

**Influência da pressão hidrostática em  
*Saccharomyces cerevisiae*: correlação com  
estresses químicos e físicos**

**Fernando Lucas Palhano Soares**

**Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal.**

**Mestrado em Biologia Vegetal  
Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória, março de 2005.**

# **Influência da pressão hidrostática em *Saccharomyces cerevisiae*: correlação com estresses químicos e físicos**

**Fernando Lucas Palhano Soares**

Dissertação realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular CBM/UFES sob a orientação da Professora Dra Patricia M. B. Fernandes, submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal.

**Mestrado em Biologia Vegetal  
Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória, março de 2005.**

Palhano, Fernando Lucas Soares, 1979

Influência da pressão hidrostática em *Saccharomyces cerevisiae*: correlação com estresses físicos e químicos. [Vitória] 2005

XVI, 118 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Biologia Vegetal, 2005)

Orientador: Pfa Dra Patricia M. B. Fernandes.

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGBV.

1- Resposta celular ao estresse; 2 - Pressão hidrostática; 3 – Óxido nítrico; 4 - RT-PCR semi-quantitativo; 5 - Baroresistência.

I. Universidade Federal do Espírito Santo – Biologia Vegetal.

II. TÍTULO

Dedico este trabalho a meus pais, Jorge e Inêz, meus grandes incentivadores, que me deram tudo o que eles podiam para que eu pudesse me dedicar inteiramente a este trabalho.

# AGRADECIMENTOS

A toda minha família, em especial: minha mãe Inêz, meu pai Jorge, minha noiva Tatiana, minha irmã Patrícia e meu sobrinho Pedro Henrique, pela paciência, colaboração e pelo amor e carinho em todos os momentos.

A Profa Patricia M. B. Fernandes, por ter me orientado. Agradeço tudo que com ela aprendi, o respeito, pelo elevado espírito crítico além da liberdade que me foi dada de pensar e realizar os experimentos.

Aos colegas de Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular: Carlos, Eliomara, Fernanda, Helena, Jéssica, Mirella Binoti, Mirella Pupo, Olavo, Paulo, Poliana, Silas, Soraya, Umberto, pelos momentos que passamos juntos aprendendo, além disso, somos uma equipe e soubemos trabalhar muito bem em conjunto, sempre ajudando uns aos outros.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV), por todo o apoio e constante troca de informações.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia: Elias, Maria Helena, Nino, Penha, Soninha, pelo apoio dispensado para a execução deste trabalho.

Aos colegas da Pós Graduação, pelos momentos de estudo e bate papo nem sempre científicos.

Aos demais Professores da UFES que juntos com os professores do PPGBV me proporcionaram um ensino e orientação de qualidade que coloca nossa universidade entre as melhores do país.

Aos Prof Elisardo Vasquez e Profa Silvana Meirelles do Departamento de Ciência Fisiológicas - UFES e Dr Alan Wheals da Universidade de Bath, Inglaterra, pela discussão que permeou nosso trabalho com NO.

A Profa Regina Keller do Departamento de Engenharia Ambiental - UFES, pelo uso de equipamentos de seu laboratório. A Profa Eleonora Kurtenbach, do Departamento de Bioquímica Médica - UFRJ, por nos disponibilizar alguns primers usados nesta dissertação.

Aos Profs R. S. de Biasi, do IME-RJ, Alan Wheals, da Universidade de Bath, Inglaterra e J. Broach da Universidade de Princeton, EUA, pelas revisões de nossos trabalhos.

A Profa Ana Cristina Chiaradia, do Departamento de Ciências Fisiológicas - UFES, pela efetiva participação no título dessa dissertação.

Ao CNPq que financiou minha bolsa e o projeto que minha dissertação esta inserida.

# SUMÁRIO

---

<b>Introdução</b>	<b>17</b>
1- Resposta dos organismos ao estresse.....	17
2- Leveduras como modelo de célula eucarionte.....	17
3- Aquisição de resistência ao estresse.....	18
4- Resposta de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aos estresses.....	19
5- Oxido nítrico (NO).....	21
6- A pressão hidrostática.....	22
6.1- Efeitos da pressão hidrostática em macromoléculas.....	22
6.2- Efeitos da pressão hidrostática em alimentos.....	23
6.3- Efeitos da pressão hidrostática em células e processos celulares.....	24
7- Efeitos da pressão hidrostática em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
8- Regulação da transcrição de genes responsivos ao estresse.....	26
<b>Objetivos</b>	<b>30</b>
1- Objetivo geral.....	30
2- Objetivos específicos.....	30

## **Material e métodos** **32**

1- Microorganismos e condição de crescimento.....	32
2- Determinação da taxa de gemulação.....	32
3- Tratamento com pressão hidrostática.....	32
4- Doadores de Óxido Nítrico.....	33
5- Determinação de NO.....	33
6- Tratamento com temperatura alta.....	35
7- Tratamento com temperaturas baixas.....	35
8- Tratamento com peróxido de hidrogênio.....	35
9- Tratamento com etanol.....	35
10- Viabilidade celular.....	35
11- Extração de proteínas e análise por <i>Western blotting</i> .....	35
12- Extração do RNA.....	36
13- Síntese da primeira fita de cDNA.....	37
14- PCR semi-quantitativo.....	37
15- Aquisição de imagens.....	39
16- Extração e dosagem dos níveis de trealose.....	39
17- Análises estatísticas.....	39

## **Resultados** **40**

1- Taxa de gemulação de células de levedura tratadas com pressão hidrostática.....	40
--	----



2- Efeito do NO no ciclo celular de levedura.....	40
3- Detecção de diferentes isoformas da NOS.....	42
4- Indução de barotolerância mediada por NO.....	44
5- Barotolerancia induzida por pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.....	47
6- Barotolerancia induzida por pré-tratamento com etanol.....	50
7- Indução de barotolerância por exposição a 10 °C.....	50
8- Análise semiquantitativa da transcrição dos genes <i>YER067W</i> , <i>HSP30</i> e <i>HSP12</i> por RT-PCR.....	50
9- Indução de tolerância ao estresse por pré-tratamento sub-letal de pressão hidrostática.....	54
10- Otimização do tempo de incubação após o pré-tratamento de pressão para indução de resistência contra estresses severos.....	56
11- Análise semiquantitativa por RT-PCR dos genes induzidos pela pressão hidrostática.....	56
12- Sobrevivência de cepas mutantes <i>hsp12</i> , <i>hsp30</i> e <i>yer067w</i> à alta pressão hidrostática.....	57
13- Dosagem dos níveis de trealose em células submetidas ao tratamento compressão hidrostática.....	57

## **Discussão 62**

1- Efeitos da pressão hidrostática nas células de levedura.....	62
2- Papel do NO na resposta de leveduras ao estresse de pressão hidrostática.....	62
3- Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e HHP.....	63
4- Pré-tratamento com etanol e HHP.....	64
5- Choque frio e HHP.....	67
6- Efeitos da pressão hidrostática nas células de levedura.....	69

<b>Conclusões e Perspectivas</b>	<b>75</b>
----------------------------------	-----------

<b>Referências bibliográficas</b>	<b>78</b>
-----------------------------------	-----------

<b>Anexos</b>	<b>92</b>
---------------	-----------

Anexo I- DOMITROVIC, T, PALHANO, F.L, BARJA-FIDALGO, C, DEFREITAS, M, ORLANDO, M.T.D. e FERNANDES, P.M.B. Role of nitric oxide in the response of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells to heat shock and high hydrostatic pressure. <b>FEMS Yeast Research</b> , v.: 3, p.: 341-346, 2003.....	92
---	----

Anexo II- PALHANO, F.L., ORLANDO, M.T. e FERNANDES, P.M.B. Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <b>FEMS Microbiology Letters</b> , v.: 233, p.: 139-145, 2004.....	98
---	----

Anexo III- PALHANO, F.L., GOMES, H.L., ORLANDO, M.T., KURTENBACH, E. e FERNANDES, P.M.B. Pressure response in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : From cellular to molecular approaches. <b>Cellular and Molecular Biology</b> , v.: 50, p.: 447-457, 2004.....	105
---	-----

### **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Lista de cepas utilizadas nesta dissertação.....	32
Tabela 2. Sequência dos primers utilizados nas reações de RT-PCR semiquantitativo.....	38

### **Lista de Ilustrações**

Fig 1. Visão geral das vias de sinalização em resposta ao estresse em <i>S. cerevisiae</i> .....	29
--	----

Fig 2. Diagrama da câmara de alta pressão hidrostática.....	34
Fig 3. Taxa de gemulação de células tratadas com pressão.....	41
Fig 4. Efeito do aumento da concentração de diferentes doadores de NO no crescimento de <i>S. cerevisiae</i> .....	43
Fig 5. Análise por <i>Western blotting</i> da expressão das isoformas endotelial, neuronal e induzível da NOS (NOS3, NOS1 e NOS2).....	45
Fig 6. Indução de barotolerância através do tratamento com doadores de NO.....	46
Fig 7. Indução de barotolerância por pré-tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	48
Fig 8. Resistência à alta pressão hidrostática em presença de glutathiona.....	49
Fig 9. Barotolerância induzida pelo etanol.....	51
Fig 10. Choque-frio induzindo barotolerância.....	52
Fig 11. Análise semiquantitativa por RT-PCR dos genes mais induzidos por pressão.....	53
Fig 12. Tolerância de células tratadas com pressão contra estresses severos.....	55
Fig 13. Estudo do período ótimo de pressurização capaz de induzir resistência contra estresses severos.....	58
Fig 14. Análise da transcrição dos genes induzidos por pressão por RT-PCR semiquantitativo...	59
Fig 15. Análise de sobrevivência de cepas mutantes submetidas à pressão hidrostática de 200 MPa por 30 min.....	60
Fig 16. Dosagem dos níveis de trealose em células submetidas ao tratamento com pressão hidrostática.....	61
Fig 17. Modelo de sinalização em resposta ao estresse de pressão.....	72

### **Lista de abreviaturas e siglas**

AMPC	Adenosina 3', 5' – monofosfato cíclico
atm	Atmosfera
ATP	Adenosina trifosfato
BeCu	Liga de cobre e berílio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
DO	Densidade optica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESR	Resposta ao estresse ambiental
GSH	Glutationa
Gsh1	Gama glutamil cisteína sintetase
H <sup>+</sup> -ATPase	H <sup>+</sup> adenosina trifosfatase
HHP	Alta Pressão Hidrostática
Hog1	Fator de transcrição de estresse osmótico
HSE	Elemento de choque térmico
Hsf1	Fator de transcrição de choque térmico
Hsps	Proteínas de choque térmico
HT	Alta Temperatura
MPa	Megapascal
Msn2/4	Fatores de transcrição de estresse
NOS	Óxido nítrico sintase

NOS1	Óxido nítrico sintase, isoforma neuronal
NOS2	Óxido nítrico sintase, isoforma induzível
NOS3	Óxido nítrico sintase, isoforma endotelial
ORF	Sequência aberta de leitura
P	Fosfato
PIP	Proteínas Induzidas por Pressão
pb	Pares de bases
PMSF	Fenil-metil sulfonyl fluoreto
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PVDF	Polifluoreto de Vinilideno
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA Mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT	Transcriptase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i> (Banco de dados do genoma de leveduras)
Skn7	Fator de transcrição estresse oxidativo
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNP	Nitroprussiato de sódio
SSC	Tampão Citrato de Sódio e NaCl
STRE	Elemento responsivo ao estresse
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris - HCL - EDTA
Tps1	Alfa fosfato trealose sintase
UCT	Temperatura Ultra Fria
UFC	Unidades formadoras de colônias
Yap1	Fator de transcrição estresse oxidativo
YEPD	Extrato de lêvedo petona dextrose
wt	Cepa do tipo selvagem

## RESUMO

---

Leveduras são organismos unicelulares expostos a ambientes altamente variáveis, acerca de viabilidade de nutrientes, temperatura, pH, radiação, acesso ao oxigênio e, especialmente, atividade da água. A evolução tem selecionado leveduras tolerantes, até certo ponto, a estes estresses ambientais. Altas pressões hidrostáticas (HHP) exercem um amplo efeito sobre células de leveduras, interferindo nas membranas celulares, arquitetura celular e em processos de polimerização e desnaturação de proteínas. O padrão de expressão gênica de *S. cerevisiae* em resposta a HHP revelou um perfil de resposta ao estresse. A maioria dos genes induzidos estão envolvidos na defesa ao estresse e metabolismo de carboidratos, enquanto a maioria dos genes reprimidos pertencem a categoria de progressão do ciclo celular e síntese de proteínas (Fernandes *et al.*, 2004). O óxido nítrico (NO) é uma molécula simples e única que possui diversas funções em organismos, incluindo a de mensageiro intracelular e intercelular. A influência do NO no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e como molécula sinalizadora em resposta ao estresse de HHP foi avaliada. Células respirando foram mais sensíveis a um aumento na concentração intracelular de NO que células crescendo fermentativamente. Baixos níveis de NO demonstraram um efeito citoprotetor durante o estresse causado pela pressão hidrostática. A indução da NO sintase foi isoforma-específica e dependente do estado metabólico da célula e da via de resposta ao estresse. Estes resultados suportam a hipótese que um aumento na concentração intracelular do NO leva à proteção contra o estresse de HHP. Além disso, a aquisição de tolerância a alta pressão hidrostática de 220 MPa em resposta ao pré-tratamento com 0,4 mM de peróxido de hidrogênio, 6 % de etanol ou choque frio de 10 °C por diferentes intervalos de tempo foi estudado na levedura *S. cerevisiae*. A proteção conferida por estes diferentes tratamentos foi similar, aproximadamente 3 log, e dependente do tempo. A análise da indução dos principais genes induzidos pela pressão sobre estas

condições foi investigada por RT-PCR. Nossos resultados revelaram que a resposta celular a HHP possui características comuns com os estresses de peróxido de hidrogênio e etanol, mas difere em alguns aspectos ao choque frio. Também, foi observado que média pressão induz parada no ciclo celular e proteção contra estresses severos, como alta temperatura, alta pressão e congelamento. Entretanto, esta proteção foi significativa apenas quando as células eram incubadas à pressão atmosférica após o tratamento com HHP. A expressão dos genes que são induzidos por HHP e são relacionados à resistência a este estresse também foi analisada, e, para a maioria destes, a maior indução foi atingida após 15 min pós-pressurização. Juntos estes resultados implicam em uma interconexão entre estes estresses.

## ABSTRACT

---

Yeasts are unicellular organisms that are exposed to a highly variable environment, concerning the availability of nutrients, temperature, pH, radiation, access to oxygen and, specially, water activity. Evolution has selected yeasts to tolerate, to a certain extent, these environmental stresses. High hydrostatic pressure (HHP) exerts a broad effect upon yeast cells, interfering with the cell membranes, cellular architecture and in processes of polymerisation and denaturation of proteins. Gene expression patterns in response to HHP revealed a stress response profile. The majority of the upregulated genes are involved in stress defence and carbohydrate metabolism while most of the repressed ones are in cell cycle progression and protein synthesis categories (Fernandes *et al*, 2004). Nitric oxide (NO) is a simple and unique molecule that has diverse functions in organisms, including intracellular and intercellular messenger. The influence of NO on cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* and as a signal molecule in stress response of HHP was evaluated. Respiring cells were more sensitive to an increase in intracellular NO concentration than fermentatively growing cells. Low levels of NO demonstrated a cytoprotective effect during stress from HHP. Induction of NO synthase was isoform-specific and dependent on the metabolic state of the cells and the stress response pathway. These results support the hypothesis that an increase in intracellular NO concentration leads to stress protection against HHP. In addition, the acquisition of tolerance to high hydrostatic pressure of 220 MPa (HHP) in response to a 0.4 mM hydrogen peroxide, 6 % ethanol or 10 °C cold shock pretreatment for different lengths of times was studied in the yeast *S. cerevisiae*. The protection conferred by these different treatments was similar, around 3 log cycles and time-dependent. Analysis of the induction of the most pressure up-regulated genes under these conditions was investigated by RT-PCR. Our results revealed that the cell stress response to HHP shares common features with hydrogen peroxide and ethanol stresses, but differs in some way to cold shock. Also, it was seen that mild pressure induced cell cycle arrest and protection against severe stresses, such as high temperature, high pressure and ultra cold shock. Nevertheless, this protection was only



significant if the cells were incubated at atmospheric pressure after the HHP treatment. Expression of genes that were upregulated by HHP and are related to resistance to these stresses were also analysed, and, for the majority of them, higher induction was attained after 15 min post-pressurization. Taken together, the results imply an interconnection among stresses.

# Introdução

---

## **1- Resposta dos organismos ao estresse.**

A sobrevivência de organismos vivos é dependente da sua habilidade de sentir alterações no ambiente e responder apropriadamente à nova situação. Isso é válido para as mais diversas formas de vidas, desde organismos procariontes, eucariontes primitivos, vegetais e animais. O mecanismo molecular induzido quando os organismos são expostos a condições adversas é denominado de “resposta ao estresse”. O mecanismo de resposta ao estresse protege as células contra os potenciais efeitos deletérios do estresse e auxilia a reparar qualquer dano molecular (SIDERIUS e MAGER, 1997). Conseqüentemente, células de organismos unicelulares e multicelulares devem contar com mecanismos para detectar alterações do ambiente e serem capazes de ajustar seu programa de expressão gênica de forma a melhor se adequarem às novas condições de crescimento (CRAIG, 1992). A compreensão desses mecanismos e a identificação de genes importantes para a sobrevivência celular sob condições extremas são de grande interesse, não só pela possibilidade de aplicação biotecnológica visando a produção de organismos melhor adaptados ao meio, como também por contribuir no entendimento de patologias, já que a viabilidade da célula depende de sua capacidade de adaptar-se ao ambiente que a cerca e de sobrepujar as condições desfavoráveis para sua proliferação (MURRAY *et al.*, 2004).

## **2- Leveduras como modelo de célula eucarionte.**

O conhecimento atual confirma que muitos princípios da resposta ao estresse são conservados entre eucariotos, tornando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um bom modelo de célula eucariota para o estudo da resposta ao estresse (HOHMANN, 2002).

Por serem facilmente cultivados, possuírem ciclo de vida curto e por permitirem fácil manipulação gênica, esses organismos foram utilizados em estudos de extrema importância para a compreensão da fisiologia da célula eucariótica, como por exemplo, o controle do ciclo celular (KATAOKA *et al.*, 1985). Em abril de 1996, foi depositada em um banco de dados público, [genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/](http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/), a seqüência completa do genoma de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (GOFFEAU *et al.*, 1996, 1997). Esse foi o primeiro eucarioto e também o primeiro organismo modelo a ter o genoma completamente seqüenciado.

*S. cerevisiae* possui diferentes fases de crescimento. Durante a primeira fase exponencial ou fase fermentativa, a fermentação da glicose é a única via energética usada pela célula e a taxa de crescimento é alta. Em leveduras, a presença de glicose reprime a expressão dos genes que codificam para enzimas da via respiratória, assim como genes que codificam para enzimas envolvidas no catabolismo de outras fontes de carbono. Quando a glicose é totalmente consumida, o ciclo celular é interrompido e genes envolvidos na via aeróbica do metabolismo são induzidos. Essa fase do crescimento é conhecida como segunda fase exponencial ou fase respiratória. Durante esta fase, a célula usa outras fontes de carbono para gerar energia. O etanol, principal produto da fase fermentativa, serve como importante fonte de carbono para as células na fase respiratória. Durante a fase respiratória, ao contrário da fase fermentativa, a célula depende de oxigênio e a produção de radicais livres é aumentada (CARLSON, 1999). Quando todas as fontes de carbono se esgotam, as células mudam seu metabolismo e entram em estado de latência. Nessa fase, conhecida como fase estacionária, as células acumulam açúcares de reserva como glicogênio e trealose, além de proteínas de defesa conhecidas como proteínas de choque térmico (Hsps). As células ficam nesta fase até que as condições ótimas para seu crescimento sejam restituídas.

### **3- Aquisição de resistência ao estresse em *S. cerevisiae*.**

Um aspecto intrínseco da resposta ao estresse de células de levedura é o fenômeno da resistência adquirida ao estresse. Células de diversos organismos podem resistir a estresses severos quando são previamente expostas a uma forma branda do mesmo estresse (SIDERIUS e MAGER, 1997). No caso de leveduras *S. cerevisiae*, um curto pré-tratamento das células com 0,7 M de NaCl leva a um aumento na sobrevivência das células subsequentemente tratadas com 1,4 M de NaCl (TROLLMO *et al*, 1988). O mesmo tendo sido descrito para células expostas ao choque térmico severo quando primeiro tratadas com um choque térmico brando (COOTE *et al*, 1991). Esse estresse brando pode desencadear uma resposta celular que prepara as células a superar o estresse severo.

A existência de uma resposta celular geral ao estresse começou a se evidenciar com a descoberta do evento da proteção cruzada, que consiste na indução de proteção contra um determinado estresse através do pré-tratamento com um estresse de natureza diferente. O pré-tratamento das células com choque osmótico brando confere resistência ao choque térmico (VARELA *et al*, 1992), assim como exposição de leveduras a concentrações altas de etanol ou ácidos fracos confere termotolerância (COOTE *et al*, 1991). Entretanto, apesar do fenômeno da proteção cruzada ser um indicativo de uma rota comum de resposta ao estresse,

isto é apenas parcialmente verdade, já que em algumas situações a aquisição de tolerância não ocorre. Por exemplo, o tratamento de células de levedura com  $H_2O_2$  não promove resistência contra a droga geradora de superóxido menadiona (JAMIESON, 1992), enquanto o tratamento com menadiona protege as células contra o  $H_2O_2$ . Similarmente, pré-exposição ao choque térmico resulta em aquisição de tolerância contra etanol, mas o inverso não é verdadeiro (PIPER, 1995). Portanto, a falha na indução de proteção nas situações descritas sugere que a resposta celular ao estresse parece conter elementos em comum, no entanto, diferentes condições impõem mudanças celulares específicas.

#### **4- Resposta de *Saccharomyces cerevisiae* aos estresses.**

Os mecanismos de resposta ao estresse buscam proteger a célula dos potenciais danos causados pelas condições adversas e também atuam no reparo de danos produzidos pelo estresse. Para tanto, ocorrem mudanças metabólicas e um rearranjo no padrão de expressão gênica, levando a célula a um novo estado fisiológico. Isso significa que proteínas não expressas em condições normais são sintetizadas ou o nível de expressão de genes regularmente expressos é alterado em relação à situação anterior ao estresse. Desse modo, a célula não só se recupera das lesões causadas pelo agente estressante como também fica mais protegida contra danos futuros.

A resposta celular ao estresse mais bem caracterizada em *S. cerevisiae* é a induzida por choque térmico. Quando células crescidas sob temperatura ótima de 28°C são transferidas para 40°C, observa-se uma série de alterações no metabolismo. A célula sofre uma parada no ciclo celular na fase G1 e uma repressão geral na síntese de proteínas; simultaneamente, ocorre um acúmulo intracelular do dissacarídeo trealose e o aparecimento das proteínas de choque térmico (HSPs). Muitas dessas HSPs, como por exemplo as das famílias das Hsp60p, Hsp70p e a Hsp90p, atuam como chaperoninas, auxiliando no correto enovelamento de proteínas (BECKER e CRAIG, 1994), enquanto que a Hsp104p participa do processo de dissolução de agregados intracelulares formados por proteínas comprometidas pelo estresse térmico (PARSELL *et al.*, 1994). O calor também prejudica o funcionamento das proteínas implicadas na cadeia respiratória. Como resultado, a redução do oxigênio torna-se menos eficiente, refletindo numa produção aumentada de radicais livres. Entre as proteínas induzidas por choque térmico estão enzimas como catalases e superóxido dismutases, que catalisam diretamente a degradação do peróxido de hidrogênio, promovendo, então, proteção contra o estresse oxidativo (HOHMANN e MAGER, 1997).

A trealose é um dissacarídeo não redutor cuja função acreditava-se ser fonte de energia e carbono. No entanto, com o avanço do conhecimento de anidrobiose, uma nova função como protetor celular foi atribuída a este açúcar na célula. Devido a sua estrutura química, a molécula de trealose interage facilmente com proteínas e fosfolípidos de membrana. Essa característica é muito importante para o papel protetor da trealose em estresses como congelamento e desidratação, ambos envolvidos na remoção de água nos sistemas biológicos. A trealose, por sua vez, é capaz de substituir a água de hidratação das biomoléculas durante estes processos, prevenindo a fusão da fase lipídica, bem como a desnaturação das proteínas. A trealose substitui as moléculas de água ligando-se tanto às cabeças polares dos fosfolípidos, quanto aos domínios hidrofílicos das proteínas, mantendo assim a fluidez da membrana e o enovelamento protéico (SINGER e LINDQUIST, 1998). A observação de que o choque osmótico ou alcoólico também induz o acúmulo de trealose sugere que essa molécula pode estar implicada nos mecanismos de proteção contra outros estresses (PANEK, 1995).

Estudos de microarranjo em células de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a uma ampla variedade de estresses químicos e ambientais mostraram que a resposta para cada situação específica possui características particulares. Entretanto, analisando-se os genes normalmente expressos é possível detectar uma regulação estereotipada após a transição para condições estressantes, denominada de resposta ao estresse ambiental (ESR). Embora o número de genes regulados na ESR possa variar conforme a intensidade ou tempo de duração do estresse, em geral, observa-se uma forte repressão de genes codificantes para proteínas envolvidas na síntese de proteínas e ciclo celular. Especula-se que a redução do número de transcritos e seus produtos podem ajudar na conservação de energia enquanto a célula se adapta a nova condição, um papel que já havia sido proposto para a redução de genes codificantes de proteínas ribossomais (WARNER, 1999). Em contraste, os genes induzidos na ESR estão envolvidos em várias funções celulares, como metabolismo de carboidratos, enovelamento de proteínas, defesa contra agentes oxidantes, reparo do DNA entre outras (GASH *et al.*, 2000). É a proteção conferida pela expressão desses genes que provavelmente contribui para os fenômenos de proteção cruzada (LEWIS *et al.*, 1995).

### **5- Óxido nítrico (NO).**

O óxido nítrico (NO) é considerado uma molécula sinalizadora envolvida na regulação de um grande número de funções celulares, atuando como um mensageiro intercelular e intracelular regulando células vizinhas (MONKADA *et al.*, 1991). Inversamente, o NO é

implicado como um efector altamente citotóxico envolvido na progressão de várias condições patológicas (SAMDANI *et al.*, 1997). Sendo um radical livre, o NO pode reagir com oxigênio molecular ( $O_2$ ) e superóxido ( $O_2^-$ ), gerando agentes oxidantes como peroxinitrito ( $^{\cdot}OONO$ ) (CHIANG *et al.*, 2000a). Estes compostos podem causar danos a vários componentes celulares como proteínas, lipídeos e DNA. Por outro lado, o NO pode atuar como molécula sinalizadora, ativando ou inibindo atividades enzimáticas e controlando cascatas de transdução de sinais (MURAD, 1994).

NO é produzido pela óxido nítrico sintase (NOS). Em mamíferos, as isoformas de NOS ocorrem na forma constitutiva (neuronal NOS1 e endotelial NOS3) e induzível (NOS2). Pequenas quantidades de NO gerada pela isoforma constitutiva da NOS participam na regulação da tonicidade do sistema vascular e regulação do sistema nervoso central. Por outro lado, a expressão do gene que codifica para a NOS2 é induzida em macrófagos e outros tipos de células em resposta a agentes inflamatórios (WENDEHENNE *et al.*, 2001).

Recentemente foi mostrado que o NO não é produzido apenas em mamíferos, mas também em células de diversos organismos como invertebrados, plantas e microorganismos (LUCKHART e ROSEMBERG, 1999). Em plantas, NO tem sido implicado em muitas funções fisiológicas, do desenvolvimento da planta até resposta de defesa (BOLWELL, 1999). Apesar da grande presença do NO nos sistemas biológicos, pouco é conhecido sobre sua ação no metabolismo celular. A levedura *S. cerevisiae* possui constitutivamente uma proteína homóloga a NOS neuronal de mamífero (KANADIA *et al.*, 1997). Foi mostrado um efeito citoprotetor e citotóxico do NO em resposta ao estresse de cobre (CHIANG *et al.*, 2000b). Estes resultados sugerem que o NO pode estar envolvido em vias de resposta ao estresse em leveduras. Entretanto, nem a regulação da expressão da NOS em células de levedura, nem o papel da via de sinalização do NO são conhecidas.

## **6- A pressão hidrostática.**

Altas pressões hidrostáticas caracterizam a maior parte da biosfera quando analisamos os volumes ocupados pelos componentes terrestres e aquáticos. Habitats terrestres, onde as pressões são de 1 atmosfera [1 atm = 0,101 megapascal (MPa)] ou menos, respondem por menos que 1% do volume total da biosfera (SOMERO, 1992). Os oceanos, que cobrem aproximadamente 70% da superfície terrestre, possuem profundidade média de 3800 m e pressão de 381 atm (38 MPa). Aproximadamente 79% do volume dos componentes marinhos situam-se abaixo de 1000 m. A região mais profunda da Terra, as Fossas Marianas, localizada no Oceano Pacífico, possuem aproximadamente 11.000 m de profundidade (~ 110 MPa).

Mesmo alguns lagos, ex. Lago Baikal na Rússia (profundidade máxima de 1632 m), apresentam ambientes de alta pressão.

Surpreendentemente, muitos organismos aquáticos conseguem viver sob pressões hidrostáticas extremamente altas, apesar dos profundos efeitos exercidos pela pressão numa variedade de estruturas e funções celulares (ZIMMERMAN, 1971). Além dos ambientes aquáticos, células de organismos terrestres ocasionalmente estão submetidas a altas pressões, como por exemplo, componentes de determinados tecidos, como articulações em animais ou tecidos vasculares em plantas, podem experimentar pressões relativamente altas de até 20 MPa e 100 MPa, respectivamente (ELO *et al.*, 2004; PETERS, *et al.*, 2000).

Altas pressões hidrostáticas têm ganhado uma grande importância biotecnológica na última década devido a estudos na descontaminação de alimentos, produção de vacinas entre outros (ROTHSCHILD e MANCINELLI, 2001).

Resumidamente, pode-se classificar a biociência que estuda os efeitos da pressão hidrostática em três categorias principais: 1- Efeitos da pressão hidrostática em alimentos, 2- Efeitos da pressão hidrostática em macromoléculas, 3- Efeitos da pressão hidrostática em células e processos celulares.

### **6.1 Efeitos da pressão hidrostática em alimentos.**

Novos métodos alternativos para processamento de alimentos, ou novas combinações de métodos existentes, são continuamente investigados pela indústria com o propósito de produzir alimentos com maior qualidade e economicamente rentável (HOOVER *et al.*, 1989). O tratamento com alta pressão hidrostática revelou-se uma técnica potencial na preservação de alimentos desde que Hite demonstrou, em 1899, que os microorganismos que contaminam o leite podiam ser destruídos com aplicação de pressão hidrostática (SMELT, 1998). Entretanto, apenas recentemente a indústria de alimentos tem utilizado a pressão hidrostática na descontaminação de alimentos (SAN MARTIN *et al.*, 2002).

O método tradicional de descontaminação de alimentos é o uso de altas temperaturas. Entretanto, o uso de altas temperaturas geralmente causa mudanças nas características organolépticas dos alimentos, como alteração da cor, flavor, degradação de várias vitaminas, textura, etc (MOLINA-GARCIA, 2002). Todas essas mudanças resultam em produtos diferentes do produto fresco original. A mudança no comportamento dos consumidores, que buscam produtos processados com características do produto original, forçou o desenvolvimento de novas técnicas de processamento de alimento pelas indústrias. Entre as vantagens do uso de altas pressões, quando comparado com o uso de altas temperaturas,

observa-se: i) as características organolépticas dos alimentos são conservadas, ii) é necessário um gasto energético menor, pois, após a obtenção do valor de pressão desejado não é necessário adicionar energia ao sistema, iii) a pressão é homogênea em todos os pontos do sistema. Apesar do custo dos aparelhos de pressão ainda ser elevado, já são comercializados na Europa, Japão e EUA, produtos processados por pressão, como preparações de frutas, sucos de laranja e maçã, bolo de arroz, lula crua, guacamole, ostras, etc (SMELT, 1998).

A combinação de dois ou mais processos pode aumentar a eficiência de inativação empregando-se um menor valor de pressão (ROSS *et al.*, 2003). Vários trabalhos mostram o efeito sinérgico de altas pressões com baixos valores de pH (ROBERTS e HOOVER, 1996), agentes antimicrobianos (HAUBEN *et al.*, 1996), óleos essenciais (PALHANO *et al.*, 2004c), sistema lactoperoxidase (GARCÍA-GRAELLS *et al.*, 2003), etc.

Assim como aconteceu com o processamento térmico, o desenvolvimento de novas tecnologias, como a pressão hidrostática, requer um detalhado conhecimento para que a eficiência máxima de inativação seja alcançada. Isso envolve estudos sobre os valores de pressão usados para os vários microorganismos e como esta inativação é afetada por relevantes processos e parâmetros, como o tempo de processamento, pressão e temperatura, tipo de alimento, pH, etc (GARCÍA-GRAELLS *et al.*, 2003). Mais ainda, é importante compreender como são as respostas dos microorganismos à pressão e quais fatores podem influenciar na tolerância adquirida contra a pressão hidrostática.

## **6.2- Efeitos da pressão hidrostática em macromoléculas.**

Dentre as macromoléculas estudadas usando-se pressões hidrostáticas destacam-se as proteínas. O uso de altas pressões hidrostáticas no estudo de biomoléculas vem crescendo nos últimos anos (FOGUEL e SILVA, 2004). Este crescimento pode ser explicado pelas vantagens que a pressão hidrostática apresenta em relação às outras ferramentas de estudo. Os métodos clássicos de estudo de enovelamento, desnaturação e agregação de proteínas usam o calor ou agentes desnaturantes como principais ferramentas. Entretanto, perturbações causadas pela temperatura envolvem mudanças no volume e na energia total do sistema. Ao contrário, as perturbações causadas pela pressão dependem apenas das mudanças do volume do sistema em estudo (ALVAREZ-MARTINEZ *et al.*, 2003). Enquanto a desnaturação causada pela temperatura é geralmente irreversível e leva à agregação, provavelmente devido ao aumento nas interações hidrofóbicas, a desnaturação causada pela pressão (dentro de uma faixa limite) é reversível. Outra grande vantagem do uso de pressões é a estabilização de



intermediários enovelados de proteínas, proporcionando uma oportunidade única para caracterização de sua estrutura e dinâmica (FOGUEL e SILVA, 2004).

### **6.3- Efeitos da pressão hidrostática em células e processos celulares.**

Ao ser submetida a altas pressões, a célula sofre uma redução no volume de reação, o que leva a alteração de diversos componentes celulares de maneira a favorecer uma conformação mais compacta. Além de provocar mudanças estruturais em biomoléculas, a pressão também é capaz de alterar o equilíbrio de reações para a formação de espécies de menor volume (MENTRÉ *et al.*, 1999).

A pressão hidrostática afeta severamente a membrana plasmática promovendo uma maior compactação dos lipídeos, especialmente na periferia de proteínas inseridas na membrana (BRAGANZA E WORCESTER, 1986; REYES *et al.*, 1993). Esse fenômeno é explicado pela redução de volume associado a uma organização mais densa e ordenada dos lipídeos. Como consequência, observa-se uma redução na fluidez e um aumento na espessura da membrana, o que, além de interferir nos processos de difusão, ainda pode comprometer a estrutura e, conseqüentemente, a atividade de proteínas de membrana.

Proteínas citoplasmáticas também podem sofrer os efeitos da pressão hidrostática. Embora sejam geralmente necessárias pressões acima de 500 MPa para provocar desnaturação, pressões menores, de 20-40 MPa, já são suficientes para induzir importantes modificações conformacionais capazes de levar à alterações na funcionalidade das proteínas (MOLINA-GARCIA, 2002). Isso ocorre devido à reorganização da camada de hidratação das proteínas quando submetidas à pressão hidrostática. A pressão força a inserção de moléculas de água entre domínios hidrofóbicos ou eletricamente carregados de maneira a promover uma redução do volume ocupado pela macromolécula (MENTRÉ e HUI BON HOA, 2001; SILVA *et al.*, 2001). Esse fenômeno leva ao enfraquecimento de interações iônicas e hidrofóbicas, tanto entre complexos protéicos, quanto na estrutura da própria proteína. De fato, foi comprovado que mesmo pressões modestas de 20 MPa são suficientes para induzir a dissociação de microtúbulos, *in vitro* (microtúbulos isolados) e *in vivo* (fuso mitótico celular) (ROBINSON e ENGELBORGHES, 1982; SALMON, 1975).

Interações proteína-DNA também podem ser perturbadas pela pressão hidrostática. Como exemplo, foi demonstrado que a enzima de restrição *Bam*HI perde afinidade por seu sítio no DNA devido a uma modificação estrutural induzida pela pressão de 30 MPa (LYNCH e SLIGAR, 2002). Apesar da síntese de DNA ser bastante sensível à pressão, sendo inibida, *in*

*vitro*, a 50 MPa, a síntese de RNA é um processo bastante estável sob pressão, persistindo mesmo até mais de 100 MPa (YAYAMOS e POLLARD, 1969).

Além das alterações estruturais, a constante de ionização de moléculas carregadas são afetadas pela pressão. A pressão hidrostática tende a favorecer o equilíbrio em direção à produção de espécies ionizadas, uma vez que moléculas carregadas interagem mais fortemente com a água, levando à redução do volume (ABE *et al.*, 1999). De fato, foi demonstrado que células de *S. cerevisiae* submetidas à pressão hidrostática sofrem acidificação intracelular, provavelmente em decorrência da dissociação de prótons de açúcares fosforilados e do H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ABE e HORIKOSHI, 1995; 1997).

Sendo assim, a pressão hidrostática constitui um estresse físico com características muito particulares, cujos mecanismos celulares utilizados para contrabalançar seus efeitos ainda permanecem pouco entendidos.

#### **7- Efeitos da pressão hidrostática em *Saccharomyces cerevisiae*.**

As conseqüências do estresse de pressão hidrostática para as células eucarióticas ainda são pouco conhecidas até mesmo para organismos modelos já bem caracterizados como a levedura *S. cerevisiae*. Inicialmente, foi demonstrado que um pré-tratamento com temperatura não letal (40°C) é capaz de induzir resistência em células de levedura submetidas ao estresse de pressão (IWAHASHI *et al.*, 1991). Esses dados sugerem que a pressão causaria os mesmos tipos de danos induzidos por temperaturas elevadas e, portanto, a resposta celular a esses dois estresses seria idêntica (IWAHASHI *et al.*, 1993). De fato, foi demonstrado que alguns fatores importantes para a sobrevivência ao calor, como a proteína de choque térmico Hsp104p, assim como o acúmulo de trealose, também contribuem para a resistência à pressão hidrostática (FUJI *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 1997).

