,638 Å. **C)** Pose 3 de ligação entre a proteína YER053C-A (Verde) com a molécula de IP₃ (Vermelho) com o valor de RMSD de 1,722 Å. **D)** Pose 5 de ligação entre a proteína YER053C-A (verde) com a molécula de IP₃(Vermelho) com o valor de RMSD de 1,769 Å. **E)** Pose 6 de ligação entre a proteína YER053C-A (Verde) com a molécula de IP₃ (Vermelho) com o valor de RMSD de 1,975 Å. **F)** Pose 8 de ligação entre a proteína YER053C-A (verde) com a molécula de IP₃(Vermelho) com o valor de RMSD de 1,769 Å. **G)** Pose 9 de ligação entre a proteína YER053C-A (Verde) com a molécula de IP₃ (Vermelho) com o valor de RMSD de 1,951 Å.

Fonte: Elaborado pelo autor.

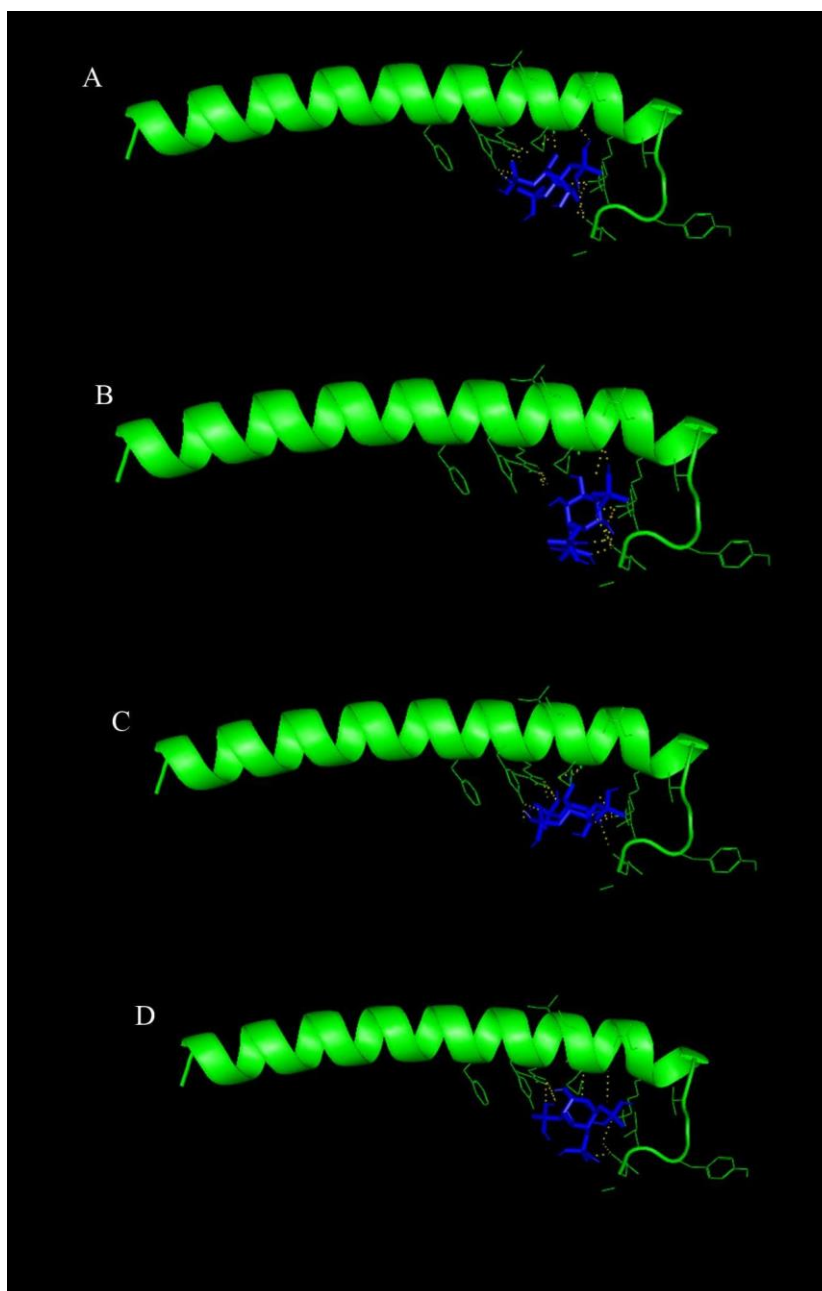
Tabela 4: Resultado da posição 1 da *Gridbox* na ferramenta AutoDock Tools entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP₃ de *S. cerevisiae*

