UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Caracterização Biofísica da Membrana Plasmática da Levedura

Francisco Maria dos Santos e Silva Aresta Branco

Mestrado em Bioquímica
(Área de especialização: Bioquímica Médica)

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Caracterização Biofísica da Membrana Plasmática da Levedura

Francisco Maria dos Santos e Silva Aresta Branco

Mestrado em Bioquímica
(Área de especialização: Bioquímica Médica)

Dissertação orientada pelo Doutor Rodrigo Freire Martins de Almeida
e pela Prof. Doutora Helena Susana Marinho

2009

Agradecimentos

Aos meus orientadores Dr. Rodrigo de Almeida e Prof. Dra. Susana Marinho por me terem dado a oportunidade de trabalhar nos seus laboratórios para desenvolver a minha Tese de Mestrado, pela confiança que demonstraram no meu trabalho e pela total disponibilidade sempre que necessitei de ajuda. Agradeço-lhes por contribuírem de forma especial para o meu desenvolvimento intelectual e por esclarecerem as minhas muitas e muitas dúvidas ao longo de todo o trabalho.

À Prof. Dra. Luísa Cyrne e ao Prof. Dr. Fernando Antunes por contribuírem com ideias e discussões interessantes para o meu trabalho durante os *lab meetings* e por toda a ajuda prestada sempre que necessitei.

À Ana Matias que, incansavelmente, me ajudou em inúmeros protocolos, pela sua amizade e por aturar as minhas dúvidas e brincadeiras sempre com um óptimo ambiente de trabalho.

Ao André Fernandes "Esquilo" com quem a boa disposição e entreajuda no laboratório sempre imperaram ao longo de todo o trabalho. Como grande amigo, foi uma pedra basilar não só durante este trabalho mas em todo o Mestrado.

Ao André Cordeiro e ao Joaquim pela amizade, pela boa disposição e picardias muito engraçadas, pelo óptimo ambiente de trabalho e a enorme disponibilidade em qualquer situação.

Ao Dr. Pedro Lima e André Bastos pela sua amizade e óptimo ambiente de trabalho.

À Margarida, Catarina e Joana pela sua amizade, pelos pequenos grandes momentos de descontracção, os *smoke-breaks*, e pelo apoio que me transmitiram.

Ao Damas, Henri, Marco, Marta, Tavares e Ana Lúcia por terem trabalhado comigo ao longo destes últimos seis anos e contríbuido para o meu desenvolvimento intelectual e pela sua grande amizade.

Ao Cristiano, Bebé e Pombo que, mesmo tendo poucas oportunidades para conviver, demonstraram sempre um apoio sem reservas e uma enorme amizade acima de tudo.

Ao Raposo, Paulo, Neves, Nuno Filmes, Inês, Pedro Costa, Corvo, França, António Soure, Nuno Gomes, ao GDB, à velha guarda da FCUL e à malta de Coimbra que pela sua grande amizade, boa disposição e apoio me fizeram encarar cada dia de trabalho com optimismo.

À Sofia por toda a força que me tem dado, pela "presença" nas duras noitadas de trabalho mesmo estando longe e por ser tão especial para mim.

À minha família por serem fundamentais no desenvolvimento da minha pessoa, por todo o apoio incondicional, os conselhos que sempre me transmitiram e é a eles que eu devo o facto de poder estudar. É à minha família que eu dedico esta Tese.

Índice

Lista de abreviaturas e símbolos v

Resumo ix

Abstract xi

Introdução 1

1. Composição e Arquitectura de Biomembranas 1

1.1 Modelos da Estrutura de Biomembranas 1

1.2 Composição de Biomembranas 2

2. Membrana Plasmática da Levedura 5

2.1 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico de estudo 5

2.2 Composição da membrana plasmática de *S. cerevisiae* 6

2.3 Organização da membrana plasmática de *S. cerevisiae* 14

3. Propriedades Termotrópicas das Bicamadas Lipídicas 16

4. Espectroscopia de Fluorescência no Estudo de Domínios Lipídicos 18

Objectivos 23

Materiais e Métodos 25

Resultados 35

1. Optimização de condições experimentais com a sonda *t*-PnA em *S. cerevisiae* 35

2. Caracterização fotofísica da sonda *t*-PnA na membrana plasmática de *S. cerevisiae* 41

2.1 Espectros de absorção, excitação e emissão do *t*-PnA 41

2.2 Estudos de Fluorescência em Estado Transiente 43

2.3 Estudos de Anisotropia de Fluorescência em Estado Estacionário 51

3. Caracterização fotofísica da sonda DPH na membrana plasmática de *S. cerevisiae* 54

3.1 Espectros de absorção, excitação e emissão do DPH 54

3.2 Estudos de Anisotropia de Fluorescência em Estado Estacionário 56

3.3 Estudos de Fluorescência em Estado Transiente 57

Discussão 61

Considerações Finais e Perspectivas 69

Lista de Referências Bibliográficas 73

Lista de abreviaturas e símbolos

%b	Percentagem de branco
$< r >$	Anisotropia de fluorescência em estado estacionário
$< \tau >$	Tempo de vida médio de fluorescência
Ácido gordo Cn:m	Ácido gordo com n átomos de carbono e m insaturações
ADC	Conversor analógico-digital (do inglês *Analog to Digital Convertor*)
α_i	Pré-exponencial associada ao tempo de vida da componente i
χ^2	Qui-quadrado reduzido
CCM	Canal de contagens máximas
CL	Cardiolipina
CWI	do inglês *Cell Wall Integrity*
D	Coeficiente de difusão lateral
DHS	Di-hidroesfingosina
DPH	Difenil-hexatrieno
FCCP	Carbonil cianida 4-(trifluorometoxi)fenil-hidrazona
G	Factor de correcção de polarização do monocromador de emissão
g	Estado simétrico
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
H_2O_2	Peróxido de hidrogénio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil]-1-piperazinoetanosulfónico
HOG	do inglês *High Osmotic Response*
I(t)	Intensidade de fluorescência ao longo do tempo
$I_\perp$	Intensidades de emissão de luz em estado estacionário com polarização perpendicular à luz de excitação
$I_\parallel$	Intensidades de emissão de luz em estado estacionário com polarização paralela à luz de excitação
I_{HH}	Intensidade de emissão de luz em estado estacionário com os polarizadores de excitação e emissão na orientação horizontal

I_{HV}	Intensidade de emissão de luz em estado estacionário com os polarizadores de excitação e emissão nas orientações horizontal e vertical, respectivamente
IPC	Inositol fosfoceramida
I_{VH}	Intensidade de emissão de luz em estado estacionário com os polarizadores de excitação e emissão nas orientações vertical e horizontal, respectivamente
I_{VV}	Intensidade de emissão de luz em estado estacionário com os polarizadores de excitação e emissão na orientação vertical
l_d	Fase lamelar fluida ou líquido desordenado
LED	Díodo de emissão de luz (do inglês *Light Emitting Diode*)
LisoPC	Lisofosfatidilcolina
l_o	Fase lamelar líquido ordenado
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
$M(IP)_2C$	Manosildi-inositol fosfoceramida
MCA	Analisador multicanais (do inglês *Multichannel Analyzer*)
MCC	Compartimento Membranar C (do inglês *Membrane Compartment occupied by Can1*)
MCP	Compartimento Membranar P (do inglês *Membrane Compartment occupied by Pma1*)
MIPC	Manosilinositol fosfoceramida
OD_{600}	Densidade óptica a 600 nm
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PHS	Fitoesfingosina
PI	Fosfatidilinositol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfanilo
POPC	Palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina

PS	Fosfatidilserina
θ	Tempo de correlação rotacional
r_0	Anisotropia de fluorescência em estado estacionário na ausência de rotação
S	Ordem de membrana
SARS-CoV	Coronavírus do síndrome respiratório agudo
SC	do inglês *Synthetic Complete*
s_o	Fase lamelar gel ou sólido ordenado
SPT	Técnica de detecção de partícula única (do inglês *Single Particle Tracking*) ou técnica de cronometragem de fotão único (do inglês *Single Photon Timing*)
t	Tempo
TAC	Conversor de tempo em amplitude (do inglês *Time to Amplitude Convertor*)
TCSPC	Técnica de cronometragem de fotão único (do inglês *Time-Correlated Single Photon Counting*)
τ_i	Tempo de vida da componente i
T_m	Temperatura de transição principal
t-PnA	Ácido 9, 11, 13, 15-todas *trans*-octadecatetraenóico ou ácido *trans*-parinárico
u	Estado anti-simétrico
u.a.	Unidades arbitrarias
UV-Vis	Ultravioleta – visível
v/v	Volume/volume
wt	*Wild-type*
YNB	do inglês *Yeast Nitrogen Base*
YPD	do inglês *Yeast extract, Peptone, Dextrose*

Resumo

A membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* foi estudada por espectroscopia de fluorescência, utilizando as sondas de membrana ácido *trans*-parinárico e difenil-hexatrieno, de modo a compreender os princípios biofísicos subjacentes à formação e função de compartimentos membranares, cuja importância foi reconhecida recentemente.