Para células em fase exponencial de crescimento, a ausência da trealose torna as cepas mutantes deletadas na trealose 6-P sintase (*tps1*) mais sensíveis à pressão hidrostática, principalmente após a faixa de 100 MPa. Entretanto, foi demonstrado que para células de fase estacionária, essa diferença de sobrevivência entre as cepas selvagem e *tps1* não é tão pronunciada (FERNANDES *et al.*, 1997). Sabe-se que células em fase final de crescimento, além de acumularem trealose expressam uma série de genes regulados por estresse que estariam contribuindo para o aumento de sobrevivência da cepa mutante. Esse resultado indica que, provavelmente, outros fatores além da trealose são responsáveis pela sobrevivência à pressão. Corroborando essa idéia, foi demonstrado que mesmo as mutantes *tps1* são capazes de adquirir baroresistência quando submetidas a um pré-tratamento térmico,

mostrando que a trealose não é essencial para aquisição de resistência (FERNANDES *et al.*, 1997, 2001).

Estudos posteriores envolvendo fisiologia celular e expressão gênica revelaram que a pressão hidrostática não é essencialmente igual ao estresse causado pelo calor (MENTRÉ e HUI BON HOA, 2001; FERNANDES *et al.*, 2004; PALHANO *et al.*, 2004ab). Portanto, fica mais evidente que a pressão hidrostática causa um efeito complexo na fisiologia celular, fazendo com que a resposta à pressão hidrostática seja única. Como a levedura *S. cerevisiae* normalmente não enfrenta ambientes de alta pressão, o que se observa é uma resposta celular desencadeada pelos danos causados pela pressão e ao mesmo tempo uma soma da parte compartilhada de aspectos em comum com respostas celulares aos estresses mais variados como alta temperatura, baixa temperatura, etanol, oxidativo, osmótico, etc.

### **8- Regulação da transcrição de genes responsivos ao estresse.**

Em *S. cerevisiae*, a regulação da síntese dos genes de estresse está sob o controle de fatores de transcrição que são translocados para o núcleo quando a célula é exposta ao agente estressante. Destacam-se dois sistemas principais de transdução de sinal: o do fator de transcrição Hsf1p e o dos fatores Msn2/Msn4p (ESTRUCH, 2000).

A resposta ao choque térmico é ativada, principalmente, pelo fator de transcrição Hsf1p. Quando o mesmo se torna fosforilado em resposta a temperaturas elevadas, este fator é translocado para o núcleo e promove o aumento no nível de expressão dos genes cuja seqüência promotora apresenta o elemento de choque térmico (HSE) (MAGER e KRUIJFF, 1995).

Outro fator de transcrição, também participante da resposta ao choque térmico e comumente ativado por outros tipos de estresse, é o Msn2p e seu homólogo Msn4p. A migração desses fatores para o núcleo está relacionada à baixa atividade da PKA. Isso ocorre devido à diminuição dos níveis intracelulares do AMPc provocada pela baixa taxa de crescimento, característica essa, comum a células sob estresse ou carência nutricional. Dessa forma, a expressão dos genes sob controle desses fatores é reprimida durante o crescimento de *S. cerevisiae* em meio rico contendo fonte de carbono fermentável e induzida na fase de transição para o metabolismo respiratório, sob condições de limitação de nitrogênio e por diversos tipos de estresses, como choque térmico, alta osmolaridade, acidez e exposição ao etanol (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 1996).

Msn2/4p reconhecem a seqüência constituinte do elemento responsivo ao estresse (STRE). Essa seqüência foi identificada em muitos genes induzidos por estresse e está presente em

diversos genes já descritos que compõem a denominada resposta ao estresse ambiental (ESR). Uma busca no banco de dados do genoma de levedura identificou 186 genes contendo a seqüência STRE em seu promotor. Entretanto, foi experimentalmente comprovado que a simples presença da seqüência no promotor não garante que o gene seja regulado pelo respectivo fator de transcrição (ESTRUCH, 2000).

De fato, alguns tipos de estresse promovem, além da ativação dos fatores Msn2/4p e Hsf1p, a indução de outras vias de sinalização específicas. Na resposta ao estresse causado por meio hiper-osmótico, um dos eventos mais proeminentes é o acúmulo intracelular de glicerol. O acúmulo desse soluto permite à célula regular sua pressão de turgor e assim adaptar-se às condições osmóticas do meio. A regulação, tanto dos genes responsáveis pela síntese de glicerol, quanto de outros genes importantes para a sobrevivência sob alta osmolaridade, está sob o controle do fator de transcrição Hog1p. O mesmo é ativado por duas vias de sinalização independentes, deflagradas pelas proteínas de membrana Sho1p ou Sln1p que funcionam como sensores de osmolaridade. Ambas são ativadas, provavelmente, por alterações estruturais da membrana plasmática (ABERTYN *et al.*, 1994).

Nas respostas ao estresse oxidativo e à exposição a metais pesados, outros fatores de transcrição são especificamente ativados, Yap1p e Skn7p. Mutantes *yap1/skn7* são hipersensíveis ao estresse oxidativo. Esses fatores de transcrição controlam vários genes relacionados à defesa contra radicais livres, como por exemplo, o gene codificante para a enzima Gsh1p, implicada na biosíntese da glutathiona, uma molécula que atua como agente redutor neutralizando substâncias com alto poder oxidativo. Outras proteínas atuantes nas defesas antioxidantes também são reguladas por Yap1p e Skn7p, como as tioredoxinas Trx1p/Trx2p, as superóxido dismutases Sod1p/Sod2p e catalases Cta1p/Ctt1p. Além disso, a exposição ao cobre, através da ativação de Ace1p, induz especificamente os genes *CUP1/CUP2*, codificantes para proteínas capazes de se ligar ao cobre (WELCH *et al.*, 1989). Na figura 1 estão representadas as vias de sinalização em resposta a estresses em *S. cerevisiae*.

Interessantemente, é muito comum que genes responsivos ao estresse possuam mais de uma seqüência reguladora em seu promotor, podendo ser regulados de maneira diferente em cada situação. Esse é o caso de genes como o *CTTI* e o gene *CUP1* que, apesar de serem controlados pelos fatores de transcrição Yap1p e Skn7p, também possuem a seqüência HSE em seu promotor, sendo, portanto, regulados por Hsf1p e induzidos por choque térmico. Entretanto, alguns genes importantes, como o codificante para a proteína Hsp30p, ainda não possuem seu mecanismo regulador completamente elucidado. A indução do gene *HSP30* não

depende nem de STRE nem de HSE (HAMER *et al.*, 1985). Portanto, fica claro que a resposta celular ao estresse constitui um fenômeno complexo e envolve um intrincado mecanismo de regulação cuja compreensão envolve uma cuidadosa análise da resposta celular, não a um só tipo de situação, mas sim aos vários fatores que compõem o ambiente.

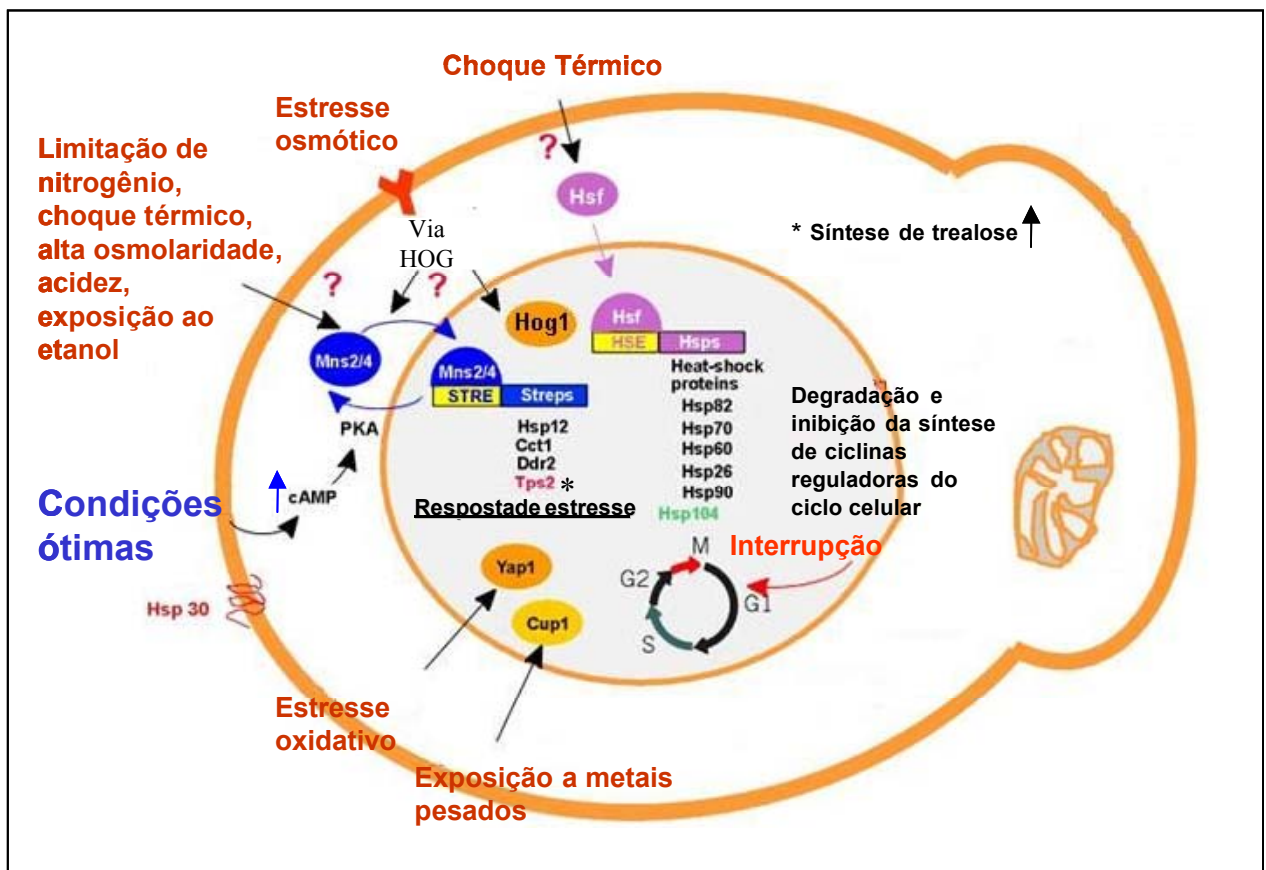


Fig 1. Visão geral das vias de sinalização em resposta ao estresse em *S. cerevisiae*. Mediante ao estímulo de estresse, fatores de transcrição são fosforilados e translocados para o núcleo onde desencadearão a transcrição de genes possuindo seqüências reguladoras em seus promotores. Além disso, há a repressão de genes relacionados à replicação celular o que induz a parada na fase G1 do ciclo mitótico. Estresses como calor, estresse osmótico e exposição ao etanol levam ao acúmulo de trealose. Modificado de [http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast\\_Biology/13\\_Regulation.htm](http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biology/13_Regulation.htm)

# Objetivos

---

## 1 – Objetivo geral.

Analisar as relações entre os estresses causados pela pressão hidrostática, óxido nítrico, altas temperaturas, baixas temperaturas, etanol e estresse oxidativo em células de levedura *S. cerevisiae*.

## 2 – Objetivos específicos.

1. Analisar o efeito da pressão hidrostática no ciclo celular da levedura e o tempo que as células levam para recobrar o crescimento normal;
2. Determinar o efeito citotóxico do óxido nítrico (NO) em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* crescendo na fase fermentativa ou respiratória;
3. Analisar o papel do NO na indução de barotolerância em leveduras;
4. Detectar a presença das isoformas da NO sintase (NOS) em leveduras, em diferentes fases de crescimento, na presença de fontes de carbono variáveis.
5. Investigar o efeito do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, etanol ou baixa temperatura na sobrevivência de células de levedura submetidas à alta pressão hidrostática;
6. Determinar o período de exposição ao peróxido de hidrogênio, etanol e baixa temperatura ideal para a indução máxima da barotolerância;
7. Analisar por RT-PCR a indução dos genes *YER067W*, *HSP30* e *HSP12* (genes induzidos por pressão hidrostática) nas condições de exposição ao peróxido de hidrogênio, etanol ou baixa temperatura;
8. Investigar o efeito do pré-tratamento de alta pressão hidrostática (HHP) na sobrevivência de células de levedura submetidas a estresses severos de choque térmico, alta pressão hidrostática ou congelamento;
9. Determinar o efeito da incubação à pressão e temperatura ambiente após o pré-tratamento com HHP na sobrevivência das células a estresses severos;
10. Analisar por RT-PCR a indução dos genes *HSP30*, *HSP12*, *HSP26*, *DDR2* e *ERG25* (genes induzidos por pressão hidrostática) em células de leveduras tratadas com

pressão hidrostática e posteriormente incubadas por diferentes períodos à pressão ambiente.



# MATERIAL E MÉTODOS

---

## 1. Microorganismos e condição de crescimento.

Células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* tipo selvagem Y440, proveniente do Laboratório do Dr. J. Broach da Universidade de Princeton, EUA, foram usadas para todos os experimentos desta dissertação, exceto para os estudos envolvendo sobrevivência de cepas de *S. cerevisiae* contendo mutações nos genes fortemente induzidos pela pressão, onde foram utilizadas cepas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Allan Wheals, University of Bath, provenientes do banco de cepas EUROSCARF, assim como sua respectiva selvagem BY4741 cedida pela Profa. Dra. Elvira Carvajal, UERJ. As cepas utilizadas (Tabela 1) foram crescidas em meio rico YEPD (2% glucose, 1% extrato de levedura, 2% peptona) ou YEPGal (2% galactose, 1% extrato de levedura, 2% peptona) pH 5,6 a 28 °C com constante aeração até a fase fermentativa ( $DO_{600\text{ nm}} = 1,0$ ) ou fase respiratória ( $DO_{600\text{ nm}} = 10,0$ ).

Tabela 1. Lista de cepas utilizadas nesta dissertação.

ORFs deletadas	Genótipo
YER067W	MATa <i>his3delta1 leu2delta0 met15delta0 ura3delta0 yer067w::KanMX4</i>
YFLO14W (HSP12)	MATa <i>his3delta1 leu2delta0 met15delta0 ura3delta0 yfl014w::KanMX4</i>
YCR021C (HSP30)	MATa <i>his3delta1 leu2delta0 met15delta0 ura3delta0 ycr021c::KanMX4</i>
BY4741 (Selvagem)	MATa <i>his3delta1 leu2delta0 met15delta0 ura3delta0</i>
Y440 (Selvagem)	MATa <i>leu2-3</i>

## 2- Determinação da taxa de gemulação.

As células de levedura foram fixadas em solução de formaldeído a 20%, diluídas e contadas no microscópio óptico usando-se um hemocitômetro. A taxa de gemulação foi determinada pelo número de células gemulando dividido pelo total de células.

## 3- Tratamento com pressão hidrostática.

Para o tratamento com HHP, foi utilizado um sistema de alta pressão hidrostática desenvolvido pelo Prof Dr Marcos T.D. Orlando (ORLANDO, 1999).

As células de levedura foram colocadas em um tubo de Teflon utilizando-se uma cápsula de pressão de BeCu, com diâmetro interno e externo de 36 mm e 10 mm, respectivamente, similar à usada em outros trabalhos (FERNANDES *et al.*, 1991; ORLANDO, 1999; DOMITROVIC *et al.*, 2003). A pressão foi obtida pela compressão do tubo de Teflon usando-se uma prensa hidráulica operada manualmente (Eureka Ltda, MG, Brasil). A pressão interna foi medida usando-se um manômetro calibrado (Woler Ind. Brasileira, MG, Brazil). Um desenho esquemático da câmara de alta pressão é mostrado na Fig 2. As amostras foram pressurizadas em meio rico YEPD pH 5,6 em ausência de bolhas de ar. O tempo para compressão e descompressão das amostras foi menor que 1 min, para os dois processos.

As células de levedura foram submetidas a valores de pressão hidrostática de 25, 50, 75, 100 e 220 MPa por 30 min a temperatura ambiente (~25 °C).

#### **4- Doadores de Óxido Nítrico.**

Nitroprussiato de sódio (SNP), (Merck Chemical Ind., Darmstadt, Germany) e S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) gentilmente cedido pelo Dr. Jamil Assreuy, UFSC, SC, foram usados como doadores de NO. As soluções foram preparadas dissolvendo-se o sal em água estéril ultrapura imediatamente antes do uso. As culturas de leveduras foram tratadas com SNP ou SNAP em concentrações variando de 0,5 a 3,0 mM. Além disso, experimentos similares foram conduzidos com nitrito e nitrato de sódio afim de verificar se ambos tinham algum efeito citotóxico em células de levedura (Merck Chemical Ind.).

#### **5- Determinação de NO.**

NO foi dosado indiretamente utilizando o método de Griess (GRANGER *et al* 1990), medindo-se o nitrito formado pela decomposição do NO: 0,4 ml 1% (p/v) sulfanilamida em 2,5% (v/v) de ácido fosfórico e 0,4 ml 0,5% (p/v) N-(1-naftil) etilenodiamino diidrocloreto em 2,5% (v/v) de ácido fosfórico foram adicionados à 0,2 ml da amostra. Após 10 min à 25 °C, foi feita a medida da absorbância a 540 nm. Como padrão de dosagem foi utilizado nitrito de sódio (0-25 µM).

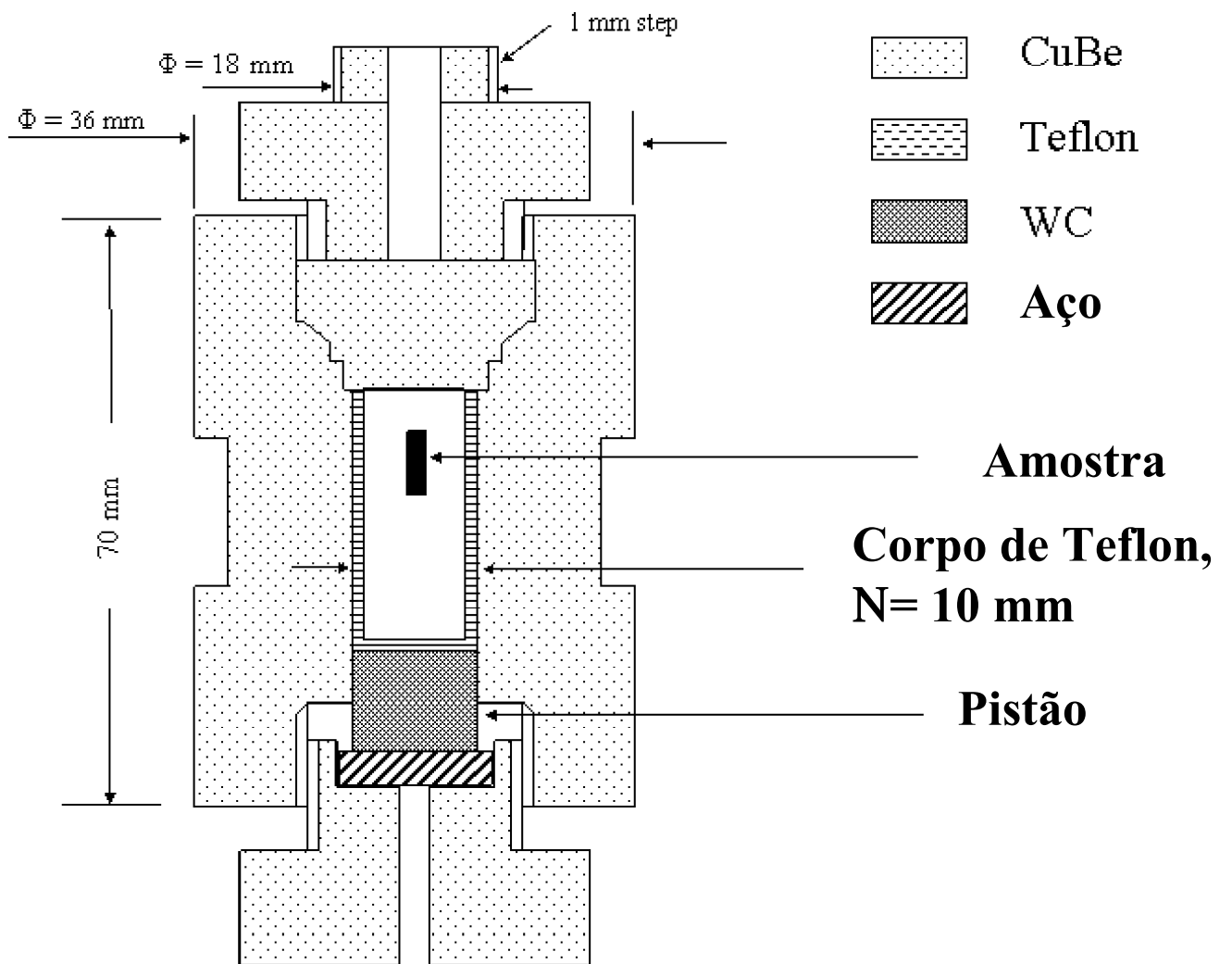


Fig 2. Diagrama da câmara de alta pressão hidrostática. CuBe significa a liga de cobre e berílio usada e WC carbeto de tungstênio.

**6- Tratamento com temperatura alta.**

Células de levedura ( $DO_{600\text{ nm}} = 1,0$ ) foram submetidas a temperaturas de 40 °C ou 54 °C por 30 e 20 minutos, respectivamente.

**7- Tratamento com temperaturas baixas.**

Células de levedura ( $DO_{600\text{ nm}} = 1,0$ ) foram submetidas a 10 °C por 1, 2 e 4 horas.

Para os tratamentos severos de temperatura fria (UCT), as leveduras foram congeladas em nitrogênio líquido por 24 horas e descongeladas a temperatura ambiente.

**8- Tratamento com peróxido de hidrogênio.**

Células de levedura crescidas até a primeira fase logarítmica ( $DO_{600\text{ nm}} = 1,0$ ) foram tratadas com 0,40 mM de peróxido de hidrogênio por 30, 45 e 60 minutos. Em seguida aos tratamentos, as células foram centrifugadas, lavadas com água ultrapura estéril, e, após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em meio rico. Subseqüentemente, a cultura foi submetida à alta pressão hidrostática.

**9- Tratamento com etanol.**

Células de *S. cerevisiae* ( $DO_{600\text{ nm}} = 1,0$ ) foram tratadas com 6% de etanol por 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ou 4.0 horas. Após o tratamento as células foram pressurizadas em meio rico na presença ou ausência do etanol.

**10- Viabilidade celular.**

Após os tratamentos, as células foram diluídas apropriadamente e plaqueadas em meio sólido YEPD. A viabilidade celular foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após dois dias de crescimento a 28 °C. Todas as placas foram feitas em duplicata.

Como controle para todos os tratamentos, as células de levedura foram crescidas em meio rico até a primeira fase exponencial e então submetidas, sem pré-tratamento, aos estresses severos (alta pressão hidrostática, choque térmico ou congelamento em N<sub>2</sub> liq).

**11- Extração de proteínas e análise por *Western blotting*.**

As células foram coletadas por centrifugação (2000 X g) e lavadas 3 vezes em água estéril gelada. O precipitado foi ressuscitado em 5 µl de tampão de extração (50 mM Tris-Base, pH 7,2; 300 mM de NaCl; 1,5 µM pepstatina e PMSF). As células foram rompidas com pérolas de vidro (425-600 µm, Sigma, St. Louis, EUA) agitando-se por 1 min, intercalando 1 min no gelo. Esse procedimento foi repetido 5 vezes.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al*, 1951) e ajustada para 50 µg. Cada amostra contendo 50 µg de proteína foi submetida à eletroforese e imunotransferência. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi feita em gel 10% de acrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, Sunnyvale, EUA) durante 2 h (80 mA) em tampão Tris-glicina (25 mM Tris-HCl, pH 7,0, glicina 192 mM) contendo 20 % de metanol. As membranas PVDF foram incubadas em TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05% Tween-20) contendo 2 % de albumina de soro bovina (Sigma, St. Louis, EUA) por 12 h a 4 °C. Então, as membranas foram incubadas por 2 h a temperatura ambiente com os seguintes anticorpos primários: coelho (policlonal) anti-NOS2 (sc-651) ou anti-NOS3 (sc-8311) (2 µg.ml<sup>-1</sup>, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, EUA) ou de camundongo (monoclonal) anti-NOS1 (1:500, Sigma, St. Louis, EUA). Após extensiva lavagem em TBS, as membranas PVDF foram incubadas com anticorpo anti IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase (1: 2000, Sigma, St. Louis, EUA). A imunoreatividade das proteínas foi visualizada usando-se 3,3'-diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, EUA), substrato para a peroxidase e a imagem capturada por uma câmera digital (Nikon, Coopix 885, S. Korea).

## **12- Extração do RNA.**

Para extração de RNA, tanto das amostras controle quanto das tratadas, 4 ml de células Y440 na DO<sub>(600 nm)</sub> 1,0 foram crescidas a 28 °C. Os tratamentos foram os seguintes:

- a- Controle (células crescidas a 28 °C sem nenhum tratamento),
- b- 50 MPa por 30 min,
- c- 50 MPa por 30 min seguido de 0,1 MPa por 15 min,
- d- 50 MPa por 30 min seguido de 0,1 MPa por 30 min,
- e- 50 MPa por 30 min seguido de 0,1 MPa por 60 min,
- f- 6% de etanol por 60 min,
- g- 10 °C por 2 h,
- h- 0,4 mM de peróxido de hidrogênio por 45 min.

Após o tratamento, as amostras foram imediatamente colocadas no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 3 minutos a 5 °C, sendo o precipitado imediatamente congelado em N<sub>2</sub> líquido e mantido a -20 °C até o momento da extração de RNA. Os precipitados congelados correspondentes às células foram ressuspensos em 400 µl de tampão AE (acetato de sódio 50 mM, EDTA 10 mM, pH 5,3). A extração do RNA total foi prosseguida pelo método de fenol ácido (AIBA *et al.*, 1981).

Ao precipitado de células suspenso em 400 µl de tampão AE, foram adicionados 40 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. A suspensão foi brevemente agitada e logo em seguida, foram acrescentados 500 µl de fenol equilibrado a pH 5,5. Após agitação intensa por 5 min, as amostras foram incubadas a 65°C por 4 minutos e logo em seguida, rapidamente resfriadas em N<sub>2</sub> líquido, sendo, então, centrifugadas a 10.600 g por 5 minutos a 4 °C. A fase aquosa obtida foi transferida para novos tubos contendo igual volume de fenol clorofórmio (2 : 1) e após agitação intensa, as amostras foram novamente centrifugadas a 10.600 g por 10 minutos a 4 °C. À fase aquosa proveniente dessa centrifugação, foram adicionados 500 µl de etanol 100 % gelado e 25 µl de acetato de sódio 3 M. A solução foi incubada por 2 h a - 20 °C e depois submetida à centrifugação a 10.600 g por 30 minutos a 4 °C.

O precipitado de RNA foi lavado com etanol 70 % e em seguida solubilizado em água ultrapura para os diversos procedimentos experimentais ou em etanol 70 % para estocagem a -20 °C. Para a remoção de qualquer resíduo de DNA genômico, as amostras de RNA total foram tratadas com 0,5 U DNase I livre de RNase para cada 1 µg de RNA, durante 15 minutos a 37 °C.

### **13. Síntese da primeira fita de cDNA.**

Amostras de RNA extraídas de células de levedura conforme descrito no item 12 foram submetidas à síntese da primeira fita de cDNA. Para 25 µl de volume de reação contendo 1 µg de RNA, adicionou-se: 0,2 µg/µl de hexadonucleotídeos randômicos pd (N)<sub>6</sub>, 0,34 mM de cada dNTP, tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 6,8 mM e 60 U de transcriptase reversa M-MLV (Life Technologies). A reação foi a 37°C por 1 hora e interrompida com inativação da enzima a 90°C por 5 minutos. O cDNA resultante foi estocado a -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

### **14. PCR semi-quantitativo.**

O cDNA resultante foi amplificado em 25 µl de meio de reação contendo 2,5 µl da reação de primeira fita, 50 pmol de oligonucleotídeos específicos, dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM,

2.5 U de Taq polimerase (Promega), 2,5 µl tampão da enzima (Tris-HCL 10 mM, KCl 50 mM e 0,1% de Triton ® X-100). Na Tabela 1 estão descritos os genes avaliados, a seqüência dos seus respectivos oligonucleotídeos, assim como o tamanho do fragmento amplificado. A condição utilizada para a amplificação dos fragmentos correspondentes ao fragmento de cDNA dos genes *HSP30* e *HSP12* foi de 94 °C por 1 minuto, 47 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto seguido de 5 minutos de incubação a 72 °C, enquanto que para os genes *YER067W*, *ACT1*, o programa utilizado foi o mesmo exceto pela temperatura de anelamento alterada para 56 °C e 53 °C, respectivamente. As curvas de amplificação para esses quatro genes foram obtidas através da coleta de amostras de PCR a ciclos de 24, 30, 36 e 40 (Fig 10) ou 24, 32 e 40 (Fig 14). Para a comparação do nível de expressão dos genes *HSP26* e *DDR2*, as amostras foram coletadas nos ciclos de número 24, 32 e 40. As condições de PCR para esses genes foram similares aos genes descritos acima, exceto pela temperatura de anelamento alterada para 37 °C e 46 °C, respectivamente. Para o gene *ERG25* as amostras foram coletas nos ciclos 30, 38 e 45, nas seguintes condições 94 °C por 1 min, 38 °C por 0,5 min e 72 °C por 1,5 min. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados nas reações de RT-PCR semiquantitativo.

RNAm alvo (tamanho do fragmento em pb)	Seqüência do oligonucleotídeo
HSP12 (192)	Senso, 5'CCAGACTCTCAAAGTCATA3' Anti-senso, 5'CATGTAATCTCTAGCTTGGT3'
HSP30 (377)	Senso, 5'TTGACTAGATATGCCTTAGC3' Anti-senso, 5'GTGTAATAACCCCACTTGTA3'
HSP26 (629)	Senso, 5'CAGTCCATTTTTTGATTTTC3' Anti-senso, 5'TTACCCACGATTCTTGAGA3'
DDR2 (165)	Senso, 5'GTTTTCATTTCTGCCATC3' Anti-senso, 5'TCAAAAAGGCCAAAGCAC3'
ERG25 (906)	Senso, 5'CGTTTTCAACAACGCTAC3' Anti-senso, 5'TTGAGCATTGTTTTCAGC3'
YER067W (504)	Senso, 5'ATGACAAAGAAGGATAAGAAGGAAGTAAAAGTTCAAACG3' Anti-senso, 5'TTGATCCACGCGGAACCAGATTTGCGCCTACAGGATGT3'
ACT1 (755)	Senso, 5'TACGTTTCCATCCAAGCC GTT3' Anti-senso, 5'AACATACGCGCACAAA AGCAGA3'

### 15. Aquisição de imagens.

As amostras foram visualizadas através de eletroforese em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídio (Sigma, St. Louis, EUA). As imagens foram geradas por uma câmera digital (Nikon, Coopix 885, S. Korea).

### 16- Extração e dosagem dos níveis de trealose.

Para extração de trealose, tanto das amostras controle quanto das tratadas, 30 ml de células Y440 na  $DO_{(600\text{ nm})}$  1,0 foram crescidas a 28 °C (PARROU *et al.*, 1997). Os tratamentos foram os seguintes:

- a- Controle (células crescidas a 28 °C sem nenhum tratamento),
- b- 50 MPa por 30 min,
- c- 50 MPa por 30 min seguido de 0,1 MPa por 15 min,
- d- 50 MPa por 30 min seguido de 0,1 MPa por 30 min,
- e- 50 MPa por 30 min seguido de 0,1 MPa por 60 min,

Após o tratamento, as amostras foram imediatamente colocadas no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 g por 2 minutos. O pellet foi lavado com água estéril gelada e centrifugado com descrito acima. Esta etapa foi repetida mais uma vez. O precipitado foi imediatamente congelado em N<sub>2</sub> líquido e mantido a -20 °C até o momento da extração da trealose. Os precipitados congelados foram ressuspensos em 125 µl de carbonato de sódio 0,25 M e aquecido a 95 °C por 2 h. Após a extração, o pH da suspensão foi ajustado para 5,2 usando 75 µl de ácido acético 1M e 300 µl de tampão acetato 0,2 M pH: 5,2. As amostras foram incubadas durante a noite 37 °C em presença de 3 mU de trealase (Sigma, St. Louis, EUA). A glicose liberada foi determinada com o reagente de glicose oxidase (BioSystems S.A, Barcelona, Espanha).

### 17- Análises estatísticas.

Todos as placas foram feitas em duplicata e cada experimento foi feito em triplicata. Utilizando-se o programa Prism® (Graphpad Software, Inc, San Diego, EUA), foram feitos os gráficos e o desvio padrão de três experimentos independentes foi representado por barras de erro.



# RESULTADOS

---

## 1- Taxa de gemulação de células de levedura tratadas com pressão hidrostática.

Na levedura *S. cerevisiae* a presença do broto (ou gêmula) reflete a posição no ciclo celular; a célula no intervalo G1 do ciclo não está gemulando e o broto aparece no momento em que a célula entra na fase S. Quando as células de *S. cerevisiae* são expostas à limitação de nutrientes, ao feromônio sexual ou ao estresse brando, elas param em um ponto exato no final da fase G1 do ciclo celular conhecido como START (CRAIG, 1992, LEW *et al.*, 1992, WHEALS, 1987). Verificamos que esse fenômeno também acontece quando células de levedura são submetidas a HHP de 50 MPa por 30 min, levando a parada de crescimento, ocorrendo acúmulo de células sem gêmula (Fig 3).

As células de levedura em primeira fase exponencial ( $DO_{600nm} = 1,0$ ) foram pressurizadas a 50 MPa por 30 min e então incubadas à pressão atmosférica por 120 min. Foi observada uma diminuição no número de células gemulando durante o estresse de pressão, atingindo o valor mínimo 45 min após o tratamento com pressão. As células começam a recobrar o crescimento 60 min após o estresse. Apenas 2 h depois, a taxa de gemulação volta ao normal. Para comparar o efeito da pressão hidrostática no crescimento celular, foi feito o mesmo experimento após o choque térmico de 40 °C por 30 min. As células pressurizadas mostraram uma resposta mais lenta e demoraram mais para recobrar o crescimento que células tratadas com calor (Fig 3).

## 2- Efeito do NO no ciclo celular de levedura.

Visando observar o efeito do NO em *S. cerevisiae*, culturas de células em diferentes fases exponenciais de crescimento foram tratadas com diferentes concentrações dos doadores de NO, SNP ou SNAP, durante 6h. Em concentrações variando de 0,1 a 1,0 mM, o SNP não teve efeito inibitório em células na fase fermentativa, além disso, a taxa de gemulação permaneceu igual ao controle. Células tratadas com concentrações acima de 1,5 mM apresentaram um aumento no tempo de geração, demonstrando um efeito citotóxico do NO (Fig. 4 A). A inibição do ciclo celular é grandemente aumentada na fase respiratória, onde uma concentração baixa de 0,5 mM de SNP foi suficiente para causar uma forte diminuição no crescimento celular (Fig. 4 C). Células

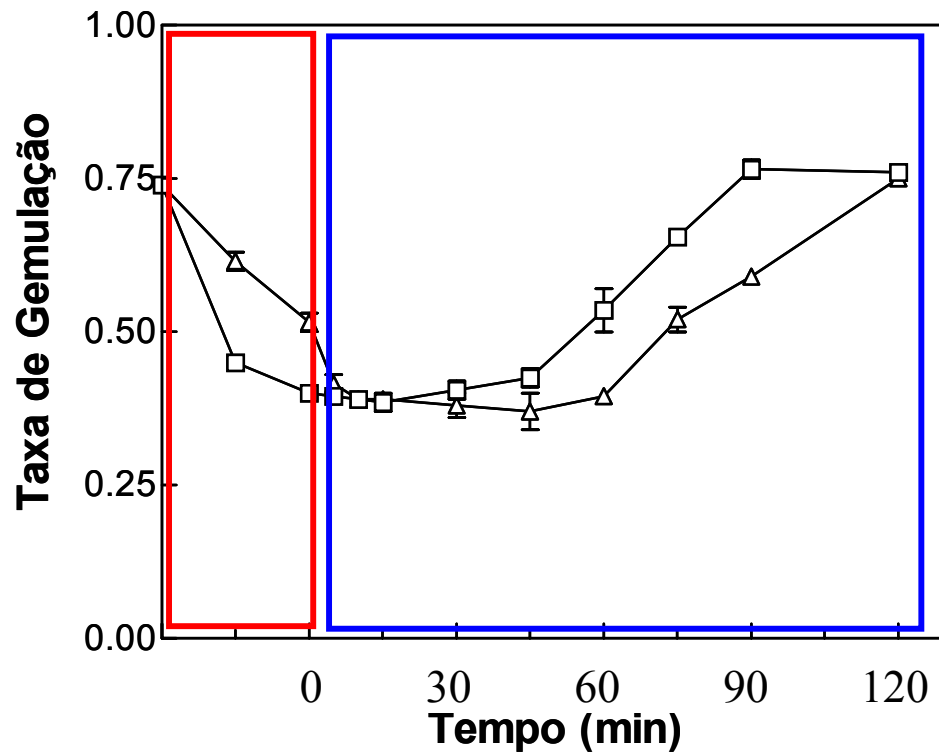


Fig 3. Taxa de gemulação de células tratadas com pressão. Células de *Saccharomyces cerevisiae* foram submetidas à alta pressão hidrostática de 50 MPa por 30 min, em seguida as células foram incubadas a pressão atmosférica (0,1 MPa) por 120 min (triângulos). A resposta ao choque térmico foi usada como controle (quadrados). A área delimitada em vermelho corresponde taxa de gemulação das células durante os estresses de calor ou pressão, enquanto a área em azul representa a taxa de gemulação das células após os estresses testados.

de levedura na fase respiratória, tratadas com 1,5 mM de SNP têm uma diminuição de 50% na taxa de gemulação comparada com células não tratadas. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que demonstram que a citotoxicidade mediada pelo NO é aumentada pelo O<sub>2</sub> e outras espécies reativas (CHIANG *et al.*, 2000a). Além disso, a nitrosilação da região heme do complexo IV na cadeia respiratória reconhecidamente resulta em uma potente inibição da respiração e contribui para os efeitos citotóxicos do NO.

Entretanto, SNAP, outro doador de NO, quando usado nas mesmas concentrações que SNP mostrou efeitos citostáticos, não causou alterações no ciclo celular (Fig. 4 B e D). Uma cinética distinta de liberação de NO é descrita para ambos compostos (BULTER e MEGSON, 2002), por tanto, o método de Griess foi usado para se comparar quantitativamente o NO liberado pelos dois doadores. Como o NO é um composto extremamente instável, sua dosagem é feita de forma indireta pela determinação de nitrito, o produto de sua degradação. Após 30 min de incubação em meio de cultura sem células, SNAP e SNP geraram quantidades similares de nitrito (20-30 µM). Entretanto, na presença de células de levedura, a liberação de NO pelo SNP foi mais rápida, atingindo o mesmo valor (25µM) em poucos minutos e a decomposição do SNAP não foi afetada pela presença de células no meio. Esta observação está de acordo com as diferentes características químicas destes compostos e sugere que a cinética de liberação do NO é um importante fator na sua toxicidade. Outra explicação baseia-se no efeito tóxico do cianeto liberado pelo SNP. Entretanto, dados da literatura atestam que o cianoferrato formado,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , é biologicamente inerte e é improvável que cause envenenamento por cianeto (BULTER e MEGSON, 2002). Além do mais, quando células de levedura foram tratadas com SNP decomposto, ou com nitrito e nitrato, nenhum efeito citotóxico foi observado (dados não apresentados).