Pose	Energia de Afinidade (kcal/mol)	RMSD (Å)
1	-4,6	0,000*
2	-4,4	1,638*
3	-4,3	1,722*
4	-4,3	2,180
5	-4,3	1,769*
6	-4,2	1,975*
7	-4,2	2,167
8	-4,1	1,769*
9	-4,1	1,951*

*: Valores de RMSD aceitos (<2 Å)

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 15: *Docking Molecular, Gridbox 2, entre a Proteína YER053C-A e a Molécula de IP₃ de S. cerevisiae realizado pela ferramenta Autodock Tools*



Visualização a partir da ferramenta Pymol da ancoragem entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP₃ de *S. cerevisiae*, na posição 2 da *Grid Box* a partir do *Docking* molecular realizado pela ferramenta Autodock Tools. **A)** Pose 1 de ligação entre a proteína YER053C-A (Verde) com a molécula de IP₃ (Azul) com o valor de RMSD de 0,000 Å. **B).** Pose 2 de ligação entre a proteína YER053C-A (verde) com a molécula de IP₃(Azul) com o valor de RMSD de 1,808 Å. **C).** Pose 5 de ligação entre a proteína YER053C-A (Verde) com a molécula de IP₃ (Azul) com o valor de RMSD de 1,405 Å. **D)** Pose 6 de ligação entre a proteína YER053C-A (verde) com a molécula de IP₃(Azul) com o valor de RMSD de 1,746 Å.

Fonte: Elaborado pelo autor.

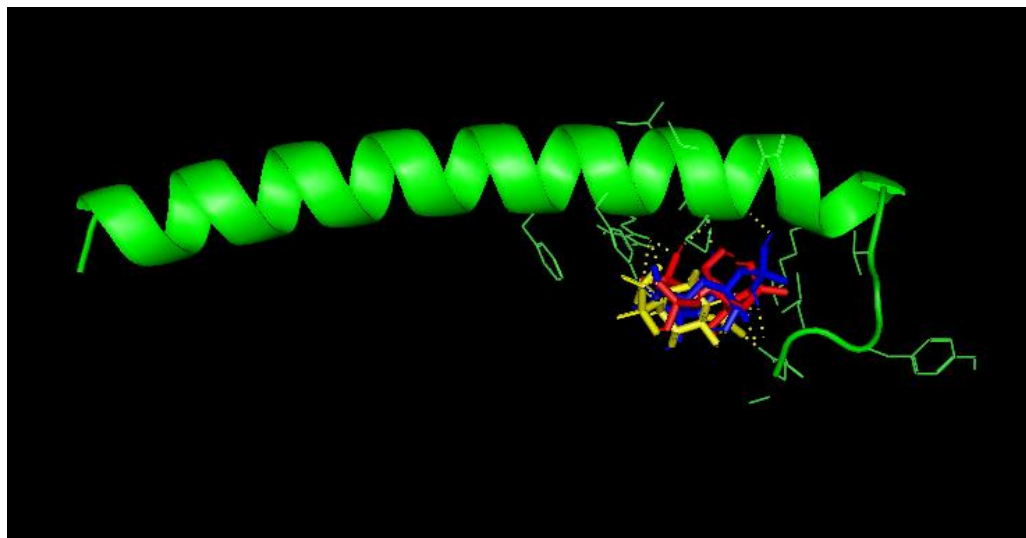
Tabela 5: Resultado da posição 2 da *Gridbox* na ferramenta AutoDock Tools entre a proteína YER053C-A e a molécula de IP₃ de *S. cerevisiae*

Pose	Energia de Afinidade (kcal/mol)	RMSD (Å)
1	-4,5	0,000*
2	-4,5	1,808*
3	-4,4	2,502
4	-4,3	2,027
5	-4,3	1,405*
6	-4,2	1,746*
7	-4,2	2,003
8	-4,1	2,748
9	-4	2,145

*: Valores de RMSD aceitos (<2 Å)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16: Posição de ancoragem da molécula de IP₃ de *S. cerevisiae* na proteína YER053C-A nas duas estratégias utilizadas