O estudo foi realizado em (i) células *wt*; (ii) esferoblastos (células *wt* com remoção completa da parede celular); (iii) lipossomas preparados a partir de extractos lipídicos totais de células *wt*; (iv) células *erg6*Δ, que acumulam zimosterol em vez de ergosterol; (v) células *scs7*Δ, que não sintetizam esfingolípidos com ácidos gordos C26:0 α-hidroxilados.

As principais observações foram: (a) a membrana plasmática da levedura possui domínios de gel ricos em esfingolípidos com conteúdo baixo ou nulo de esteróis; (b) os lípidos de levedura possuem a capacidade de formar domínios mais rígidos na ausência de proteínas do que os detectados na membrana plasmática; (c) os sistemas *erg6*Δ e esferoblastos possuem uma maior ordem global de membrana; (d) modificações na biossíntese do ergosterol e a remoção da parede celular não alteram significativamente a rigidez dos domínios ricos em esfingolípidos, mas em ambos os casos há uma diminuição da sua abundância relativa.

Os resultados obtidos sugerem que a parede celular desempenha um papel na estabilização dos domínios ricos em esfingolípidos que poderá ocorrer por interacção da mesma com proteínas ancoradas a glucosilfosfatidilinositol. A partir dos resultados também foi proposto um modelo em que nas células onde os domínios ricos em esfingolípidos são menos abundantes ocorre uma distribuição mais homogénea de esfingolípidos por toda a membrana, responsável pelo aumento de ordem global da mesma.

Concluindo, este trabalho comprova a existência de domínios ordenados tipo gel na membrana plasmática de organismos vivos, reforçando a ideia de que os

esfingolípidos são componentes essenciais na constituição da membrana e na resposta a alterações fisiológicas que ponham em causa a integridade da célula.

Palavras-Chave:

Jangadas lipídicas; Ácido *trans*-parinárico; Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo; Metabolismo de ergosterol e esfingolípidos; Fase gel rica em esfingolípidos.

Abstract

The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* was studied by fluorescence spectroscopy with the membrane probes *trans*-parinaric acid and diphenylhexatriene to understand biophysical principles underlying the formation and role of membrane compartments, with relevance recently recognized.

The study included: (i) *wt* cells; (ii) spheroplasts (wt cells with complete cell wall removal); (iii) liposomes from total lipid extracts of wt cells; (iv) *erg6*Δ cells, which accumulate zymosterol instead of ergosterol; (v) *scs7*Δ cells, which lack synthesis of α-hydroxylated sphingolipid-associated C26:0 fatty acids.

The main observations were: (a) the yeast plasma membrane contains sphingolipid-enriched gel domains with low or none sterol content; (b) yeast lipids have the ability to form, in the absence of proteins, domains more rigid than those detected in the plasma membrane; (c) *erg6*Δ cells and spheropasts have a higher membrane order; (d) alterations in sterol biosynthesis and cell wall removal do not significantly affect sphingolipid-enriched domains rigidity, although significantly reducing their relative abundance.

The results obtained suggest that the cell wall has an important role in the stabilization of sphingolipid-enriched domains which might occur through its interaction with glucosylphosphatidylinositol anchored proteins. Furthermore, a model is proposed that explains the lower abundance of sphingolipid-enriched domains by a more homogeneous distribution of those lipids throughout the whole plasma membrane, thereby increasing the membrane global order.

In conclusion, this work shows the existence of gel-like ordered domains in the plasma membrane of living cells, supporting the idea that sphingolipids are essential components for the constitution of biomembranes and for the response to physiological changes that are dangerous for the cell integrity.

Keywords:

Lipid rafts; *Trans*-parinaric acid; Time-resolved fluorescence spectroscopy; Ergosterol and sphingolipid metabolism; Sphingolipid-enriched gel phase.

Introdução

1. Composição e Arquitectura de Biomembranas

1.1 Modelos da Estrutura de Biomembranas

As membranas são estruturas presentes em todos os organismos que definem o limite externo – membrana plasmática - e a compartimentalização – membranas internas - das células. As membranas são flexíveis, dinâmicas e selectivamente permeáveis a solutos polares, o que lhes confere a capacidade de controlar a homeostasia celular. Muitos processos celulares são organizados ou estão associados à participação de membranas, tais como transdução de sinal e energia, síntese proteica e lipídica e transporte de metabolitos, e ainda outros que dependem da capacidade das membranas sofrerem fissão e se re-associarem, como divisão celular e endocitose, (Nelson and Cox, 2005).

O conceito de bicamada lipídica, tal como é hoje conhecido, surgiu em 1925 quando Gorter e Grendel extraíram os lípidos de membrana de eritrócitos de diversos animais, colocando-os numa superfície de água e formaram uma monocamada lipídica contínua (de Almeida and Loura, 2004). A área desta monocamada era sensivelmente o dobro da área superficial total dos eritrócitos, e sendo a membrana plasmática a única membrana nestas células, Gorter e Grendel concluíram que os fosfolípidos membranares se arranjam numa bicamada. Para além de contraporem a teoria de Langmuir onde a membrana celular seria uma monocamada (Langmuir, 1917), ainda previram a orientação física dos fosfolípidos na bicamada com base em interacções moleculares.

Em 1935 apareceu o primeiro modelo da estrutura biomembranar que incluiu proteínas e em que Danielli e Davson propuseram a existência de uma camada proteica adsorvida a cada lado lipófilo da bicamada. A existência de poros aquosos explicava a passagem de moléculas hidrófilas através duma membrana tão estática.

Na década de 60, com o desenvolvimento de técnicas de extracção de proteínas e da técnica de microscopia electrónica de criofractura foi possível distinguir as proteínas membranares em intrínsecas ou extrínsecas (Fisher and Stoeckenius, 1983). Isto permitiu a Singer e Nicolson conceber um novo modelo de arquitectura membranar em 1972, designado modelo do mosaico fluido (de Almeida and Loura, 2004). Este modelo continua a descrever os fosfolípidos dispostos em bicamada, mas as proteínas penetram no "solvente" lipídico podendo atravessar toda a membrana ou ainda manterem-se à superfície da mesma. Hoje em dia, este modelo ainda é aceite mas ao longo dos anos muitas adaptações foram feitas: (i) a existência de barreiras de difusão lipídica constituídas por proteínas membranares com pequena difusão (Kusumi *et al.*, 1993); (ii) a segregação lateral de lípidos em domínios membranares (Simons and Ikonen, 1997); (iii) a membrana plasmática encontra-se estruturada na forma de um mosaico com microdomínios de constituição diversa (Maxfield, 2002); (iv) a existência de conchas lipídicas (*lipid shells*), estruturas termodinamicamente estáveis com afinidade para cavéolos / jangadas (*rafts*), que direccionam especificamente proteínas para estes locais (Anderson and Jacobson, 2002); (v) as duas camadas das biomembranas possuem assimetria lipídica, fenómeno associado a *flipases* (Pomorski *et al.*, 2004).

Estes novos conhecimentos, em conjunto com o modelo do mosaico fluido, têm permitido descrever com maior pormenor não só a arquitectura das biomembranas, como também compreender inúmeros processos bioquímicos que ocorrem ou que têm início nas membranas.

1.2 Composição de Biomembranas

As biomembranas são maioritariamente constituídas por lípidos e proteínas, havendo igualmente glícidos que se encontram associados às duas classes anteriores (Gennis, 1989) (Figura 1).

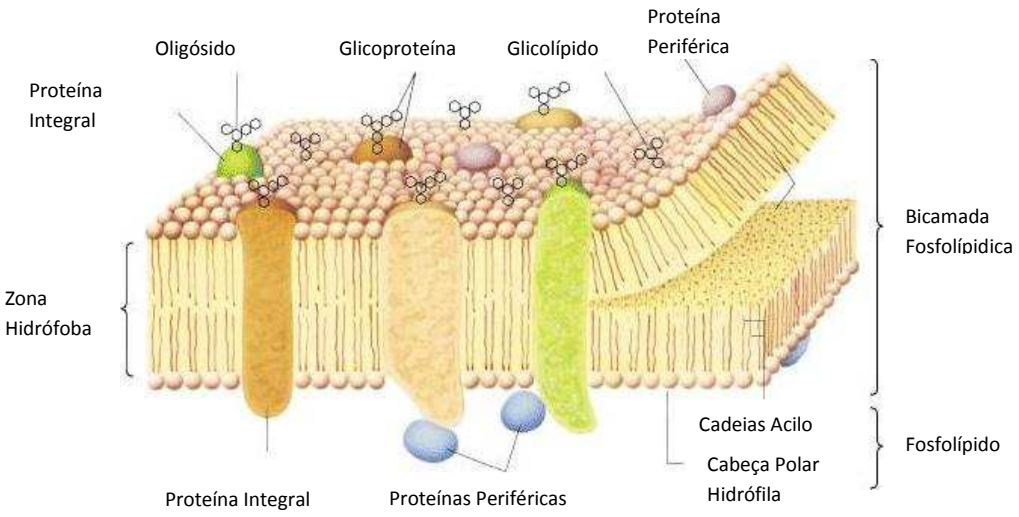

Figura 1 – Composição de uma membrana biológica (adaptado de (Lodish *et al.*, 2000))

As proteínas são os componentes bioquimicamente mais activos nas membranas, possuindo estruturas e funções diversas consoante o tipo de célula e localização celular. As proteínas podem ser designadas de (i) integrais, ou seja, atravessam a bicamada lipídica e podem constituir cerca de 70% da massa total de proteínas em certas membranas; (ii) periféricas, ou seja, localizam-se à superfície das membranas, por vezes associadas a proteínas integrais (Cantor and Schimmel, 1980). Existem proteínas com diversos tipos de modificações (e.g. acilações, glicosilações, farnesilações) que estão associadas à membrana (Nelson and Cox, 2005). É o caso de proteínas ancoradas ao glucosilfosfatidilinositol (GPI) através de um ligação glicosídica que se encontram exclusivamente no folheto externo da membrana plasmática e que, devido a este tipo de ligação à membrana, conseguem ter uma maior difusão no plano da bicamada fosfolipídica (Lodish *et al.*, 2000)).