### **3- Detecção de diferentes isoformas da NOS.**

Para a detecção das diferentes isoformas da NOS (NOS1, NOS2 e NOS3), foram feitas análises por *Western blotting* em *S. cerevisiae* em diferentes fases do crescimento, na presença de glicose ou galactose (Fig. 5). Não foi observada banda no gel relacionada a nenhuma das isoformas da NOS em células em fase estacionária. Entretanto, durante a primeira e a segunda fases exponenciais, uma banda pode ser observada para cada uma das isoformas testadas. As massas moleculares observadas no gel são correspondentes com as isoformas encontradas em camundongos: 160, 130 e 132 kDa para a NOS1, NOS2 e NOS3, respectivamente.

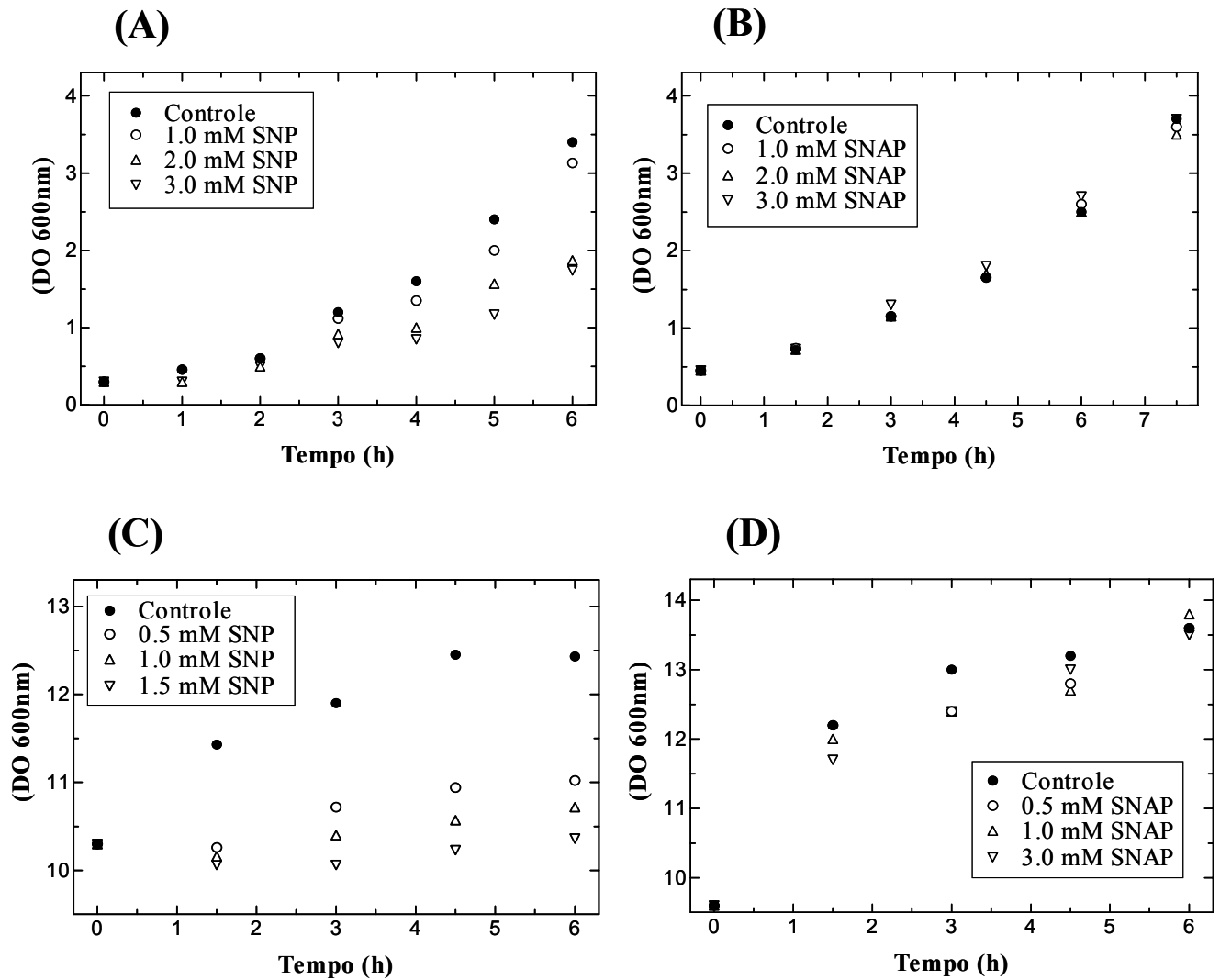


Fig 4. Efeito do aumento da concentração de diferentes doadores de NO no crescimento de *S. cerevisiae*. Células na primeira fase exponencial foram crescidas em presença de SNP (A) ou SNAP (B) em concentrações variando entre 1,0 a 3,0 mM. Células na segunda fase exponencial foram crescidas com 0,5, 1,0 e 1,5 mM de SNP (C) ou SNAP (D). Amostras das culturas foram retiradas a cada hora durante 6 h e foi observada a absorvância a 600 nm. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. As barras de erro são menores do que os pontos.

As isoformas constitutivas da NOS1 e NOS3 (conhecidas como neuronal e endotelial em mamíferos) foram expressas em células crescendo em fase exponencial, mas não foram detectadas na fase estacionária. Por outro lado, a expressão da NOS2 (chamada induzível em mamíferos, expressa principalmente em macrófagos) foi claramente induzida durante fermentação, como pode ser visualizado como um forte sinal no *Western blot* (Fig. 5, linha 2). Mesmo quando a galactose (uma fonte de carbono menos repressiva em relação à glicose) foi usada como substrato fermentativo, a enzima foi claramente detectada (Fig. 5).

O tratamento térmico de 40 °C por 1 h não leva a uma indução das isoformas de NOS (Fig 5, linhas 5,6 e 7). Ao contrário, comparando células não tratadas com células tratadas com calor, nas duas fases exponenciais (Fig 5, linhas 2 e 5), foi observada uma diminuição na expressão da NOS2, indicando que a indução da NOS não faz parte da cascata de proteção induzida pelo calor. Entretanto, diferentemente do calor, os resultados de *Western blot* mostraram que a expressão da NOS2 não foi diminuída quando as células foram submetidas ao tratamento de 50 MPa por 30 min (Fig. 5).

#### **4- Indução de barotolerância mediada por NO.**

Para analisar o papel do NO na indução de barotolerância em leveduras, células de levedura em primeira fase exponencial ( $DO_{600\text{ nm}} = 1,0$ ) foram tratadas com 1 mM de SNP por 10 min e submetidas à pressão de 220 MPa por 30 min, em meio rico. O mesmo experimento foi conduzido com células tratadas com 1,0 mM de SNAP durante 90 min. Como controle negativo, as células foram submetidas à mesma pressão hidrostática sem nenhum tratamento prévio. A sobrevivência das células foi aumentada pelo NO quando liberado por SNP ou SNAP na concentração de 1,0 mM (Fig 6), sendo a taxa de sobrevivência 500 vezes maior que células não tratadas.

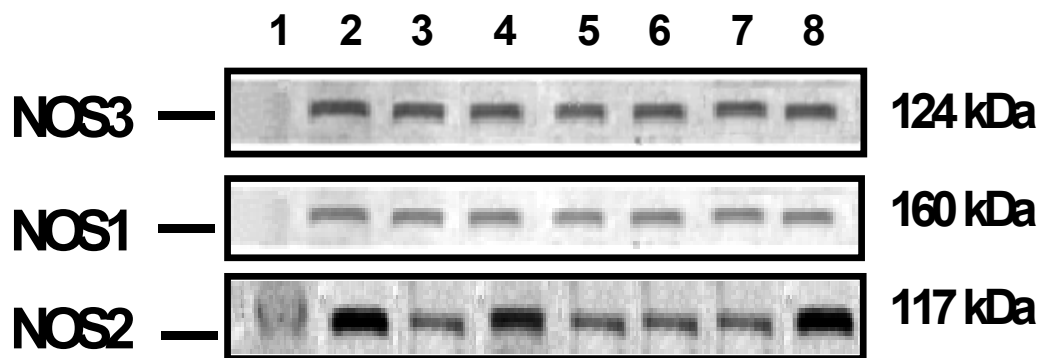


Fig 5. Análise por *Western blotting* da expressão das isoformas endotelial, neuronal e induzível da NOS (NOS3, NOS1 e NOS2): linha 1, células em fase estacionária crescidas em YEPD; linha 2, células em primeira fase exponencial em YEPD; linha 3, segunda fase exponencial em YEPD; linha 4, primeira fase exponencial em YEPGal; linha 5, primeira fase exponencial em YEPD tratadas com 40 °C por 1 h; linha 6, segunda fase exponencial em YEPD tratadas com 40 °C por 1 h; linha 7, primeira fase exponencial em YEPGal tratadas com 40 °C por 1h; linha 8, primeira fase exponencial em YEPD tratadas à 50 MPa por 30 min.

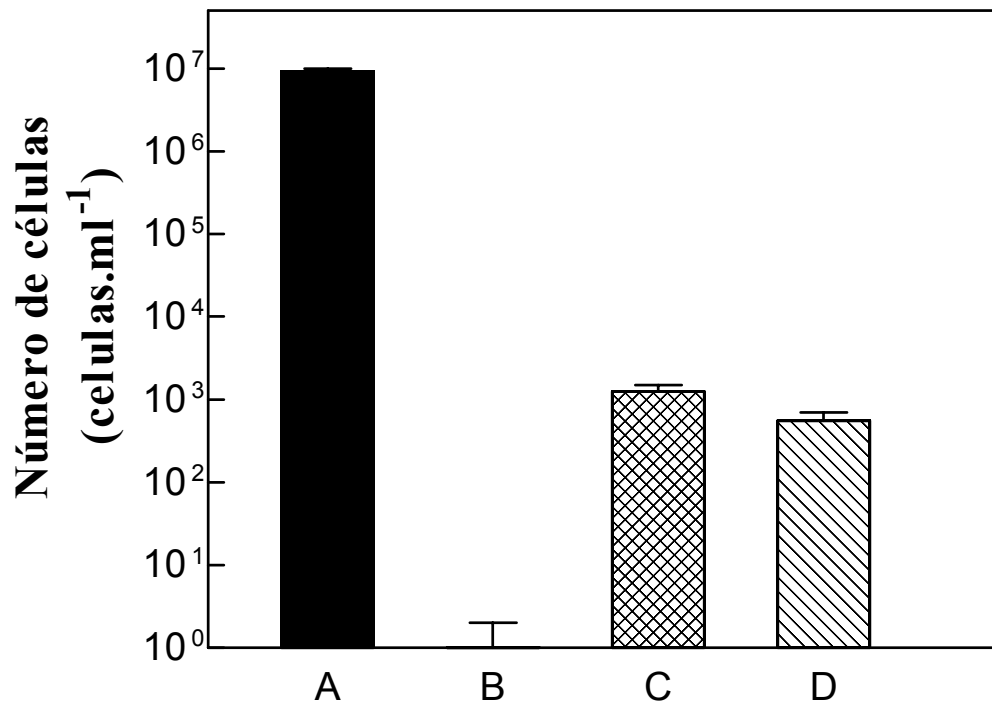


Fig 6. Indução de barotolerância através do tratamento com doadores de NO. Células em primeira fase exponencial foram pressurizadas a 220 MPa por 30 min após tratamento com 1,0 mM de SNP por 10 min (C) ou após 90 min na presença de 1,0 mM de SNAP (D). Como controle negativo, as células foram submetidas à mesma pressão hidrostática sem o prévio tratamento (B). A barra negra (A) representa as células que não foram pressurizadas. A barra de erro indica a média do erro padrão de três experimentos independentes.

### **5- Barotolerância induzida por pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.**

Foi investigado o efeito do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio na tolerância de leveduras expostas a alta pressão hidrostática. Na figura 7, observa-se que o pré-tratamento com 0,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de induzir baroresistência. A baroresistência das células foi dependente do tempo, sendo que depois de 45 min de tratamento foi obtido o maior valor de sobrevivência. Após 60 min a barotolerância diminuiu.

Um dos genes mais importantes na resposta ao estresse oxidativo é o gene *GSH1* que codifica para  $\gamma$ -glutamilcisteína sintase, enzima requerida para biossíntese de glutatona (GSH). GSH é o mais abundante componente intracelular contendo o grupo tiol e atua como um sequestrador de radicais livres através de seu grupamento sulfidril que possui atividade redox (Jamieson, 1998). Quando pressurizadas na presença de GSH, as células de levedura foram protegidas dos efeitos deletérios da HHP (Fig. 8). É importante notar que apesar do meio rico YEPD conter glutatona, a concentração deste composto no meio não é suficiente para conferir resistência a HHP, já que células submetidas a HHP em água, solução salina ou YEPD mostraram a mesma taxa de sobrevivência (dados não mostrados).



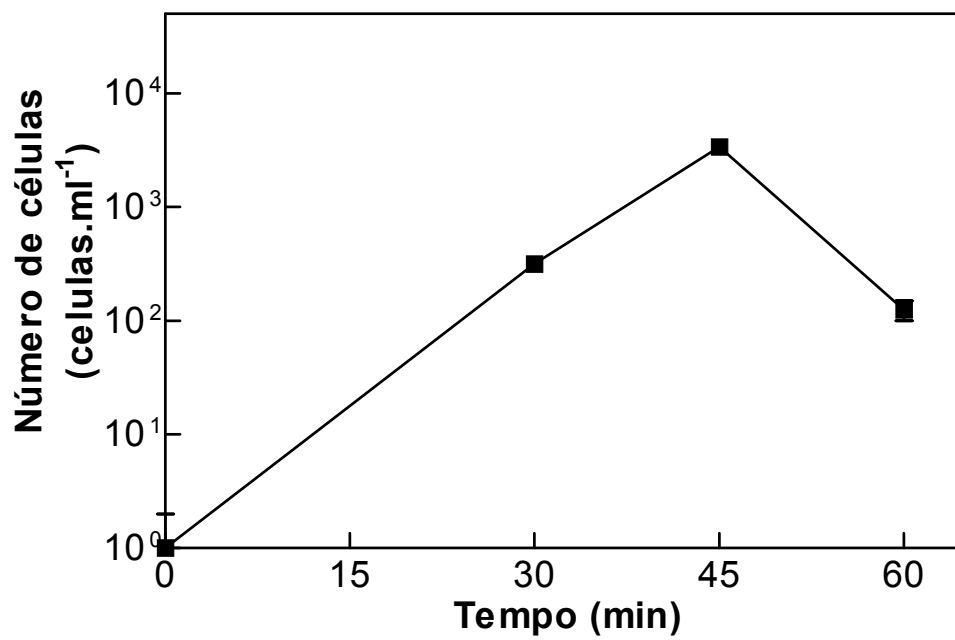


Fig 7. Indução de barotolerância por pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Células de *S. cerevisiae* crescendo em primeira fase exponencial (10<sup>7</sup> células.ml<sup>-1</sup>) foram tratadas com 0,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por diferentes períodos de tempo, lavadas com água e ressuspendidas em meio rico. Em seguida, foram submetidas a 220 MPa por 30 min. O ponto zero representa células submetidas à pressão hidrostática sem pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.

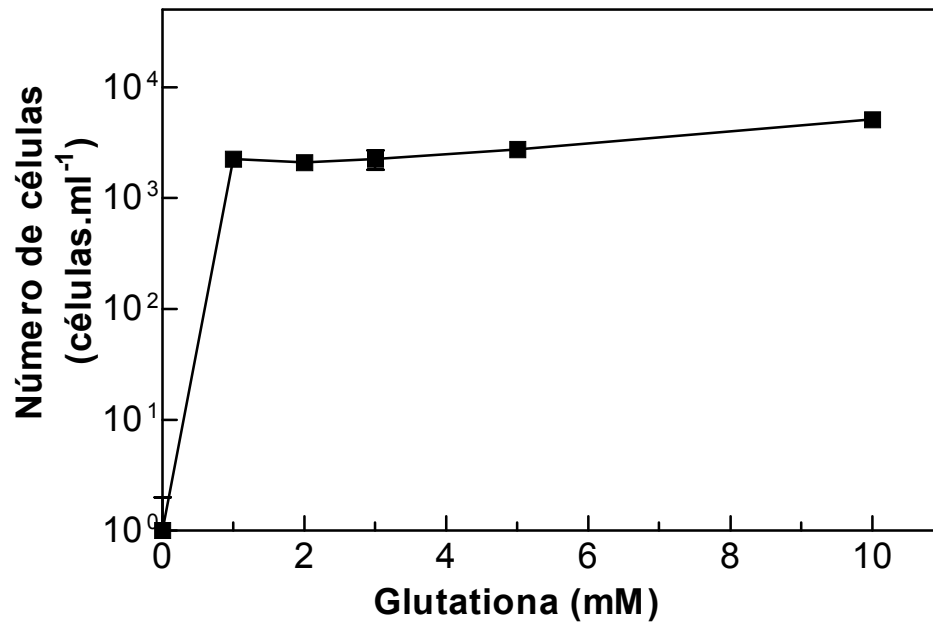


Fig 8. Resistência à alta pressão hidrostática em presença de glutatona. Células de *S. cerevisiae* crescidas em meio rico na primeira fase exponencial ( $10^7$  células.ml<sup>-1</sup>) foram pressurizadas a 220 MPa por 30 min na presença de diferentes concentrações de glutatona. O ponto zero representa as células submetidas à pressão na ausência de glutatona.

#### **6- Barotolerância induzida por pré-tratamento com etanol.**

A viabilidade das células de *S. cerevisiae* expostas a HHP foi analisada em células pré-expostas ao estresse subletal de etanol (Fig. 9). Um aumento na tolerância a HHP foi observado após o tratamento com 6% de etanol, alcançando o máximo de sobrevivência entre 1,5 e 2 h de tratamento. Após 4 h de tratamento com etanol, ainda existe alguma proteção, sendo menor que 1 log. Uma importante característica da proteção conferida pelo etanol é que ele deve estar presente durante a pressurização. Quando as células pré-tratadas com etanol foram ressuspensas em meio fresco YEPD imediatamente antes da pressurização, a barotolerância não foi observada.

#### **7- Indução de barotolerância por exposição a 10 °C.**

A figura 10 mostra o efeito do pré-tratamento com temperatura baixa de 10 °C na indução de baroresistência em leveduras. É observado um aumento significativo na sobrevivência celular após incubação das células a 10 °C por 1 ou 2 h. Observou-se uma leve diminuição na barotolerância após 4 h de tratamento.

#### **8- Análise semiquantitativa da transcrição dos genes *YER067W*, *HSP30* e *HSP12* por RT-PCR.**

Entre os genes induzidos pela pressão hidrostática destacam-se os genes *YER067W*, *HSP30* e *HSP12* (FERNANDES *et al.*, 2004). Para a análise da expressão desses genes quando as células são submetidas a diferentes estresses ( $H_2O_2$ , etanol, baixa temperatura e pressão hidrostática), foi feita a análise semiquantitativa da transcrição por RT-PCR. Os resultados apresentados na figura 11 revelam que os genes *YER067W*, *HSP30* e *HSP12* são fortemente induzidos por etanol,  $H_2O_2$  e por pressão hidrostática. Entretanto, o estresse causado pela mudança da temperatura de 28 °C para 10 °C foi capaz de induzir apenas o gene *HSP12*.

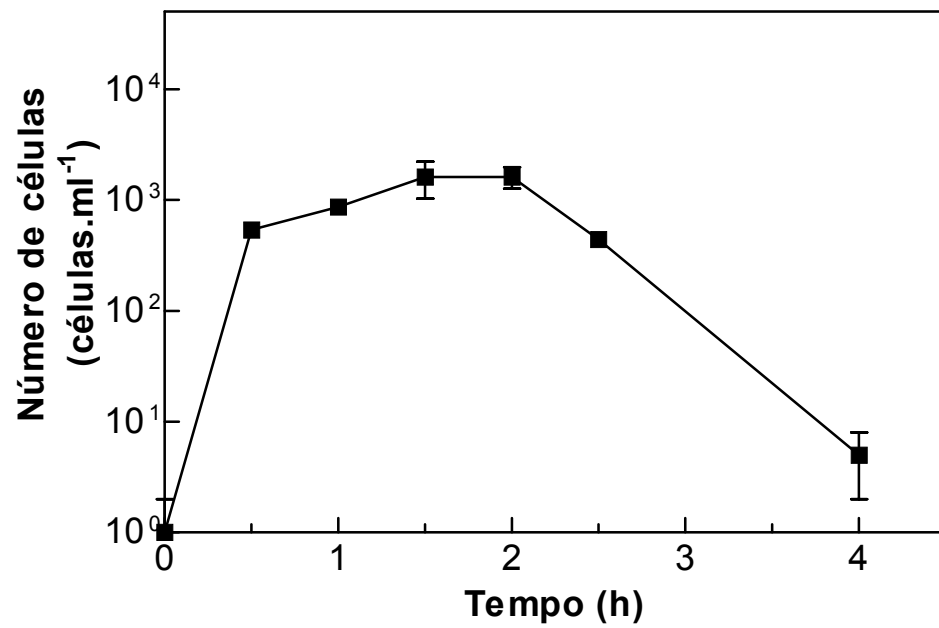


Fig 9. Barotolerância induzida pelo etanol. Células de *S. cerevisiae* crescidas em meio rico em primeira fase exponencial ( $10^7$  células.ml<sup>-1</sup>) foram tratadas com 6% de etanol por diferentes períodos de tempo e pressurizadas a 220 MPa por 30 min em presença de etanol. O ponto zero representa as células submetidas à pressão sem tratamento com etanol.

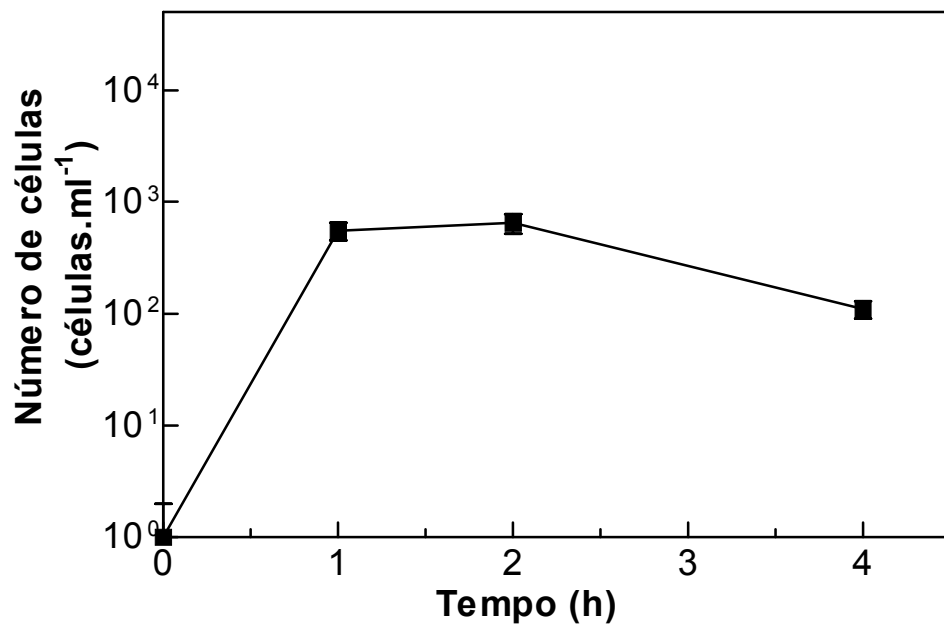


Fig 10. Choque-frio induzindo barotolerância. *S. cerevisiae* crescendo em primeira fase exponencial ( $10^7$  células.ml<sup>-1</sup>) foram submetidas à baixa temperatura de 10 °C por diferentes períodos de tempo. As amostras foram incubadas rapidamente (aproximadamente 2 min) até atingirem a temperatura ambiente, e submetidas à alta pressão de 220 MPa por 30 min. O ponto zero representa células submetidas à pressão serem submetidas ao choque-frio.

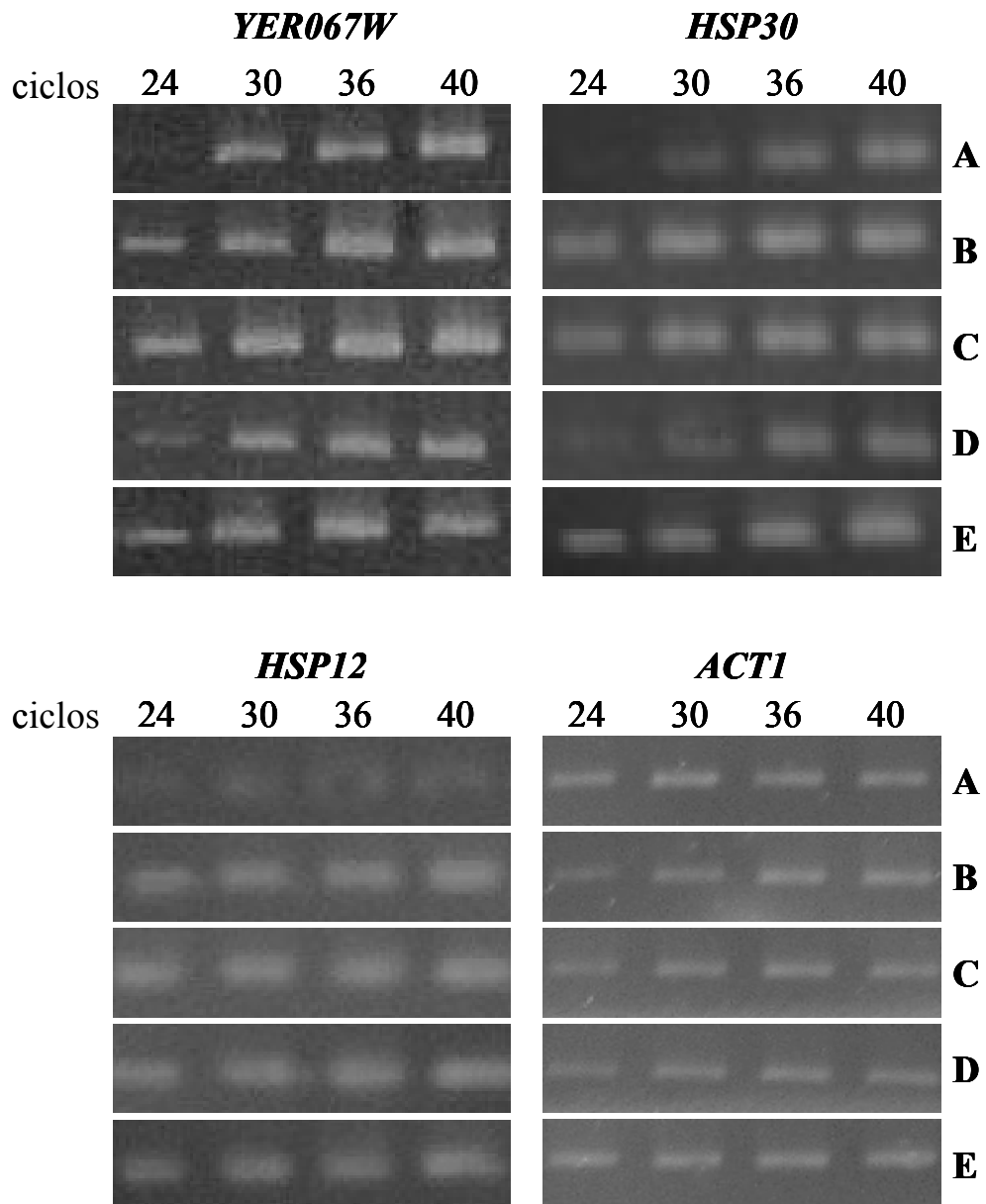


Fig 11. Análise semiquantitativa por RT-PCR dos genes mais induzidos por pressão. O RNA total das leveduras foi amplificado por RT-PCR usando-se os primers listados na Tabela 1. As amostras de PCR foram retiradas após 24, 30, 36 e 44 ciclos e analisadas em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. As mudanças na expressão dos genes *YER06W*, *HSP30* e *HSP12* foram analisadas após o tratamento com: 6% de etanol por 60 min (C), 10 °C por 2 h (D) e 0,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 45 min (E). Células sem nenhum tratamento (A) ou tratadas com 50 MPa por 30 min (B) foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. O gene da actina, *ACT1*, foi usado como controle constitutivo da expressão gênica.

### **9- Indução de tolerância ao estresse por pré-tratamento sub-letal de pressão hidrostática**

Células de *S. cerevisiae* em primeira fase exponencial foram tratadas com HHP de 25, 50, 75 e 100 MPa por 30 min e imediatamente submetidas aos seguintes estresses: alta temperatura de 54 °C por 20 min (HT), HHP de 220 MPa por 30 min (HP), ou congelamento em N<sub>2</sub> líquido por 24 h (UCT).

O tratamento severo com temperatura HT é letal para as células, no entanto, o pré-tratamento com pressão hidrostática confere alguma proteção, menor que uma ordem de magnitude (Fig 12A). O tratamento com 220 MPa por 30 min também é letal para as células e diferente do observado para o HT, submetendo as células a pressões sub-letais não houve indução de resistência (Fig 12B). O congelamento em N<sub>2</sub> líquido leva a uma drástica redução da viabilidade celular e o pré-tratamento com 25 MPa não foi capaz de induzir resistência. Além disso, o pré-tratamento com pressões maiores que 25 MPa antes do congelamento diminuem a viabilidade da cultura, levando uma completa inativação após o tratamento de 100 MPa (Fig 12C).

Entretanto, se as células forem colocadas à pressão atmosférica (0,1 MPa) com aeração por um período de 15 min após o tratamento com pressão sub-letal, elas adquirem resistência contra um estresse severo subsequente (Fig 12). Estes resultados mostram que a máxima indução foi atingida com o pré-tratamento a 50 MPa para todos os estresse severos testados. Este efeito pode também ser observado, em menor extensão, com pressões de 25 e 75 MPa, mas 100 MPa não induz uma significativa proteção contra HT e HP. O pré-tratamento de 100 MPa só induziu proteção considerável contra o congelamento.

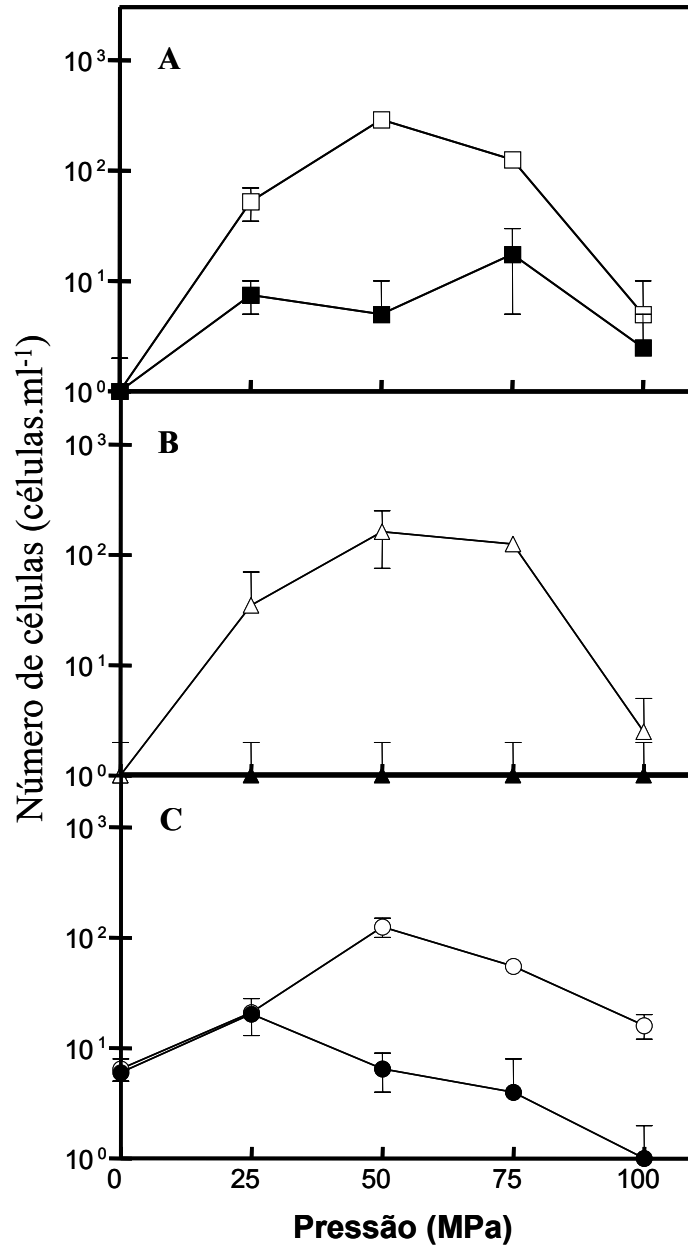


Fig 12. Tolerância de células tratadas com pressão contra estresses severos. Células de *Saccharomyces cerevisiae* na primeira fase exponencial ( $10^7$  células.ml<sup>-1</sup>) foram submetidas a diferentes valores de pressão hidrostática por 30 min antes do estresse de **A**) 54 °C por 20 min, **B**) 220 MPa por 30 min e **C**) congelamento em N<sub>2</sub> liq por 24 h. Os símbolos sólidos representam células que, após o tratamento com pressão, foram submetidas imediatamente aos estresses severos e os símbolos abertos são usados para representar as células que foram incubadas a pressão atmosférica (0,1 MPa) por 15 min antes do estresse severo. As barras de erro representam o desvio padrão de três experimentos.



### **10- Otimização do tempo de incubação após o pré-tratamento de pressão para indução de resistência contra estresses severos.**

Para determinar qual período de incubação à pressão atmosférica após o barotratamento seria capaz de induzir a máxima resistência contra os estresses severos testados, as células de levedura foram pressurizadas a 50 MPa por 30 min e então incubadas à pressão atmosférica com aeração por, 15, 30 ou 60 min antes de serem submetidas aos estresse severos (HT, HP ou UCT). Verificamos que a máxima resistência foi obtida após 15 min à pressão atmosférica. (Fig 13).

O barotratamento protege as células contra o estresse térmico após 15 min a 0,1 MPa e esta resistência foi transiente, diminuindo progressivamente, mostrando quase nenhuma resistência 60 min após a pressurização (Fig 13A). Entretanto, para HP, a resistência adquirida foi mantida durante o período de 60 min (Fig 13B). Para o estresse de congelamento, foi observada uma tendência de aumento na proteção conferida pela pressão até 60 min após o barotratamento (Fig 13C).

### **11- Análise semiquantitativa por RT-PCR dos genes induzidos pela pressão hidrostática.**

Como a indução máxima de resistência com o pré-tratamento de 50 MPa por 30 min foi atingida após incubação à pressão atmosférica, tornou-se importante analisar a expressão de genes que são induzidos por pressão e que são conhecidos por serem importantes na tolerância contra a pressão hidrostática alta e baixas temperaturas.

Entre os genes mais induzidos por pressão (e por calor e frio) estão *HSP12*, *HSP26* e *DDR2*. *HSP30* é induzido por pressão e calor, mas é reprimido pelo frio. *ERG25* é induzido por pressão e frio, mas não por calor (Fernandes *et al*, 2004; Sahara *et al*, 2002; Gasch *et al*, 2000). Para analisar a expressão destes genes, foi feito RT-PCR semiquantitativo das células de levedura ( $DO_{600}$  1,0) submetidas a 50 MPa por 30 min e também para células que foram incubadas à pressão atmosférica por 15, 30 e 60 min após a pressurização (Fig 14). Como mostrado previamente, *HSP12* e *HSP30* são induzidos por HHP de 50 MPa (Fernandes *et al*, 2004) e a análise da expressão mostrou que esta indução aumenta após 15 min a 0,1 MPa. *HSP12* e *HSP30* permanecem induzidos durante os 60 min após o tratamento com HHP (Fig 14). Surpreendentemente, a 50 MPa, *HSP26* foi induzido apenas 30 min pós-pressurização (Fig 14). Os resultados apresentados na Fig 14 indicam que, apesar de *DDR2* ter sido induzido por 200 MPa (Fernandes *et al*, 2004), este gene não foi induzido por 50 MPa em nenhuma situação testada. O gene *ERG25* foi fracamente expresso e necessitou de mais ciclos de

amplificações para ser visualizado. Este gene foi induzido por 50 MPa e permanece expresso até 30 min pós-pressurização, retornando ao mesmo nível do controle após 60 min a pressão atmosférica (Fig 14).

### **12- Sobrevivência de cepas mutantes *hsp12*, *hsp30* e *yer067w* à alta pressão hidrostática.**

A figura 15 mostra a taxa de sobrevivência das mutantes comparada à cepa selvagem BY4741 frente a HHP. Nesse caso, o resultado indicou que a ausência destes genes em células expostas a um estresse súbito de pressão não refletiu num aumento da sensibilidade ao tratamento.

### **13- Dosagem dos níveis de trealose em células submetidas ao tratamento com pressão hidrostática.**

Foi verificado se a pressão hidrostática de 50 MPa por 30 min seria capaz de induzir uma mudança nos níveis intracelulares do dissacarídeo trealose em leveduras. Para isso foram realizados os mesmos tratamentos descritos no item 11 de resultados. Observa-se que a pressão hidrostática de 50 MPa não é capaz de induzir o acúmulo de trealose em *S. cerevisiae* (Fig 16), além disso, mesmo depois de tratadas com pressão e incubadas por 15, 30 e 60 min as células apresentam os mesmos níveis de trealose de células controle (Fig 16). Como controle positivo, as células foram tratadas com 40°C por 30 min (Fig 16), situação descrita na literatura onde a síntese e o acúmulo de trealose atinge altos níveis (PARROU *et al*, 1997).