Região de ancoragem da molécula de IP₃ de *S. cerevisiae* na proteína YER053C-A (Verde) nas duas estratégias de *Docking* Molecular. A posição de ancoragem na estratégia utilizando a ferramenta Dockthor é representada pela molécula de IP₃ na cor amarela. A posição de ancoragem na estratégia utilizando a ferramenta Autodock Tools, na primeira posição da *Gridbox* é representada pela molécula de IP₃ na cor vermelha. E a posição de ancoragem na estratégia utilizando a ferramenta AutodockTools, na primeira posição da *Gridbox* é representada pela molécula de IP₃ na cor azul. Visualização realizada a partir do uso da ferramenta Pymol.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.6 - Similaridade entre os motivos conservados de receptores de IP₃ e as proteínas Alg6p, Sse2p, Swc3p e Yvc1p.

Como anteriormente dito, as proteínas Alg6p (Cadeia A, B e C), Sse2p, Swc3p e Yvc1p, são relatadas na literatura como possíveis candidatas a serem receptores de IP₃ em *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, para verificar se existe similaridade entre os motivos conservados identificados no presente estudo e essas proteínas, foram realizados alinhamentos par-a-par (BLASTp).

Foi possível identificar similaridades entre as proteínas com os motivos conservados (Tabela 6). Na figura 17 é possível visualizar os motivos conservados que apresentaram similaridade com a proteína Yvc1p. No total, cinco motivos conservados foram encontrados nesta proteína. Três deles em posições diferentes da proteína e dois foram encontrados na mesma posição da proteína. Na figura 18 é demonstrado os motivos conservados que apresentaram similaridade com a proteína Alg6p cadeia A e cadeia B. Na cadeia A, dois motivos conservados foram encontrados em posições diferentes, e um motivo foi observado na cadeia B. Na figura 19 é possível observar os cinco motivos conservados que apresentaram similaridade com a proteína Sse2p. Estes foram encontrados em diferentes posições na proteína. Na figura 20 é possível observar os motivos conservados que apresentaram similaridade com a proteína Swc3p. Foram encontrados dois motivos conservados em posições diferentes da proteína.

Uma vez que os motivos identificados no presente trabalho representam regiões conservadas entre as sequências de receptores de IP₃ de diferentes espécies e que estes apresentam alta similaridade com as sequências das proteínas Alg6p, Sse2p, Swc3p e Yvc1p, estas são candidatas a serem receptores de IP₃ em leveduras.

Como já anteriormente abordado, três tipos de receptores de IP₃ em eucariotos já foram identificados (FEDORENKO et al., 2014). Uma hipótese levantada com esses resultados é que tanto a YER053C-A (proteína candidata encontrada a partir da busca por similaridade com os motivos conservados entre receptores de IP₃), quanto alguma dessas proteínas Alg6p, Yvc1p, Sse2p e Swc3p, podem ser os receptores de IP₃ em leveduras. Porém, estudos experimentais são necessários para identificar se essas proteínas interagem com a molécula de IP₃, e auxiliam na sinalização de cálcio intracelular e na ativação da enzima H⁺-ATPase.