Do ponto de vista químico, a característica mais distintiva das biomembranas é a sua elevada concentração de lípidos. Na categoria de lípidos incluem-se os ácidos gordos e seus derivados, bem como uma grande variedade de compostos pouco polares de baixa massa molecular (van Meer *et al.*, 2008), mas em biomembranas resumem-se a apenas quatro classes principais: (i) glicerofosfolípidos; (ii) esfingolípidos; (iii) glicolípidos; (iv) esteróis (de Almeida and Loura, 2004). Outros tipos

de lípidos poderão existir em quantidades vestigiais como é o caso do esqualeno, um poliisopreno que se encontra por vezes no plano horizontal no centro da bicamada (Hauss *et al.*, 2002). Quando em condições de adaptação ao H_2O_2, os níveis de esqualeno chegam a duplicar (Pedroso *et al.*, 2009).

Os glicerofosfolípidos são constituídos por duas cadeias de ácidos gordos ligadas a um fosfato de glicerol por ligações éster, sendo, em biomembranas de eucariotas, todos derivados do estereoisómero L (Marsh, 1990). O grupo fosfato encontra-se esterificado por um grupo hidroxilo do glicerol e, frequentemente, por um outro composto hidrófilo (Quadro 1).

Quadro 1 – Denominações e abreviaturas para os glicerofosfolípidos comuns. Adaptado de (de Almeida and Loura, 2004).

Grupo polar ligado ao fosfato	Nome Genérico	Nome Sistemático	Abreviatura
Hidrogénio	Ácido Fosfatídico	ácido 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfórico	PA
Colina	Fosfatidilcolina	1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfocolina	PC
Etanolamina	Fosfatidiletanolamina	1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina	PE
Serina	Fosfatidilserina	1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfoserina	PS
Glicerol	Fosfatidilglicerol	1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol	PG
Inositol	Fosfatidilinositol	1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfoinositol	PI

A grande variedade desta classe de lípidos depende não só dos vários grupos polares mas também do grande número de ácidos gordos existentes com diferentes comprimentos de cadeias carbonadas e graus de insaturação (serão referidos na secção 2.2.1 os principais ácidos gordos do sistema em estudo). A pH fisiológico PA, PS, PG e PI são aniónicos (carga global negativa) e PC e PE são *zwitteriónicos* (carga global nula).

Os esfingolípidos são compostos por uma amina de longa cadeia alifática, hidrófoba, maioritariamente saturada, por vezes hidroxilada, denominada de base esfingóide e que estabelece uma ligação amida a um ácido gordo de cadeia longa. Pode conter um grupo polar de entre os descritos no Quadro 1, este último associado

por uma ligação fosfodiéster ou glicosídica. Consequentemente, os esfingolípidos repartem-se entre as categorias de fosfolípidos e glicolípidos, respectivamente (Nelson and Cox, 2005).

Os glicolípidos possuem uma estrutura semelhante às duas classes anteriores mas possuem um mono-, di- ou oligósido no lugar do grupo fosfato e da cabeça polar. São moléculas importantes na regulação do crescimento, no reconhecimento e na adesão celulares (de Almeida and Loura, 2004).

Os esteróis são compostos por um esqueleto de ciclopentanoperidrofenantreno, ou seja, constituído por quatro anéis (três anéis com seis carbonos e um anel com cinco carbonos), uma cadeia lateral de hidrocarboneto e um grupo hidroxilo. Adiante será apresentada a via de biossíntese de um esterol juntamente com as fórmulas de estrutura. São moléculas compactas e rígidas que providenciam um nível apropriado de fluidez membranar que permitem uma função óptima a enzimas de membrana e que regulam a permeabilidade desta (Lees *et al.*, 1997).

2. Membrana Plasmática da Levedura

2.1 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico de estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem vindo a adquirir um papel importante como organismo modelo para estudos bioquímicos devido às diversas vantagens que apresenta: (i) é um organismo simples com o seu genoma totalmente sequenciado (Goffeau *et al.*, 1996); (ii) não é patogénico; (iii) possui um crescimento rápido; (iv) a manutenção destes organismos requer baixos custos (Sherman, 2002). Portanto, consideram-se os estudos em leveduras como um ponto de partida para a descoberta de novas estruturas e processos em células eucariotas, que possam posteriormente ser utilizados como alvo de estudo em sistemas eucariotas mais complexos como células animais ou vegetais.

A membrana plasmática de células eucariotas é muito sofisticada e a sua organização é essencial ao desenvolvimento de funções complexas. Admite-se actualmente que o nível de complexidade é ainda maior, pois tem-se tornado claro que as propriedades biofísicas das membranas resultantes das interacções lípido-lípido e a sua modulação por interacções lípido-proteína e proteína-proteína estão envolvidos, estimulam e respondem a todos os tipos de sinais e alterações de condições fisiológicas (Opekarova *et al.*, 2005;Grossmann *et al.*, 2007;Hofman *et al.*, 2008;Guan *et al.*, 2009). Por exemplo, durante a adaptação celular ao peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em *S. cerevisiae*, foram detectadas alterações na permeabilidade da membrana plasmática a este agente oxidante (Sousa-Lopes *et al.*, 2004;Branco *et al.*, 2004), alterações na composição proteica (Pedroso, 2008) e lipídica da membrana plasmática (Pedroso *et al.*, 2009) e consequentemente nas propriedades biofísicas (Folmer *et al.*, 2008). Também a susceptibilidade a drogas por parte da levedura e de mutantes da via biossintética do ergosterol tem sido extensamente estudada, revelando que o aumento da mesma está intimamente relacionada com alterações das propriedades biofísicas da membrana plasmática dos mutantes (Mukhopadhyay *et al.*, 2002;Abe and Hiraki, 2009).

2.2 Composição da membrana plasmática de *S. cerevisiae*

2.2.1 Glicerofosfolípidos

Os fosfolípidos são o componente primordial das membranas. As percentagens de cada fosfolípido presente na membrana plasmática da levedura estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 – Composição de fosfolípidos da membrana plasmática de *S. cerevisiae* em relação à composição lipídica total. Adaptado de (van der Rest *et al.*, 1995): *a* – retirado de (Patton and Lester, 1991); *b* – retirado de (Zinser *et al.*, 1991). CL – cardiolipina; As restantes abreviaturas estão definidas na Tabela 1.

Abreviatura	% da composição total	
	a	*b*
PA	2,5	3,9
PC	17	16,8
PE	14	20,3
PS	3,8	33,6
CL	4,2	0,2
PI	27,7	17,7

Em relação aos fosfolípidos membranares descritos na secção 1.2, observa-se que não existe fosfatidilglicerol (PG) mas sim cardiolipina (CL) que é uma estrutura dimérica de dois PG's ligados por um esqueleto de glicerol. Este lípido encontra-se em pequena quantidade na membrana plasmática de leveduras, sendo a sua presença elevada na membrana interna do mitocôndrio devido à sua importância na bioenergética mitocondrial (Joshi *et al.*, 2009). Há resultados que sugerem também uma relação entre a via de síntese da cardiolipina e a biogénese da parede celular (Zhong and Greenberg, 2005). A fosfatidiletanolamina (PE) poderá estar relacionada com a acomodação de proteínas membranares e modulação das suas actividades (van Meer *et al.*, 2008). A fosfatildilcolina (PC) tem um papel bastante importante na transdução de sinal como fonte de moléculas lipídicas sinalizadoras como lisoPC, ácido fosfatídico (PA) e diacilglicerol (de Kroon, 2007). Os derivados fosforilados de fosfatidilinositol (PI) participam em funções de sinalização e reconhecimento, sendo importantes no recrutamento de proteínas solúveis e transmembranares para plataformas de sinalização e localizações sub-celulares específicas (van Meer *et al.*, 2008). Os glicerofosfolípidos desempenham uma importante função estrutural e a razão PC/PE é considerada com um importante parâmetro na manutenção da curvatura adequada da membrana plasmática da levedura (de Kroon, 2007).