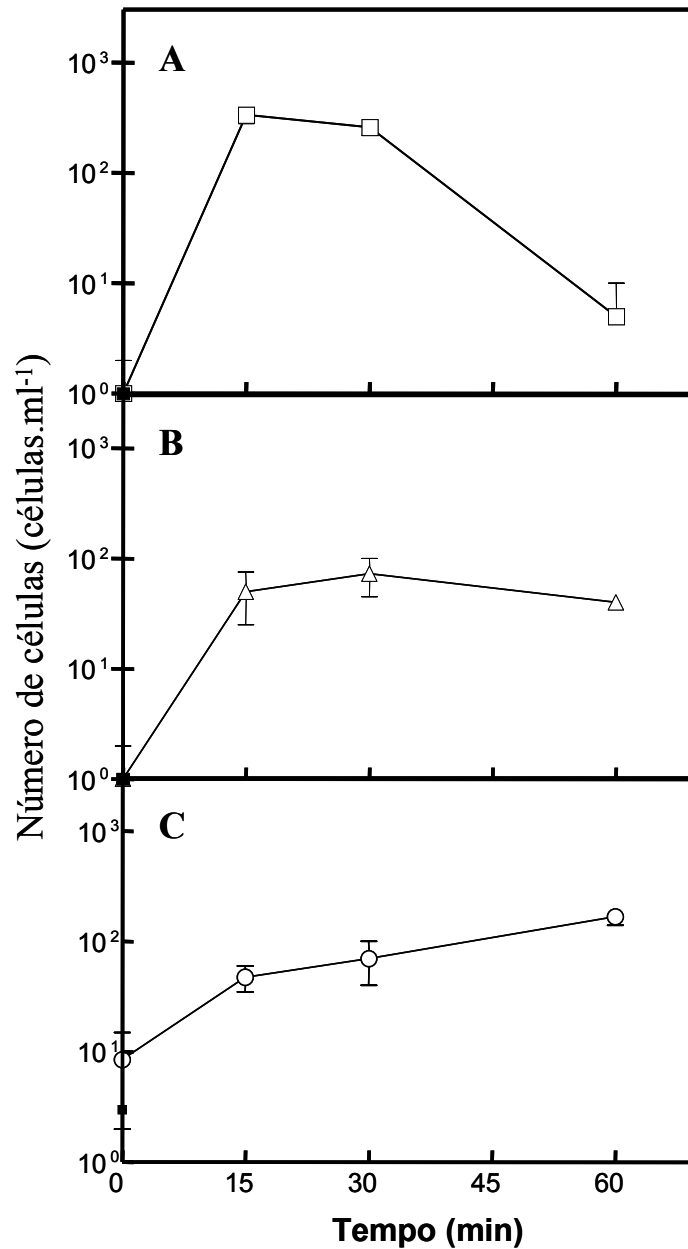


Fig 13. Estudo do período ótimo de pressurização capaz de induzir resistência contra estresses severos. Células de *S. cerevisiae* em primeira fase logarítmica foram submetidas à pressão hidrostática de 50 MPa por 30 min e então incubadas a pressão atmosférica por diferentes períodos de tempo, com constante aeração, a 30 °C. As células foram então submetidas a **A)** 54 °C por 20 min, **B)** 220 MPa por 30 min e **C)** congelamento em N<sub>2</sub> liq por 24 h. As barras de erro representam o desvio padrão de três medidas.

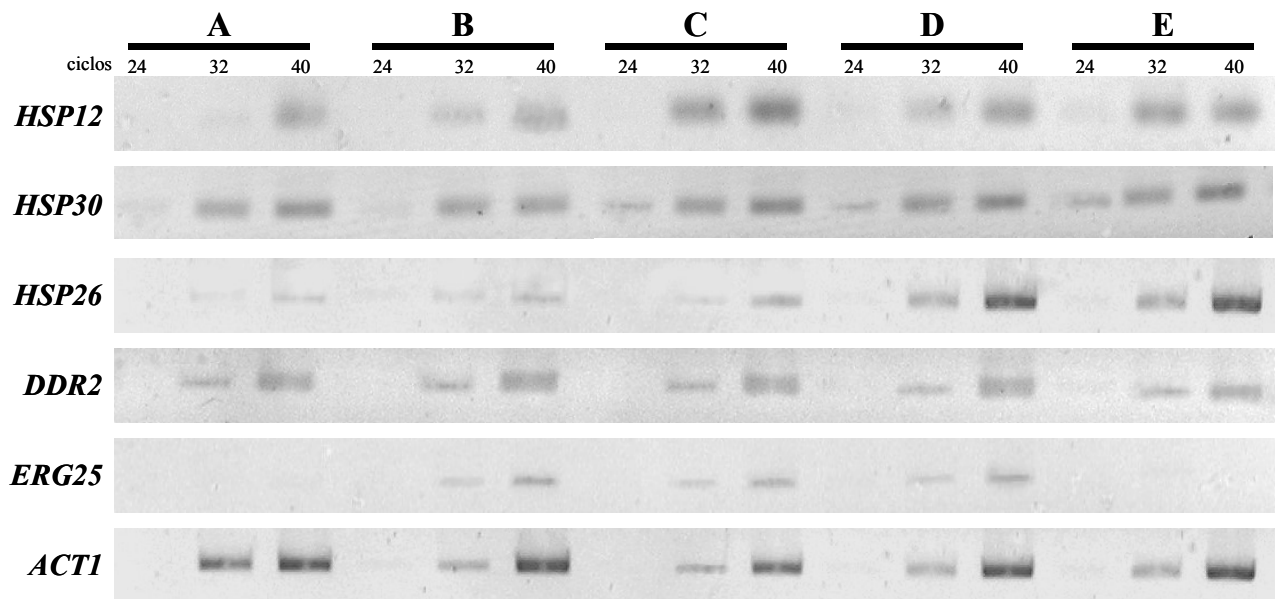


Fig 14. Análise da transcrição dos genes induzidos por pressão por RT-PCR semiquantitativo. Células sem nenhum tratamento (A) foram usadas como controle. As mudanças na expressão gênica foram analisadas após tratamento com 50 MPa por 30 min (B) seguido por incubação a pressão atmosférica por 15 (C), 30 (D) e 60 (E) min. O gene da actina, *ACT1*, foi usado como controle constitutivo da expressão.

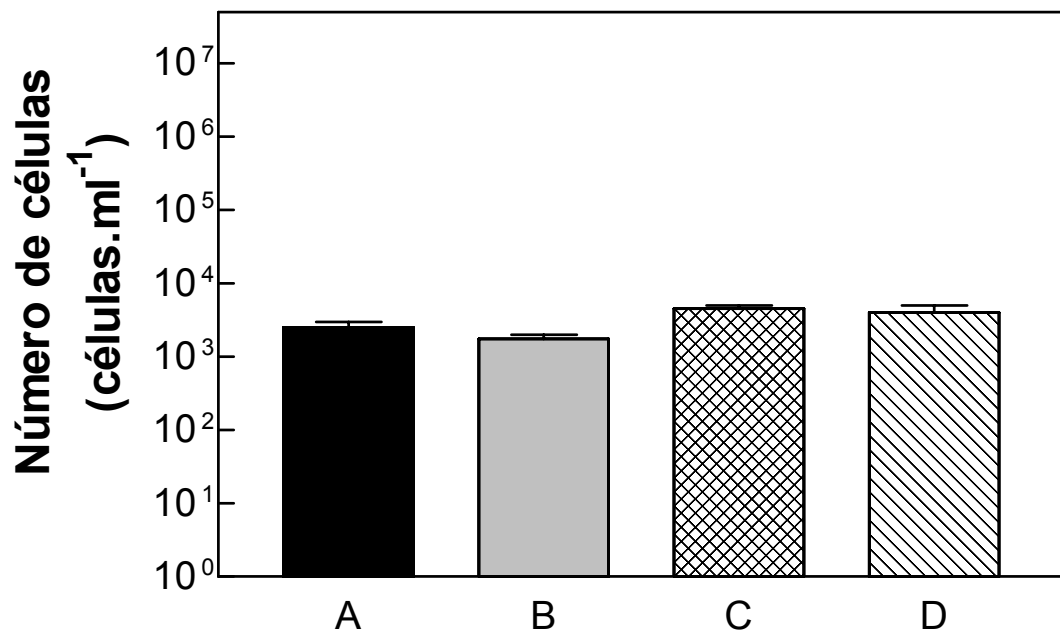


Fig 15. Análise de sobrevivência de cepas mutantes submetidas à pressão hidrostática de 200 MPa por 30 min. As células de levedura foram crescidas até a  $DO_{600nm} = 1.0$  e então submetidas a HHP. A concentração inicial para toda as cepas correspondia a  $10^7$  células/ml. Como controle foi usada a cepa selvagem BY4741 (A). As cepas deletadas correspondem a *hsp12* (B), *hsp30* (C), e *yer067w* (D).

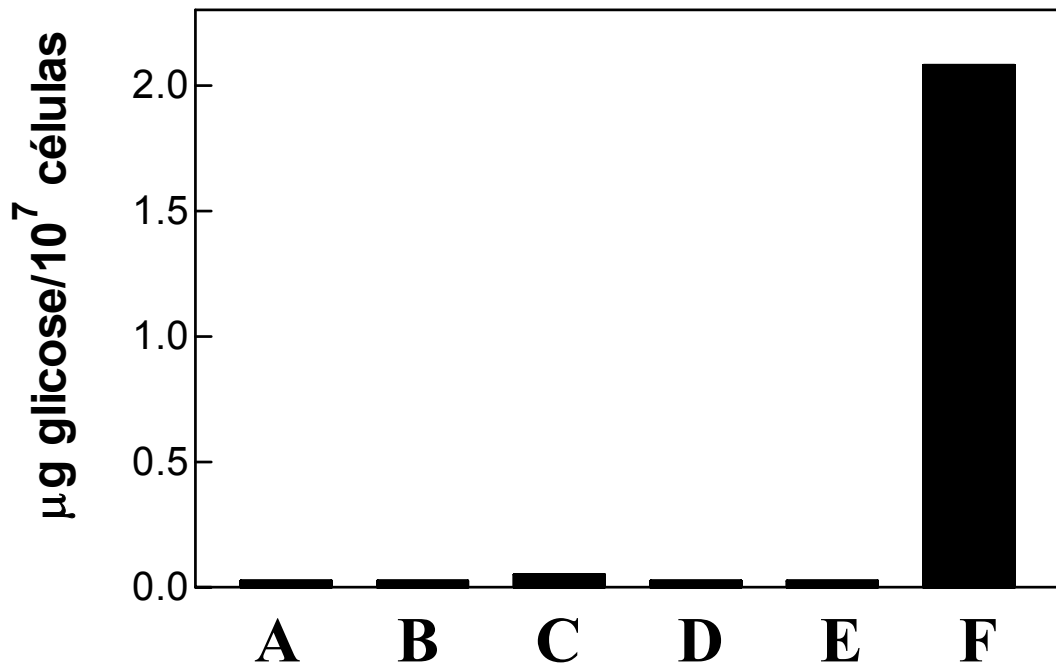


Fig 16. Dosagem dos níveis de trealose em células submetidas ao tratamento com pressão hidrostática. Células sem nenhum tratamento (A) foram usadas como controle. As mudanças nos níveis de trealose foram analisadas após tratamento com 50 MPa por 30 min (B) seguido por incubação a pressão atmosférica por 15 (C), 30 (D) e 60 (E) min. O tratamento com 40 °C por 30 min foi usado como controle positivo para os níveis de trealose (F).

# DISCUSSÃO

---

## **1- Efeitos da pressão hidrostática nas células de levedura.**

Altas pressões hidrostáticas promovem um vasto efeito nas células vivas e, a respeito da regulação do crescimento, o efeito do estresse permanece por um período maior comparado com células estressadas com calor pelo mesmo intervalo de tempo (Fig 3). Isto pode sugerir que, mesmo após as células de levedura terem sido retiradas da pressão, elas continuam sofrendo mudanças metabólicas e respondendo ao estresse. Como já descrito para várias situações de estresse, como, por exemplo, choque osmótico, alta concentração de etanol, alta temperatura e estresse oxidativo, foi observada após a pressão hidrostática (FERNANDES *et al.*, 2004) a indução de genes codificantes para enzimas envolvidas tanto em vias de síntese quanto de degradação de carboidratos (ALEXANDRE *et al.*, 2001; YALE e BOHNERT *et al.*, 2001; GASCH *et al.*, 2000). Apesar da co-indução desses genes ser aparentemente antagônica, o fenômeno poderia ser justificado como sendo um mecanismo que permitiria à célula rapidamente modular a atividade das enzimas correspondentes, de maneira a otimizar a degradação ou síntese de glicogênio. A indução desses genes provavelmente aumenta a capacidade da célula de ajustar seu metabolismo energético às flutuações das condições ambientais (GASH *et al.*, 2000). Essas evidências, somadas a outras, reforça a idéia que a pressão hidrostática causa uma resposta celular caracterizada pela indução de genes relacionados a estresses e parada no ciclo celular.

## **2- Papel do NO na resposta de leveduras ao estresse de pressão hidrostática.**

Foi observado que, em altas concentrações, o NO é capaz de interagir com o fator de transcrição Ace1p de *S. cerevisiae*, impedindo sua atividade (SHINYASHIKI *et al.*, 2000). Neste caso foi proposto que, em presença de O<sub>2</sub>, o NO reage com grupos tiol do fator Ace1p, impedindo sua ligação na região promotora de genes ligados ao estresse de cobre, como *CUP1*, *SOD1* e *CRS5*. Somado ao efeito citotóxico do NO, isso poderia explicar a maior sensibilidade das células tratadas com altas concentrações de NO ao estresse causado por cobre. De forma inversa, o NO, em baixos níveis, interage com o fator transcripcional Ace1p, aumentando sua atividade tornando as células mais resistentes ao estresse com cobre (CHIANG *et al.*, 2000b).

Não se conhece a interação do NO com outros fatores de transcrição de levedura, podendo ser o caminho envolvido na resposta celular à presença de NO. Entretanto, a diminuição na

expressão da NOS2 durante o tratamento com calor sugere que, mesmo que o NO funcione como um indutor de Hsps, provavelmente ele não é essencial no mecanismo de resposta ao estresse em células submetidas ao calor. Além disso, não ocorre acúmulo de trealose durante o tratamento com todas as concentrações de SNP testadas (dados não apresentados), indicando que a trealose-6-fosfato sintase, uma Hsp, não é induzida por NO.

Uma condição de estresse leva as células a ajustarem seu metabolismo induzindo a alteração na expressão gênica. Genes não essenciais são reprimidos enquanto genes que codificam para proteínas que desempenham um importante papel na proteção celular contra o estresse são induzidos (MAGER e HOHMANN, 1997). Os resultados apresentados revelam que após o tratamento com 50 MPa por 30 min, a concentração intracelular de NOS2 permanece no mesmo nível que células crescendo em primeira fase exponencial. Esta observação não apenas confirma que a pressão hidrostática induz uma resposta ao estresse diferente do calor, mas também sugere que o NO pode ter um papel como uma molécula sinalizadora no estresse induzido pela pressão hidrostática.

### **3- Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e alta pressão hidrostática.**

O anion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil (OH) são as mais importantes espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelas células. ROS causam danos oxidativos em ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas, carboidratos e outros componentes celulares (COSTA e MORADAS-FERREIRA, 2001). Já foi mostrado que o pré-tratamento com 0,4 mM de  $H_2O_2$  induz resistência contra um subsequente estresse causado por  $H_2O_2$  (Davies *et al*, 1995). Além disso, uma correlação entre HHP, alta temperatura e estresse oxidativo já foi proposta (IWAHASHI *et al.*, 1993). Na Fig 7 é mostrado que um pré-tratamento com 0,4 mM de  $H_2O_2$  é capaz de induzir tolerância contra HHP.

A levedura *S. cerevisiae* é capaz de perceber o estresse oxidativo e construir uma resposta molecular envolvendo a indução de defesas contra radicais livres. A resposta ao  $H_2O_2$  é caracterizada por uma forte indução de genes envolvidos na detoxificação do  $H_2O_2$  (como superóxido desmutases, glutathione peroxidase e tiol-antioxidantes específicos), bem como genes envolvidos em reações oxidativas e redutoras dentro da célula (tioredoxina, tioredoxina redutases, glutaredoxina, e glutathione redutase) (GASCH *et al.*, 2000). O estresse oxidativo leva a indução de 150 genes (> 2 vezes induzido), dos quais 66 são envolvidos na categoria de resposta ao estresse ambiental (ESR). Análises de microarranjo de *S. cerevisiae* submetidas a HHP revelam que entre os 131 genes induzidos pela pressão (> 2 vezes induzido), destacam-se genes que codificam para proteínas implicadas no estresse oxidativo, como catalase



citoplasmática e CuZn superóxido desmutase (FERNANDES *et al.*, 2004). Foi demonstrado que o pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induz barotolerância, indicando a mudança no padrão de expressão gênica induzida pelo estresse oxidativo pode levar a resposta necessária para manter a estabilidade celular durante o estresse de alta pressão, demonstrando a inter-relação destes dois estresses.

Leveduras possuem dois transportadores específicos para GSH, capazes de internalizar este composto quando presente no ambiente extracelular (PENNINCKX, 2002). Quando GSH é adicionado ao meio de cultura, as células podem rapidamente captá-lo e usá-lo na forma reduzida como substrato para a enzima glutatona peroxidase eliminar as espécies ativas de oxigênio. Foi observado que concentrações entre 1 e 10 mM de GSH mostraram o mesmo efeito de indução de resistência. Isto pode ser devido à saturação do sistema de transporte.

Na figura 8 observa-se que a presença de glutatona (GSH) é capaz de proteger as células contra a HHP. Estes resultados reforçam o fato que HHP causa estresse oxidativo na célula e confirma a importância do mecanismo de defesa oxidativo, como o induzido pelo tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podendo este diminuir os danos causados pela pressão.

O estresse oxidativo promovido pela pressão hidrostática pode estar relacionado ao mau funcionamento da cadeia respiratória sob altas pressões. Estudos com *Shewanella benthica*, um organismo de águas profundas, mostraram que, sob pressões de até 60 atm, a cadeia respiratória é modificada, já que os citocromos normalmente ativos a 1 atm não são funcionais sob pressão. A respiração passa a contar com uma quinol oxidase para a redução do oxigênio e bombeamento de elétrons para o espaço periplasmático (KATO e QURESHI, 1999). Como não há descrição de um mecanismo tão especializado para a levedura *S. cerevisiae*, o processo de respiração deve ficar severamente comprometido. Essa observação é coerente com o grande número de genes relacionados à respiração que se mostraram reprimidos após a pressão hidrostática, como por exemplo *FLX1*, proteína carreadora de FAD mitocondrial; *YDJI* proteína transportadora mitocondrial, *PET130*, biossíntese de proteínas mitocondriais e *AAT1*, aspartato transaminase mitocondrial (FERNANDES *et al.*, 2004).

#### **4- Pré-tratamento com etanol e alta pressão hidrostática.**

A viabilidade das células de *S. cerevisiae* expostas a HHP foi analisada em células expostas previamente ao estresse subletal de etanol (Fig 9). É importante notar que células pressurizadas diretamente em etanol não apresentam baroresistência, sendo fundamental que as células sejam tratadas por 1,5 - 2 h para adquirirem barotolerância. Uma possível explicação para esta característica é que durante o tratamento com etanol, as células se

adaptam a maior concentração do mesmo, mudando algumas de suas propriedades físicas, devido ao efeito de etanol em reduzir a habilidade de hidratação da água pelos pontos de hidratação (JONES, 1989). Após a remoção do etanol, uma nova situação ocorre na célula devido à presença de moléculas de água ocupando os pontos de hidratação antes ocupados pelo etanol. Mesmo a mudança transcripcional induzida pelo pré-tratamento com etanol não é capaz levar as células a barotolerância, já que macromoléculas associadas à água constituem domínios particularmente sensíveis as forças de pressão (Fig 17).

Células de *S. cerevisiae* pré-expostas a concentrações subletais de etanol adquirem tolerância contra um subsequente estresse letal de etanol (COSTA *et al*, 1993). Foi mostrado por microarranjo que genes que são induzidos por etanol são de uma forma geral envolvidos no metabolismo energético, endereçamento de proteínas, homeostase iônica e resposta ao estresse (ALEXANDRE *et al*, 2001). A exposição celular ao etanol aumenta a atividade da catalase T citoplasmática (codificada pelo gene *CTT1*) e da isoforma mitocondrial da superóxido desmutase (codificada pelo gene *SOD2*). Entretanto, os níveis de glutathione e da isoforma citoplasmática da superóxido desmutase (codificada pelo gene *SOD1*) permanecem inalterados (COSTA *et al*, 1993; PIPER, 1995). *CTT1* e *SOD2* são ambos induzidos pela HHP (FERNANDES *et al.*, 2004) sugerindo que tanto a pressão quanto o etanol promovem importante estresse oxidativo nas células.

O papel do etanol como agente que afeta o estado físico-químico e as funções biológicas em várias membranas celulares é bem conhecido (JONES *et al*, 1989). Os lipídeos de membrana são conhecidos moduladores da fluidez da membrana e acredita-se que eles desempenham um papel essencial na tolerância de *S. cerevisiae* ao etanol (CHI e ARNEBORG, 1999). Entretanto, tem havido muitas discrepâncias entre os trabalhos a cerca do efeito do etanol na composição lipídica da célula. Alguns autores encontraram um aumento na fluidez correlacionado com a exposição ao etanol (JONES *et al.*, 1989; HERRERO *et al.*, 1982; ALEXANDRE *et al.*, 1994; KAJIWARA *et al.*, 1996), enquanto outros acreditam que

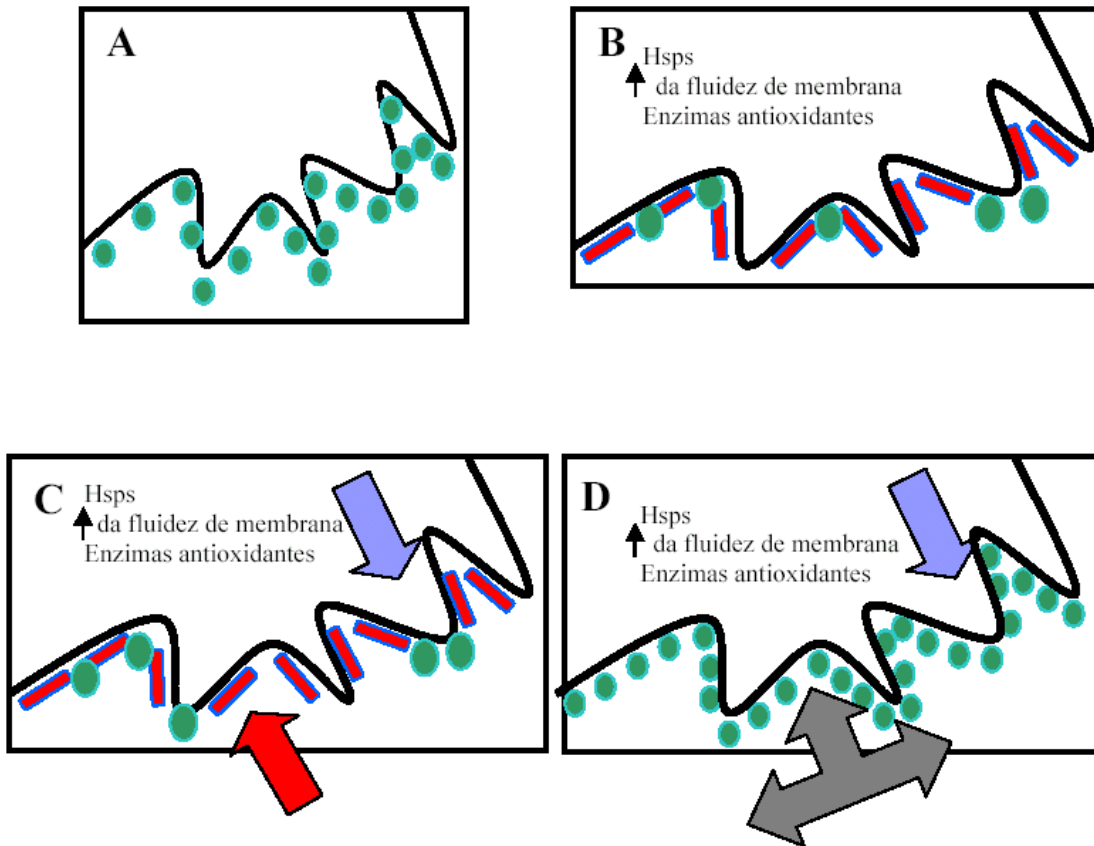


Fig 17. Esquema ilustrando os efeitos do etanol nas macromoléculas celulares. (A) Membrana de célula de levedura crescendo em meio rico. A principal molécula que interage com os lipídeos de membrana e proteínas é a água (●). Quando o etanol (■) é adicionado ao meio, este compete com as moléculas de água por pontos de hidratação antes ocupados pela água (B). A resposta bioquímica celular (seta azul) é capaz de reverter os efeitos danosos provocados pela HHP (seta vermelha) (C). Entretanto, se o etanol for removido, as moléculas de água passam a ocupar os pontos antes ocupados pelo etanol, e mesmo a resposta bioquímica celular não é capaz de compensar os efeitos provocados pela HHP (seta cinza) (D).

esta condição leva a uma diminuição da fluidez da membrana (PIPER, 1995; CHI e ARNEBORG, 1999; YOU *et al.*, 2003). De fato, o etanol aumenta a quantidade de ácidos graxos insaturados nos resíduos dos fosfolípidos de membrana (JONES *et al.*, 1989; CHI e ARNEBORG, 1999; KAJIWARA *et al.*, 1996; YOU *et al.*, 2003; SAJBIDOR e GRECO, 1992; ALEXANDRE *et al.*, 1994b). Apesar de membranas insaturadas possuírem um maior grau de desordem que bicamadas saturadas, elas são menos sensíveis a HHP devido ao fato de suas regiões de maior movimentação formarem uma barreira para a acessibilidade das moléculas de água (MENTRÉ e HUI BOM HOA, 2001). Além disso, HHP induz um aumento na ordem e diminui a fluidez em membranas plasmáticas. O fato que a insaturação de bicamadas é importante na resistência à pressão é confirmado pela indução pela pressão do gene responsável pela desaturase (*OLE1*), uma enzima que introduz uma dupla ligação em ácidos graxos de membrana de leveduras (FERNANDES *et al.*, 2004).

A exposição à concentração subletal de etanol induz uma resposta caracterizada pela indução de proteínas de choque térmico, enzimas anti-oxidantes e mudanças na composição da membrana plasmática. Estas características provavelmente são responsáveis pela indução de baroresistência após o pré-tratamento com etanol.

### **5- Choque frio e alta pressão hidrostática.**

Entre os numerosos estresses ambientais, mudanças de temperatura são provavelmente os estresses mais comuns para todos os organismos vivos. A Fig 10 mostra o efeito de um pré-tratamento com 10 °C induzindo baroresistência. Efeitos similares foram vistos em *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus sanfranciscensis* submetidos respectivamente a temperaturas de 0 °C e 12,5 °C antes da HHP (NOMA e HAYAKAWA, 2003; SCHEYHING *et al.*, 2004).

*S. cerevisiae* mostra um aumento de aproximadamente 500 vezes na viabilidade quando as células são submetidas ao tratamento com choque térmico antes da HHP (IWAHASHI *et al.*, 1991; FERNANDES *et al.*, 2001). A maior característica do tratamento com altas temperaturas é a indução de proteínas de choque térmico (HSPs), que previnem a perda de estrutura de outras proteínas (CRAIG, 1992; PIPER, 1997). Entretanto, ao contrário do choque térmico, o enovelamento protéico não é o maior problema das células em baixas temperaturas. Os maiores problemas que surgem sob baixas temperaturas são a redução da fluidez da membrana e a parada na síntese de proteínas. Em *S. cerevisiae*, vários genes relacionados ao choque frio foram identificados. No trabalho de Sahara *et al.*, 2002 é apresentada uma análise global de genes expressos em células de levedura expostas a 10 °C.

Um grande número de genes responsáveis por várias funções celulares são diversamente induzidos ou reprimidos sobre condições de baixa temperatura.

Interessantemente, a maioria dos genes que codificam para HSPs foram reprimidos, enquanto apenas *HSP12* e *HSP26* foram induzidos. Estes dois genes são induzidos também por HHP em temperatura ambiente (FERNANDES *et al.*, 2004). Além disso, um trabalho recente mostrando mudanças de expressão gênica induzidas por pressão em baixa temperaturas, confirmou a indução desses dois genes (IWAHASHI *et al.*, 2003). A função das proteínas Hsp12p e Hsp26p ainda é pouco entendida nas condições de estresse. Entretanto, a indução de ambos os genes tem sido relacionada a estresses que causam danos na membrana, como osmótico (YALE e BOHNERT, 2000), etanol (ALEXANDRE *et al.*, 2001) e pressão hidrostática (FERNANDES *et al.*, 2004), sugerindo que a indução destas HSPs pode estar relacionada com a desestabilização da membrana. Outra possibilidade é apresentada por Motshewene *et al.*, 2004, onde, após confirmar que a proteína Hsp12p localiza-se na parede celular, propôs que esta proteína, altamente hidrofílica, atua na parede celular interrompendo as pontes de hidrogênio e interações iônicas entre polímeros de polissacarídeos adjacentes resultando em uma estrutura mais flexível.

Outra característica ligada à adaptação a baixas temperaturas é o aumento na proporção de ácidos graxos *cis*-insaturados nos lipídeos de membrana, aumentando então a fluidez de membrana (QUINN *et al.*, 1989). Em leveduras, a desaturação dos ácidos graxos é feita por uma  $\Delta 9$  desaturase, codificada pelo gene *OLE1* (ZHANG *et al.*, 1999). Análises de microarranjo feitas em leveduras submetidas a baixas temperaturas (SAHARA *et al.*, 2002) e HHP (FERNANDES *et al.*, 2004) demonstraram a indução do gene *OLE1*, indicando que as células podem sentir o estado de fluidez da membrana e possui mecanismos para compensar os efeitos das condições ambientais.

É sugerido que o estresse oxidativo pode ser um entre vários fatores que contribuíram para a injúria causada pelo resfriamento em plantas (O'KANE *et al.*, 1996). Durante a estocagem no frio (4 °C) de células tubulares humanas, um aumento na formação de radicais livres tem sido documentado (SALAHUDDEN *et al.*, 2000). A relação entre o resfriamento e uma resposta antioxidante nas células de levedura é apresentada no trabalho de Zhang *et al.*, 2003. Neste trabalho foi mostrado que a mudança da temperatura de 30 °C para 10 °C induz um aumento nos níveis transcripcionais dos genes *SOD1*, *CTT1* e *GSH1*, genes relacionados ao estresse oxidativo. Mais ainda, a atividade da Sod1p e catalase, e os níveis intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram aumentados pela diminuição da temperatura. Estes dados somados ao fato de o

pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzir a baroresistência, reforçam a idéia de uma relação entre o estresse oxidativo e a pressão hidrostática.

#### **6- Alta pressão hidrostática como um indutor de resistência em leveduras.**

A observação de que HHP variando de 25 a 100 MPa não induz resistência contra estresse está de acordo com observações prévias onde células submetidas a 50 MPa por 15 min não mostram aumento na viabilidade após um subsequente pressão de 200 MPa e que pré-tratamentos maiores que 15 min matam todas as células submetidas a 200 MPa (FERNANDES *et al.*, 1997). Por outro lado, um curto período de tempo após o pré-tratamento com pressão hidrostática aumenta a sobrevivência celular a subsequentes estresses letais (alta temperatura, HHP e congelamento) (Fig 12). Neste caso pode-se inferir uma relação entre a parada em G1 no ciclo celular e o atraso da resposta à pressão. O efeito protetor foi observado após 15 min de incubação a pressão atmosférica e em relação ao estresse severo de pressão e congelamento estes efeito persistiu por 1 h (Fig 13). Ao contrario, a proteção contra o estresse severo de temperatura foi curto, consistente com o fato que a indução das HSPs após o tratamento com choque térmico é transiente (MILLER *et al.*, 1979). Em bactérias, proteínas induzidas por pressão (PIP) são maximamente induzidas 60-90 min após o estresse, indicando que em relação às muitas outras proteínas induzidas pela pressão, a indução das PIP é lenta (BARTLETT *et al.*, 1995). Além disso, resultados de microarranjo de células pressurizadas tem demonstrado que genes que codificam para o processo de síntese protéica são reprimidos (FERNANDES *et al.*, 2004). A síntese de proteínas é certamente uma das funções celulares mais sensíveis a pressão, sendo completamente bloqueada a 67 MPa em *E coli* e várias células de mamíferos (GROSS e JAENICKE, 1994; LANDAU, 1967; MENTRÉ e HUI BOM HOA, 2001). O desacoplamento dos ribossomos é, muito provavelmente, o maior fator que contribui para essa inibição (GROSS e JAENICKE, 1990; GROSS *et al.*, 1993). De fato, a alta pressão hidrostática tem efeito distinto sobre a síntese de proteínas e ácidos nucléicos: a síntese de RNA é mantida sob pressões onde a síntese de DNA e proteínas são completamente inibidas (MENTRÉ e HUI BOM HOA, 2001). Muitos grupos têm mostrado a tradução de genes que codificam para proteínas de resposta a estresse ocorre apenas após o choque de pressão (BARTLETT *et al.*, 1995; GROSS e JAENICKE, 1994).

Isto leva a conclusão de que as células sob pressão subletal são capazes de induzir genes responsivos ao estresse, entretanto, a tradução destes genes é comprometida devido à inibição do aparato de síntese protéica sob pressão. Altas pressões não causam apenas a inibição da síntese protéica, mas também a desnaturação e dissociação de proteínas, sendo ambas

reversíveis após pressões de até 100-300 MPa (MENTRÉ *et al.*, 1999; VERJOVSHI-ALMEIDA *et al.*, 1986). Quando as células retornam para a pressão atmosférica após o tratamento subletal com pressão, as alterações das organelas e sistemas biológicos são rapidamente revertidos (MENTRÉ e HUI BOM HOA, 2001) e, então, os novos RNAm sintetizados podem ser traduzidos.

Existe uma importante relação entre adaptação ao estresse e controle do crescimento. A expressão de genes relacionados ao crescimento é estimulada pela alta atividade da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A expressão dos genes relacionados à resposta geral ao estresse parece estar sob controle negativo da via Ras-AMPC, por outro lado a PKA parece ser controlada por mecanismos dependentes de estresse. Craig e Gross, 1991 propuseram que a proteína Hsp70p atuaria como sensor para resposta celular às mudanças de temperatura. Hsp70p desempenha um papel central no crescimento normal da célula, que envolve ligação e liberação de outros polipeptídeos para facilitar, ou prevenir, interações inter e intra-molecular, sendo que Hsp70p realiza a mesma função em condições de estresse. Estresses que induzem desnaturação protéica aumentam a demanda de Hsp70p, resultando na indução da resposta ao choque térmico. Os autores especulam que Hsp70p pode interagir diretamente com o fator de transcrição ao choque térmico (HSF). Sob condições normais de crescimento, Hsp70p poderia manter o fator de transcrição HSF na forma inativa e sob choque térmico o aumento na concentração de proteínas desenoveladas recrutaria as Hsp70p presentes na célula. Com isso a interação da Hsp70p com HSF seria perdida, HSF ficaria na forma livre e ativa, levando a produção de outras HSPs. Posteriormente, Geymonat *et al.*, mostraram uma interação positiva entre um tipo de Hsp70p com Cdc25p, uma proteína relacionada ao controle da via Ras em leveduras (GEYMONAT *et al.*, 1998). Em seguida, foi proposto um modelo no qual estresses, de uma maneira geral, poderiam levar esta Hsp70p a interagir com proteínas desnaturadas reduzindo sua interação com Cdc25p, inativando então as proteínas Ras e eventualmente a proteína quinase A (ESTRUCH, 2000). Já que HHP causa desenovelamento protéico, extrapolamos o modelo proposto por Estruch para o estresse causado pela pressão hidrostática. A Fig 18 apresenta o modelo proposto relacionando o estresse da pressão hidrostática levando a parada do ciclo celular em G1 e a indução de resposta ao estresse. De fato, a pressão causa marcantes mudanças na fisiologia da levedura, levando a uma parada em G1 no ciclo celular, como visto na Fig 3, e indução de vários genes relacionados à resposta ao estresse (FERNANDES *et al.*, 2004). É possível que várias vias de sinalização regulem fatores de transcrição, como Msn2p e Msn4p, em resposta a HHP. Alguns genes regulados por Msn2/4p, como *HSP12* e *HSP26*, são expressos sobre pressão, mas outros, como os

implicados no metabolismo da trealose, não são, indicando a existência de vários mecanismos envolvidos na proteção contra condições desfavoráveis.

Já foi mostrado, por análises de microarranjo, a expressão de genes afetados por HHP de 200 MPa por 30 min sendo confirmado por RT-PCR semiquantitativo a indução dos genes mais expressos sob 200 e 50 MPa por 30 min (FERNANDES *et al.*, 2004). Interessantemente, os resultados mostrados na Fig 14 mostram que os genes *HSP12* e *HSP30* são induzidos por pressão de 50 MPa por 30 min e uma maior indução é observada após as células retornarem a pressão atmosférica. Mais ainda, *HSP26* só é expresso 30 min após as células retornarem a pressão atmosférica.

*HSP30* codifica para uma proteína que diminui a atividade da  $H^+$ -ATPase ( $H^+$  adenosina trifosfatase). Estresses como alta pressão hidrostática, choque térmico, exposição ao etanol e osmótico promovem na levedura uma acidificação citoplasmática (PIPER, 1997). Essa acidificação citoplasmática pode comprometer várias vias bioquímicas na célula principalmente alterando a atividade de diversas enzimas citoplasmáticas, podendo levar a célula à morte. A função da  $H^+$ -ATPase de membrana é bombear  $H^+$  para fora da célula as custas de ATP. Hsp30p atua diminuindo a atividade da  $H^+$ -ATPase estimulada pelo estresse. Sendo a  $H^+$ -ATPase a maior consumidora do ATP celular, especialmente em células estressadas, a indução de Hsp30p pode desempenhar um papel na conservação de energia em condições de estresse (PIPER, 1997).