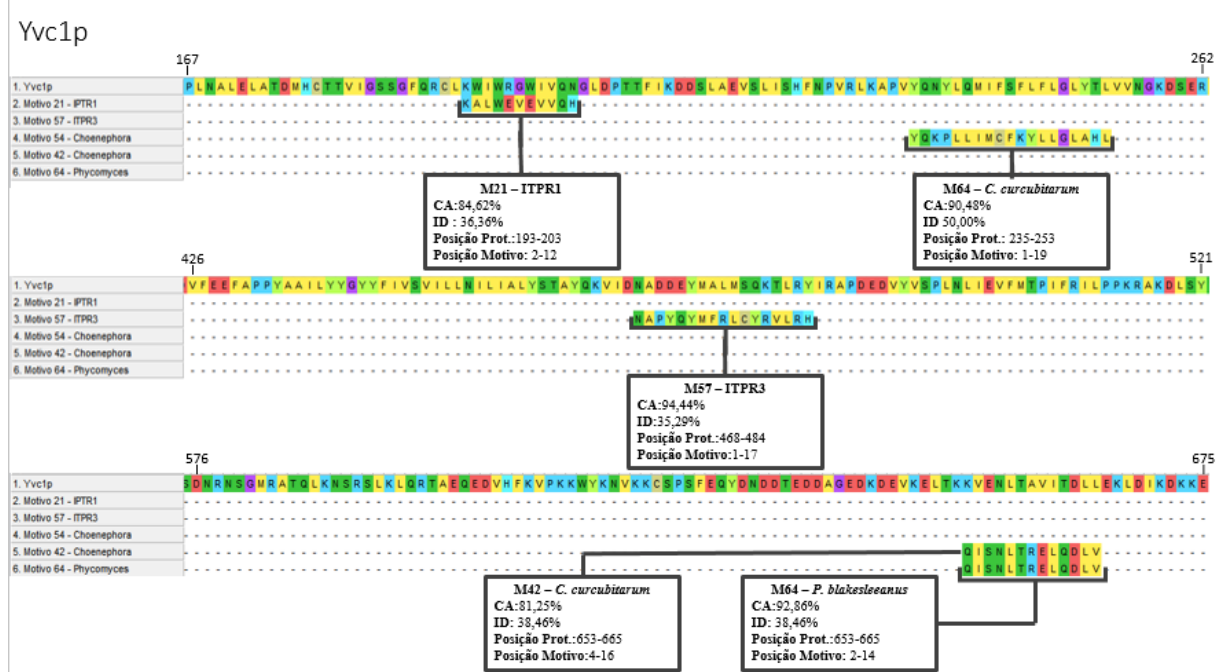
Ter encontrado similaridade entre os motivos identificados e proteínas já descritas como candidatas a receptores de IP₃ em *S. cerevisiae* também evidencia a eficácia da estratégia *in silico* desenvolvida no presente estudo para identificar receptores moleculares.

Tabela 6: Similaridades entre motivos conservados e as proteínas Alg6p, Sse2p, Swc3p e Yvc1p

Proteína	ID. Motivo	Motivo conservado	Identidade	Cobertura de Alinhamento
Yvc1p	M21 - ITPR1	SKALWEVEVVQHD	36,36%	84,62%
Yvc1p	M57 - ITPR3	NAPYQYMFRLCYRVLRRHS	35,29%	94,44%
Yvc1p	M64 - <i>C. curcubitarum</i>	YQKPLLIMCFKYLLGLAHLGL	50,00%	90,48%
Yvc1p	M42 - <i>C. curcubitarum</i>	HLSQISNLTRELQDLV	38,46%	81,25%
Yvc1p	M64 - <i>P. blakesleeanus</i>	SQISNLTRELQDLV	38,46%	92,86%
Alg6p Chain A	M71 - ITPR1	RGGGFLPMTP	50,00%	80,00%
Alg6p Chain A	M246 - ITPR3	QIVFPVPAI	50,00%	88,89%
Alg6p Chain B	M198 - ITPR1	STEYTGPE SYVAEMIKER	41,18%	94,44%
Sse2p	M68 - ITPR1	VHITTIFPITKMAKGE	40,00%	93,75%
Sse2p	M51 - ITPR2	NPVQLDD	71,43%	100,00%
Sse2p	M237 - ITPR3	EVGHNIYILAL	36,36%	100,00%
Sse2p	M108 - ITPR3	EHTVVMETKLKILEILQ	46,67%	88,24%
Sse2p	M52 - <i>P. blakesleeanus</i>	FEKVALTDYTIYTSINNNT EYYPFGSSGIE	39,29%	90,32%
Swc3p	M112 - ITPR3	KEFVEV	50,00%	100,00%
Swc3p	M01 - <i>P. blakesleeanus</i>	MKREVEEFLRIGDDILLSS	47,06%	89,47%

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 17: Similaridade entre a proteína Yvc1p e os motivos conservados de receptores de IP₃