Uma característica importante das biomembranas é a assimetria da distribuição dos fosfolípidos entre os dois folhetos das bicamadas. A PC encontra-se

maioritariamente no folheto externo da membrana plasmática, enquanto que a PE e o PI estão confinados predominantemente no folheto interno (Tyurina *et al.*, 2002;van der Rest *et al.*, 1995). Já a PS é o único fosfolípido que se encontra quase exclusivamente no folheto interno da membrana plasmática (Tyurina *et al.*, 2002;van der Rest *et al.*, 1995) Em células humanas, o aparecimento de PS no folheto externo é um sinal de entrada da célula em apoptose, de modo a ser reconhecida por macrófagos (Tyurina *et al.*, 2002;Bratton *et al.*, 1997). A assimetria lipídica em membranas é consequência de múltiplos factores, incluindo as propriedades biofísicas que ditam a capacidade de um lípido atravessar a bicamada espontaneamente, mecanismos que retêm lípidos num dos folhetos da bicamada (por exemplo, a sua glicosilação) e a presença de transportadores que assistem na translocação de lípidos (van Meer *et al.*, 2008).

As cadeias dos ácidos gordos presentes nos fosfolípidos de *S. cerevisiae* encontram-se apenas nas formas saturada ou monoinsaturada, não existindo polinsaturações. Os principais ácidos gordos da levedura são o palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), e oleico (C18:1), e em menor abundância o ácido mirístico (C14:0) (van der Rest *et al.*, 1995;Daum *et al.*, 1999;Schneiter *et al.*, 1999). O empacotamento da membrana aumenta com o aumento do comprimento das cadeias acilo e a diminuição dos graus de insaturação levando à formação duma estrutura mais ordenada e rígida (van der Rest *et al.*, 1995) A relação entre comprimento e área superficial das cadeias acilo com o tamanho do grupo polar dos lípidos também tem influência na curvatura da membrana, e esta pode afectar profundamente a organização lateral de lípidos e proteínas e, consequentemente, as funções membranares (de Kroon, 2007).

2.2.2 Esfingolípidos

Os esfingolípidos de *S. cerevisiae* possuem uma constituição diferente dos de células animais cuja base de cadeia longa é uma esfingosina. Em *S. cerevisiae*, a base de cadeia longa pode ser uma di-hidroesfingosina (DHS) com 16, 18 ou 20 átomos de carbono ou uma fitoesfingosina (PHS) com 18 ou 20 átomos de carbono. A PHS pode

ser produzida através da hidroxilação da DHS através duma reacção catalisada pelo enzima Sur2p (Figura 2) (Dickson, 2008).

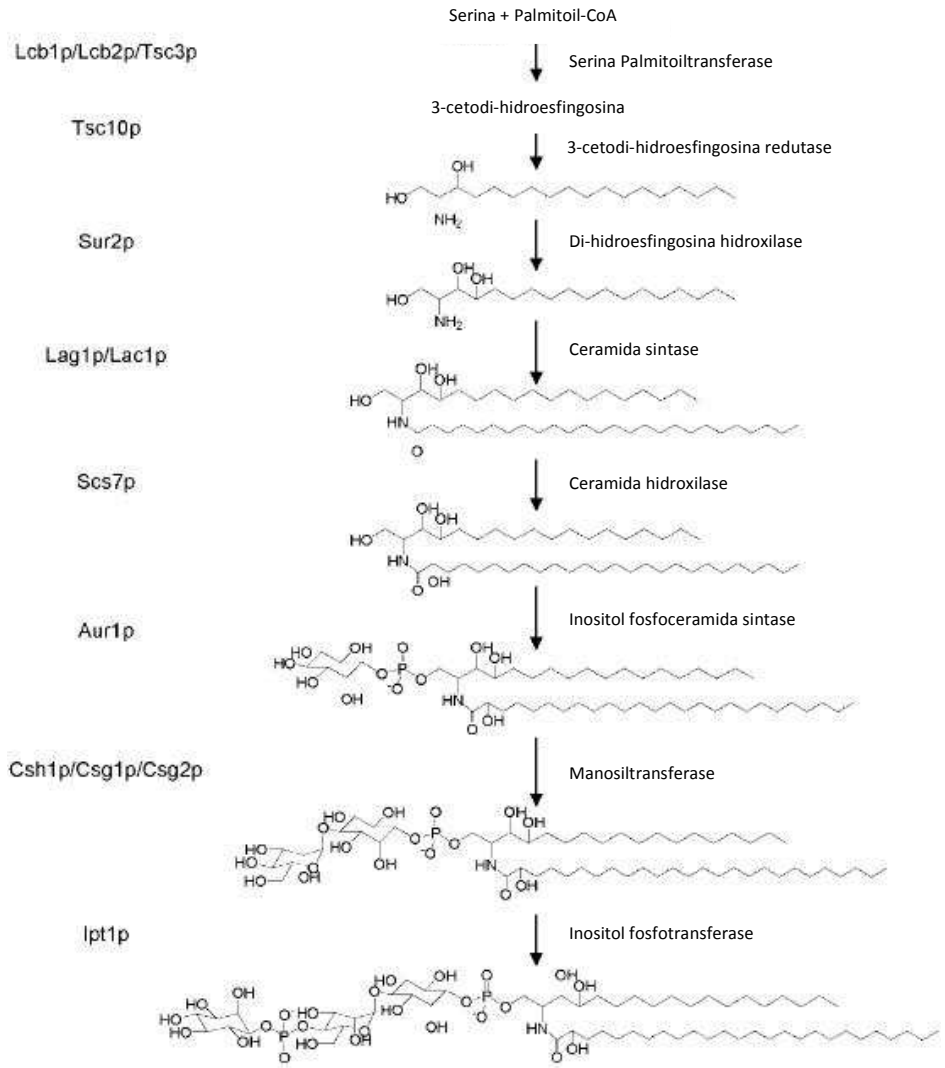

Figura 2 – Via de formação de esfingolípidos em *S. cerevisiae*. À esquerda encontram-se as proteínas que catalisam o tipo de reacções indicado à direita das setas (adaptado de (Guan and Wenk, 2006)).

A cadeia acilo destes esfingolípidos possui, na sua maioria, 26 átomos de carbono e é saturada mas pode ter zero, uma ou duas hidroxilações (Dickson, 2008), e, em menor quantidade, também poderá ter 24 átomos de carbono na sua cadeia (Guan and Wenk, 2006). Os principais esfingolípidos complexos da levedura são a inositol fosfoceramida (IPC), a manosilinositol fosfoceramida (MIPC) e a manosildi-inositol fosfoceramida ($M(IP)_2C$) (Guan and Wenk, 2006). Os esfingolípidos encontram-se

maioritariamente distribuídos pela membrana plasmática (cerca de 90%) e constituem cerca de 30% (molar) dos fosfolípidos da membrana plasmática (Patton and Lester, 1991;van der Rest *et al.*, 1995). Na Figura 2, encontra-se representada a via de síntese dos esfingolípidos complexos em *S. cerevisiae*.

A existência de um ácido gordo com uma cadeia muito longa C26 em esfingolípidos de *S. cerevisiae* deverá estar relacionada com a execução de funções únicas e essenciais à célula dado que mutantes com ácidos gordos de cadeia mais curta não são tão resistentes a *stress* térmico (Dickson, 2008). A primeira função atribuída a estes esfingolípidos foi a de transdução de sinal através da membrana plasmática (van der Rest *et al.*, 1995). Mais recentemente, foram atribuídas aos esfingolípidos funções em processos como resposta a *stress* térmico, crescimento celular, endocitose e transporte vesicular de proteínas ancoradas a GPI (glucosilfosfatidilinositol) do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi (Obeid *et al.*, 2002). O bloqueio da síntese dos ácidos gordos de cadeia longa C26:0 ou da síntese de esfingolípidos leva a um *mistargeting* da bomba protónica H^+-ATPase Pma1 da membrana plasmática (Gaigg *et al.*, 2005). Em condições de adaptação ao H_2O_2, há uma diminuição dos níveis de ácidos gordos de cadeia longa 2-OH-C26:0 presentes na membrana plasmática que se deve à repressão da expressão dos genes que codificam para os enzimas de elongação de ácidos gordos C16 e C18 para C20-C26 (Pedroso *et al.*, 2009).

Quando a síntese de esfingolípidos é totalmente impedida, as leveduras conseguem sintetizar glicerofosfatidilinositol com cadeias C26 que pode ser manosilado e substituir IPC's nas suas funções essenciais conseguindo sobreviver (Cerantola *et al.*, 2009). Este resultado sugere que poderão ser as propriedades biofísicas, como sejam uma elevada temperatura de transição de fase principal ou a forte tendência para a formação de fases interdigitadas que poderão estar na base das funções mais importantes dos esfingolípidos em *S. cerevisiae*. Quando o gene *SCS7*, que codifica para um α-hidroxilase do ácido gordo C26:0 ligado às ceramidas de modo a gerar ceramidas hidroxiladas, se encontra *deletado* não só se observam alterações no estado de hidroxilação de esfingolípidos que são responsáveis pela regulação da homeostase de cálcio e sensibilidade a anti-fúngicos (Swain *et al.*, 2002), como também é alterado o perfil de esfingolípidos complexos (Figura 3). No entanto, não se

observam alterações nos níveis de fosfolípidos no mutante *scs7*Δ em relação à estirpe *wt* (Guan and Wenk, 2006).