É importante notar que células deletadas nos genes *HSP12*, *HSP30* e *YER067W*, os três principais genes induzidos pela pressão (FERNANDES *et al.*, 2004) mostraram o mesmo nível de sobrevivência que sua parental selvagem BY4741, quando submetidas à pressão de 200 MPa por 30 min (Fig 15). Esses resultados nos mostram que apesar de acreditarmos que a



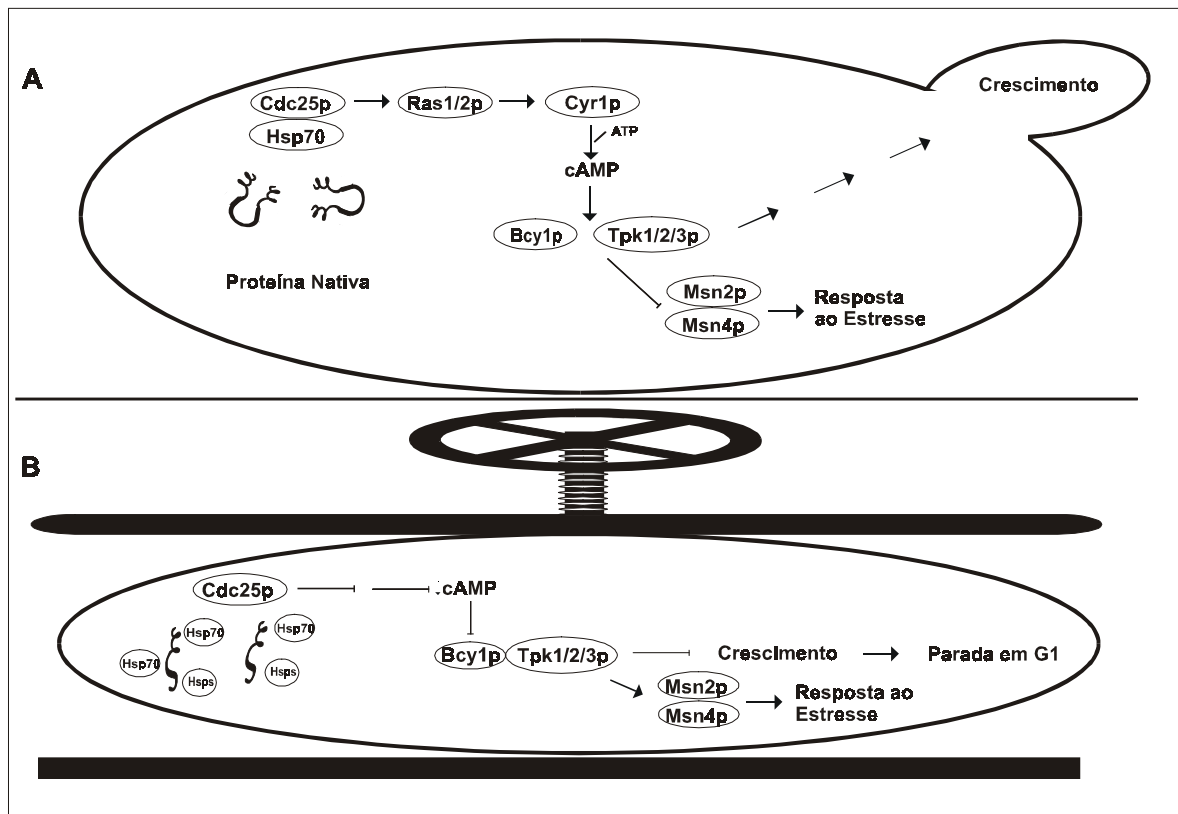


Fig 18. Modelo de sinalização em resposta ao estresse de pressão. **A)** Sobre condições normais de crescimento, Hsp70p (Ssa1p) interage com Cdc25p, induzindo Ras, uma proteína ligadora de GTP, a ativar a adenilato ciclase (Cyr1p) a produzir AMPc a expensas de ATP. AMPc liga especificamente a sub-unidade regulatória da PKA (Bcy1p), liberando a sub-unidade catalítica (Tpk1/2/3p) para fosforilar seus substratos. **B)** Altas pressões hidrostáticas induzem desnaturação protéica que recruta a chaperona Hsp70p.

indução destes genes é importante na resistência ao estresse causado pela HHP, a célula possui outros sistemas que compensam a ausência desses genes.

Hsp26p é uma pequena proteína de choque térmico de *S. cerevisiae* que possui atividade molecular de chaperona e, como os outros membros da família Hsp, protege as proteínas de agregação irreversível. Já foi mostrado que a dissociação do complexo Hsp26 é um pré-requisito para sua eficiente atividade de chaperona (HASLBECK *et al.*, 1999).

O perfil da baroproteção observado para as células de levedura após retornarem para pressão atmosférica pode ser entendido pelo fato que os genes mais induzidos pela pressão hidrostática codificam para proteínas relacionadas com a proteção de membranas, e os maiores problemas causados pela pressão e o choque frio são a redução de fluidez de membrana e a parada na síntese de proteínas. Os resultados apresentados sugerem que uma vez que estas proteínas protetoras de membranas são sintetizadas e começam a desempenhar seu papel no processo de proteção, elas estabilizam a célula por um longo período, resultando na proteção contra alta pressão e congelamento que é observada mesmo 60 min após descompressão.

Por outro lado, foi observado que as proteínas produzidas após o tratamento com pressão são suficientes apenas para uma proteção transiente contra os efeitos deletérios do calor. É bem conhecido que o principal problema causado pelo calor nas células está associado como envelhecimento protéico (PIPER, 1997), e a pressão não induz grandes quantidades de Hsps com atividade chaperona. Cavicchioli e Watson, 1986, mostraram que células estressadas com calor e incubadas por 3 h a temperatura de 23 °C perdem progressivamente a termotolerância, mas, retêm altos níveis da maioria das proteínas de choque térmico. Por exemplo, no caso da proteína Hsp26p, o complexo formado por essa proteína pode ser dissociado sob pressão e uma inicial proteção pode ser observada, entre outros fatores, relacionada com a atividade de chaperona desta proteína. Algum tempo após retornar a pressão normal, o complexo Hsp26p se associa fazendo com que esta proteína perca sua atividade de chaperona.

É bem conhecido que os níveis do dissacarídeo trealose se elevam em células expostas a vários tipos de estresse especialmente à exposição ao calor (PARROU *et al.*, 1997). Esse açúcar junto com as Hsps auxilia na proteção de proteínas e membranas contra os efeitos deletérios de vários tipos de estresse inclusive contra HHP (FERNANDES *et al.*, 1997). Entretanto, não observamos diferença nos níveis de trealose quando tratamos as células com 50 MPa por 30 min (Fig 16). Visando investigar a possibilidade da síntese da trealose ser induzida após o tratamento com pressão, foi feita a dosagem dos níveis de trealose em células tratadas com 50 MPa por 30 min e incubadas à pressão ambiente por 15, 30 e 60 min.

Novamente, não houve alteração nos níveis de trealose nestas células quando comparadas ao controle (Fig 16). Portanto, a proteção induzida pelo tratamento com pressão contra os estresses severos de alta temperatura, alta pressão hidrostática e congelamento (Fig 12) não podem ser explicados por alterações nos níveis de trealose e sim por outros fatores explicados no decorrer desta dissertação.

*DDR2* codifica para uma proteína de resposta a vários estresses, Ddr2p, cuja expressão é ativada por uma variedade de agentes xenobióticos e estresses físicos e ambientais. Entretanto, estudos gênicos usando mutantes com esse gene ausente demonstraram que *DDR2* não é um gene essencial contra estes tipos de estresse. A sobrevivência celular contra agentes que causam danos ao DNA e após altas temperaturas não foi significativamente afetada pela deleção deste gene e este mutante adquire termotolerância nos mesmos níveis da cepa selvagem (KOBAYASHI *et al.*, 1996). *DDR2* é induzido pela pressão de 200 MPa mas não por 50 MPa. Aparentemente, *DDR2* não é importante no processo de baroproteção.

Estresses que causam desestabilização de membranas, como osmótico (YALE e BOHNERT, 2001), etanol (CARTWRIGHT *et al.*, 1987), frio (SAHARA *et al.*, 2002) e pressão hidrostática (FERNANDES *et al.*, 2001; PERRIER-CORNET *et al.*, 1999) provocam uma discreta indução do gene *ERG25* (ALEXANDRE *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2004; SAHARA *et al.*, 2002; YALE e BOHNERT, 2001). Erg25p é uma esterase implicada na biosíntese de ergosterol e foi sugerido que esta enzima pode estar ligada a membrana (BARD *et al.*, 1996). Nos estresses citados acima, a célula pode manter a integridade da membrana ativando vários mecanismos que são capazes de minimizar os efeitos deletérios do estresse. Por outro lado, o choque térmico reprime o gene *ERG25* em leveduras (GASCH *et al.*, 2000). Entretanto, foi mostrado em leveduras, que a adição de ergosterol induz tolerância contra calor e etanol em cepas auxotróficas para ergosterol (SWAN e WATSON, 1998) e vesículas de membranas contendo colesterol (molécula análoga ao ergosterol, encontrada em mamíferos) provaram ser mais resistentes a HHP que vesículas sem colesterol (BENEY *et al.*, 1997; MENTRÉ e HUI BOM HOA, 2001). O ergosterol é esteróide contendo uma cadeia insaturada enquanto o colesterol possui uma cadeia saturada. Células de *S. cerevisiae* enriquecidas com ergosterol mostram maior resistência contra o etanol que células enriquecidas com colesterol. As membranas biológicas tem sido implicadas como um sensor primário do estresse ambiental e os esteróides de membrana parecem ser importantes nessa sensibilidade e na tolerância aos estresses.

## Conclusões e Perspectivas

---

- Observamos que em concentração de 1 mM os dois doadores de NO testados foram capazes de levar a uma proteção celular de 1000X contra a pressão hidrostática. Entretanto, são necessários mais estudos a fim de estabelecer se existe a ação específica do NO sobre alguma via de resposta de defesa ao estresse ou se o NO gera um estresse oxidativo capaz de levar a barotolerância.
- Observamos a presença das três isoformas descritas de NOS (endotelial, neuronal e induzível) em diferentes fases metabólicas de *S. cerevisiae*. Apesar de termos usado a técnica de *Western blotting*, que é altamente específica, vale lembrar que os anticorpos usados são contra as isoformas de camundongos, como descrito em material e métodos. Apesar de existirem proteínas de leveduras com alto grau de similaridade com as NOS descritas, ainda não se isolou nenhuma NOS em levedura. Portanto, é interessante no futuro, uma busca no banco de dados de leveduras, ORFs que possuam similaridade de seqüência primária com as NOS descritas, afim de clonar e estudar estas proteínas, na tentativa de caracterizar a presença de alguma NOS em *S. cerevisiae*.
- Acreditamos que o fato de os estresses de peróxido de hidrogênio, etanol e baixa temperatura levarem a barotolerância seja, entre outros fatores, devido ao estresse oxidativo gerado pelos três estresses. Além disso, alguns genes relacionados ao estresse oxidativo como *CTTI* (catalase), *SOD1* e *SOD2* (superóxido desmutase) são induzidos por HHP (FERNANDES *et al*, 2004). Seria interessante provar que a HHP gera um estresse oxidativo celular. Isso é possível através do uso de sondas sensíveis a oxidação, como diacetato de 2',7'- diclofluoreceína, através do uso de fluorímetro (ZHANG *et al.*, 2003) mensurando a produção de peróxido de hidrogênio intracelular.
- Outro fator que acreditamos que seja importante na tolerância a HHP é o nível de saturação dos ácidos graxos da membrana celular. Existem vários indícios de que membranas mais insaturadas são mais resistentes a HHP (MENTRÉ e HUI BOM HOA, 2001), entretanto, ainda não há nenhum trabalho na literatura provando que

células de levedura com uma proporção maior de ácidos graxos insaturados na membrana são mais tolerantes a HHP. Solicitamos cepas transgênicas de leveduras ao Dr Knipple, da Universidade de Cornell, EUA, que gentilmente nos as enviou cepas deletadas no gene *OLE1* (discutido no texto) e no seu lugar foram inseridos genes de desaturases de diferentes insetos, fazendo com que a proporção entre os ácidos graxos de membrana seja diferente para cada cepa. Foram realizados alguns experimentos de viabilidade contra HHP com estas cepas e, apesar de termos obtidos resultados interessantes, não conseguimos reproduzir o fenótipo encontrado no trabalho publicado pelo Dr Knipple (YOU *et al.*, 2003). Portanto, são necessários mais experimentos para que possamos nos assegurar que não houve contaminação das cepas enviadas, para então confirmarmos nossos dados. Além disso, também recebemos do Dr Knipple uma cepa deletada no gene *OLE1* sem outro gene que possa compensar a ausência dessa desaturase, com isso em meio de cultura comum esta cepa é inviável. A viabilidade desta cepa é dependente de meio de cultura suplementado com ácido palmitoleico (C16:1) e ácido oléico (C18:1), os principais produtos da enzima Ole1p. Seria interessante crescer esta cepa em diferentes proporções de C16:1 e C18:1 e avaliar sua tolerância a HHP. Com isso poderíamos observar qual a proporção ideal de ácido palmítico (C16), ácido esteárico (C18), ácido palmetoleico (C16:1) e ácido oléico (C18:1) que leva a maior tolerância celular contra a HHP.

- Mostramos que a pressão de 50 MPa é capaz de levar as células a tolerância contra o estresse de calor, pressão e congelamento (Fig. 12, p 55). Entretanto, a proteção só foi efetiva após 15 min de incubação à pressão ambiente (ver discussão). Acreditamos que a síntese das proteínas relacionadas à indução de tolerância contra os estresse testados se encontra bloqueada durante o tratamento por pressão. Seria interessante tratar as células com 50 MPa e em seguida incubar estas células por 15 min na presença de um inibidor da síntese protéica (como cicloheximida) afim de se determinar se é realmente a síntese de proteínas após o estresse com pressão responsável pela tolerância adquirida.
- É sabido que a indução de um gene não está sempre diretamente relacionado a sua tradução. Seria interessante avaliar a similaridade entre o perfil de expressão gênica gerada pela pressão (FERNANDES *et al.*, 2004) e o perfil de proteínas (proteoma) induzidas após este estresse. Obviamente que recomendamos a extração de proteínas

após, pelo menos, 15 min de tratamento com HHP. Essa é uma ferramenta valiosa para a análise dos principais fatores envolvidos no estresse causado pela HHP.

- Fizemos uma proposta de que os fatores de transcrição Msn2/4 são responsáveis pela regulação da resposta ao estresse de células de leveduras submetidas a HHP (Fig. 17, p 71). Existem várias formas de comprovar esta teoria. Uma delas é a análise de cepas que possuem construções que permitem avaliar o nível da indução desses fatores através do ensaio com gene reporter  $\beta$ -galactosidase (BOY-MARCOTTE *et al.*, 1998). Além disso, estas cepas são mutadas em algumas diesterases (enzimas que degradam cAMP), permitindo o controle intracelular de cAMP. Desta forma será possível observar se uma alteração nos níveis de cAMP são capazes de alterar a sensibilidade celular a HHP. Este trabalho está sendo conduzido no Laboratório de Expressão Heteróloga de Proteínas, UFRJ coordenado pela Profa Dra Eleonora Kurtenbach.
  
- Outro fato que nos chamou atenção é a ausência da indução dos genes envolvidos na biosíntese de trealose (FERNANDES *et al.*, 2004), e que a concentração de trealose não se mostrou alterada mesmo quando as células eram tratadas com pressão e incubadas a pressão ambiente por diferentes intervalos de tempo (Fig 16, p 61). Apesar de os níveis de trealose não serem de extrema importância para células submetidas a HHP, seu papel não deixa de ser importante neste estresse (FERNANDES *et al.*, 1997, 2001). Com isso surgiu-nos uma dúvida: Será que a HHP realmente não é capaz de induzir a síntese de trealose? Para responder esta pergunta estamos utilizando cepas selvagens e mutante no gene responsável pela degradação intracelular da trealose (*NTH1*). Observamos o acúmulo de trealose nestas cepas incapazes de degradar este dissacarídeo. Mais ainda, esse acúmulo parece ocorrer apenas 15 min pós-pressurização, indicando que assim como a tradução do RNAm, a HHP também estaria bloqueando a síntese de trealose. Desta forma, aparentemente as células de levedura acumulam trealose após o estresse de pressão hidrostática, através de um mecanismo aparentemente independente da indução gênica, e rapidamente a degradam. Uma hipótese a ser investigada é a indução paralela da via de síntese e degradação de trealose conhecida como “ciclo fútil” induzida por outros estresses em leveduras (PARROU *et al.*, 1997).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABE, F. e HORIKOSHI, K. Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 130, p.: 307-312, 1995.
- ABE, F. e HORIKOSHI, K. Vacuolar acidification in *Saccharomyces cerevisiae* induced by elevated hydrostatic pressure is transient and is mediated by vacuolar H<sup>+</sup>ATPase. **Extremophiles**, v.: 1, p.: 89-93, 1997.
- ABE, F., KATO, C. e HORIKOSHI, K. Pressure-regulated metabolism in microorganisms. **Trends in Microbiol**, v.: 7, p.: 447-453, 1999.
- ABERTYN, J., HOHMANN, S. e PRIOR, B.A. Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. **Curr Genet**, v.: 25, p.: 12-18, 1994.
- AIBA, H., ADHYA S. e CROMBRUGGHE B. Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells. **J Biol Chem**, v.: 256, p.: 11905-11910, 1981.
- ALEXANDRE, H., ROUSSEAU, I. e CHARPENTIER, C. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 124, p.: 17-22, 1994.
- ALEXANDRE, H., ROUSSEAU, I. e CHARPENTIER, C. Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Appl Biochem**, v.: 20, p.: 173-183, 1994.
- ALEXANDRE, H., ANSANAY-GALEOTE, V., DEQUIN, S. e BLODIN, B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v.: 498, p.: 98-103, 2001.
- ALVAREZ-MARTINEZ, M.T., TORRENT, J., LANGE, R., VERDIER, J.M., BALNY, C. e LIAUTARD, J.P. Optimized overproduction, purification, characterization and high-

- pressure sensitivity of the prion protein in the native (PrP(C)-like) or amyloid (PrP(Sc)-like) conformation. **Biochim Biophys Acta**, v.: 1645, p.: 228-420, 2003.
- BARD, M., BRUNER, D.A., PIERSON, C.A., LEES, N.D., BIERMANN, B., FRYE, L., KOEGEL, C. e BARBUCH, R., Cloning and characterization of *ERG25*, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.: 93, p.:186-190, 1996.
- BARTLETT, D.H, KATO, C. e HORIKOSHI, K. High pressure influences on gene and protein expression. **Res Microbiol**, v.: 146, p.: 697-706, 1995.
- BECKER, J. e CRAIG, E.A. Heat shock proteins as molecular chaperones. **Eur J Biochem**, v.: 219, p.: 11-23, 1994.
- BENEY, L., PERRIER-CORNET, J.M., HAYERT, M. e GERVAIS, P. Shape modification of phospholipid vesicles induced by high pressure: influence of bilayer compressibility. **Biophys J**, v.: 72, p.: 1258-1263, 1997.
- BOLWELL, G.P. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. **Curr Opin Plant Bio**, v.: 2, p.: 287-294, 1999.
- BRAGANZA, L.F. e WORCESTER, D.L. Structural changes in lipid bilayers and biological membranes caused hydrostatic pressure. **Biochemistry**, v.: 25, p.: 7484- 488, 1986.
- BUTLER, A. R. e MEGSON I. L. Non-heme iron nitrosyls in biology. **Chem Rev**, v.: 102, p.: 155-966, 2002.
- CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Curr Opin Microbiol**, v.: 2, p.: 202-207, 1999.
- CARTWRIGHT, C.P., VEAZEY, F.J. e ROSE, A.H., Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in, and accumulation of glycine by *Saccharomyces cerevisiae*. **J Gen Microbiol**, v.: 133, p.: 857-865, 1987.



- CAVICCHIOLI, R. e WATSON, K. Loss of heat-shock acquisition of thermotolerance in yeast is not correlated with loss of heat-shock proteins. **FEBS Lett**, v.: 207, p.: 149-152, 1986.
- CHI, Z. e ARNEBORG, N. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Appl Microbiol**, v.: 86, p.: 1047-1052, 1999.
- CHIANG, K.T., SWITZER, C.H., AKALI, K.O. e FUKUDO, J.M. The role of oxygen and reduced oxygen species in nitric-oxide-mediated cytotoxicity: studies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.: 167, p.: 30-36, 2000a.
- CHIANG, K.T., SHINYASHIKI, M., SWITZER, C.H., VALENTINE, J.S., GRALLA, E.B., THIELE, D.J. e FUKUDO J.M. Effects of nitric oxide on the copper-responsive transcription factor Ace1 in *Saccharomyces cerevisiae*: cytotoxic and cytoprotective actions of nitric oxide. **Arch Biochem Biophys**, v.: 377, p.: 296-303, 2000b.
- COOTE, P.J., COLE, M.B. e JONES, M.V. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. **J Gen Microbiol**, v.: 137, p.: 1701-1708, 1991.
- COSTA, V., REIS, E., QUINTANILHA, A. e MORADAS-FERREIRA, P. Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The key role of the mitochondrial superoxide dismutase. **Arch Biochem Biophys**, v.: 300, p.: 608-614, 1993.
- COSTA, V. e MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Mol Aspects Med**, v.: 22, p.: 217-246, 2001.
- CRAIG, E.A. The heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In **The Molecular and Cellular Biology of The Yeast *Saccharomyces***. Gene Expression, v.: 2, p.: 501-537, 1992.

- CRAIG, E.A. e GROSS, C.A. Is hsp70 the cellular thermometer? **Trends Biochem Sci.**, v.: 16, p.: 135-140, 1991.
- DAVIES, J.M.S., LOWRY, C.V. e DAVIES, K.J.A. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. **Arch Biochem Biophys**, v.: 317, p.: 1-6, 1995.
- DOMITROVIC, T., PALHANO, F.L., BARJA-FIDALGO, C., DEFREITAS, M. E ORLANDO, M.T.D. e FERNANDES, P.M.B. Role of nitric oxide in response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to heat shock and high hydrostatic pressure. **FEMS Yeast Res**, v.: 3, p.: 341-346, 2003.
- ELO MA, KARJALAINEN HM, SIRONEN RK, VALMU L, REDPATH NT, BROWNE GJ, KALKKINEN N, HELMINEN HJ e LAMMI MJ. High hydrostatic pressure inhibits the biosynthesis of eukaryotic elongation factor-2. **J Cell Biochem**, em publicação.
- ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiol Rev**, v.: 24, p.: 469-486, 2000.
- FERNANDES, A.A., SANTAMARIA, J., BUD'KO, S.L., NAKAMURA, O., GUIMPEL, J. E SCHULLER, I.K. Effect of physical and chemical pressure on the superconductivity of high-temperature oxide superconductors. **Phys Rev B Condens Matter**, v.: 44, p.: 7601-7606, 1991.
- FERNANDES, P.M.B., PANEK, A. e KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in trehalose-6-phosphate synthase gene. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 152, p.: 17-21, 1997.
- FERNANDES, P.M.B., FARINA, M. E KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Lett Appl Microbiol**, v.: 32, p.: 42-46, 2001.
- FERNANDES, P.M., DOMITROVIC T., KAO C.M. e KURTENBACH E. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS Lett**, v.: 556, p.: 153-60, 2004.

- FOGUEL, D., e SILVA, J.L. New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. **Biochemistry**, v.: 43, p.:11361-70, 2004.
- FUJII, S., IWAHASHI, H., OBUCHI, K., FUJII, T. e KOMATSU, Y. Characterization of a barotolerant mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of trehalose content and membrane fluidity. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 141, p.: 97-101, 1996.
- GARCIA-GRAELLS, C., VAN OPSTAL, I., VANMUYSEN, S.C. e MICHIELS, C.W. The lactoperoxidase system increases efficacy of high-pressure inactivation of foodborne bacteria. **Int J Food Microbiol**, v.: 81, p.: 211-21, 2003.
- GASCH, A., SPELLMAN, P.T., KAO, C.M., CARMEL-HAREL, O., EISEIN, M.B., STORZ, G., BOTSTEIN, D. e BROWN, P.O. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Mol Biol Cell**, v.: 11, p.: 4241-4257, 2000.
- GEYMONAT, M., WANG, L., GARREAU, H. e JACQUET, M., Ssa1p chaperone interacts with the guanine nucleotide exchange factor of ras Cdc25p and controls the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**, v.: 30, p.: 855-64, 1998.
- GOFFEAU, A., BARRELL, B.G., BUSSEY, H., DAVIS, R.W., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J.D., JACQ, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E.J., MEWES, H.W., MURAKAMI, Y., PHILIPPSSEN, P., TETTELIN, H. e OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. **Science**, v.: 274, p.: 563-567, 1996.
- GOFFEAU, A., AERT, R. e AGOSTINI-CARBONE, M. L. The yeast genome directory. **Nature**, v.: 387 (supplement), p.: 1-105, 1997.
- GRANGER, D. L., HIBBS, J. B. J., PERFECT, J. R. e DURACK, D. T. Metabolic fate of L-arginine in relation of microbiostatic capability of murine macrophages. **J Clin Investing**, v.: 85, p.: 264-273, 1990.

- GROSS, M. e JAENICKE, R. Pressure-induced dissociation of tight couple ribosomes. **FEBS Lett**, V.: 267, p.: 239-241, 1990.
- GROSS, M., LEHLE, K., JAENICKE, R. e NIERHAUS, K.H. Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. Stabilizing conditions and identification of the most sensitive functional state. **Eur J Biochem**, v.: 218, p.: 463-468, 1993.
- GROSS, M. e JAENICKE, R., Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. **Eur J Biochem**, v.: 221, p.: 617-30, 1994.
- HAMER, D.H., THIELE, D.J. e LEMOTT, J.E. Function and autoregulation of yeast copper-thionein. **Science**, v.: 228, p.: 685-690, 1985.
- HASLBECK, M., WALKE, S., STROMER, T., EHMSPERGER, M., WHITE, H.E., CHEN, S., SAIBIL, H.R. e BUCHER, J. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. **EMBO** , v.: 18, p.: 6744-6751, 1999.
- HAUBEN, K.J.A., WUYTACK, E.Y., SOONTJENS, C.C.F. e MICHIELS, C.W. High-pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. **J Food Protect**, v.: 59, p.: 350-355, 1996.
- HERRERO, A.A., GOMEZ, R.F. e ROBERTS, M.F. Ethanol-induced changes in the membrane lipid composition of *Clostridium thermocellum*. **Biochim Biophys Acta**, v.: 693, p.: 195-204, 1982.
- HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.: 66, p.: 300-372, 2002.
- HOHMANN, S. e MAGER, W.H. Yeast stress responses. **Landes Company Austin**, .1997.
- HOOVER, D.G., METRICK, C., PAPINEAU, A.M., FARKAS, D.F. e KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic-pressure on food microorganisms, **Food Techn**, v.: 43, p.: 99-107, 1989.

- IWAHASHI, H., KAUL, S.C., OBUCHI, K. e KOMATSU, Y. Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. **FEMS Microbiol Lett.** V.: 64, p.: 325-328, 1991.
- IWAHASHI, H., FUJII, S., OBUCHI, K., KAAUL, S.C., SATO, A. e KOMATSU, Y. Hydrostatic pressure is like high temperature and oxidative stress in the damage it causes to yeast. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 108, p.: 53-57, 1993.
- IWAHASHI, H., SHIMIZU, H., ODANI, M e KOMATSU, Y. Piezophysiology of genome wide gene expression levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Extremophiles**, v.: 7, p.: 291-298, 2003.
- JAMIESON, D.J. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. **J Bacteriol**, v.: 174, p.: 6678-6681, 1992.
- JAMIESON, D.J. Oxidative stress responses of the *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.: 14, p.: 1511-1527, 1998.
- JONES, R.P. Biological principles for the effects of ethanol. **Enzyme Microb. Technol**, v.: 11, p.: 130-153, 1989.
- KAJIWARA, S., SHIRAI, A. FUJII, T., TOGURI, T., NAKAMURA, K. AND OHTAGUCHI, K. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of ethanol tolerance and the *FAD2* gene from *Arabidopsis thaliana*. **Appl Environ Microbiol**, v.: 62, p.: 4309-4313, 1996.
- KANADIA, R.N., KUO, W.N., MENABB, M., e BOTCHWAY, A. Constitutive nitric oxide synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Mol Bio Intern**, v.: 45, p.: 1081-1087, 1997.
- KATAOKA, T., POWERS, S., CAMERON, S., FASANO, O., GOLDFARB, M., BROACH, J.R., e WIGLER, M. Functional Homology of Mammalian and Yeast RAS genes. **Cell**, v.: 40, p.: 19-26, 1985.

- KATO, C. e QUERESHI, M.H. Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v.: 1, p.: 87-92, 1999.
- KOBAYASHI, N., MCCLANAHAN, T.K., SIMON, J.R., TREGGER, J.M. e MCENTEE, K. Structure and functional analysis of the multistress response gene *DDR2* from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Biophys Res Commun**, v.: 229, p.: 540-547, 1996.
- LANDAU, J.V. Induction, transcription and translation in *Escherichia coli*: a hydrostatic pressure study. **Biochim Biophys Acta**, v.: 149, p.: 506-512, 1967.
- LEW, D.J., WEINERT, T. e PRINGLE, J.R. Cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. In: **The molecular and Cellular Biology of the yeast *Saccharomyces*. Gene Expression**, Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach, J.R. (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, **3**: 607-695, 1992.
- LEWIS, J.G., LEARMONTH, R.P. e WATSON, K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v.: 141, p.: 687-694, 1995.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. e RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.: 193, p.: 265-275, 1951.
- LUCKHART, S. e ROSENBERG, R. Gene structure and polymorfism of invertebrate nitric oxide synthase. **Gene**, v.: 232, p.: 25-34, 1999.
- LYNCH, T.W. e SLIGAR, S.G. Experimental and theoretical high pressure strategies for investigating protein-nucleic acid assemblies. **Biochim Biophys Acta**, v.: 1595, p.: 277-282, 2002.
- MAGER, W.H. e KRUIFF, A.J. Stress-induced transcriptional activation. **Microbiol Rev**, v.: 59, p.: 506-531, 1995.

- MAGER, W.H. e HOHMANN, S. Stress response mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Yeast Stress Response** (Mager, W.H. and Hohmann, S., Eds.) pp. 75-99. R.G. Company, Texas, U.S.A, 1997.
- MARTÍNEZ-PASTOR, M.T., MARCHLER, G., SCHÜLLER, C., MARCHLER-BAUER, A., RUIS, H. e ESTRUCH, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **EMBO**, v.: 15, p.: 2227-2235, 1996.
- MENTRÉ, P., HAMRAOUI, L., HUI BON HOA, G. e DEBEY, P. Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and *nucleolus* as revealed by electron microscopy. **Cell Mol Biol**, v.: 45, p.: 353-362, 1999.
- MENTRÉ, P. e HUI BON HOA, G. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule – associated water. **Int Rev of Cytol**, v.: 201, p.: 1-84, 2001.
- MILLER, M.J., XUONG, N.H. e GEIDUSCHEK, E.P., A response of protein synthesis to temperature shift in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.: 76, p.: 5222-5225, 1979.
- MOLINA-GARCIA, A.D. The effect of hydrostatic pressure on biological systems. **Biotechnol Genet Eng Rev**, v.: 19, p.: 3-54, 2002.
- MONKADA, S., PALMER, R.M.J. e HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v.: 43, p.: 109-141. 1991.
- MOTSHWENE, P., KARREMAN, R., KGARI, G., BRANDT, W. e LINDSEY, G., LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J**, v.: 377, p.: 769-74, 2004.
- MURAD, F. The role of nitric oxide in modulating guanylyl cyclase. **Neurotrans**, v.: 2, p.: 1-4, 1994.

- MURRAY, J.I., WHITFIELD, M.L., TRINKLEIN, N.D., MYERS, R.M., BROWN, P.O. E BOTSTEIN, D. Diverse and specific gene expression responses to stresses in cultured human cells. **Mol Biol Cell**, v.: 15. p.:2361-74, 2004.
- OKANE, D., GILL, V., BOYD, P. e BURDON, B. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. **Planta**, v.: 198, p.: 371-377, 1996.
- ORLANDO, M. T. D. Comparação entre o efeito da pressão química e a pressão externa hidrostática em supercondutores do tipo (Hg, Re)-1223. **Tese de Doutorado**, CBPF, Brasil. 1999.
- PALHANO, F.L., ORLANDO, M.T.D. e FERNANDES, P.M.B. Induction of Baroresistance by Hydrogen Peroxide, Ethanol and Cold Shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 233, p.: 139-154, 2004a.
- PALHANO, F.L., GOMES, H.L., ORLANDO, M.T., KURTENBACH, E. e FERNANDES, P.M.B. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: From cellular to molecular approaches. **Cell Mol Biol**, v.: 50, p.: 447-457, 2004b.
- PALHANO, F.L., VILCHES, T.T., SANTOS, R.B., ORLANDO, M.T., VENTURA, J.A. e FERNANDES, P.M. Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. **Int J Food Microbiol**, v.: 95, p.: 61-6, 2004c.
- PANEK, A.D. Trehalose metabolism: new horizons in technological applications. **Braz J Med Biol Res**, v.: 28. p.: 169-181, 1995.
- PARROU, J.L., TESTE, M.A. e FRANÇOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, v.: 143, p.: 1891-1900, 1997.



- PARSELL, D.A., KOWAL, A.S. e LINDQUIST, S. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. **Nature**, v.: 372, p.: 475-478, 1994.
- PENNINCKX, M.J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. **FEMS Yeast Res**, v.: 2, p.: 295-305, 2002.
- PETERS, W.S., HAGEMANN, W. e DERI TOMOS, A. What makes plants different? Principles of extracellular matrix function in 'soft' plant tissues. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v.: 125, p.: 151-67, 2000.
- PERRIER-CORNET, J.M., HAYERT, M. e GERVAIS, P., Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization. **J Appl Microbiol**, v.: 87, p.: 1-7, 1999.
- PIPER, P.W. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 134, p.: 121-127, 1995.
- PIPER, P.W. The yeast heat shock response. In: **Yeast Stress Response** (Mager, W.H. and Hohmann, S., Eds.) pp. 75-99. R.G. Company, Texas, U.S.A, 1997.
- QUINN, P.J., JOO, F. e VIGH, L. The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. **Prog Biophys Mol Biol**, v.: 53, p.: 71-103, 1989.
- REYES, M.C., TAUC, P e BROCHON, J. C. Pressure effects on the physical properties of lipid bilayers detected by trans-parinaric acid fluorescence decay. **Biophys J**, v.: 65, p.: 2248-2260, 1993.
- ROBERTS, C.M. e HOOVER, D.G. Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. **J Appl Bacteriol**, v.: 81, p.: 363-368, 1996.
- ROBINSON, C.R. e ENGELBORGHES, Y. Tubulin polymerization in dimethyl sulfoxide. **J Biol Chem**, v.: 257, p.: 5367-5371, 1982.

- ROSS, A.I., GRIFFITHS, M.W., MITTAL, G.S. e DEETH, H.C. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. **Int J Food Microbiol**, v.: 89, p.: 125-138, 2003.
- ROTHSCHILD, L.J. e MANCINELLI, R.L. Life in extreme environments. **Nature**, v.: 409, p.: 1092-1101, 2001.
- SAHARA, T., GODA, T. e OHGIYA, S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. **J Biol Chem**, v.: 277, p.: 50015-50021, 2002.
- SAJBIDOR, J. e GREGO, J. Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 93, p.: 13-16, 1992.
- SALAHUDEEN, A.K., HUANG, H, PATEL, P. e JENKINS, J.K. Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. **Transplantation**, v.: 70, p.: 1424-1431, 2000.
- SALMON, E.D. Pressure- induced depolymerization of brain microtubules *in vitro*. **Science**, v.: 189, p.: 884-886, 1975.
- SAMDANI, A.F., DAWSON, T.M. e DAWSON, V.L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. **Stroke**, v.: 28, p.: 1283-1288. 1997.
- SAN MARTÍN, M.F., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. e SWANSON. Food Processing by High Hydrostatic Pressure. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.: 42, p.:627-645, 2002.
- SEYMOUR, J.I. e PIPER, P.W. Stress induction of *HSP30*, the plasma membrane heat shock protein gene of *Saccharomyces cerevisiae*, appears not to use known stress-regulated transcription factors. **Microbiology**, v.: 145, p.: 231-239, 1999.

- SIDERIUS, M. e MAGER, W.H. General stress response: in search of a common denominator. In: **Yeast Stress Response** (Mager, W.M. e Hohmann, S., Eds.) pp. 241-230. R.G. Company, Texas, USA, 1997.
- SILVA, J., FOGUEL, D. e ROYER, C. A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **Trends Biochem Sci**, v.: 26, p.: 612-618, 2001.
- SINGER, M.A. e LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. **Trends Biotechnol**, v.: 16, p.:460-468, 1998.
- SMELT, J.P.P.M. Recent advances in the microbiology of high hydrostatic pressure processing. **Trends Food Sci Technol**, v.: 9, p.: 152-158, 1998.
- SOMERO, G.N. Adaptations to high hydrostatic pressure. **Annu Rev Physiol**, v.: 54, p.: 557-577, 1992.
- SWAN, T.M. e WATSON, K. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 169, p.: 191-197, 1998.
- TAMURA, K., MIYASHITA, M. E IWAHASHI, H. Stress tolerance of pressure-shocked *Sacharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Lett**, v.: 20, p.: 1167-1169, 1998.
- TROLLMO, C., ANDRÉ, L., BOLMBERG, A. e ADLER, L. Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v.: 56, p.: 321-326, 1988.
- VARELA, J.C.S., VAN BEEKVELT, C.A., PLANTA, R.J. e MAGER, W.H Osmostress-induced changes in yeast gene expresión. **Mol Microbiol**, v.: 6, p.: 2183-2190, 1992.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S., KURTENBACH, E., AMORIM, A.F. e WEBER, G., Pressure-induced dissociation of solubilized sarcoplasmic reticulum ATPase. **J Biol Chem.**, v.: 261, p.: 9872-9878, 1986.

- WARNER, J.R. The economies of ribosome biosynthesis in yeast. **Trends Biochem Sci**, v.: 24, p.: 437-440, 1999.
- WHEALS, A.E. Biology of the cell cycle in yeasts. In: **The yeasts**, Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds), Academic Press INC, London, UK, 1987, vol. 1, pp. 283-390.
- WELCH, J., FOGEL, S., BUCHMAN, C. e KARIN, M. The CUP2 gene product regulates the expression of the CUP1 gene, coding for yeast metallothionein. **EMBO**, v.: 8, p.: 255-260, 1989.
- WENDEHENNE, D., PUGIN, A., KLESSING, D.F. e DURNER, J. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends Plant Sci**, v.: 6, p.: 177-183, 2001.
- YALE, J. e BOHNET, H.J. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. **J Biol Chem**, v.: 276, p.: 15996-6007, 2001.
- YAYANOS, A.A. e POLLARD, E.C. A study of the effects of hydrostatic pressure on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **Biophysics**, v.: 9, p.: 1464-1482, 1969.
- YOU, K.M., ROSENFELD, C.-L e KNIPPLE, D.C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Appl Environ Microbiol**, v.: 69, p.: 1499-1503, 2003.
- ZHANG, S., SKALSKY, Y. e GARFINKEL, D.J. *MAG2* or *SPT23* is required for transcription of the  $\Delta 9$  fatty acid desaturase gene, *OLE1*, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v.: 151, p.: 473-483, 1999.
- ZHANG, L., ONDA, K., IMAI, R., FUKUDA, R., HORIUCHI, H. e OHTA, A. Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Biophys Res Commun**, v.: 307, p.: 308-314, 2003.
- ZIMMERMAN, A.M. High pressure studies in cell biology. **Int Rev Cytol**, v.: 30, p.: 1-47, 1971.

## Role of nitric oxide in the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to heat shock and high hydrostatic pressure

Tatiana Domitrovic<sup>a</sup>, Fernando L. Palhano<sup>a</sup>, Christina Barja-Fidalgo<sup>b</sup>,  
Martha DeFreitas<sup>b</sup>, Marcos T. D. Orlando<sup>c</sup>, Patricia M. B. Fernandes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dept. C. Fisiológicas/CBM/UFES Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe 29040-090 Vitória, ES, Brazil

<sup>b</sup> Dept. Farmacologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 20.551-030, Brazil

<sup>c</sup> Dept. Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES 29040-090, Brazil

Received 2 April 2002; received in revised form 30 November 2002; accepted 11 December 2002

First published online 19 February 2003

### Abstract

Nitric oxide (NO) is a simple and unique molecule that has diverse functions in organisms, including intracellular and intercellular messenger. The influence of NO on cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* and as a signal molecule in stress response was evaluated. Respiring cells were more sensitive to an increase in intracellular NO concentration than fermentatively growing cells. Low levels of NO demonstrated a cytoprotective effect during stress from heat-shock or high hydrostatic pressure. Induction of NO synthase was isoform-specific and dependent on the metabolic state of the cells and the stress response pathway. These results support the hypothesis that an increase in intracellular NO concentration leads to stress protection.