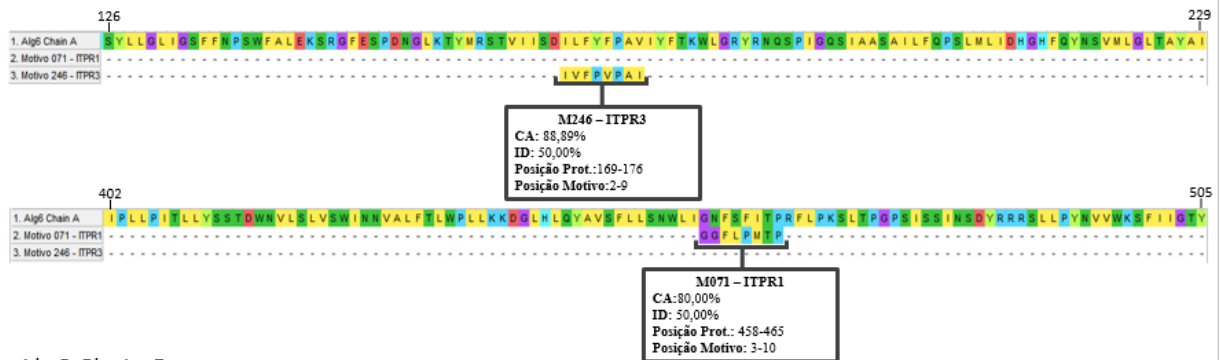


O alinhamento par a par, utilizando o BLASTp, demonstra os motivos conservados de receptores de IP₃ que tiveram similaridade com a proteína Yvc1p, ao todo 5 motivos conservados foram encontrados na proteína. As caixas pretas demonstram a identificação do motivo, a posição em que os motivos são encontrados na proteína (Posição Prot.), a parte do motivo que teve similaridade com a proteína (Posição Motivo), a cobertura de alinhamento (CA) e a identidade (ID).

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 18: Similaridade entre a proteína Alg6p e os motivos conservados de receptores de IP₃

Alg6 Chain A



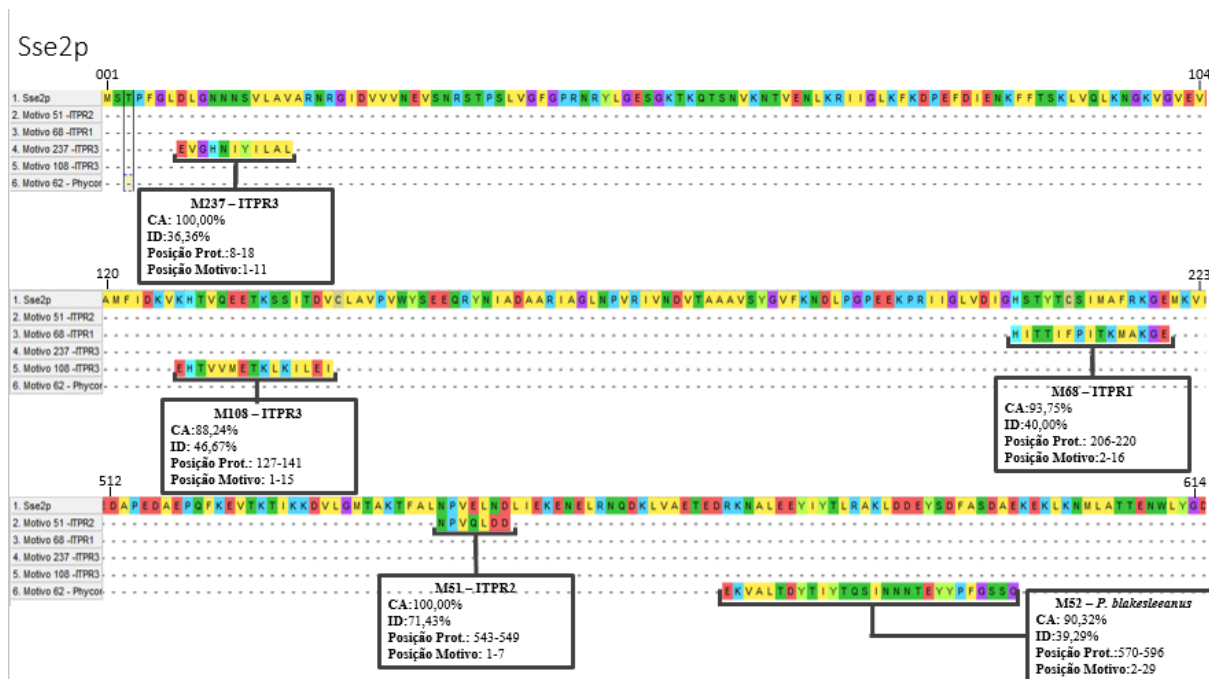
Alg6 Chain B



O alinhamento par a par, utilizando o BLASTp, demonstra os motivos conservados de receptores de IP₃ que tiveram similaridade com a proteína Alg6p, ao todo 2 motivos conservados foram encontrados na proteína na cadeia A e 1 na cadeia B. As caixas pretas demonstram a identificação do motivo, a posição em que os motivos são encontrados na proteína (Posição Prot.), a parte do motivo que teve similaridade com a proteína (Posição Motivo), a cobertura de alinhamento (CA) e a identidade (ID).