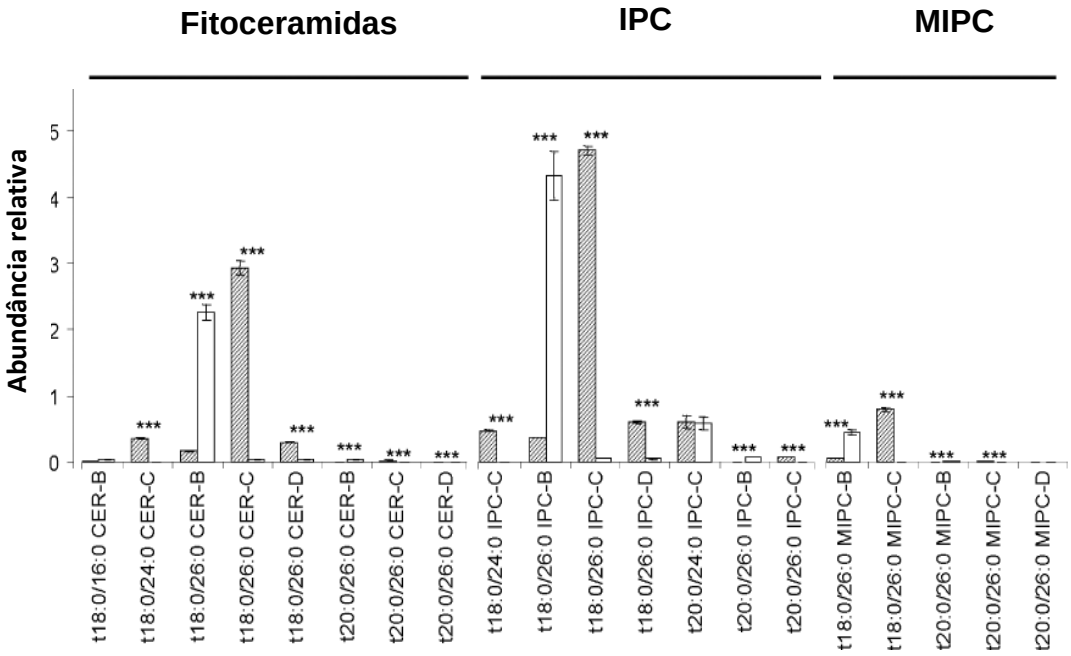

Figura 3 – Quantificação dos níveis de esfingolípidos nas estirpes *wt* (a cinzento) e *scs7*Δ (a branco). O enzima Scs7p catalisa a transformação de esfingolípidos da série B para a série C. ***: p<0,001. (adaptado de (Guan and Wenk, 2006)).

2.2.3 Esteróis

As leveduras não possuem o colesterol – esterol maioritário das células de mamífero – na composição das suas membranas mas sim o ergosterol que contém duas ligações duplas adicionais e um grupo metilo (Schulz and Prinz, 2007). Apesar de conferirem propriedades físicas ligeiramente diferentes às membranas, quer o ergosterol quer o colesterol exibem propriedades qualitativamente semelhantes, tais como o efeito na fluidez de membranas e a tendência de se associarem a membranas resistentes a detergentes (Schulz and Prinz, 2007).

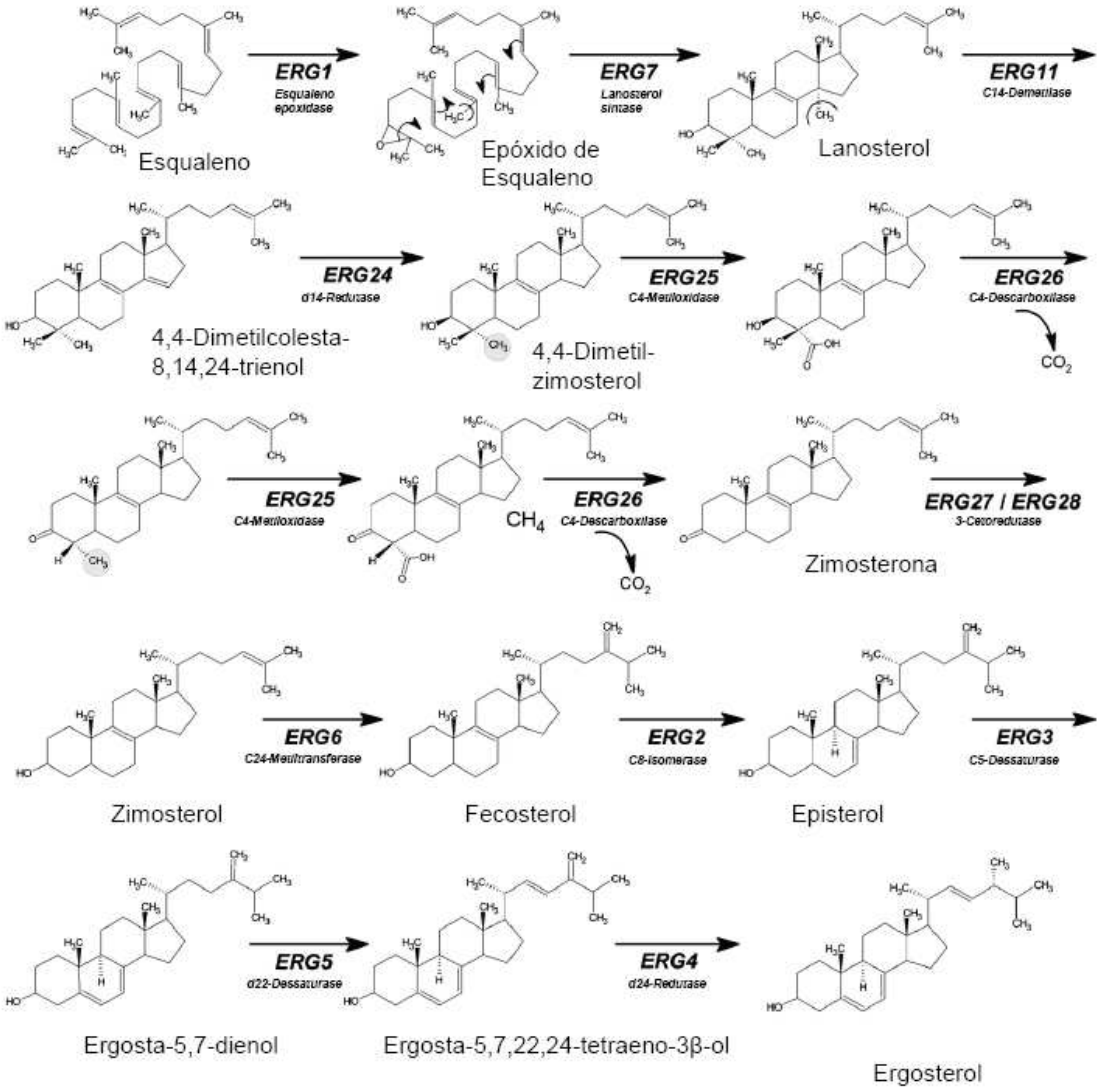

Figura 4 – Via biossintética do ergosterol pós-esqualeno em *S. cerevisiae*. (Adaptado de (Pedroso, 2008))

A via biossintética do ergosterol – que é complexa e metabolicamente dispendiosa (Parks and Casey, 1995) - encontra-se bem caracterizada e é apresentada na Figura 4.

O ergosterol não é o único esterol presente na membrana plasmática – aproximadamente 79,4% (Pedroso *et al.*, 2009) -, estando também presentes alguns intermediários da sua biossíntese – fecosterol com cerca de 9,0%, lanosterol com cerca 6,5% e zimosterol com cerca 5,0% (Pedroso *et al.*, 2009). O ergosterol deverá ser o esterol seleccionado por leveduras pois poderá satisfazer uma variedade de funções, algumas dessas não críticas a organismos superiores (Parks and Casey, 1995). A razão

molar esterol/fosfolípido é de cerca de 0,365 sendo superior a outras membranas celulares (Bottema *et al.*, 1983). O ergosterol está envolvido conjuntamente com esfingolípidos na formação de jangadas lipídicas em leveduras, sendo estas cruciais para a presença de determinadas proteínas na membrana plasmática (Bagnat *et al.*, 2000). O ergosterol encontra-se também envolvido na regulação da rigidez/fluidez da membrana plasmática alterando o movimento e actividade de proteínas membranares (van der Rest *et al.*, 1995) e evitando mudanças dramáticas de fluidez membranar em condições ambientais flutuantes (Rodriguez *et al.*, 1985). Processos como a endocitose (Heese-Peck *et al.*, 2002), a regulação da biossíntese de esfingolípidos e a do próprio ergosterol encontram-se dependente deste composto (Smith *et al.*, 1996;Swain *et al.*, 2002;Guan *et al.*, 2009). Aquando da reprodução sexuada, níveis baixos de ergosterol inibem a sinalização com base em feromonas e a fusão da membrana plasmática (Jin *et al.*, 2008).