© 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; Nitric oxide; Nitric oxide synthase; Stress response; Heat-shock; Hydrostatic pressure

### 1. Introduction

Nitric oxide (NO) is considered to be a widespread signalling molecule involved in the regulation of a large number of cellular functions, being an intracellular messenger and an intercellular messenger to regulate neighboring cells [1]. Conversely, NO is implicated as a highly cytotoxic effector involved in the progression of various pathophysiological conditions [2]. As a free radical, NO can easily react with molecular oxygen (O<sub>2</sub>) and superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), generating strong oxidizing agents like peroxynitrite (OONO) [3]. These compounds can cause damage to various cellular components such as proteins, lipids and DNA. As a signalling molecule, NO can activate or inhibit enzyme activities controlling signal transduction cascades [4].

NO is produced by a nitric oxide synthase (NOS). Mammalian NOS occurs in both constitutive (neuronal

NOS1 and endothelial NOS3) and inducible (NOS2) isoforms. Small quantities of NO generated by the constitutive NOS help to maintain the vasculature and the central nervous system. In contrast, NOS2 gene expression is induced in macrophages and many other cell types in response to inflammatory agents [5].

Recently, it has been shown that NO is produced not only in mammals but also in cells from organisms as diverse as invertebrates, plants and microorganisms [6]. In plants, NO has been implicated in several physiological functions ranging from plant development to defense responses [7]. Despite the wide presence of NO in biological systems, little is known about its action on cellular metabolism.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a well-established model for studies of eukaryotic cell biology and has a constitutive NOS homolog to the mammalian neuronal type [8]. However, neither the regulation of NOS expression in the yeast cell, nor the role of NO in signalling pathways is known. Recently, a cytoprotective and cytotoxic effect of NO in response to copper stress has been shown [9]. Those results suggest that NO may be involved in stress response pathways.

\* Corresponding author. Tel.: +55 (27) 3335 7348;

Fax: +55 (27) 3335 7270.

E-mail address: pat@npd.ufes.br (P.M. B. Fernandes).

When yeast cells are subjected to a heat-shock stress, a range of lethal disruptions may occur, including marked changes in nucleolus, granulation of the cytoplasm, as well as formation of electron-dense granules in the mitochondria [10]. A nearly universal response of organisms, *S. cerevisiae* included, to a mild heat-shock treatment is the induction of a set of proteins referred to as heat-shock or stress proteins (Hsps). Those cells acquire tolerance to high osmotic pressure, dehydration, cryotreatment and hydrostatic pressure [11–16].

Hydrostatic pressure is a useful tool to study physical stress in living cells, as it is a way of changing only one variable, the reaction volume. Temperature variation involves both volume and thermal changes [17]. Hydrostatic pressure has a strong effect on various cell structures and their functions [18–19]. Among other effects, high pressure interferes with the cytoarchitecture and with processes of polymerization and denaturation of proteins that are essential to the formation, function and stability of mitotic structures [20–21]. Yeast viability during hydrostatic-pressure treatment decreases with increasing pressure and this effect is more pronounced when cells are submitted to pressures above 100 MPa. At 220 MPa all wild-type cells are killed. Transmission electron-microscopic images of the yeast cells suggest that hydrostatic pressure induces changes in the cytoskeleton, and consequently on the cell wall and in organelle dynamics [16]. It has already been observed that a heat pre-treatment induces barotolerance [15–16]. Nevertheless, hydrostatic pressure does not have a similar effect as temperature, since a low-pressure (50 MPa) pre-treatment does not induce tolerance to higher pressures [22]. Those results lead to the concept that even if the pathways may be overlapping, they are not the same and do not induce the same protection mechanisms.

In the present work we explored the ability of NO to interfere in cell growth. Studies were also conducted to determine the extent of a protective effect of NO on yeast cells submitted to physical stresses caused by high temperature or high hydrostatic pressure. In addition, the expression pattern of NOS isoforms in yeast cells under different growth conditions was analyzed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strain and media

*S. cerevisiae* wild-type strain Y440 Mat *a leu2* was grown in YEPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) or YEPGal (1% yeast extract, 2% peptone, 2% galactose) at 30°C with aeration up to different growth phases.

### 2.2. Reagents

Sodium nitroprusside (SNP), (Merck Chemical Ind.,

Darmstadt, Germany) and *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), a gift from Dr. Jamil Assreuy (UFSC, SC, Brazil), were used as NO donors. Solutions were prepared by dissolving the salt in ultra-pure sterile water immediately before use. Yeast cultures were treated with SNP or SNAP at concentrations ranging from 0.5 up to 2 mM. In addition, the same experiments were conducted with sodium nitrite and sodium nitrate (Merck Chemical Ind.).

### 2.3. NO determination

NO was indirectly determined as nitrite using Griess reagent [23]: 0.4 ml 1% (w/v) sulfanilamide in 2.5% (v/v) phosphoric acid and 0.4 ml 0.5% (w/v) *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in 2.5% (v/v) phosphoric acid were added to 0.2 ml of sample. After 10 min at room temperature the absorbance at 540 nm was measured. Sodium nitrite (0–25 µM) was used for the calibration curve.

### 2.4. Temperature treatment

Yeast cultures at early exponential phase (approximately  $10^7$  cells ml<sup>-1</sup>) were treated with different concentrations of SNP and submitted to heat shock at 54°C for 20 min. For comparative analysis cells were pre-treated at 40°C for 60 min.

### 2.5. Hydrostatic-pressure treatment

Yeast cells were subjected to a hydrostatic pressure of 50 or 220 MPa for 30 min at room temperature. Samples were pressurized in the absence of air bubbles. The experiments were performed as previously described [22], except for the equipment used. The external hydrostatic pressure was applied in a BeCu piston-cylinder cell similar to the one used in other works [24–26]. A calibrated mechanical manometer was used to measure the pressure inside the cell.

### 2.6. Cell viability

Cells were plated on solidified YEPD medium after appropriate dilution and viability was determined by colony counts 48 h after treatment. The tolerance value was determined by comparing the colony-forming units of treated versus untreated samples. All plates were done in duplicate. Cell growth was followed at 600 nm. Yeast cells were fixed with 20% formaldehyde, diluted and counted in the hemacytometer under the microscope. Budding index was determined by the ratio of budding cells to total cell number. Each experiment was carried out at least three times and mean values were calculated.

### 2.7. Protein extraction and Western blotting analysis

Cells were collected by centrifugation (2000×*g*) and



washed three times in cold sterile water. The pellet was resuspended in 5  $\mu$ l extraction buffer (50 mM Tris, pH 7.2; 300 mM NaCl; 1.5  $\mu$ M pepstatin and 0.4 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Cells were broken with glass beads (425–600  $\mu$ m, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) by vortexing five times, 1 min each with intervals of 1 min on ice.

Protein concentration was determined in the lysates and samples (50  $\mu$ g) were subjected to gel electrophoresis and immunoblotting. SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) was performed on 10% acrylamide. After gel electrophoresis, proteins were transferred to PVDF membranes (Amersham Pharmacia Biotech., Sunnyvale, CA, USA) during 2 h electrophoresis (80 mA) in Tris–glycine buffer (25 mM Tris–HCl, pH 7.0, 192 mM glycine) containing 20% methanol. The PVDF membranes were incubated in TBS (20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20) containing 2% bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., USA) overnight at 4°C, and then incubated for 2 h at room temperature with the primary antibodies: rabbit (polyclonal) anti-NOS2 (sc-651) or anti-NOS3 (sc-8311) (2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA) or mouse (monoclonal) anti-NOS1 (1:500, Sigma Chemical Co., USA). After extensive washing in TBS, the nitrocellulose sheets were incubated with

anti-rabbit IgG antibody peroxidase-conjugated (1:2000, Sigma Chemical Co., USA). Immunoreactive proteins were visualized by staining with 3,3'-diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., USA).

### 3. Results and discussion

In order to determine a possible cytotoxic effect of NO on *S. cerevisiae*, cell cultures in distinct exponential growth phases were treated with different concentrations of NO donors, SNP or SNAP for 6 h. During the first exponential phase, glucose fermentation is the only energetic pathway and the growth rate is high. In yeast, availability of glucose represses expression of genes coding for enzymes of the respiratory pathway as well as of genes for catabolism of other carbon sources. When glucose is depleted, the cell cycle is interrupted and genes involved in aerobic energy metabolism are expressed, allowing the yeast to resume growth until the stationary phase when the nutrients are consumed. During the second exponential phase, contrary to the first, cells depend on oxygen and the production of free radicals is higher [27].

In concentrations ranging from 0.1 to 1.0 mM, SNP had no inhibitory effect on the early exponential cell growth, as

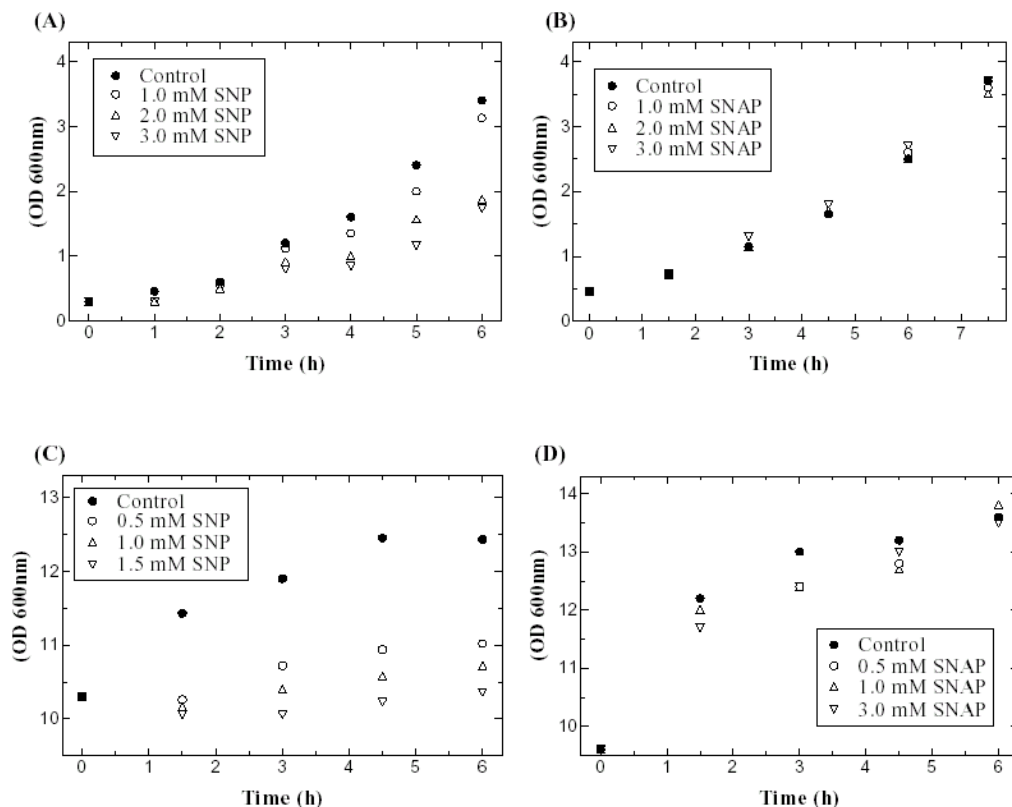


Fig. 1. Effect of increasing concentrations of different NO donors on cell growth of *S. cerevisiae*. Fermentative yeast cells were grown in the presence of SNP (A) or SNAP (B) at concentrations ranging from 1.0 to 3.0 mM. Cells at late exponential phase were grown with 0.5, 1.0 and 1.5 mM SNP (C) or SNAP (D). Culture samples were taken at each hour for up to 6 h and checked for absorbance at 600 nm. The data points represent the mean value for at least three independent experiments. Error bar is smaller than the size of the data points.

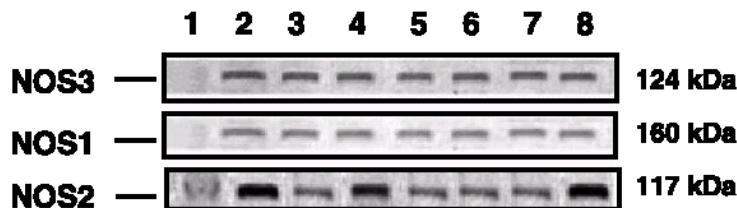


Fig. 2. Western blotting analysis of the expression of endothelial, neuronal and inducible NOS isoforms (NOS3, NOS1 and NOS2): lane 1, stationary cells grown in YEPD; lane 2, early-exponential-phase cells in YEPD; lane 3, late-exponential-phase cells in YEPD; lane 4, early-exponential-phase cells in YEPGal; lane 5, early-exponential-phase cells in YEPD and treated at 40°C for 1 h; lane 6, late-exponential-phase cells in YEPD treated at 40°C for 1 h; lane 7, early-exponential-phase cells in YEPGal treated at 40°C for 1 h; lane 8, early-exponential-phase cells in YEPD barotreated at 50 MPa for 30 min.

the budding index of the 1.0-mM-treated cells remained the same as of the control. Cells treated with concentrations above 1.5 mM showed an increase in generation time, demonstrating a cytostatic effect of NO at those higher concentrations (Fig. 1A). The inhibitory effect of NO on the cell cycle is greatly enhanced in the late exponential phase, where a concentration as low as 0.5 mM SNP was sufficient to cause a strong decrease in cell growth (Fig. 1C). Yeast cells at late exponential phase treated with 1.5 mM SNP had a decrease of 50% in their budding rate compared to the untreated control cells. These results are in agreement with a previous report proposing that NO-mediated cytotoxicity is enhanced by O<sub>2</sub> itself and other reactive species [3]. Furthermore, nitrosation of the heme moiety of complex IV in the respiratory chain has been recognized to result in powerful inhibition of respiration and to partially account for cytotoxic effects of NO [28].

However, SNAP, another NO donor used at concentrations that SNP showed cytostatic effects, did not cause alterations in the cell cycle (Fig. 1B,D). Since a distinct kinetic pattern of NO release has been described for both compounds [29], the Griess assay was performed to comparatively quantify the nitrite formation from NO liberated by the two donors. After a 30-min incubation in cell-free culture medium SNAP and SNP generated almost equivalent nitrite concentrations (20–30 μM). However, in the presence of yeast the NO release by SNP was faster, reaching the same values (25 μM) in few minutes, and SNAP decomposition to NO and SAP (*S*-acetylpenicillamine) was slower, being not affected by the presence of cells in the medium (data not shown). This observation is in agreement with the different chemical characteristics of these two donors, and suggests that the kinetics of NO liberation are an important factor for the toxicity. Another explanation refers to the toxic effect of cyanide released by SNP. Nevertheless, data in the literature attest that the final cyanoferrate formed, [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup>, is biologically inert, and is unlikely to cause cyanide poisoning [29]. Furthermore, when yeast cell cultures were treated with completely decomposed SNP, or with nitrite and nitrate, no cytotoxic effect was observed (data not shown).

In order to detect the presence of the NOS isoforms

NOS1, NOS3 and NOS2, Western blotting analyses were performed on *S. cerevisiae* cells at different growth phases in the presence of glucose or galactose (Fig. 2). No bands could be detected from the stationary-phase cells. However, during the first and second exponential growth phases, a single band could be visualized for each isoform tested. The molecular masses were in agreement with those found for mouse NOS isoforms: 160, 130 and 132 kDa for NOS1, NOS2 and NOS3, respectively [30].

The isoforms of NOS1 and NOS3 (known as neuronal and endothelial in mammals) seem to be expressed in yeast cells throughout exponential growth, but could not be detected at stationary phase. On the other hand, the expression of NOS2 (called inducible in mammals) was clearly induced during fermentation, as it could be visualized as a stronger signal on Western blot (Fig. 2, lane 2). Even when galactose, a carbon source less repressive towards respiration was the fermentative substrate, the enzyme could be clearly detected (Fig. 2, lane 4).

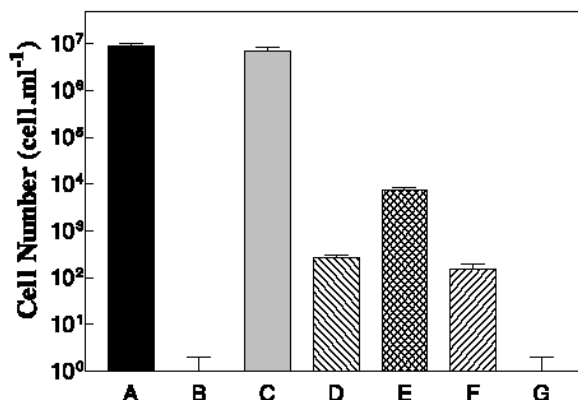


Fig. 3. Thermotolerance induction by SNP treatment. Exponentially growing *S. cerevisiae* cells were submitted to different thermotreatments, with and without SNP. Yeast cells at 30°C (A) and heat-shocked cells at 54°C for 20 min (B) are the positive and negative controls, respectively. Also, as a control, induction of cytoprotection was achieved by submitting cells to a heat pretreatment at 40°C for 60 min followed by heat-shock at 54°C for 20 min (C). Yeast cells were treated for 10 min with the NO donor SNP at the concentrations of 0.5 mM (D), 1.0 mM (E), 1.5 mM (F), 2.0 mM (G) and heat-shocked at 54°C for 20 min. Error bars indicate the standard error of the mean for at least three independent experiments.



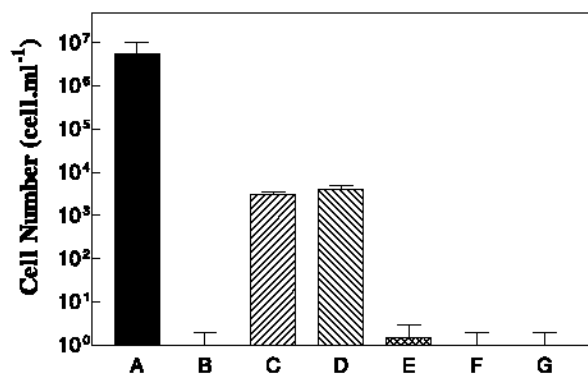


Fig. 4. Cell resistance against heat shock after SNAP, or nitrite and nitrate treatment. *S. cerevisiae* cells at early exponential phase were grown for 90 min in presence of SNAP, or  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$ , and then submitted to heat shock at 54°C during 20 min. As a control, cell viability of untreated culture was determined before (A) and after heat shock (B). SNAP concentrations tested were 1.0 mM (C) and 2.0 mM (D). Sodium nitrate and sodium nitrite were assayed in concentrations of 0.5 mM (E), 1.0 mM (F) or 2.0 mM (G). Error bars indicate the standard error of the mean for at least three independent experiments.

Previous studies have indicated that NO might have both a toxic effect on *S. cerevisiae* and play a protective role [9]. To address a possible mechanism of interaction of NO and physical stresses, yeast cells treated with different NO donors were exposed to a high temperature of 54°C for 30 min, or to a high hydrostatic pressure of 200 MPa for 30 min. Cells can only survive those otherwise lethal conditions if they have been previously submitted to a temperature treatment of 40°C. This increase in temperature is sufficient to induce the Hsps necessary to protect the cells against damage caused by high temperature and other severe stresses [11]. A possible role of NO as a mediator for heat stress response was examined using different concentrations of SNP or SNAP. A cytoprotection was clearly observed when cells were treated with 1.0 mM SNP (Fig. 3). The same result was obtained for SNAP. However, due to its slower release of NO in solution when compared to SNP, a pretreatment of 90 min was necessary to confer protection (Fig. 4). Furthermore, since NO is rapidly oxidized to nitrite and nitrate, yeast cells were treated with various concentrations of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  in order to investigate whether NO metabolites might interfere in the cytoprotective effect of SNP or SNAP. No cytoprotection was observed, ensuring that NO was itself responsible for the protective effect (Fig. 4).

A low intracellular concentration of NO may elicit a stress protection signal, but our results lead us to believe that it does not induce all the Hsps necessary for full protection. Indeed, trehalose does not accumulate during treatment with any concentration of SNP (data not shown), indicating that the trehalose-6-phosphate synthase, an Hsp, is not being induced by NO. In fact, the protection conferred by NO is not the same as the one achieved by the heat pretreatment. Moreover, heat pretreatment does not lead to an induction of the NOS iso-

forms. On the contrary, by comparing untreated (Fig. 2, lane 2) with heat-treated cells (Fig. 2, lane 5), both at the early exponential phase, there was a decrease in the NOS2 expression level, indicating that the induction of the NOS does not take part in the heat-induced protection cascade. High concentrations of SNP did not lead to an increase in thermotolerance. Furthermore, cells treated with 2.0 mM SNP did not survive high temperature, resembling control cells that had not been submitted to any kind of pre-treatment (Fig. 3). An explanation could be that high concentrations of NO lead to an oxidative stress, thus reducing cell resistance [3].

To analyze the role of NO in the induction of barotolerance in yeast, cells were treated with 1.0 mM SNP and submitted to a 200-MPa pressure. The same assay was conducted with cells treated with 1 mM SNAP during 90 min. Like the results observed for heat-shocked cells, the survival rate of treated cells was 500 times greater than that of untreated cells. On the other hand, the Western blot experiment showed that, differently from the result after heat treatment, NOS2 expression was not decreased in cells submitted to a barotreatment of 50 MPa (Fig. 2, lane 8).

Our results, in agreement with others involving NO interaction with copper stress [9], showed that NO elicits a cytoprotection effect in *S. cerevisiae* yeast cells. It has been found that at low levels, NO interacts with the transcription factor ACE1, enhancing its activity [31]. Further experiments could extend this for other transcription factors involved in stress response. However, the decrease in NOS2 expression during heat-pretreatment suggests that, even if NO functions as an Hsp inducer, probably it is not essential for the heat stress response.

A stress condition leads to adjustment of metabolism

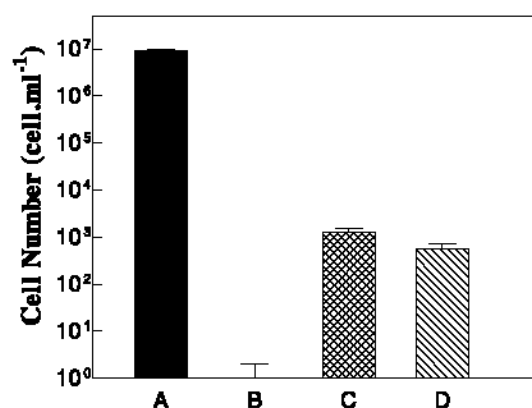


Fig. 5. Barotolerance induction by treatment with NO donors. Exponentially growing yeast cells were pressurized at 220 MPa for 30 min after treatment with 1.0 mM SNP for 10 min, (C) or after 90 min in the presence of 1 mM SNAP (D). As a negative control, cells were submitted to the same hydrostatic pressure without any previous treatment (B). Dark bar (A) represents cells that had not been pressurized. Error bars indicate the standard error of the mean for at least three independent experiments.

and gene expression pattern to a new status. Non-essential genes are repressed while genes coding for proteins that play an important role in protecting the cell against the stress are induced [32]. Our results pointed out that after a barotreatment the intracellular concentration of NOS2 remains the same as during the first exponential growth phase. This observation not only confirms that hydrostatic pressure induces a stress response that is different from the heat-stress response, but also suggests that NO may play a role as signal molecule in stress induced by hydrostatic pressure.

### Acknowledgements

Thanks are due to Dr. Vasquez and Dr. Meyrelles, UFES, for enthusiastic discussions on the early phase of this work and to Dr. Alan Wheals, Bath University, for critical review of the manuscript. This work was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and PIBIC/CNPq/UFES.

### References

- [1] Monkada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–141.
- [2] Samdani, A.F., Dawson, T.M. and Dawson, V.L. (1997) Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28, 1283–1288.
- [3] Chiang, K.T., Switzer, C.H., Akali, K.O. and Fukudo, J.M. (2000) The role of oxygen and reduced oxygen species in nitric-oxide-mediated cytotoxicity: studies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 167, 30–36.
- [4] Murad, F. (1994) The role of nitric oxide in modulating guanylyl cyclase. *Neurotransmissions X* (2), 1–4.
- [5] Wendehenne, D., Pugin, A., Klessing, D.F. and Durner, J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* 6, 177–183.
- [6] Luckhart, S. and Rosenberg, R. (1999) Gene structure and polymorphism of invertebrate nitric oxide synthase. *Gene* 232, 25–34.
- [7] Bolwell, G.P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Bio.* 2, 287–294.
- [8] Kanadia, R.N., Kuo, W.N., Menabb, M. and Botchway, A. (1997) Constitutive nitric oxide synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Mol. Bio. Int.* 45, 1081–1087.
- [9] Chiang, K.T., Shinyashiki, M., Switzer, C.H., Valentine, J.S., Gralla, E.B., Thiele, D.J. and Fukudo, J.M. (2000) Effects of nitric oxide on the copper-responsive transcription factor Ace1 in *Saccharomyces cerevisiae*: cytotoxic and cytoprotective actions of nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 377, 296–303.
- [10] Webster, D.L. and Watson, K. (1993) Ultrastructural changes in yeast following heat shock and recovery. *Yeast* 9, 1165–1175.
- [11] Craig, E.A. (1992) The heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Gene Expression (Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach, J.R. Eds.), Vol. 2, pp. 501–537. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- [12] Sanchez, Y., Taulin, J., Borkovich, K.A. and Lindquist, S. (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* 11, 2357–2364.
- [13] Varela, J.C.S. and Mager, W.H. (1996) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiology* 142, 721–731.
- [14] Komatsu, Y., Obuchi, K., Iwahashi, H., Kaul, S.C., Ishimura, M., Fahy, G.M. and Rall, W.F. (1991) Deuterium oxide, dimethylsulfoxide and heat shock confer protection against hydrostatic pressure damage in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 1141–1147.
- [15] Iwahashi, H., Kaul, S.C., Obuchi, K. and Komatsu, Y. (1991) Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 80, 325–328.
- [16] Fernandes, P.M.B., Farina, M. and Kurtenbach, E. (2001) Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Let. Appl. Microbiol.* 32, 42–46.
- [17] Mentre, P. and Hoa, G.H.B. (2001) Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. *Int. Rev. Cytol.* 201, 1–84.
- [18] Zimmerman, A.M. (1971) High pressure studies in cell biology. *Int. Rev. Cytol.* 30, 1–47.
- [19] Heremans, K.A.H. (1982) High pressure effects upon proteins and other biomolecules. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 11, 1–21.
- [20] Landau, J.V. (1970) Hydrostatic pressure on the biosynthesis of macromolecules. In: *High Pressure Effects on Cellular Processes* (Zimmerman, A.M., Ed.), pp. 45–70. Academic Press, New York.
- [21] Ronald, G., Wilson, J.R., Zimmerman, S. and Zimmerman, A.M. (1971) High pressure studies in cell biology. *Int. Rev. Cytol.* 30, 1–47.
- [22] Fernandes, P.M.B., Panek, A.D. and Kurtenbach, E. (1997) Effect of hydrostatic pressure on a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in the trehalose-6-phosphate synthase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 17–21.
- [23] Granger, D.L., Hibbs, J.B.J., Perfect, J.R. and Durack, D.T. (1990) Metabolic fate of L-arginine in relation of microbistatic capability of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 85, 264–273.
- [24] Fernandes, A.A.R., Santamaria, J., Bud'ko, S.L., Nakamura, O., Guimpel, J. and Schuller, I.K. (1991) Effect of physical and chemical pressure on the superconductivity of high-temperature oxide superconductors. *Phys. Rev. B* 44, 7601–7606.
- [25] Orlando, M.T.D., Cunha, A.G., de Mello, E.V.L., Belich, H., Baggio-saitovitch, E., Sin, A., Obradors, X., Burghardt, T. and Eichler, A. (2000) Effect of hydrostatic pressure on HgBa<sub>2</sub>Ca<sub>2</sub>Cu<sub>3</sub>O<sub>8+δ</sub> superconductor doped with Re. *Phys. Rev. B* 61, 15454–15461.
- [26] Orlando, M.T.D., de Mello, E.V.L., Passos, C.A.C., Caputo, M.R.C., Martinez, L.G., Zeini, B., Yague, E.S., Vanoni, W. and Baggio-Saitovitch, E. (2001) Hg, Re-1223 system: T-c dependence on hydrostatic pressure and thermopower measurements. *Physica C* 364, 350–352.
- [27] Carlson, M. (1999) Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 202–207.
- [28] Kroncke, K.D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1997) Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1, 107–120.
- [29] Butler, A.R. and Megson, I.L. (2002) Non-heme iron nitrosyls in biology. *Chem. Rev.* 102, 155–966.
- [30] Sessa, W.C. (1994) The nitric oxide synthase family protein. *J. Vasc. Res.* 31, 131–143.
- [31] Shinyashiki, M., Chiang, K.T., Switzer, C.H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Thiele, D.J. and Fukudo, J.M. (2000) The interaction of nitric oxide (NO) with the yeast transcription factor ACE 1: A model system for NO-protein thiol interactions with implications to metal metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6, 2491–2496.
- [32] Mager, W.H. and Hohmann, S. (1997) Stress response mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast Stress Response* (Mager, W.H. and Hohmann, S., Eds.), pp. 1–5. R.G. Company, Texas, U.S.A.



# Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*

Fernando L. Palhano<sup>a</sup>, Marcos T.D. Orlando<sup>b</sup>, Patricia M.B. Fernandes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, 29040-090, Vitória, ES, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, 29040-090, Vitória, ES, Brazil

Received 1 December 2003; received in revised form 2 February 2004; accepted 3 February 2004

First published online 20 February 2004

## Abstract

The acquisition of tolerance to high hydrostatic pressure of 220 MPa (HHP) in response to a 0.4 mM hydrogen peroxide, 6% ethanol and cold-shock (10 °C) pretreatment for different lengths of times was studied in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The protection conferred by these different treatments was similar (~3 log cycles) and time-dependent. Analysis of the induction of the most pressure up-regulated genes under these conditions was investigated by RT-PCR. Our results revealed that the cell stress response to HHP shares common features with hydrogen peroxide and ethanol stresses, but differs in some way to cold-shock. © 2004 Published by Elsevier B.V on behalf of Federation of European Microbiological Societies.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; Stress; Hydrostatic pressure; Ethanol; Hydrogen peroxide; Cold-shock

## 1. Introduction

Yeast cells, as unicellular organisms, must cope with a natural environment that does not always provide all the conditions needed for constant growth. When the environmental conditions change abruptly, cells must rapidly adjust their genomic expression program to adapt to the new situation. Yeast cells can withstand severe stress more easily when they are previously exposed to a mild form of stress. This observation suggests that mild stress conditions probably trigger cellular responses that prepare the cells to cope with a severe stress. This is true for stresses of the same kind, as the classical mild heat treatment protecting against the otherwise lethal heat-shock, and also for other kinds of stresses since pretreatment of cells with a mild osmotic shock or exposure of yeast to high ethanol concentrations confers resistance to heat-shock [1]. On the other hand, a mild heat shock does not induce osmotolerance

[2] and treatment with hydrogen peroxide does not induce resistance to the superoxide generating drug menadione, nevertheless menadione treatment can protect the cells against hydrogen peroxide [3].

High hydrostatic pressure (HHP) has gained a great biotechnological importance in the last decade, due to studies on food decontamination, vaccines production, among others [4,5]. Therefore, studies on the pressure effect on cells, *Saccharomyces cerevisiae* as a model, are interesting not only for the comprehension of the physiological adaptations of organisms but also to better understand changes imposed by pressure on microorganisms.

High hydrostatic pressure (HHP) has a strong effect on a range of cell structures and their functions [6,7]. Among other effects, high pressure interferes with the cellular architecture and processes of polymerization and denaturation of proteins that are essential to the formation, function and stability of mitotic structures [8]. Yeast viability during hydrostatic pressure treatment decreases with increasing pressure and this effect is more pronounced when cells are submitted to pressures above 100 MPa. At 220 MPa all wild-type cells are killed. Transmission electron microscopic images of the yeast

\* Corresponding author. Tel.: +55-27-3335-7348; fax: +55-27-3335-7342.

E-mail address: pat@npd.ufes.br (P.M.B. Fernandes).

cells suggest that hydrostatic pressure induces changes on the cell wall and on the cytoskeleton, and thus on the cell membranes and in the organelles dynamics [9]. Furthermore, microarray analysis of yeast cells submitted to high hydrostatic pressure revealed a stress response expression profile. For the 6200 known or predicted genes of *S. cerevisiae* 131 were >2-fold induced and 143 were <2-fold repressed by HHP. The majority of the up-regulated genes are unknown, including the most frequently induced *YER067W*. Genes that are classified as the stress category, such as *HSP30* and *HSP12*, were also highly induced by pressure [10].

It has already been observed that a heat pretreatment induces barotolerance [9,11]. Nevertheless, hydrostatic pressure does not have exactly the same effect as temperature, since a lower pressure of 50 MPa pretreatment does not induce tolerance to higher pressures [12].

These evidences indicate that the stress response routes are only partially shared. For that reason, in this work experiments were conducted to test the induction of barotolerance by prior treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ethanol and cold-shock and to study the induction of the mentioned pressure up-regulated genes in these conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strain and growth conditions

*Saccharomyces cerevisiae* Y440 Mat *a leu2* was grown in YEPD (2% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone) at 28 °C with aeration to exponential growth phase (OD<sub>600</sub> 1.0).

### 2.2. Hydrostatic pressure treatment

Yeast suspensions were put into a small Teflon tube tightly stoppered with a BeCu high-pressure clamp and housed in the BeCu piston-cylinder (pressure cell) with outer and internal diameters of 36 and 10 mm, respectively, similar to the one used in other works [13,14]. Samples were pressurized in rich media in the absence of air bubbles. The time to attain the maximum pressure and to release the pressure was less than 1 min, for both processes. Pressure was attained by compression of the Teflon tube in the pressure cell using a manually operated piston pump (Eureka Ltda, MG, Brazil). The inner cell pressure was measured using a calibrated mechanical manometer (Woler Ind. Brasileira, MG, Brazil).

Yeast cells were subjected to a hydrostatic pressure of 50 and 220 MPa for 30 min at room temperature.

### 2.3. Hydrogen peroxide treatment

Cells were grown to early-log phase and then H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Farmax, MG, Brazil) was added for a final concentra-

tion of 0.40 mM. Samples were collected at 30, 45 and 60 min, washed with cold water and resuspended in rich media and subsequently pressurized.

### 2.4. Ethanol treatment

*Saccharomyces cerevisiae* cells growing in rich media to the early exponential phase were treated with 6% ethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 4.0 h. After treatment, cells were pressurized in the presence of ethanol at room temperature.

### 2.5. Glutathione exposure

Reduced glutathione (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to early-log phase cells at a final concentration of 1, 2, 3, 5 and 10 mM. Those cells were immediately pressurized. Cells were also pressurized without glutathione as a control.

### 2.6. Cold-shock treatment

*Saccharomyces cerevisiae* at exponential growing phase were submitted to a cold-shock of 10 °C for 1, 2 and 4 h. The samples were submitted to a high hydrostatic pressure at room temperature.

### 2.7. Cell viability and controls

Cells were plated on solidified YEPD medium after appropriate dilution and viability was determined by colony counts 48 h after treatment. All plates were made in duplicate.

As a control for all treatments, yeast cells growing in rich media to the early phase were pressurized without pretreatment.

### 2.8. RNA isolation

Total RNA was extracted using phenol/chloroform and further precipitated with 3 M sodium acetate/absolute ethanol. Extracted RNA samples were treated for 10 min with 0.5 U of RNase-free DNase I/μg RNA at 37 °C to remove any residual genomic DNA. RNA pellets were washed in 70% ethanol and resuspended in DEPC-treated water.

### 2.9. Semi-quantitative RT-PCR

First strand synthesis of cDNA was performed in a 25 μl reaction volume containing 1 μg of RNA, 0.2 μg/μl random hexadeoxynucleotides pd(N)<sub>6</sub> primer, 0.34 mM of each dNTP, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 6.8 mM DTT and 60 U M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies, CA, USA) for 60 min at 37 °C. The resulting cDNA was amplified in 25 μl of



Table 1  
Oligonucleotides used as primers in RT-PCR analysis

Target mRNA	Primer sequence	Amplicon size (bp)
YER067W	Forward, 5'ATGACAAAAGAAGGATAAGAAGGAAGTAAAAGTTCAAACG3' Reverse, 5'TTGGATCCACGCGGAACCAGATTTGCGCCTACAGGATGT3'	504
HSP30	Forward, 5'TTGACTAGATATGCCTTAGC3' Reverse, 5'GTGTAATAACCCCACTTGTAT3'	377
HSP12	Forward, 5'CCAGACTCTCAAAAGTCATA3' Reverse, 5'CATGTAATCTCTAGCTTGGT3'	192
ACT1	Forward, 5'TACGTTTCCATCCAAGCC GTT3' Reverse, 5'AACATACGCGCACAAA AGCAGA3'	755

PCR reaction medium, containing 2.5  $\mu$ l of the first-strand reaction, 50 pmol of specific oligonucleotides (Table 1), 200  $\mu$ M dNTPs, 2.5 U of *Taq* polymerase (Promega, WI, USA), enzyme buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl and 0.1% Triton<sup>®</sup>X-100) and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. The PCR program for amplification of both *HSP30* and *HSP12* fragment was 94 °C for 1 min, 47 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, followed by incubation at 72 °C for 5 min. *ACT1* and *YER067W* fragments were amplified using the same program except for the annealing temperature of 53 and 56 °C, respectively. PCR samples were taken after cycle 24, 30, 36 and 44 and analyzed on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide (Sigma, St. Louis, MO, USA). The gel images were generated in digital camera (Nikon, Coolpix 885, Korea).

### 2.10. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. The present data are the means and standard deviation of three independent experiments.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Hydrogen peroxide pretreatment and HHP

The effect on high hydrostatic pressure of 220 MPa (HHP) tolerance of hydrogen peroxide pretreatment was investigated. Superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and hydroxyl radical (OH) are the most important reactive oxygen species (ROS) produced by cells. ROS cause oxidative damage on nucleic acids, lipids, proteins, carbohydrates and other cellular components [15]. It has been shown that pretreatment with 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces resistance to a subsequent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge [16]. Moreover, a correlation between HHP, high temperature and oxidative stress has been proposed [17]. The present work shows that a 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment is also capable to induce baroresistance. In this case the resistance induction is time-dependent, since it increases up to 45 min of treatment and then,

with 60 min of pretreatment there is a decrease in barotolerance (Fig. 1).