Fonte: Elaborado pelo autor

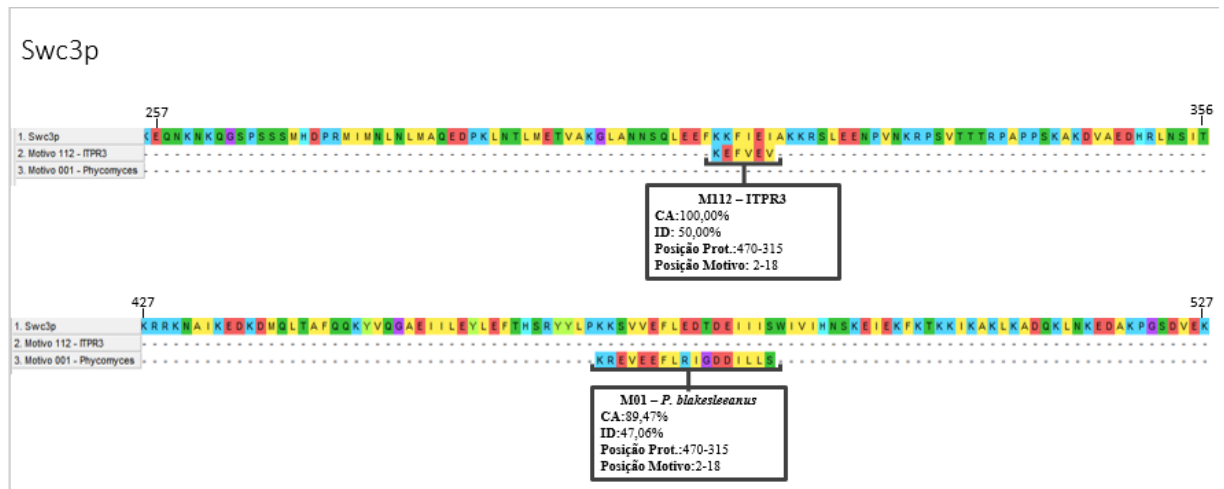
Figura 19: Similaridade entre a proteína Sse2p e os motivos conservados de receptores de IP₃



O alinhamento par a par, utilizando o BLASTp, demonstra os motivos conservados de receptores de IP₃ que tiveram similaridade com a proteína Sse2p, ao todo 5 motivos conservados foram encontrados na proteína. As caixas pretas demonstram a identificação do motivo, a posição em que os motivos são encontrados na proteína (Posição Prot.), a parte do motivo que teve similaridade com a proteína (Posição Motivo), a cobertura de alinhamento (CA) e a identidade (ID).

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 20: Similaridade entre a proteína Swc3p e os motivos conservados de receptores de IP₃



O alinhamento par a par, utilizando o BLASTp, demonstra os motivos conservados de receptores de IP₃ que tiveram similaridade com a proteína Swc3p, ao todo 2 motivos conservados foram encontrados na proteína. As caixas pretas demonstram a identificação do motivo, a posição em que os motivos são encontrados na proteína (Posição Prot.), a parte do motivo que teve similaridade com a proteína (Posição Motivo), a cobertura de alinhamento (CA) e a identidade (ID).

Fonte: Elaborado pelo autor

CONCLUSÃO

Podemos concluir com este trabalho que a proteína candidata YER053C-A é um possível receptor de IP₃ em leveduras, bem como as proteínas Alg6p, Yvc1p, Sse2p e Swc3p também podem ser, quando usamos a metodologia para identificação de regiões conservadas. Porém, ainda são necessárias algumas análises *in silico* e laboratoriais para confirmar a interação dessas proteínas com a molécula de IP₃, com a via de ativação da enzima H⁺-ATPase e sinalização de cálcio intracelular.

Vale mencionar que a estratégia de bioinformática estabelecida no presente trabalho, foi capaz de identificar receptores moleculares que até então não tinham sido descritos. Devido ao fato que, foi possível identificar proteínas que até então não havia sido descrito similaridade e relação com receptores de IP₃ de eucariotos com leveduras. Ademais, a estratégia pode ser utilizada para identificação de outros receptores moleculares que até o momento não foram identificadas, mas que apresentam pode apresentar alguma importância fisiológica para outros organismos.