Mutações nos passos que catalisam reacções desde o zimosterol ao ergosterol não são impeditivas do crescimento porque os intermediários produzidos podem substituir parcialmente as funções do ergosterol (Iwaki *et al.*, 2008). Contudo, muitos processos celulares são comprometidos nos mutantes que possuem deleções nos genes que codificam para os enzimas das reacções referidas. Assim, células *erg6*Δ nas quais o gene *ERG6* que codifica para o enzima que catalisa a formação de fecosterol a partir de zimosterol está ausente, apresentam uma captação de triptofano reduzida, uma vez que a permease com afinidade para o triptofano Tat2p é conduzida para o vacúolo, e não para a parede celular, quando existem níveis baixos de triptofano extracelular (Umebayashi and Nakano, 2003). Este mutante possui, igualmente, uma maior sensibilidade ao agente oxidante H_2O_2 (Branco *et al.*, 2004), assim como a xenobióticos como ciclo-heximida, orto-fenantrolina, metotrexato e fluconazolo (Abe and Hiraki, 2009;Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Outros efeitos resultantes de mutações no gene *ERG6* são, por exemplo, alterações nos perfis de esfingolípidos e de fosfolípidos (Guan *et al.*, 2009) como apresentado na Figura 5.

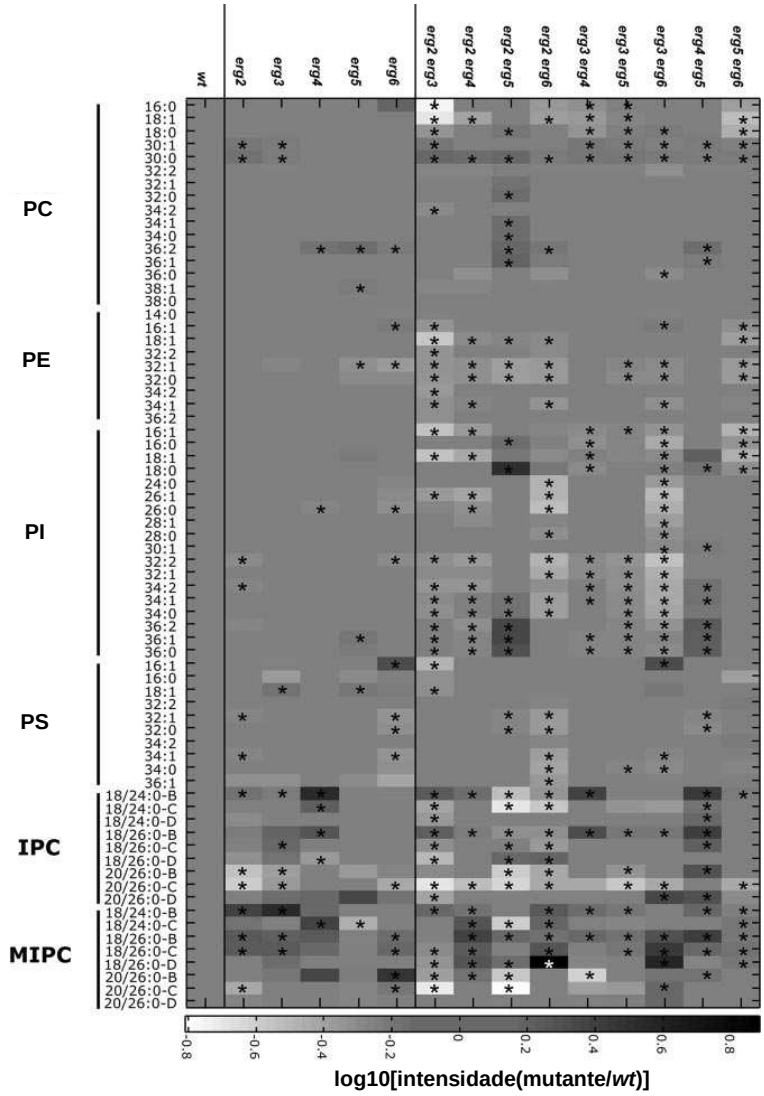

Figura 5 – Lipidómica de mutantes da biossíntese do ergosterol. *: p<0,05 (Adaptado de (Guan *et al.*, 2009)). Para as restantes abreviaturas ver Quadro 1 e Figura 2. B, C, e D referem-se às classe de esfingolípidos (número de hidroxilações).

2.3 Organização da membrana plasmática de *S. cerevisiae*

Na membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae* foram detectados dois compartimentos laterais não sobrepostos: (i) MCP (do inglês ***M**embrane **C**ompartment occupied by **P**ma1*); (ii) MCC (do inglês ***M**embrane **C**ompartment occupied by **C**an1*) (Malinska *et al.*, 2004). O MCC, além de conter o transportador do simporte arginina/H^+ Can1p, inclui pelo menos outras 20 proteínas já identificadas, por exemplo, o transportador simporte uracilo/H^+ Fur4p, a proteína Sur7p e o transportador de

triptofano Tat2p (Malinska *et al.*, 2004;Grossmann *et al.*, 2008). Em conjunto, estes dois compartimentos cobrem cerca de 80% de toda a membrana plasmática (Grossmann *et al.*, 2006). O MCC consiste em zonas isoladas de aproximadamente 300 nm de diâmetro e extremamente estáveis, não mudando de posição num intervalo de tempo comparável ao ciclo de divisão celular deste organismo (Malinska *et al.*, 2003). Dado que a proteína Tat2p está sempre dependente da presença de esteróis (Umebayashi and Nakano, 2003), este compartimento é considerado rico em ergosterol. Contudo, a presença de proteínas no MCC varia ao longo do tempo, uma vez que a Can1p, a Fur4p e a Tat2p possuem uma expressão dependente de substrato (Grossmann *et al.*, 2007). O MCC poderá estar envolvido ainda no controlo do *turnover* de proteínas transportadoras (Grossmann *et al.*, 2008). O MCP, que é possivelmente rico em esfingolípidos (Pedroso *et al.*, 2009), cobre toda a restante superfície da membrana definida por estes dois compartimentos (Grossmann *et al.*, 2007).

Um subdomínio distinto denominado eisossoma foi detectado no MCC co-localizando com os locais de endocitose (Walther *et al.*, 2006). Estão localizados no eisossoma as proteínas Pil1p, que está envolvida na biogénese do eisossoma (Moreira *et al.*, 2009), Lsp1p e Sur7p (Grossmann *et al.*, 2007;Alvarez *et al.*, 2007).

Tal como nos organismos eucariotas mais complexos, as leveduras também apresentam jangadas lipídicas. Em 1997, Simons e Ikonen apresentaram o modelo das jangadas lipídicas que se baseiam na agregação dinâmica de esfingolípidos e colesterol, formando domínios rígidos que se deslocam na bicamada lipídica fluida como uma jangada na água. A área de secção recta das cabeças dos esfingolípidos é, em geral, bastante superior à das suas cadeias acilo que possuem um comprimento muito longo e que podem interdigitar com a camada interna. Assim, o colesterol preenche o "vazio" criado pelos esfingolípidos (de Almeida and Loura, 2004). Nas leveduras acontece o mesmo fenómeno com a substituição do colesterol pelo ergosterol. Operacionalmente, as jangadas lipídicas são domínios resistentes à solubilização por detergentes não iónicos como o Triton X-100 a frio, mas tem sido demonstrado que este tratamento pode induzir a formação deste tipo de domínios (Heerklotz, 2002).

As jangadas lipídicas são consideradas centros organizadores por se associarem preferencialmente com proteínas específicas, podendo estas desempenhar um papel estabilizador nestes domínios (Simons and Toomre, 2000). As proteínas ancoradas a GPI's no folheto extracelular e as proteínas aciladas no folheto intracelular particionam-se nestes domínios ordenados devido ao empacotamento favorável das suas cadeias acilo saturadas (Alvarez *et al.*, 2007). Muitas das funções destes domínios em leveduras estão relacionadas com transdução de sinal, distribuição proteica, tráfego lipídico, endocitose e polaridade celular (Alvarez *et al.*, 2007;Watanabe *et al.*, 2002).

3. Propriedades Termotrópicas das Bicamadas Lipídicas

Os lípidos em água, devido à sua natureza anfipática, formam agregados que minimizam a exposição da parte hidrófoba das moléculas à fase aquosa. Os agregados podem ser de dois tipos: (i) fases lamelares, onde os fosfolípidos estão dispostos em bicamada; (ii) fases não-lamelares, onde os fosfolípidos se organizam em estruturas hexagonais ou cúbicas. Estas fases não-lamelares estão relacionadas com eventos transientes das biomembranas como a fusão, fissão e formação de poros (van Meer *et al.*, 2008).

Entre as fases lamelares, as mais relevantes em biomembranas são as fases fluida ou líquido desordenado (l_d), gel ou sólido ordenado (s_o) e líquido ordenado (l_o) que estão representadas na Figura 6 (van Meer *et al.*, 2008), cujos comportamentos observados são característicos dos lípidos que as compõem - definidos pelos parâmetros *S* (ordem de membrana) e *D* (coeficiente de difusão lateral) (van Meer *et al.*, 2008).