Yeast cells can sense the oxidative stress and are able to build a response at molecular level involving the induction of primary and secondary antioxidant defences. The response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is characterized by a strong induction of genes involved in the detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (such as superoxide dismutases, glutathione peroxidases, and thiol-specific antioxidants), as well as genes involved in oxidative and reductive reactions within the cell (thioredoxin, thioredoxin reductases, glutaredoxin, and glutathione reductase) [18]. Oxidative stress leads to the up regulation of 150 genes (>2-fold induced), 66 of them are involved in the environmental stress response (ESR). Microarray analysis of *S. cerevisiae* submitted to HHP revealed that among the 131 genes up-regulated by pressure, there was more than two fold induction in the expression of genes that encodes for proteins implicated in oxidative stress, as cytoplasmatic catalase, CuZn superoxide desmutase [10]. We showed that the prior H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment induces baroresistance, indicating that the overlap between oxidative stress and HHP genes expression leads to induction of

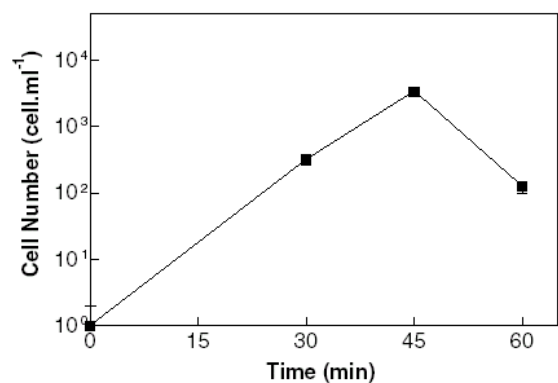


Fig. 1. Barotolerance induction by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment. Exponentially growing *S. cerevisiae* cells (10<sup>7</sup> cells ml<sup>-1</sup>) were treated with 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for different lengths of time, washed with cold water and re-suspended in rich media. Afterwards, they were submitted to 220 MPa for 30 min. Time-point zero represents cells submitted to pressure without hydrogen peroxide pretreatment.

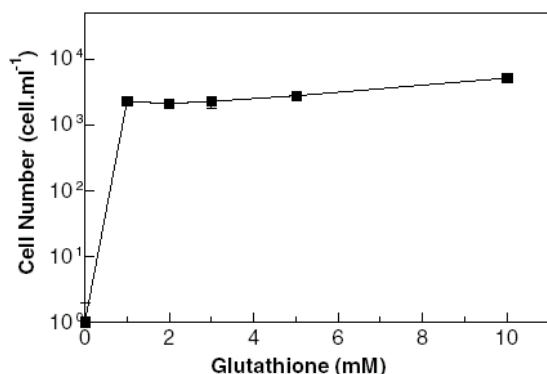


Fig. 2. High hydrostatic pressure resistance in the presence of glutathione. *S. cerevisiae* cells growing in rich media to the early exponential phase ( $10^7$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ) were pressurized at 220 MPa for 30 min in the presence of glutathione at different final concentrations.

responses necessary to maintain cell stability during high-pressure stress.

Another feature of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress is the induction of *GSH1*, encoding to  $\gamma$ -glutamylcysteine syntetase, enzyme required for glutathione (GSH) biosynthesis. GSH is the most abundant low-molecular-mass intracellular thiol compound. GSH acts as a radical scavenger with the redox-active sulphhydryl group reacting with oxidants [19]. When yeast cells were subjected to HHP in the presence of GSH, they exhibited baroresistance (Fig. 2). It's worth to notice that even though YEPD medium contains glutathione, it's not enough to confer resistance to HHP, as yeast cells submitted to HHP in water, saline solution or YEPD medium showed the same survival rate (data not shown). Yeast possesses a specific GSH transport system that allows GSH to be taken up from the extracellular environment [20]. When GSH is added to the growing medium, the cells rapidly uptake it and use it, in the reduced form, as a substrate for the glutathione peroxidase enzyme, to eliminate ROS. We observed that concentrations ranging from 1 to 10 mM GSH show the same resistance induction effect. This might be due to saturation of the transport system. The results with GSH reinforce the fact that HHP causes oxidative stress within the cell and confirm the importance of an oxidative defence mechanism, as induced by the  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment, to diminish the damage caused by pressure.

### 3.2. Ethanol pretreatment and HHP

The viability of *S. cerevisiae* cells exposed to a HHP (220 MPa, for different lengths of time) was analyzed in cells pre-exposed to a sublethal ethanol stress (Fig. 3). An increase in HHP tolerance was observed after ethanol treatment, reaching maximum of survival (3 log) at 1.5–2 h. After 4 h of ethanol treatment, although there is still some protection, it is less than 1 log. An important

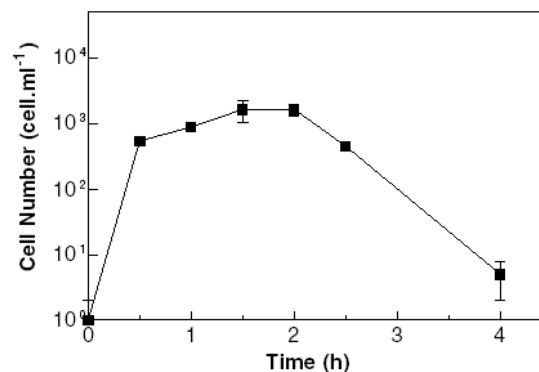


Fig. 3. Barotolerance induction by ethanol. *S. cerevisiae* cells growing in rich media to the early exponential phase ( $10^7$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ) were treated with 6% ethanol for different lengths of time and pressurized at 220 MPa for 30 min in the presence of ethanol. Time-point zero represents cells submitted to pressure without ethanol treatment.

feature of ethanol protection is that it has to be present during the pressurization. When ethanol pretreated cells were resuspended in fresh YEPD media immediately before pressure, no barotolerance is seen (data not shown). It is worth to notice the importance of the pretreatment, as yeast cells directly pressurized in ethanol containing media did not show any enhanced pressure resistance (Fig. 3). A possible explanation to this feature is that during ethanol treatment the cells had adapted to the presence of ethanol, changing some of their physical properties, due to the ethanol effect to reduce the hydrating ability of water and to compete with water for hydration sites [21]. After ethanol removal a new situation occurs in the cell due to the presence of water molecules occupying the hydration sites prior occupied by ethanol. Even the transcriptional changes induced by the ethanol pretreatment are not enough to lead the cell to a baroresistance, since macromolecule-associated water constitutes a domain particularly sensitive to pressure forces [22].

*Saccharomyces cerevisiae* cells pre-exposed to a sublethal ethanol stress become tolerant to a subsequent lethal ethanol stress [23]. Alexandre et al. [24] showed by cDNA microarray that the genes that are up-regulated by ethanol are mainly involved in energy metabolism, protein destination, ionic homeostasis, and stress response. Also, ethanol exposure in yeast increases the activity of cytoplasmic catalase T (encoded by *CTT1* gene) and the mitochondrial manganese isoform of superoxide dismutase (encoded by *SOD2* gene). The levels of glutathione and of the cytoplasmic CuZn superoxide dismutase (encoded by *SOD1* gene) however, remain unchanged [23,25]. *CTT1* and *SOD2* are both up-regulated by HHP [10] suggesting that both HHP and ethanol promotes an important oxidative stress.

The role of ethanol as an agent affecting the physicochemical state and the biological functions of various



cell membranes is well known [21]. Membrane lipids are known modulators of membrane fluidity and they are believed to play an essential role in ethanol tolerance in *S. cerevisiae* [26]. However, there have been many discrepancies among the reports on the effect of ethanol on lipid composition. Some authors find that an increase in plasma membrane fluidity is correlated with ethanol exposure [21,27–29] whereas others believe that this condition leads to a decrease in membrane fluidity [25,26,30]. In fact, ethanol increases the amount of unsaturated fatty acyl residues in the membrane phospholipids [21,26,29–32]. Although the unsaturated membranes have a higher degree of disorder than the saturated bilayers, they are less sensitive to HHP due to the fact that their motionally disordered regions are barely accessible to water molecules [22]. Indeed, HHP induces an increase in order and a fluidity decrease in the plasma membrane. The fact that unsaturated bilayers are important to pressure resistance is confirmed by the induction by pressure of the gene responsible for a desaturase (*OLE1*), an enzyme that introduces a double bond in fatty acids [10].

Sub-lethal ethanol exposure induces a response characterized by the induction of heat-shock proteins, anti-oxidant enzymes and changes in plasma membrane composition. These features are probably responsible for the baroresistance induction after ethanol pretreatment.

### 3.3. Cold-shock and HHP

Among the numerous environmental stresses, temperature change is probably the most common stress for all living organisms. Fig. 4 shows the effect of a prior cold-shock treatment on the induction of barotolerance. A significant increase in cell survival was observed after

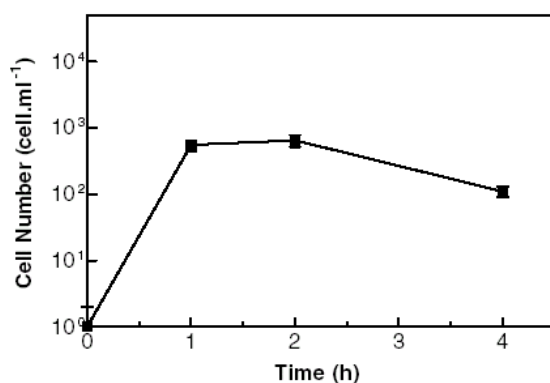


Fig. 4. Cold-shock induced barotolerance. *S. cerevisiae* at exponential growing phase ( $10^7$  cells ml<sup>-1</sup>) were submitted to a cold-shock of 10 °C for different length of time. The samples were briefly incubated up to room temperature (for approximately 2 min) and submitted to a high pressure of 220 MPa for 30 min. Time-point zero represents cells submitted to pressure without cold-shock pretreatment.

pre-incubation at 10 °C for 1 or 2 h. There was a slight decrease in barotolerance after 4 h of incubation. Similar effect has been seen in *Staphylococcus aureus* submitted to temperatures below 0 °C prior to HHP [33].

The yeast strain Y440 shows an increase of approximately 500-fold in cell viability when cells are subjected to a heat pretreatment prior to pressure stress [9,11]. The main characteristic of heat-shock is the induction of heat shock proteins (HSPs), which prevent protein unfolding [34,35]. However, in contrast to heat-shock, protein folding is not a major problem at low temperatures. Major problems that result from cold shock are the reduction of membrane fluidity and impaired protein synthesis. In *S. cerevisiae*, several cold-inducible genes have been identified. Sahara et al. [36] analyze the global gene expression in yeast cells exposed to low temperatures. A large number of genes for various cellular functions are diversely up- or down-regulated under low temperature conditions. Interestingly, the majority of the HSPs were down-regulated, whereas only *HSP12* and *HSP26* were up-regulated. Those two genes are also up-regulated by pressure at room temperature [10]. In addition, recent work on gene expression under the combined effect of pressure and low temperature also shows the induction of these two genes [37]. The function of Hsp12p and Hsp26p proteins is poorly understood concerning their role in stress conditions. However, the induction of both genes has been related to stresses that cause membrane damage, such as osmotic [38], ethanol [24] and hydrostatic pressure [10], suggesting that the induction of these HSPs genes could be related to membrane destabilization.

Another feature linked to adaptation to low temperatures is the increase in the proportion of *cis*-unsaturated fatty acyl groups in the membrane lipids thus increasing membrane fluidity [39]. In yeast *S. cerevisiae* fatty acid desaturation is performed by  $\Delta 9$  fatty acid desaturase, which is encoded by *OLE1* [40]. Microarray analyses performed on *S. cerevisiae* submitted to low temperatures [36] and HHP [10], demonstrated the induction of *OLE1* gene, indicating that the cell can sense the fluidity state of the membrane and has mechanisms to compensate for the effects of environmental condition. The role of unsaturated acyl chains in resistance to HHP was mentioned above in Section 3.2.

### 3.4. Semi-quantitative RT-PCR

Among the most up-regulated yeast genes by HHP are *YER067W*, *HSP30* and *HSP12* [10]. To analyse the expression of these genes when the cells are submitted to different stresses ( $H_2O_2$ , ethanol, cold-shock, mild pressure), we performed semi-quantitative RT-PCR analyses.

About 45% of the ORFs up-regulated by HHP are uncharacterized. Even though the function of *YER067W*,

the gene most up-induced by HHP, is unknown, it has been found to be associated with proteins related to actin and cellular wall synthesis [41]. The semi-quantitative RT-PCR analyses revealed that this gene is also strongly induced by hydrogen peroxide and ethanol (Fig. 5).

When yeast cells are submitted to stresses such as heat-shock, ethanol exposure and osmotic stress, a drop in intracellular pH occurs and leads to an increase in the activity of H<sup>+</sup>-ATPase [35]. It has been demonstrated that *S. cerevisiae* cells submitted to HHP undergo intracellular acidification, most likely caused by the dissociation of protons from H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and sugar phosphoesters [42]. Hsp30 acts down regulating stress-stimulated H<sup>+</sup>-ATPase activity. Since H<sup>+</sup>-ATPase is a major consumer of total cellular ATP, especially in stressed cells, the induction of Hsp30 may play a role in energy conservation in stress conditions [35]. As far as cold-shock is concerned this may not be true. Indeed, *HSP30* is seen in cells submitted to HHP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethanol, but not to cold-shock, as shown in Fig. 5.

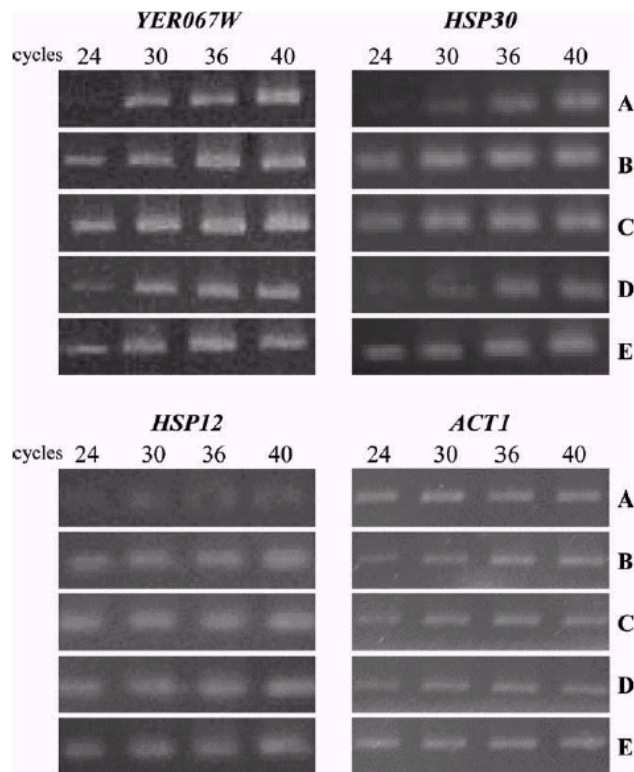


Fig. 5. Semi-quantitative transcription analysis by RT-PCR of the most pressure up-regulated genes. Total yeast RNA was amplified by RT-PCR using the primers listed in Table 1. PCR samples were taken after cycles 24, 30, 36 and 44 and analyzed on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Changes in the expression of *YER067W*, *HSP30* and *HSP12* genes were analyzed after treatment with: 6% ethanol for 60 min (C), 10 °C for 2 h (D) and 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 45 min (E). Cells without any treatment (A) or barotreated at 50 MPa for 30 min (B) were used as negative and positive controls, respectively. The actin gene, *ACT1*, was used as constitutive gene expression control.

*HSP12* is not detected in exponentially growing cells, but is commonly induced by several stresses and, actually, it had its expression induced for all the stresses tested in the present work (Fig. 5). While its function is not completely understood, it has been suggested that Hsp12 is related to membrane damage stresses [38].

In conclusion, hydrogen peroxide, ethanol and pressure induce similar oxidative damages and cell response in *S. cerevisiae*, indicating a strong correlation between oxidative stress and HHP. On the other hand, cold-shock results on a very different response. Nevertheless, all three treatments protect yeast cells against HHP. A common target among those stresses is the cell membrane. Therefore, more studies on this matter shall contribute to a better understanding of how stresses interfere with the cell membrane and how this leads to a cell stress response.

#### Acknowledgements

We thank Dr. Regina Keller, from Dept. Engenharia Ambiental, UFES, for the use of her laboratory facilities and Prof. Eleonora Kurtenbach, from Dept. Bioquímica Médica, UFRJ, for providing the primers. Thanks are also due to Prof. R.S. de Biasi, from IME-RJ, for critical review and to Mrs. M. C. Domitrovic for revising the manuscript. This work was supported by CNPq.

#### References

- [1] Siderius, M. and Mager, W.H. (1997) General stress response: in search of a common denominator. In: *Yeast Stress Response* (Mager, W.H. and Hohmann, S., Eds.), pp. 214–230. R.G. Company, Texas, USA.
- [2] Coote, P.J., Cole, M.B. and Jones, M.V. (1991) Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1701–1708.
- [3] Jamieson, D.J. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.* 174, 6678–6681.
- [4] Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L. (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092–1101.
- [5] Molina-Garcia, A.D. (2002) The effect of hydrostatic pressure on biological systems. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 19, 3–53.
- [6] Zimmerman, A.M. (1971) High pressure studies in cell biology. *Int. Rev. Cytol.* 30, 1–47.
- [7] Heremans, K.A.H. (1982) High pressure effects upon proteins and other biomolecules. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 11, 1–21.
- [8] Landau, J.V. (1970) Hydrostatic pressure on the biosynthesis of macromolecules. In: *High Pressure Effects on Cellular Processes* (Zimmerman, A.M., Ed.), pp. 45–70. Academic Press, New York.
- [9] Fernandes, P.M.B., Farina, M. and Kurtenbach, E. (2001) Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 42–46.



- [10] Fernandes, P.M.B., Domitrovic, T., Kao, C.M. and Kurtenbach, E. (2004) Genome expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett.* 556, 153–160.
- [11] Iwahashi, H., Kaul, S.C., Obuchi, K. and Komatsu, Y. (1991) Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 80, 325–328.
- [12] Fernandes, P.M.B., Panek, A.D. and Kurtenbach, E. (1997) Effect of hydrostatic pressure on a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in the trehalose-6-phosphate synthase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 17–21.
- [13] Orlando, M.T.D. (1999) Comparação entre o efeito da pressão química e a pressão externa hidrostática em supercondutores do tipo (Hg, Re)-1223. Doctor Thesis, CBPF, Brasil.
- [14] Fernandes, A.A., Santamarina, J., Bud'ko, S.L., Nakamura, O., Guimpel, J. and Schuller, I.K. (1991) Effect of physical and chemical pressure on the superconductivity of high-temperature oxide superconductors. *Phys. Rev. B* 44, 7601–7606.
- [15] Costa, V. and Moradas-Ferreira, P. (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* 22, 217–246.
- [16] Davies, J.M.S., Lowry, C.V. and Davies, K.J.A. (1995) Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 1–6.
- [17] Iwahashi, H., Fujii, S., Obuchi, K., Kaul, S., Sato, A. and Komatsu, Y. (1993) Hydrostatic pressure is like high temperature and oxidative stress in the damage it causes to yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 108, 53–58.
- [18] Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* 11, 4241–4257.
- [19] Jamieson, D.J. (1998) Oxidative stress responses of the *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511–1527.
- [20] Penninckx, M.J. (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2, 295–305.
- [21] Jones, R.P. (1989) Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 130–153.
- [22] Mentré, P. and Hui Bon Hoa, G. (2001) Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. *Int. Rev. Cytol.* 201, 1–84.
- [23] Costa, V., Reis, E., Quintanilha, A. and Moradas-Ferreira, P. (1993) Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 608–614.
- [24] Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequim, S. and Blondin, B. (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 498, 98–103.
- [25] Piper, P.W. (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 121–127.
- [26] Chi, Z. and Arneborg, N. (1999) Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 86, 1047–1052.
- [27] Herrero, A.A., Gomez, R.F. and Roberts, M.F. (1982) Ethanol-induced changes in the membrane lipid composition of *Clostridium thermocellum*. *Biochim. Biophys. Acta* 693, 195–204.
- [28] Alexandre, H., Rousseaux, I. and Charpentier, C. (1994) Relationship between ethanol tolerance lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 17–22.
- [29] Kajiwara, S., Shirai, A., Fujii, T., Toguri, T., Nakamura, K. and Ohtaguchi, K. (1996) Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of ethanol tolerance and the FAD2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4309–4313.
- [30] You, K.M., Rosenfield, C.-L. and Knipple, D.C. (2003) Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1499–1503.
- [31] Sajbidor, J. and Grego, J. (1992) Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 13–16.
- [32] Alexandre, H., Rousseaux, I. and Charpentier, C. (1994) Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20, 173–183.
- [33] Noma, S. and Hayakawa, I. (2003) Barotolerance of *Staphylococcus aureus* is increased by incubation at below 0 °C prior to hydrostatic pressure treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 261–264.
- [34] Graig, E.A. (1992) The heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae* (Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach, J.R., Eds.), vol. 2, pp. 501–537 Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- [35] Piper, P.W. (1997) The yeast heat shock response. In: *Yeast Stress Response* (Mager, W.H. and Hohmann, S., Eds.), pp. 75–99. R.G. Company, Texas, USA.
- [36] Sahara, T., Goda, T. and Ohgiya, S. (2002) Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J. Biol. Chem.* 277, 50015–50021.
- [37] Iwahashi, H., Shimizu, H., Odani, M. and Komatsu, Y. (2003) Piezophysiology of genome wide gene expression levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Extremophiles* 7, 291–298.
- [38] Yale, J. and Bohnert, H.J. (2000) Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* in high salinity. *J. Biol. Chem.* 276, 15996–16007.
- [39] Quinn, P.J., Joo, F. and Vigh, L. (1989) The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 53, 71–103.
- [40] Zhang, S., Skalsky, Y. and Garfinkel, D.J. (1999) MAG2 or SPT23 is required for transcription of the  $\Delta 9$  fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151, 473–483.
- [41] Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 10, 4569–4574.
- [42] Abe, F. and Horikoshi, K. (1995) Hydrostatic pressure promotes acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 307–312.

## PRESSURE RESPONSE IN THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: FROM CELLULAR TO MOLECULAR APPROACHES

F.L. PALHANO<sup>1</sup>, H.L. GOMES<sup>1</sup>, M.T.D. ORLANDO<sup>2</sup>, E. KURTENBACH<sup>3</sup>  
and P.M.B. FERNANDES<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo,  
Av. Marechal Campos, 1468, 29040-090, Vitória, ES, Brazil  
Fax: +55 27 3335 7342; E-mail: pat@npd.ufes.br

<sup>2</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, 29040-090, Vitória, ES, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
21941-590, RJ, Brazil

Received June 2, 2004; Accepted June 28, 2004

**Abstract** - Yeasts are unicellular organisms that are exposed to a highly variable environment, concerning the availability of nutrients, temperature, pH, radiation, access to oxygen and, specially, water activity. Evolution has selected yeasts to tolerate, to a certain extent, these environmental stresses. High hydrostatic pressure (HHP) exerts a broad effect upon yeast cells, interfering with the cell membranes, cellular architecture and in processes of polymerisation and denaturation of proteins. Gene expression patterns in response to HHP revealed a stress response profile. The majority of the upregulated genes were involved in stress defence and carbohydrate metabolism while most of the repressed ones were in cell cycle progression and protein synthesis categories. In addition, in the present work it was seen that mild pressure induced cell cycle arrest and protection against severe stresses, such as high temperature, high pressure and ultra cold shock. Nevertheless, this protection was only significant if the cells were incubated at atmospheric pressure after the HHP treatment. Expression of genes that were upregulated by HHP and are related to resistance to these stresses were also analyzed, and, for the majority of them, higher induction was attained after 15 min post-pressurization. Taken together, the results imply an interconnection among stresses.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, stress adaptation, high hydrostatic pressure, heat-shock, ultra-cold temperature

### INTRODUCTION

The philosopher Thales from Mileto [640 before Christ (BC)] stated that water was the basic element from which all other elements are formed. He theorized that the Earth was a floating disk. The water spawned all life and the living beings emerged onto the Earth's surface when the Sun dried it up, liberating the treasure within it. This ancient theory has been extensively revised but water continues to play a central role in life. Approximately 70% of the surface of the Earth is covered with water and all organisms that live in aquatic environments are subjected, to different extents, to hydrostatic pressure. Some plant and animal tissues are also subjected physiologically, to

pressure variations (6,34,39,46). Pressure ranges over four orders of magnitude in the biosphere, from 0.1 MPa at the surface to 110 MPa in the deep-sea Mariana Trench, Pacific Ocean. During large scale wine or beer production, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is exposed to several distinct stresses, including thermal, ethanolic and pressure (3,49). On the other hand, there is a search for new alternatives for food decontamination and high hydrostatic pressure is proving to be a good option for this (44,51,53). Consequently, to make this new technology feasible it is necessary to understand well the changes imposed by pressure not only on food but also on microorganisms and macromolecules.

*Saccharomyces cerevisiae* has proved to be a good eukaryotic model for the study of stress response. Evidence exists that mechanisms operating in yeast also occur in complex eukaryotes (28). There is no other eukaryotic organism where so many molecular details have been

---

**Abbreviations:** BC: before Christ; HHP: high hydrostatic pressure; HP: high pressure; Hsp: heat shock protein; HT: high temperature; PKA: cyclic AMP-dependent protein kinase; UCT: ultra-cold temperature



elucidated by biochemical and genetic analysis in different areas of cellular and molecular biology. Since 1996, the entire yeast genome had been sequenced and this has revolutionized yeast research (24). Yeast may help the understanding of stress response mechanisms in other organisms, not only piezophiles and piezotolerants, but even plants or humans.

*S. cerevisiae* exists at one atmospheric pressure, yet pressure-inducible genes and proteins also exist in this organism (20,27), probably as a result of overlapping effects of pressure and other stresses for which adaptation mechanisms exist although pressure effects upon cells are not identical to any other common stresses on yeast, such as temperature, ethanol and oxidative stresses; still pressure exerts a broad effect with characteristics from all those stresses.

The position of a chemical reaction equilibrium can be shifted by the application of external pressure as governed by the principle of Le Chatelier. Two thermodynamic relationships, considering temperature as a constant summarizes the effects of pressure:

$$[d(\ln K)/dP]_{p \rightarrow 0} = (-\Delta V/RT) \quad \text{Eq. 1}$$

$$[d(\ln k)/dP]_{p \rightarrow 0} = (-\Delta V^\ddagger/RT) \quad \text{Eq. 2}$$

where  $K$  is the equilibrium constant,  $k$  is the rate constant,  $p$  is the pressure (atm),  $T$  is the absolute temperature (K) and  $R$  is the gas constant ( $\text{ml atm K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ).  $\Delta V$  is the difference between the final and initial volume in the entire system at equilibrium (reaction volume), including the surrounding solvent.  $\Delta V^\ddagger$  is the apparent volume change of activation (activation volume) and represents the difference in volume between reactants and the transition state. Thus, when a reaction is accompanied by a volume decrease, it is enhanced by elevated pressure and *vice-versa*. Volume changes are associated with biochemically important reactions, such as protein dissociation and unfolding, lipid bilayer phase transition and ligand binding, induced by pressure were described (31,39). These data were obtained for *in vitro* purified systems and we can expect that the effects of pressure on metabolic pathways and metabolites contents in living systems will be very complex.

Over the past decade, our group has focused on the effects of high hydrostatic pressure on yeast cells and how yeast responds to this stress at a molecular level. Our main goal is to understand these effects at a molecular level and to be able to integrate them to whole cell scenario.

Yeast viability during hydrostatic pressure treatment decreases with increasing pressure and this effect is more pronounced when cells are submitted to pressures above 100 MPa. A pressure of 50 MPa is neither sufficient to kill nor to alter the yeast cell morphology. At 220 MPa all wild-type cells are killed. Yeast cells in stationary phase, where

cells are growth arrested and undergo a variety of morphological and physiological changes, are more resistant to pressure than proliferating cells (19).

High hydrostatic pressure affects protein polymerisation and also induces its denaturation, thus interfering with enzyme reactivity (55,56). Increased protein unfolding and aggregation occur when cells are exposed to high temperature. Several physiological changes take place when yeast cells are exposed to a sublethal heat shock, with a strong induction of heat shock proteins (Hsps) and accumulation of a large cytoplasmic pool of trehalose (14,22,48). In contrast, while high pressure in yeast cells induces the transcription of several stress genes, it does not induce high molecular weight Hsps or accumulation of trehalose (20).

Pressure also interferes with cell architecture and with the cell division, affecting membrane fluidity and the structure of the cell wall and several intracellular organelles (35). Transmission electron microscopic images of yeast cells suggest that hydrostatic pressure induces changes in the cell wall and in the cytoskeleton, and thus in the cell membranes and on organellar dynamics (19). Indeed, the up-regulation by pressure of *HSP12* (20) that codes for a protein related to cell wall flexibility (40) indicates that pressure directly affects cell wall integrity.

High pressure orders phospholipid bilayers causing the fatty acyl chains to pack together more tightly, reducing membrane fluidity (1). This phenomenon also occurs at low temperature (50). The increase in the extent of fatty acid unsaturation can compensate for these effects and maintain the membrane in a functional liquid crystalline state (homeoviscous adaptation). Nevertheless, the unsaturated membranes have a higher degree of disorder than the saturated bilayers, but their motionally disordered regions are barely accessible to water molecules (36), leading to an increase in the baro or low-temperature resistance. An interesting feature among pressure and low-temperature stress is that they do not induce the majority of HSPs but two small HSPs (*HSP12* and *HSP26*) related to membrane destabilization are up-regulated by both stresses.

The influence of high hydrostatic pressure on gene and protein expression has been widely recognized (5,27,58). *In vitro* studies from Foguel and Silva's group had shown that protein association with DNA is less stable under pressure (21,41), demonstrating that high pressure may interfere in transcriptional processes, altering genome expression. Nevertheless, microarray analysis of yeast cells submitted to high hydrostatic pressure revealed a stress response expression profile. For the 6,200 known or predicted genes of *Saccharomyces cerevisiae*, 131 were induced more than 2-fold and 143 were repressed greater than 2-fold by HHP. The majority of the up-regulated genes are unknown. Genes that are classified in the stress

category, such as *HSP30*, *HSP12*, *HSP26*, *DDR2*, were also highly induced by pressure (20). Several genes involved in cellular transcription, protein synthesis and direction and cell cycle regulation are down-regulated by pressure treatment (20). This might explain why a mild, sub-lethal pressure does not induce resistance to a subsequent rise into a severe high hydrostatic pressure (18). Pretreatment with a mild heat stress leads to protection to more severe heat shock and to several other stresses (47). *S. cerevisiae* is able to resist the strong effect of high hydrostatic pressure if, prior to this severe stress, the cells are submitted to a sublethal heat shock (19,30). However, a mild heat shock is only one of a number of preconditioning treatments known to induce stress tolerance. Certain chemical agents, osmotic dehydration and nutritional status have effects on yeast thermotolerance (47). Hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock also induces baroresistance (43). Although all these stresses affect the cell membrane, each of them has its own key target. Protein denaturation is the main cause of death of cells exposed to high temperature (48), while ethanol (11) and hydrogen peroxide (12) treatment cause oxidative stress. As we mentioned above, the major problem that yeast cells face at low temperature is the reduction of membrane fluidity. Therefore, the induction of genes related to preservation of cell membrane, detoxification or protein folding will protect yeast cells against the deleterious effects of high hydrostatic pressure.

Yeast cells in the fermentation tanks and also during the production of active dry yeast and nutritional yeast are always subjected to high temperature (62). The use of hydrostatic pressure in the fermentation tanks has been proposed as an approach to improve alcohol production (10). As a result of the great interest in the biotechnological use of high hydrostatic pressure (HHP) we decided to investigate the induction of baroresistance to yeast cells submitted to severe pressure or temperature. Additionally, as a tool to study severe cold shock response, liquid nitrogen was employed in this study.

Understanding the connections between high pressure and temperature in living cells may contribute with information about the particular signals generated by these stresses and may shed light on sensory transduction and biochemical adaptation in eukaryotes.

## MATERIALS AND METHODS

### *Yeast strain and growth conditions*

The *S. cerevisiae* strain used was Y440 *Mat-a leu2* derived from S288C in the J. Broach laboratory, Princeton University, USA. Yeast cells were grown in YEPD (2% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone) at 28°C with aeration to exponential growth phase ( $OD_{600nm}$  1.0).

### *Hydrostatic pressure treatment (HHP)*

Yeast suspensions were put into a small Teflon tube tightly stoppered

with a BeCu high-pressure clamp and housed in the BeCu piston-cylinder (pressure cell) with outer and internal diameters of 36 mm and 10 mm, respectively, similar to the one used in other works (15,17). Samples were pressurized in rich media in the absence of air bubbles. The time to attain the maximum pressure and to release the pressure was less than 1 min, for both processes. Pressure was attained by compression of the Teflon tube in the pressure cell using a manually operated piston pump (Eureka, MG, Brazil). The inner cell pressure was measured using a calibrated mechanical manometer (Woler, Brasileira, MG, Brazil). A schematic drawing of the high pressure chamber is shown in Fig. 1.

For high hydrostatic pressure pretreatment, yeast cells were subjected to 25, 50, 75 and 100 MPa for 30 min at room temperature. Afterwards, each sample was incubated at room pressure and temperature for 15, 30 and 60 min before the severe stress treatment. The severe pressure used was 220 MPa for 30 min at room temperature.

### *Heat shock treatment (HT)*

*S. cerevisiae* at exponential growing phase were submitted to a heat shock in liquid at 54°C for 20 min after different high hydrostatic pressure pre-treatments at room temperature.

### *Ultra-cold shock treatment (UCT)*

Exponentially growing *S. cerevisiae* cells were submitted to an ultracold-shock by immersion in liquid nitrogen (77K= -196°C) for 24 hr after high hydrostatic pressure pretreatment at room temperature.

### *Budding index determination*

Yeast cells were fixed with 20% formaldehyde and sonicated briefly to disrupt any clumps. Cells were diluted and counted using a hemacytometer under the optical microscope. Budding index was determined as the percentage of budded cells.

### *Cell viability and controls*

Cells were plated in duplicate on solidified YEPD medium after appropriate dilution and viability was determined by colony counts 48 hr after treatment. Cell growth was followed at 600 nm. All treatments were done with cell culture at an  $OD_{600}$  of 1.0 ( $10^7$  cells/ml).

As a control for all treatments, yeast cells growing in rich media in early exponential phase were submitted to severe stress (high pressure, heat-shock or ultra-cold) without pretreatment.

### *RNA isolation*

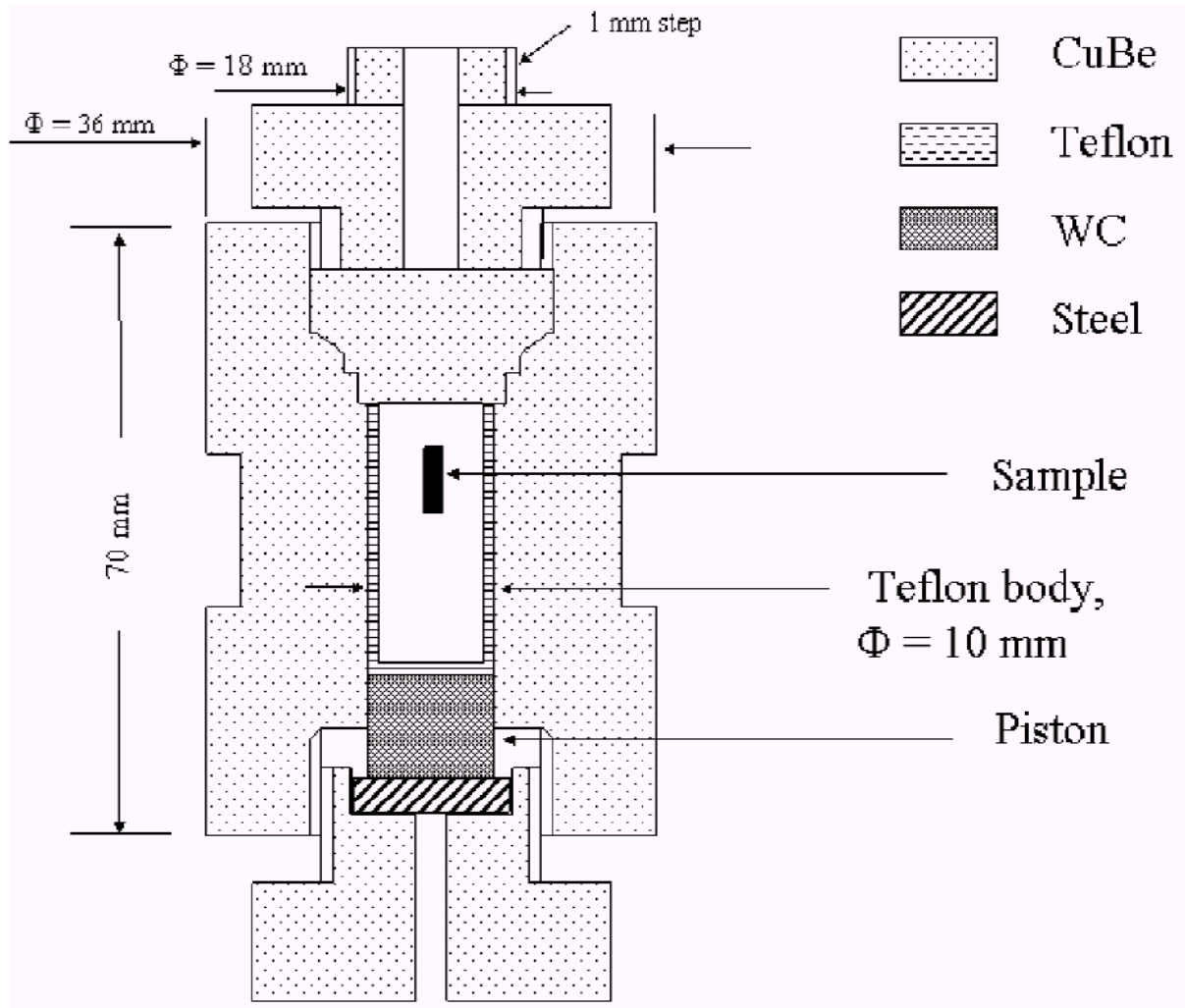
Total RNA was extracted using phenol/chloroform and further precipitated with 3 M sodium acetate / absolute ethanol. Nucleic acids pellets were washed in 70% ethanol and resuspended in DEPC treated water. Extracted RNA samples were treated for 10 min with 0.5 U of RNase-free DNase I /  $\mu$ g RNA at 37°C to remove any residual genomic DNA.

### *Semi-quantitative RT-PCR*

RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) is a well established and broadly used gene expression analysis method based on cDNA synthesis from the extracted mRNA, followed by amplification using specific oligonucleotides.

The experiment was performed as previously described (20,43). The specific oligonucleotides used as primers are listed on Table 1. The PCR program for amplification of both *HSP30* and *HSP12* fragment was 94°C for 1 min, 47°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by incubation at 72°C for 5 min. *HSP26*, *DDR2* and *ACT1* fragments were amplified using the same program except for the annealing temperature of 37, 46 and 53°C, respectively. *ERG25* fragment was amplified at 94°C for 1 min, 38°C for 0.5 min and 72°C for 1.5 min, followed by incubation at 72°C for 10 min. PCR samples were taken after cycle 24, 32 and 40, except for *ERG25* that were taken after cycles 30, 38 and 45, and analyzed on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide (Sigma, St.





**Fig. 1** Diagram of the high pressure chamber. High hydrostatic pressure system developed by Orlando (42). CuBe stands for the alloy of copper and beryllium used and WC for tungsten carbide.