PERSPECTIVAS

Faz-se necessário realizar algumas análises complementares para verificar se a YER053C-A pode ser a proteína correspondente ao receptor de IP₃ em leveduras. Para isso, será necessário a realização da dinâmica molecular para confirmar os resultados obtidos com o *docking* molecular. Confirmada a interação direta, serão realizadas análises laboratoriais para confirmar *in vivo* o envolvimento dessa proteína na ativação da enzima H⁺-ATPase de membrana citoplasmática.

Ademais, os próximos passos para verificar se as proteínas Alg6p, Yvc1p, Sse2p e Swc3p também podem ser receptores de IP₃ em leveduras envolvem análises de ancoragem molecular e dinâmica molecular entre as proteínas e a molécula de IP₃, e experimentações *in vivo* como descrito anteriormente.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.

ANRAKU, Y.; OHYA, Y.; IIDA, H. Cell cycle control of calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research**, v. 1093, n. 2–3, p. 169–177, 1991.

BARBOSA, P. G. P. **Análises de QTL e genômica comparativa para estudar mecanismos regulatórios da H⁺-ATPase de membrana**. [s.l.] Universidade Federal de Ouro Preto, 2021.

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

BENSON, D. A. et al. GenBank: update. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl_1, p. D23–D26, 2004.

BERNSTEIN, F. C. et al. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 112, n. 3, p. 535–542, 1977.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 6, p. 933–940, 2009.

BEZPROZVANNY, LLYA; WATRAS, J.; EHRLICH, B. E. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. **Nature**, v. 351, n. 6329, p. 751–754, 1991.

BEZPROZVANNY, I. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3, p. 261–272, 2005.

BORODINA, I.; NIELSEN, J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 5, p. 609–620, 1 maio 2014.

BOUILLET, L. E. M. et al. The involvement of calcium carriers and of the vacuole in the glucose-induced calcium signaling and activation of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Cell Calcium**, v. 51, n. 1, p. 72–81, 2012.

BRANDÃO, R. L. **Handbook of H⁺-ATPases: The relationship between glucose-induced calcium signaling and activation of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells.** 1^a ed. Singapura: Pan Stanford Pte. Ltd., 2014.

CASTANHEIRA, D. D. et al. Lpx1p links glucose-induced calcium signaling and plasma membrane H⁺-ATPase activation in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **FEMS yeast research**, v. 18, n. 1, fev. 2018.

CHERRY, J. M. et al. *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. 2012.

COCSETTI, P. et al. The PLC1 encoded phospholipase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is essential for glucose-induced phosphatidylinositol turnover and activation of plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1405, n. 1–3, p. 147–154, 1998.

CUNNINGHAM, K. W. Acidic calcium stores of *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell calcium**, v. 50, n. 2, p. 129–138, 2011.

CYERT, M. S.; PHILPOTT, C. C. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 193, n. 3, p. 677–713, 2013.

DECROCK, E. et al. IP₃, a small molecule with a powerful message. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1833, n. 7, p. 1772–1786, jul. 2013.

DELANO, W. L. **PyMOL**, 2002.

DENIS, V.; CYERT, M. S. Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. **The Journal of cell biology**, v. 156, n. 1, p. 29–34, 2002.

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

DUNN, T.; GABLE, K.; BEELER, T. Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7273–7278, 1994.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 19 mar. 2004.

ENGELBERG, D.; PERLMAN, R.; LEVITZKI, A. Transmembrane signaling in *Saccharomyces cerevisiae* as a model for signaling in metazoans: State of the art after 25 years.

Cellular Signalling, v. 26, n. 12, p. 2865–2878, 2014.

FEDORENKO, O. A. et al. Intracellular calcium channels: Inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 739, p. 39–48, 2014.

FEYDER, S. et al. Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 1509–1525, 9 jan. 2015.

FINCH, E. A.; TURNER, T. J.; GOLDIN, S. M. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. **Science (New York, N.Y.)**, v. 252, n. 5004, p. 443–446, abr. 1991.

FOSKETT, J. K. et al. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. **Physiological reviews**, v. 87, n. 2, p. 593–658, abr. 2007.

GARBELINI, J. M. C. **Abordagem baseada em algoritmos meméticos para descoberta de motivos biológicos**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546 LP – 567, 25 out. 1996.