A fase fluida é a mais representativa nas membranas biológicas. Esta fase é estabilizada pela presença de lípidos com ligações duplas de conformação *gauche*, das quais resulta um menor empacotamento das cadeias e também o encurtamento das mesmas e, consequentemente, um menor espessamento da bicamada (de Almeida

and Loura, 2004). As ligações com conformação *gauche* aumentam os desvios nas cadeias acilo da bicamada originando espaçamento entre as cabeças polares dos fosfolípidos, existindo moléculas de água entre as mesmas (Gennis, 1989). A ordem de membrana *S* é baixa e a difusão lateral é rápida ($D \approx 1\ \mu m^2\ s^{-1}$) (van Meer *et al.*, 2008).

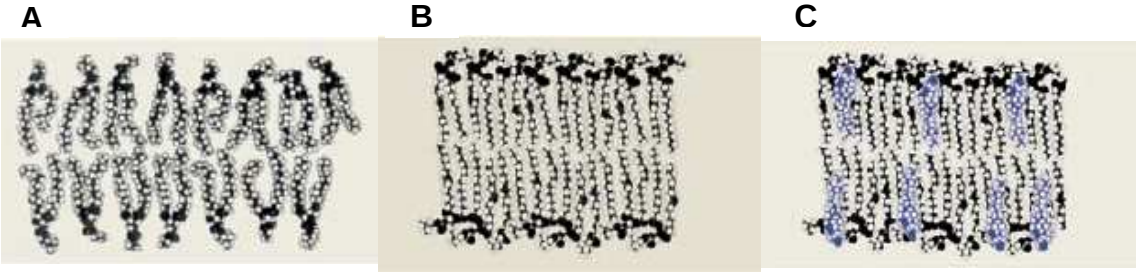

Figura 6 – Estrutura das várias fases lamelares presentes em biomembranas. A – fase líquido desordenado com lípidos possuindo maioritariamente ácidos gordos insaturados; B – fase sólido ordenado com lípidos possuindo maioritariamente ácidos gordos saturados; C – fase líquido ordenado com esfingolípidos intercalados com esteróis (a azul). Adaptado de (van Meer *et al.*, 2008).

Na fase gel, os fosfolípidos estão bem empacotados, com as cadeias acilo ordenadas na conformação todas-*trans* e a espessura da bicamada é máxima (de Almeida and Loura, 2004). A ordem de membrana *S* é elevada e a difusão lateral é lenta ($D \approx 10^{-3}\ \mu m^2\ s^{-1}$) (van Meer *et al.*, 2008).

A fase l_o é especial dado que possui uma elevada ordem de membrana característica da fase gel e uma elevada difusão lateral ($D \approx 1\ \mu m^2\ s^{-1}$) característica da fase fluida (van Meer *et al.*, 2008). Estas propriedades são conferidas pela presença de esteróis (numa determinada gama de concentrações) e frequentemente associadas às jangadas lipídicas. Considera-se bastante importante do ponto de vista evolutivo, pois devido às suas características, a fase l_o tem uma permeabilidade passiva reduzida, e simultaneamente uma dinâmica suficientemente rápida para permitir uma maximização dos processos de membrana (Quinn and Wolf, 2009).

As fases fluida e gel não dependem só da sua composição mas também da temperatura a que se encontra a membrana. Conforme a sua composição lipídica, existe uma temperatura, designada temperatura de transição principal T_m, à qual ocorre uma transição de fase termotrópica entre o gel e o fluido. A esta temperatura

ocorre coexistência das duas fases originando defeitos de empacotamento nas fronteiras entre elas. A presença de esterol em elevadas concentrações pode levar à eliminação da transição principal (de Almeida and Loura, 2004). Dada a composição lipídica das biomembranas ser muito variada, têm-se nos últimos anos realizado vários trabalhos em sistemas modelo com composição ternária (Fosfolípido/Esfingolípido/Esterol) de modo a mimetizar da melhor maneira a composição de determinada membrana (de Almeida *et al.*, 2003). A determinação dos limites de coexistência de fases nestes sistemas pode ser complicada (Veatch and Keller, 2005). A importância destes estudos no âmbito das biomembranas reside na compreensão das mudanças de fases numa membrana aquando de alterações da composição lipídica nas células. As variações locais de composição, de assimetria lipídica nos folhetos e de espessura da bicamada assumem, também, um papel importante na formação dos domínios (Marguet *et al.*, 2006).

A definição de jangadas lipídicas tem sido, ao longo dos anos, complicada devido ao pequeno tamanho das mesmas e às dificuldades para visualizá-las *in vivo* (Alvarez *et al.*, 2007). Contudo, têm sido aplicadas recentemente novas abordagens ao seu estudo, como é o caso da microscopia de força atómica (Connell and Smith, 2006), espectrometria de massa (Kraft *et al.*, 2006) e a detecção de partícula única (SPT – *Single Particle Tracking* (Kusumi *et al.*, 1993)). Esta técnica mapeia a mobilidade lateral de proteínas e lípidos isoladamente na membrana plasmática, tendo-se observado que moléculas usadas como marcadores de jangadas lipídicas se localizam, de facto, em zonas transientes com propriedades tipicamente associadas às jangadas (Alvarez *et al.*, 2007).

4. Espectroscopia de Fluorescência no Estudo de Domínios Lipídicos

A espectroscopia de fluorescência tem sido utilizada, desde há algum tempo, como técnica de estudo de domínios membranares devido à sua sensibilidade intrínseca (sendo uma importante vantagem nos estudos em sistemas biológicos) e à

capacidade de se obter informações sobre a dinâmica das membranas (escala de tempo de emissão de fluorescência em conjunto com a resolução de detecção) (de Almeida *et al.*, 2009). A combinação dos estudos por espectroscopia de fluorescência com estudos de heterogeneidade através de técnicas de imagiologia é uma ferramenta poderosa no estudo de domínios e jangadas lipídicos (de Almeida *et al.*, 2009).

Os fluoróforos utilizados neste tipo de estudos podem ser considerados intrínsecos se existirem naturalmente ou extrínsecos se tiverem de ser adicionados à amostra por esta não possuir as propriedades espectrais desejadas (Lakowicz, 2006). Entre estas últimas encontram-se as sondas de membrana que se incorporam preferencialmente num ambiente lipídico e reportam as propriedades desse ambiente através dos seus parâmetros de fluorescência.

Em espectroscopia de fluorescência em estado transiente, é possível recolher mais informação que em estado estacionário, especialmente relacionada com a dinâmica membranar, o tamanho de domínios e interacções lípido-proteína (de Almeida *et al.*, 2009). Utilizando esta técnica, são realizadas medições de curvas de decaimento de intensidade de fluorescência de um fluoróforo numa amostra. Estes decaimentos seguem, tipicamente, um modelo multi-exponencial (Lakowicz, 2006):

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp\left(-t/\tau_i\right) \qquad \text{Equação 1.1}$$

onde *I* é a intensidade de fluorescência e *i* é o índice de cada componente do decaimento com um tempo de vida τ e uma pré-exponencial associada α. Os tempos de vida que se obtêm após análise de um decaimento de intensidade de fluorescência são importantes para determinar a preferência de um fluoróforo (coeficiente de partição) entre fases lipídicas e também determinar diagramas de fases através da variação dos tempos de vida com a composição (de Almeida *et al.*, 2009).

A polarização de fluorescência é uma ferramenta poderosa no estudo da fluidez de membranas (Valeur, 2001). A extensão da polarização da emissão de uma sonda de

fluorescência é descrita em termos do parâmetro anisotropia de fluorescência em estado estacionário, < *r* > (Equação 1.2) (Lakowicz, 2006).

$$< r >= \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}} \qquad \text{Equação 1.2}$$

onde $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$ são as intensidades de emissão de luz em estado estacionário com polarização paralela e perpendicular em relação à polarização de excitação, respectivamente. A difusão rotacional após absorção altera a direcção do momento de transição de emissão relativamente ao de absorção, podendo-se inferir sobre a deslocação angular do fluoróforo entre a absorção e a emissão dum fotão. A velocidade de difusão rotacional depende da viscosidade do solvente, da temperatura e do tamanho e forma da molécula alvo. Em solventes pouco viscosos, a velocidade de difusão rotacional é tipicamente maior que a velocidade de emissão, pelo que a emissão é despolarizada e o valor de anisotropia é próximo de zero (Lakowicz, 2006). Em membranas, a microviscosidade no interior da bicamada implica que muitas vezes o tempo de difusão rotacional seja de ordem de grandeza do tempo de vida do estado excitado e, portanto, que diferenças nessa microviscosidade afectem o valor de anisotropia.