**Table 1** Oligonucleotides used as primers in RT-PCR analysis

Target mRNA	Primer sequence	Amplicon size (bp)
HSP12	Forward, 5'CCAGACTCTCAAAAGTCATA3' Reverse, 5'CATGTAATCTCTAGCTTGGT3'	192
HSP30	Forward, 5'TTGACTAGATATGCCTTAGC3' Reverse, 5'GTGTAATAACCCCACTTGTA3'	377
HSP26	Forward, 5'CAGTCCAATTTTGAITTC3' Reverse, 5'TTACCCACGATCTTGAGA3'	629
DDR2	Forward, 5'GTTTTCATTTCTGCCATC3' Reverse, 5'TCAAAAAGGCCAAAGCAC3'	165
ERG25	Forward, 5'CGTTTTCAACAACGCTAC3' Reverse, 5'TTGAGCAITGTTTCAGC3'	906
ACT1	Forward, 5'TACGTTTCCAATCCAAGCC GTT3' Reverse, 5'AACAATACGCGCACAAAAGCAGA3'	755

Louis, MO, USA). The gel images were generated in digital camera (Nikon, Coolpix 885, S. Korea).

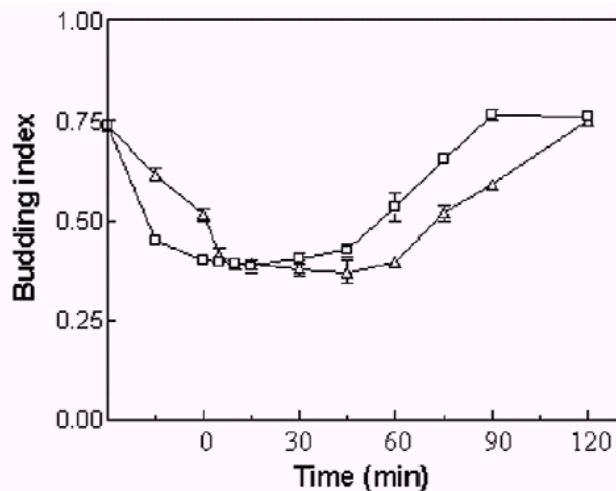
#### Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate. The present data are the means and standard deviation of three independent experiments.

## RESULTS

In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* the presence of a bud reflects the cell cycle position; cells in the G1 interval of the cell cycle are non budded and the bud appears at approximately the same time as the cell enters S phase. When *S. cerevisiae* cells are exposed to a nutrient limitation, mating-pheromone or mild stress, they arrest in the G1 phase of the cell cycle (14,34,60). Yeast cells

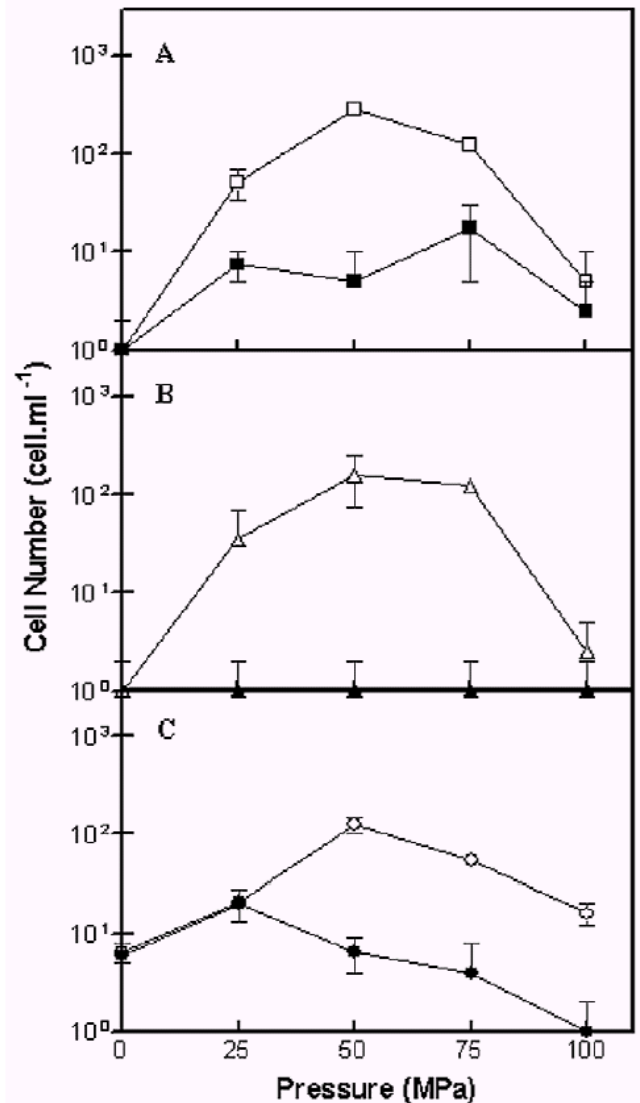
submitted to HHP of 50 MPa for 30 min halted growth, accumulating as unbudded cells (Fig. 2). Experiments were conducted in which cells were pressurized at 50 MPa for 30 min and then incubated at atmospheric pressure for 120 min. There was a decrease in the number of budded cells under the stress condition, reaching its minimum value 45 min post-pressurization. The cells started recovering after 60 min. Only 2 hr later they were fully active (Fig. 2). In order to compare yeast cell growth response to pressure with a classical stress, we performed the same experiment after heat-shock of 40°C for 30 min. Pressurized cells had a slower response and also took longer to recover the normal growth (Fig. 2).



**Fig. 2** Budding Index of pressure treated yeast cells. Exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells were submitted to high hydrostatic pressure of 50 MPa for 30 min, next the cells were incubated at atmospheric pressure (0.1 MPa) for 120 min (triangles). The response to heat-shock was used as a control (squares).

*S. cerevisiae* wild-type cells at the early exponential growth were treated with a high hydrostatic pressure (HHP) of 25, 50, 75 or 100 MPa for 30 min and then directly submitted to one of the following stresses: high temperature of 54°C for 20 min (HT), HHP of 220 MPa for 30 min (HP), and ultra-cold temperature of liquid nitrogen for 24 hr (UCT). The severe treatment of HT is lethal to the yeast cells and the baropretreatment afforded little protection, less than one order of magnitude (Fig. 3A, solid symbols). HP is also a lethal stress and submitting the cells to a sublethal pressure condition did not induce resistance (Fig. 3B, solid symbols). UCT leads to a drastic reduction of the culture and the pressure pretreatment of 25 MPa did not induce resistance. Moreover, pretreatment with pressures higher than 25 MPa before the UCT shock decreased the culture viability, to the point of complete inactivation after 100 MPa (Fig 3C, solid symbols).

However, if the cells were kept at room atmosphere (0.1 MPa) and temperature (30°C) with aeration for a period of 15 min after the HHP treatment, they acquired baro-induced resistance (Fig. 3, open symbols). These results show that maximal induction was achieved at 50 MPa for all severe stresses tested. This effect could also be observed to a lesser extent at 25 and 75 MPa but 100 MPa did not



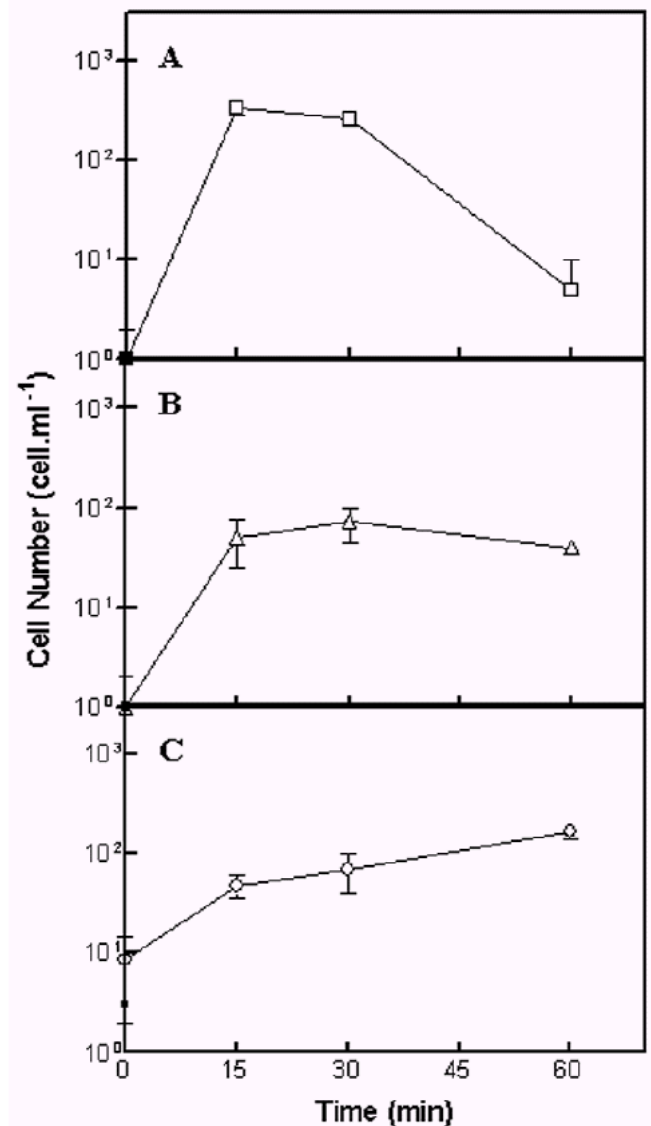
**Fig. 3** Pressure-shocked cells tolerance against severe stresses. *Saccharomyces cerevisiae* cells at early exponential phase ( $10^7$  cells/ml<sup>-1</sup>) were submitted to different values of high hydrostatic pressure for 30 min prior to a severe stress treatment of A) 54°C for 20 min, B) 220 MPa for 30 min and C) liquid nitrogen for 24 hr. Solid symbols represent cells that, after pressure treatment, had been immediately submitted to the severe stress and open symbols are used for representation of cells that had been incubated at atmospheric pressure (0.1 MPa) for 15 min prior to the severe stress. Error bars represent the SD of three measurements.

induce any significant improvement in cell tolerance to the HT and HP, but considerable protection was seen for UCT. To determine which period at atmospheric pressure after barotreatment was capable of inducing maximal resistance, yeast cells were pressurized at 50 MPa for 30 min and then incubated at room pressure, at 30°C, with aeration, for 15, 30 or 60 min prior to severe stress treatment (HT, HP or UCT). Indeed, maximal resistance was attained after 15 min at room pressure. Baropretreatment protected the cells against the severe heat-shock after 15 min at 0.1 MPa and this resistance was transient, as it diminished afterwards, showing almost no resistance 60 min post-pressurization (Fig. 3A). Nevertheless, for HP, the acquired resistance was maintained throughout the 60 min period (Fig. 4B). For UCT severe stress, we observed a tendency for the protection conferred by the baropretreatment to increase.

As maximal baro-induction of 50 MPa for 30 min was achieved after incubation at atmospheric pressure, it was important to analyse the expression of genes that are up-regulated by pressure and that are known to be important for survival at high pressure and high and low temperature. Among the genes most up-regulated by pressure (and by heat and cold shock) are *HSP12*, *HSP26* and *DDR2*. *HSP30* is induced by pressure and heat-shock but is repressed by cold shock. *ERG 25* is up-regulated by pressure and cold but not by heat shock. To analyse the expression of these genes, semi-quantitative RT-PCR was performed on yeast cells submitted to 50 MPa and also to cells that had been incubated at room pressure for 15, 30 and 60 min after the pressurization (Fig. 5). As already known, *HSP12* and *HSP30* are induced by HHP of 50 MPa (20,43) and the expression analysis showed that this induction increased after 15 min at room pressure but *HSP12* and *HSP30* still remained up-regulated throughout the 60 min after the HHP treatment (Fig. 5A and 5B). Surprisingly, at 50 MPa, *HSP26* was induced only after 30 min at room pressure (Fig. 5C). The results presented in Fig. 5D indicate that, despite the *DDR2* up-regulation by 200 MPa treatment, it was not induced by 50 MPa as there was no difference in the expression of this gene in cells that were submitted to 50 MPa pressure in comparison to the ones that had not been treated. The *ERG25* gene is weakly expressed and needed more amplification cycles to be well visualized but it was up-regulated by 50 MPa HHP and remained induced after 30 min, returning to the same level of the control after 60 min at room pressure (Fig. 5E).

## DISCUSSION

High hydrostatic pressure imposes a broad effect on living cells and, in respect to growth regulation, the stress effect remains for a longer period when compared to cells heat stressed for the same length of time (Fig. 2). This



**Fig. 4** Study of the optimum period after pressurization capable to induce resistance against severe stresses. *S. cerevisiae* cells at logarithmic phase were submitted to high hydrostatic pressure of 50 MPa for 30 min and then incubated at atmospheric pressure for different lengths of time, with constant aeration, at 30°C. Cells were then submitted to **A)** 54°C for 20 min, **B)** 220 MPa for 30 min and **C)** liquid nitrogen for 24 hr. Error bars represent the SD of three measurements.

might suggest that even after the yeast cells had been relieved from pressure stress they still suffer metabolic changes and are responding to this stress.

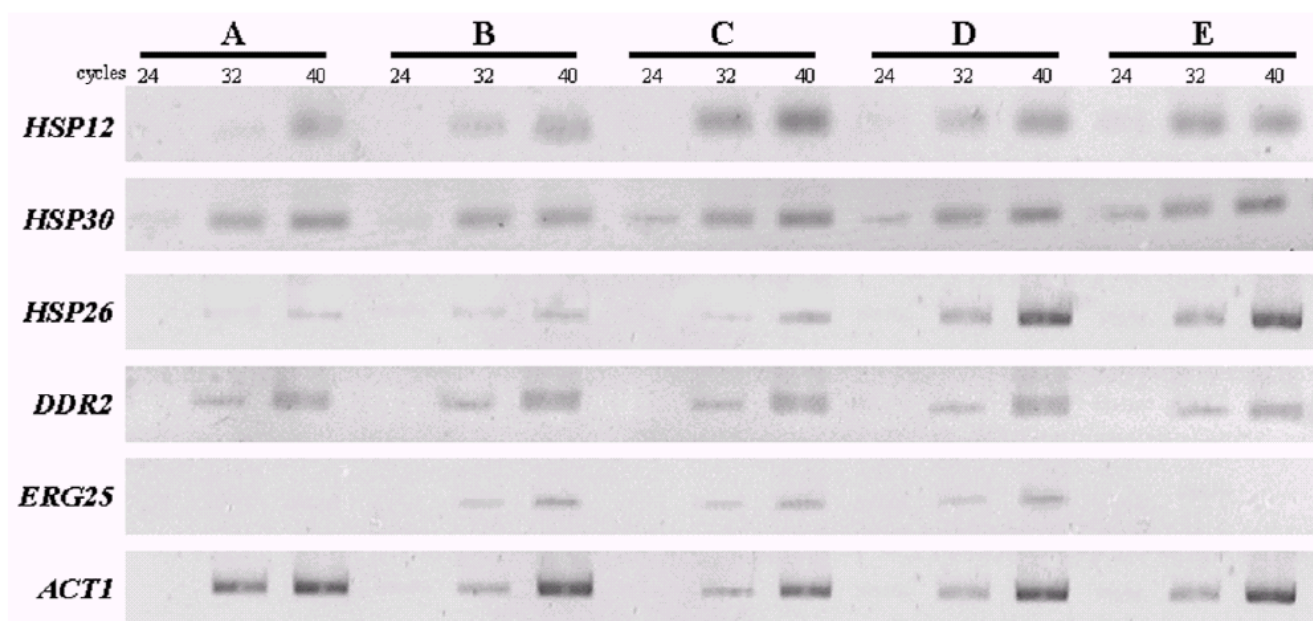
The observation that HHP varying from 25 to 100 MPa did not induce stress resistance is in accordance with our previous results that cells submitted to 50 MPa for periods up to 15 min do not show any increase in viability after



subsequent rise of pressure to 200 MPa and that pretreatment for periods longer than 15 min killed all cells (18). On the other hand, a short post recovery period after the pressure treatment enhanced survival following a subsequent severe stress shock (HT, HP and UCT). In this case, we can infer the relationship between the G1 arrest and the delay on pressure response. The protection effect was seen after 15 min of incubation at atmospheric pressure and with regards to pressure and ultra-cold severe stresses this effect persists for one hour. In contrast, the protection against heat-shock was shorter, consistent with the fact that the induction of Hsps after a heat treatment is transient (38). In bacteria, pressure inducible proteins (PIP) are maximally induced 60-90 min post-shift, indicating that relative to many other stress proteins induction, PIP induction is slow (5). In addition, microarray results from pressurized yeast cells have demonstrated that genes coding for protein synthesis processes are repressed (20). Protein synthesis is indeed one of the most barosensitive cellular functions and it is completely blocked at 67 MPa for *E. coli* and several mammalian cells (27,33,36). Ribosomes disassembly is, most probably, the major factor contributing to this inhibition (25,26). Indeed, hydrostatic pressure has a distinct effect upon the synthesis of proteins and nucleic acids: RNA synthesis is maintained at pressures at which DNA and protein synthesis are completely inhibited (36). Several groups have reported

the specific transcription and translation of genes encoding proteins related to stress response only after a pressure shock (5,27).

This leads us to conclude that the genes responsible for stress-inducible proteins that are up-regulated after HHP are unable to synthesize their proteins due to the inhibition of the protein synthesis apparatus during pressurization. High pressure causes not only protein synthesis inhibition but also protein denaturation and dissociation, both of which are reversible after pressures up to 100-300 MPa (35,59). When the cells return to atmospheric pressure after a sublethal pressure treatment the alterations of organelles and of biological processes are rapidly reversed (36) and only then will the newly transcribed mRNAs be translated. There is an important link between adaptation to stress and growth control. Growth-related gene expression is stimulated by high cAMP-dependent protein kinase activity (PKA). The general stress responsive gene expression activation appears to be under the negative control of the Ras-cAMP pathway and beyond that, PKA itself may be controlled by stress-dependent mechanisms. Craig and Gross (13) had proposed that Hsp70p acts as a sensor for cell reaction to temperature changes. Hsps70 play a central role in normal cell growth, which involves binding to and release from other polypeptides to facilitate, or to prevent, inter and intra-molecular interactions and they perform the same function under stress conditions.



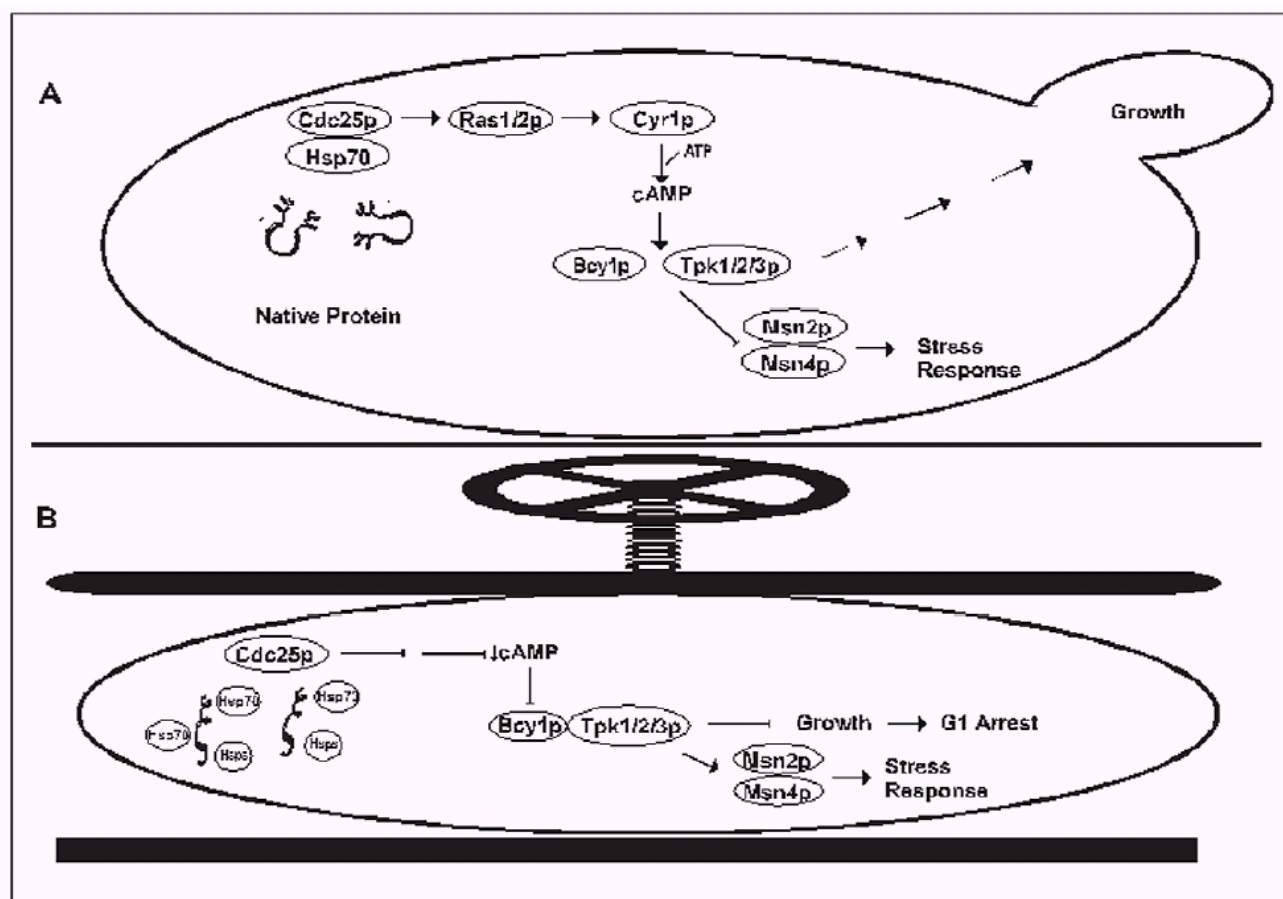
**Fig. 5** Semiquantitative transcription analysis by RT-PCR of pressure up-regulated genes. Total yeast RNA was amplified by RT-PCR using the primers listed in Table 1. PCR samples were taken after cycles 24, 32 and 40, except for *ERG25*, which was taken after cycles 30, 38 and 45. Samples were analysed on 2% agarose gels stained with ethidium bromide. Cells without any treatment (A) were used as controls. Changes in gene expression were analyzed after 50 MPa for 30 min treatment (B) followed by incubation at atmospheric pressure for 15 (C), 30 (D) and 60 (E) min. The actin gene, *ACT1*, was used as a constitutive gene expression control.



Stresses that induce protein denaturation increase the demand of Hsp70p, resulting in the induction of the heat-shock response. The authors speculated that the simplest model would have Hsp70p interacting directly with the heat shock transcription factor (HSF) and that this would be consistent with Hsp70p function. Under non-stress conditions, Hsp70 would maintain the transcription factor in a low-active form and, upon heat shock, there would be an increase in the concentration of misfolded proteins, the Hsp70p substrates. Hsp70p would then be released from HSF, resulting in a high active HSF form, leading to the production of others Hsps. Subsequently, Geymonat *et al.* (23) reported a positive interaction of one type of Hsp70p with Cdc25p, a guanine nucleotide exchange factor related to the control of the Ras-pathway. This prompted a model in which a stressor could engage this Hsp70p with denatured proteins and reduce its interaction with Cdc25p, thus inactivating the Ras proteins and eventually protein kinase A (16). Since HHP causes protein unfolding, we

extrapolate this model to high hydrostatic pressure stress as well. Fig. 6 illustrates a model that explains how HHP would lead to cell cycle arrest and the induction of stress response. In fact, the pressure stress causes marked changes in the yeast physiology leading to G1 cell cycle arrest, as seen in Fig. 2, and up-regulation of several genes related to stress response (20). We believe that several signalling pathways regulate stress transcription factors, such as Msn2p and Msn4p, in response to HHP. The proposed model highlights only one of them. For example, some genes regulated by Msn2/4p, like *HSP12* and *HSP26*, are expressed under pressure; but others, like those implicated in trehalose metabolism, are not, indicating the existence of several mechanisms involved in protection against unfavourable conditions.

We had seen by microarray analysis the expression of genes after a HHP of 200 MPa for 30 min and confirmed the most up-regulated ones by semi-quantitative RT-PCR (20). Quite interestingly, the results presented in Fig.5



**Fig. 6** Model for pressure signalling response. **A)** Under normal growth condition Hsp70p (Ssa1p) interacts with Cdc25p, inducing Ras, a GTP-binding protein, to activate the adenylate cyclase (Cyr1p) to produce cAMP by ATP expenses. cAMP binds specifically to the regulatory subunit of PKA (Bcy1p), liberating the catalytic subunits (Tpk1/2/3p) to phosphorylate their substrates. This is an indicative for cell growth and blockage of stress response. **B)** High hydrostatic pressure induces protein denaturation that recruits the chaperone Hsp70p. This reduce the interaction of Cdc25p and Hsp70p, lowering the intracellular concentration of cAMP, leading to PKA down-regulation and, thus, cell cycle arrest and induction of stress response.

show that *HSP12* and *HSP30* are up-regulated by pressure and a higher induction is seen after the cells return to atmospheric pressure. Moreover, *HSP26* is only expressed 30 min after the cells have returned to atmospheric pressure.

*HSP12* is additionally highly induced by high hydrostatic pressure and high and low temperatures. Motshewene et al (40), after confirming the cell wall location of Hsp12p, hypothesized that this highly hydrophilic protein acts in the cell wall as a plasticisers in plastic polymers, interrupting the hydrogen bonding and ionic interactions between adjacent polysaccharide polymers that otherwise result in a stable inflexible structure.

*HSP30* codes for a downregulator of the stress-stimulated H<sup>+</sup>-ATPase (H<sup>+</sup> adenosine triphosphatase) activity. Stresses like hydrostatic pressure, heat shock, ethanol exposure and osmotic stress in *S. cerevisiae* promote a cytoplasm acidification (48). H<sup>+</sup>-ATPase pumps H<sup>+</sup> at the expenses of ATP depletion. Hsp30p thus plays a role in energy conservation during the stress conditions (54).

The small heat shock protein Hsp26p from *S. cerevisiae* has a molecular chaperone activity and, like other members of the Hsp family, protects proteins from irreversible aggregation. It has been shown that dissociation of the Hsp26 complex at high temperatures is a prerequisite for efficient chaperone activity (29).

The baroprotection profile observed for yeast cells after returning to atmospheric pressure can be understood in light of the fact that the most pressure up-regulated genes encodes for proteins related to membrane protection, and the major problems that result from pressure and cold shock are the reduction of membrane fluidity and impaired protein synthesis. Our results suggest that once these membrane protective proteins are synthesized and start playing their role in this protection process, they stabilize the cells for a longer period, resulting in the protection against HP and UCT that is seen even 60 min after decompression. On the other hand, it seems that the proteins produced after HHP are only sufficient for a transient protection against the deleterious effects of HT. It is well known that the main problem imposed by high temperature in living cells is associated with protein folding (48) and pressure does not induce the larger Hsps related to chaperone activity. Cavicchioli and Watson (9) showed that primarily heat-shocked yeast cells incubated at 23°C for up to 3 hr, progressively lost thermotolerance but retained high levels of the major heat-shock proteins. Therefore, in the Hsp26p example, the complex might be dissociated under pressure and the initial protection observed could be, among other situations, related to the chaperone activity of this protein. Some time after returning to normal pressure, the Hsp26 complex associates and loses its chaperone activity.

*DDR2* codes for a multistress response protein, Ddr2p, whose expression is activated by a variety of xenobiotic agents and environmental or physiological stresses yet, genetic studies using gene disruption mutants demonstrated that *DDR2* is a nonessential gene. Cell survival after DNA damaging agents and after heat shock was not significantly affected by the *ddr2* deletion mutation and the mutant developed thermotolerance to the same level as the wild-type strain (32). *DDR2* gene is up-regulated by HHP of 200 MPa but not by 50 MPa. Apparently, *DDR2* is not important in the baroprotection process.

Stresses that cause membrane destabilization, such as osmotic (61), ethanol (8), cold (52) and hydrostatic pressure (19,45) shows a discrete induction of the *ERG25* gene (2,20,52,61). Erg25p is a sterol desaturase, implicated in ergosterol biosynthesis and suggested to be membrane-bound (4). In such stresses the cell must maintain membrane integrity and do so by activating several mechanisms that are most probably capable of minimizing these deleterious effects. On the other hand, heat-shock down-regulates the *ERG25* gene in yeast cells (22). Nevertheless, in yeast, it has been shown that the addition of ergosterol induces thermal and ethanol tolerance in sterol auxotrophic strain (57) and vesicles with membranes containing cholesterol prove to be more resistant to HHP than cholesterol-free ones (7,36). Ergosterol is a sterol containing an unsaturated side chain and cholesterol has a saturated side chain. *S. cerevisiae* cells enriched with ergosterol seem to be more resistant to ethanol than cells enriched with cholesterol. Biological membranes have been implicated as a primary sensor of environmental stress and membrane sterols appear important in stress tolerance.

**Acknowledgments** – The authors thank Dr. A. Wheals from Bath University, UK and Dr. J. Broach from Princeton University, USA, for critically reading the manuscript. Thanks are also due to Dr. R. Keller from the Department of Environmental Engineering, UFES, for the use of her laboratory facilities and to Mr. U. Zottich for helping with the scheme presented in Fig. 6. This work was supported by grant from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## REFERENCES

1. Abe, F., Kato, C. and Horikoshi, K., Pressure-regulated metabolism in microorganisms. *Trends Microbiol.* 1999, **7**: 447-453.
2. Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S. and Blondin, B., Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2001, **498**: 98-103.
3. Attfield, P.V., Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.* 1997, **15**: 1351-1357.
4. Bard, M., Bruner, D.A., Pierson, C.A., Lees, N.D., Biermann, B., Frye, L., Koegel, C. and Barbuch, R., Cloning and characterization of *ERG25*, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, **93**: 186-190.



5. Bartlett, D.H., Kato, C. and Horikoshi, K., High pressure influences on gene and protein expression. *Res. Microbiol.* 1995, **146**: 697-706.
6. Bartlett, D.H., Pressure effects on *in vivo* microbial processes. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, **1595**: 367-381.
7. Beney, L., Perrier-Cornet, J.M., Hayert, M. and Gervais, P., Shape modification of phospholipid vesicles induced by high pressure: Influence of bilayer compressibility. *Biophys. J.* 1997, **72**: 1258-1263.
8. Cartwright, C.P., Veazey, F.J. and Rose, A.H., Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in, and accumulation of glycine by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 1987, **133**: 857-865.
9. Cavicchioli, R. and Watson, K., Loss of heat-shock acquisition of thermotolerance in yeast is not correlated with loss of heat-shock proteins. *FEBS Lett.* 1986, **207**: 149-152.
10. Coelho, M.A.Z., Belo, I., Pinheiro, R., Amaral, A.L., Mota, M., Coutinho, J.A.P. and Ferreira, E.C., Effect of hyperbaric stress on yeast morphology: study by automated image analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press, accepted: April 30, 2004.
11. Costa, V., Reis, E., Quintanilha, A. and Moradas-Ferreira, P., Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, **300**: 608-614.
12. Costa, V. and Moradas-Ferreira, P., Oxidative stress and signal transduction in of *Saccharomyces cerevisiae*: Insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* 2001 **22**: 217-246.
13. Craig, E.A. and Gross, C.A., Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem. Sci.* 1991, **16**: 135-140.
14. Craig, E.A., The heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces. Gene Expression*, Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach, J.R. (eds.), Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1992, Vol. 2, pp. 501-537.
15. Domitrovic, T., Palhano, F.L., Barja-Fidalgo, C., DeFreitas, M., Orlando, M.T.D., Fernandes, P.M.B., Role of nitric oxide in the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to heat shock and high hydrostatic pressure. *FEMS Yeast Res.* 2003, **3**: 341-346.
16. Estruch, F., Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000, **24**: 469-486.
17. Fernandes, A.A., Santamarina, J., Bud'ko, S.L., Nakamura, O., Guimpel, J. and Schuller, I.K., Effect of physical and chemical pressure on the superconductivity of high-temperature oxide superconductors. *Phys. Rev. B* 1991, **44**: 7601-7606.
18. Fernandes, P.M.B., Panek, A.D. and Kurtenbach, E., Effect of hydrostatic pressure on a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in the trehalose-6-phosphate synthase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, **152**: 17-21.
19. Fernandes, P.M.B., Farina, M. and Kurtenbach, E., Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Let. Appl. Microbiol.* 2001, **32**: 42-46.
20. Fernandes, P.M.B., Domitrovic, T., Kao, C.M. and Kurtenbach, E., Genome expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett.* 2004, **556**: 153-160.
21. Foguel, D. and Silva, J.L., Cold denaturation of a repressor-operator complex: The role of entropy in protein-DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, **91**: 8244-8247.
22. Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P.O., Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* 2000, **11**: 4241-4257.
23. Geymonat, M., Wang, L., Garreau, H. and Jacquet, M., Ssa1p chaperone interacts with the guanine nucleotide exchange factor of ras Cdc25p and controls the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 1998, **30**: 855-864.
24. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G., Life with 6000 genes. *Science* 1996, **274**: 546-567.
25. Gross, M. and Jaenicke, R., Pressure-induced dissociation of tight couple ribosomes. *FEBS Lett.* 1990, **267**: 239-241.
26. Gross, M., Lehle, K., Jaenicke, R. and Nierhaus, K.H., Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. Stabilizing conditions and identification of the most sensitive functional state. *Eur. J. Biochem.* 1993, **218**: 463-468.
27. Gross, M. and Jaenicke, R., Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur. J. Biochem.* 1994, **221**: 617-630.
28. Haney, S., Xu, J., Lee, S.-Y., Broach, J.R. and Manfredi, J.P., Genetic selection in *Saccharomyces* of mutant mammalian adenylyl cyclases with elevated basal activities. *Mol. Gen. Genet.* 2001, **265**: 1120-1128.
29. Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehmsperger, M., White, H.E., Chen, S., Saibil, H.R. and Buchner, J., Hsp26: A temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* 1999, **18**: 6744-6751.
30. Iwahashi, H., Kaul, S.C., Obuch, K. and Komatsu, Y., Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991, **80**: 325-328.
31. Jeanloz, R., Physical chemistry at ultrahigh pressures and temperatures. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 1989, **40**: 237-259.
32. Kobayashi, N., McClanahan, T.K., Simon, J.R., Treger, J.M. and McEntee, K., Structure and functional analysis of the multistress response gene *DDR2* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, **229**: 540-547.
33. Landau, J.V., Induction, transcription and translation in *Escherichia coli*: A hydrostatic pressure study. *Biochim. Biophys. Acta* 1967, **149**: 506-512.
34. Lew, D.J., Weinert, T. and Pringle, J.R., Cell cycle control. In: *Saccharomyces cerevisiae. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces. Gene Expression*, Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach, J.R. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1992, **3**: 607-695.
35. Mentré, P., Hamraoui, L., Hui Bon Hoa, G. and Debey, P., Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. *Cell. Mol. Biol.* 1999, **45**: 353-362.
36. Mentré, P. and Hui Bon Hoa, G., Effects of high hydrostatic pressures on living cells: A consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. *Int. Rev. Cytol.* 2001, **201**: 1-84.
37. Mentré, P., An introduction to "Water in the cell": tamed Hydra? *Cell. Mol. Biol.* 2001, **47**: 709-715.
38. Miller, M.J., Xuong, N.H. and Geiduschek, E.P., A response of protein synthesis to temperature shift in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, **76**: 5222-5225.
39. Molina-Garcia, A., The effect of hydrostatic pressure on biological systems. *Biotechnol. Genet. Engin. Rev.* 2002, **19**: 3-54.
40. Motshwene, P., Karreman, R., Kgari, G., Brandt, W. and Lindsey, G., LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 2004, **377**: 769-774.
41. Mohana-Borges, R., Pacheco, A.B., Sousa, F.J., Foguel, D., Almeida, D.F. and Silva, J.L., LexA repressor forms stable dimers in solution. The role of specific DNA in tightening protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**: 4708-4712.

42. Orlando, M.T.D., Comparação entre o efeito da pressão química e a pressão externa hidrostática em supercondutores do tipo (Hg, Re)-1223. Doctor Thesis, CBPF, Brasil, 1999.
43. Palhano, F.L., Orlando, M.T. and Fernandes, P.M., Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004, **233**: 139-145.
44. Palhano, F.L., Vilches, T.T.B., Santos, R.B., Orlando, M.T.D., Ventura, J.A. and Fernandes, P.M.B., Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. *Int. J. Food Microbiol.* in press, accepted: February 5, 2004.
45. Perrier-Cornet, J.M., Hayert, M. and Gervais, P., Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: Occurrence of cell membrane permeabilization. *J. Appl. Microbiol.* 1999, **87**: 1-7.
46. Peters, W.S., Hagemann, W. and Deri Tomos, A., What makes plants different? Principles of extracellular matrix function in 'soft' plant tissues. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2000, **125**: 151-67.
47. Piper, P.W., Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993, **11**: 339-355.
48. Piper, P.W., The yeast heat shock response. In: *Yeast Stress Response*, Mager, W.H. and Hohmann, S. (eds.), R.G. Company, Texas, USA 1997, pp. 75-99.
49. Querol, A., Fernandez-Espinar, M.T., del Olmo, M. and Barrio, E., Adaptive evolution of wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, **86**: 3-10.
50. Quinn, P.J., Joo, F. and Vigh, L., The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1989, **53**: 71-103.
51. Ross, A.I., Griffiths, M.W., Mittal, G.S. and Deeth, H.C., Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, **89**: 125-138.
52. Sahara, T., Goda, T. and Ohgiya, S., Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**: 50015-50021.
53. San Martin, M.F., Barbosa-Canovas, G.V. and Swanson, B.G., Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2002, **42**: 627-645.
54. Seymour, I.J. and Piper, P.W., Stress induction of HSP30, the plasma membrane heat shock protein gene of *Saccharomyces cerevisiae*, appears not to use known stress-regulated transcription factors. *Microbiology* 1999, **145**: 231-239.
55. Silva, J.L. and Weber, P., Pressure stability of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1993, **44**: 89-113.
56. Silva, J.L., Foguel, D. and Royer, C.A., Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem. Sci.* 2001, **26**: 612-618.
57. Swan, T.M. and Watson, K., Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: Role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, **169**: 191-197.
58. Takahashi, K., Kubo, T., Kobayashi, K., Imanishi, J., Takigawa, M., Arai, Y. and Hirasawa, Y., Hydrostatic pressure influences mRNA expression of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 in chondrocyte-like cell line. *J. Orthop. Res.* 1997, **15**: 150-158.
59. Verjovski-Almeida, S., Kurtenbach, E., Amorim, A.F. and Weber, G., Pressure-induced dissociation of solubilized sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* 1986, **261**: 9872-9878.
60. Wheals, A.E., Biology of the cell cycle in yeasts. In: *The Yeasts*, Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds.), Acad. Press, London, UK, 1987, Vol. 1, pp. 283-390.
61. Yale, J. and Bohnert, H.J., Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**: 15996-16007.
62. Yeast: <http://www.yeastgenome.org/VL-yeast.html>