GOFFEAU, A.; SLAYMAN, C. W. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics**, v. 639, n. 3, p. 197–223, 1981.

GROPPI, S. et al. Glucose-induced calcium influx in budding yeast involves a novel calcium transport system and can activate calcineurin. **Cell calcium**, v. 49, n. 6, p. 376–386, 2011.

HARVEY LODISH. **Molecular cell biology**. 7. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2012.

HUANG, Y. et al. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 5, p. 680–682, mar. 2010.

HUH, W.-K. et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 686–691, out. 2003.

IINO, M. Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. **The Journal of general physiology**, v. 95, n. 6, p. 1103–1122, jun. 1990.

KAYA, M. MOGAMOD: Multi-objective genetic algorithm for motif discovery.

Expert Systems with Applications, v. 36, n. 2, Part 1, p. 1039–1047, 2009.

KÜHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 282–295, 2004.

KUMAR, S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LEMOS, F. DE O. et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the liver: Expression and function. **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 44, p. 6483–6494, 28 nov. 2019.

LI, J. et al. Improvement of alcoholic fermentation by calcium ions under enological conditions involves the increment of plasma membrane H(+)-ATPase activity. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1181–1186, jul. 2010.

MADDEN, T. L.; TATUSOV, R. L.; ZHANG, J. Applications of network BLAST server. **Methods in Enzymology**, v. 266, p. 131–141, 1 jan. 1996.

MAGALHÃES, C. S. et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, p. 206–224, 2014.

MALPARTIDA, F.; SERRANO, R. Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent. **FEBS letters**, v. 111, n. 1, p. 69–72, 1980.

MENGPING, L. et al. Conserved Fungal Genes as Potential Targets for Broad-Spectrum Antifungal Drug Discovery. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 4, p. 638–649, 1 abr. 2006.

MIKOSHIBA, K. IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. **Journal of neurochemistry**, v. 102, n. 5, p. 1426–1446, set. 2007.

MISETA, A. et al. The vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca²⁺ levels in *S. cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 451, n. 2, p. 132–136, 1999.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 1 dez. 2009.

PAIDHUNGAT, M.; GARRETT, S. A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca²⁺ uptake and exacerbates the *cdc1* (Ts) growth defect. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 11, p. 6339–6347, 1997.

PANTAZAKA, E.; TAYLOR, C. W. Differential distribution, clustering, and lateral diffusion of subtypes of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. **The Journal of biological**

chemistry, v. 286, n. 26, p. 23378–23387, 1 jul. 2011.

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

PEREIRA, R. R. et al. Detailed search for protein kinase(s) involved in plasma membrane H⁺-ATPase activity regulation of yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 2, 1 mar. 2015.

PORTILLO, F. Regulation of plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase in fungi and plants. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1469, n. 1, p. 31–42, mar. 2000.

RAMIREZ-CÓRDOVA, J. et al. Transcriptome analysis identifies genes involved in ethanol response of *Saccharomyces cerevisiae* in Agave tequilana juice. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 2, p. 247–255, ago. 2012.

RAMIREZ-GAONA, M. et al. YMDB 2.0: a significantly expanded version of the yeast metabolome database. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D440–D445, jan. 2017.

RILEY, R. et al. Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 35, p. 9882 LP – 9887, 30 ago. 2016.

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 12, n. 2, p. 85–94, 1 fev. 1999.

SANTANA, E. P. Evidências para a presença de uma proteína receptora de IP3 em células de *Saccharomyces cerevisiae*. 2011.

SERRANO, R. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. **Biochimica et biophysica acta**, v. 947, n. 1, p. 1–28, fev. 1988.

SERRANO, R. et al. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. **Molecular microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1319–1333, 2002.

SNEL, B. et al. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 18, p. 3442–3444, 15 set. 2000.

TAYLOR, C. W.; GENAZZANI, A. A.; MORRIS, S. A. Expression of inositol

trisphosphate receptors. **Cell calcium**, v. 26, n. 6, p. 237–251, dez. 1999.

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

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

TKACH, J. M. et al. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. **Nature cell biology**, v. 14, n. 9, p. 966–976, set. 2012.

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

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.

WERA, S.; BERGSMA, J. C. T.; THEVELEIN, J. M. Phosphoinositides in yeast: genetically tractable signalling. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 1, p. 9–13, 2001.