A anisotropia em estado estacionário provém da integração de um decaimento de anisotropia resolvida no tempo pesado pela intensidade de fluorescência emitida a cada instante. Para moléculas esféricas (que apresentam um decaimento de anisotropia mono-exponencial) e assumindo que não existem outros processos que resultem na perda de anisotropia, esta pode ser dada pela equação de Perrin (Lakowicz, 2006):

$$< r >= \frac{r_0}{(1 + \tau/\theta)} \qquad \text{Equação 1.3}$$

onde r_0 é a anisotropia na ausência de rotação, τ é o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado e θ é o tempo de correlação rotacional. Assume-se que o valor de r_0 é 0,4 para a maior parte dos fluoróforos (Lakowicz, 2006). Este modelo assume também que a rotação é livre. Em membranas, é muito comum encontrar rotação restringida,

em que a anisotropia não decai para zero, mas sim para um valor que depende do semi-ângulo de abertura máxima do cone desenhado pelo movimento de rotação do fluoróforo não esférico (Lakowicz, 2006). Esse valor pode influenciar largamente o valor de anisotropia em estado estacionário e é muito dependente do grau de empacotamento dos lípidos. Assim, pelos vários factores acima descritos, verifica-se que a anisotropia de fluorescência é sensível à fase lipídica em que o fluoróforo se insere.

Objectivos

A sonda de membrana *t*-PnA é um fluoróforo que tem sido utilizado para estudar domínios ordenados em células de mamífero e em sistemas modelo, nomeadamente lipossomas de constituições lipídicas muito variadas. Contudo, esta sonda nunca foi utilizada para estudar a membrana plasmática da levedura, mesmo considerando-se este organismo como um bom modelo para células eucariotas mais complexas. Assim, o principal objectivo do trabalho foi o de caracterizar a membrana plasmática de *S. cerevisiae* com a sonda fluorescente *t*-PnA através de medidas de fluorescência em estado estacionário e transiente. Uma vez que este fluoróforo se incorpora preferencialmente em domínios de membrana ordenados, pretendeu-se igualmente estudar o tipo de domínios que o *t*-PnA detecta na membrana plasmática de leveduras. Presentemente, todas as evidências parecem apontar para que os domínios ordenados em organismos vivos, frequentemente denominados de jangadas lipídicas, sejam constituídos maioritariamente por esteróis e esfingolípidos. Portanto pretendeu-se, para além de estudar a membrana plasmática da estirpe *wt*, estudar também a membrana plasmática utilizando estirpes mutantes em enzimas da biossíntese do ergosterol (*erg6*Δ) e da biossíntese de esfingolípidos complexos (*scs7*Δ). Pretendeu-se igualmente complementar estes estudos através do uso de lipossomas feitos a partir de lípidos totais de levedura, caracterizando as suas propriedades biofísicas com o intuito de compará-las com as da membrana intacta que contém uma grande fracção mássica de proteínas.

Outro objectivo era caracterizar a membrana plasmática de *S. cerevisiae* com a sonda fluorescente DPH. Esta sonda tem sido utilizada em diversos sistemas modelo e organismos vivos incluindo a levedura para estudar a ordem global de membrana. Contudo, a literatura relativa ao estudo do DPH em levedura não é clara e, por vezes, apresenta resultados contraditórios. Assim, pretendeu-se realizar estudos dos sistemas acima referidos com esta sonda nomeadamente medidas de fluorescência resolvidas no tempo, as quais se encontram escassamente descritas na literatura em detrimento das medidas em estado estacionário.

Por último, pretendeu-se cruzar os dados obtidos com estas duas sondas, tentando descortinar que influências podem ter alterações na constituição de domínios ordenados globalmente na ordem da membrana. Isto é possível, uma vez que a informação que os fluoróforos fornecem sobre os sistemas em estudo é complementar devido às diferentes partições que possuem em membranas.

Materiais e Métodos

Reagentes

A bacto-peptona, a *yeast nitrogen base* (YNB), o bacto agar e o extracto de levedura provieram da Difco (Detroit, MI, EUA). O glucose oxidase (de *Aspergillus niger*, EC 1.1.3.4), o catalase (de fígado de bovino), o fluoreto de fenilmetilsulfanilo (PMSF), os aminoácidos do meio de crescimento, o uracilo, a adenina, as esferas de vidro (425-600 µm) e o ácido 4-(2-hidroxietil]-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES), sílica coloidal LUDOX diluída 50% (m/m) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). O zimoliase (de *Arthrobacter luteus*, EC. 3.2.1.39) foi obtido da ICN Biomedicals (Aurora, OH, EUA). O clorofórmio com grau de pureza 99.8% e o metanol espectroscópico foram adquiridos à Fluka (St Louis, MO, EUA). O ácido 9, 11, 13, 15-todas *trans*-octadecatetraenóico ou ácido *trans*-parinárico (*t*-PnA) e o difenil-hexatrieno (DPH) foram obtidos da Invitrogen (Eugene, OR, EUA) e ambas as sondas foram reservadas em etanol com grau de pureza espectroscópica obtido da Merck (Whitehouse Station, NJ, EUA). A glucose e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) foram, igualmente, obtidos da Merck. Todos os outros reagentes eram pro-análise ou do maior grau de pureza existente no mercado.

As soluções tampão utilizadas no presente trabalho serão designadas por tampão A-D:

Tampão A - $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 100 mM, NaCl 100mM, EDTA 1mM, pH 7.4

Tampão B - Tris-HCl 25 mM, pH 7.5

Tampão C - Imidazolo-HCl 25 mM, pH 7.0

Tampão D – Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4

Os tampões foram preparados com água destilada (tampões A-C) e água bidestilada (tampão D) obtida através dum sistema Gradiente Milli-Q da MILLIPORE.

Material Biológico

Para o trabalho proposto foram usadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* obtidas da EUROSCARF (Frankfurt, Alemanha).

Quadro 3 – Estirpes utilizadas e respectivo genótipo

Estirpe	Número ACC	Genótipo
wild-type (*wt*)	Y00000	BY4741 MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0
*erg6*Δ	Y00568	isogénica à BY4741 com YML008c::kanMX4
*scs7*Δ	Y00858	isogénica à BY4741 com YMR272c::kanMX4

Meios de Cultura

Em todos os estudos realizados, o crescimento de culturas foi realizado em meio líquido SC (*synthetic complete*) cuja composição é: glucose 2% (m/v), YNB 6,85% (m/v), arginina 0,002% (m/v), metionina 0,002% (m/v), tirosina 0,003% (m/v), isoleucina 0,003% (m/v), lisina 0,003% (m/v), fenilalanina 0,005% (m/v), valina 0,015% (m/v), ácido aspártico 0,01% (m/v), ácido glutâmico 0,01% (m/v), triptofano 0,005% (m/v), histidina 0,01% (m/v), leucina 0,01% (m/v), adenina 0,0025% (m/v), uracilo 0,0025% (m/v), treonina 0,02% (m/v) e serina 0,04% (m/v).

As soluções *stock* necessárias para obter este meio, foram autoclavadas a 120°C durante 20 min (YNB e Glucose), ao passo que as soluções de aminoácidos foram autoclavadas a 110°C durante 20 min.

Para determinação da fracção de sobrevivência de sobrevivência (viabilidade celular), utilizou-se o meio sólido rico YPD [extracto de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v) e glucose 2% (m/v) suplementado com agar 2% (m/v)], sendo o agar necessário para a solidificação do meio. Posteriormente quer o meio, quer uma solução de glucose eram autoclavados a 120°C durante 20 min, sendo que a glucose só era adicionada ao meio quando necessário o uso do mesmo.

Culturas e condições de crescimento

A conservação das estirpes foi feita em caixas de Petri com meio YPD sólido, guardadas a uma temperatura de 4°C (2 passagens para meio novo, de 15 em 15 dias), ou em suspensão numa solução de glicerol a 20% (v/v) a -80°C. As pré-culturas consistiam na inoculação da estirpe em meio líquido SC, sendo postas a crescer a 30°C num agitador orbital a uma velocidade de 160 rpm durante a noite. No dia seguinte era lida a densidade óptica da suspensão celular a 600 nm (OD_{600}) no espectrofotómetro Beckham DU-68, inoculando-se posteriormente um determinado volume das células da pré-cultura para novo meio líquido SC, de forma a ter a cultura com o valor de OD_{600} inicial desejado. Os estudos realizados foram todos feitos utilizando células em fase exponencial de crescimento, tendo ocorrido no mínimo 2 ciclos de duplicação (o tempo de crescimento variou conforme a estirpe em estudo: 4.5-5 horas para *wt*, 6-6.5 horas para *scs7*Δ (Fernandes, A., comunicação pessoal) e 5-5.5 horas para *erg6*Δ (Pedroso, N., comunicação pessoal)).

Após 15 dias faziam-se novos riscados em placas de meio sólido YPD, partindo da placa inicial (glicerol) ou do riscado anterior. Após 3 passagens, os novos riscados eram feitos a partir das células armazenadas na solução de glicerol a 20% (v/v) a -80°C.

Determinou-se que 1 OD_{600} = ~$6x10^7$ células/ml através da contagem de células duma alíquota de 3 culturas diferentes num hemacitómetro. A viabilidade das células foi confirmada com a adição de azul de tripano, sendo que apenas as células com membranas permeabilizadas (inviáveis) se apresentavam coloridas com o azul de tripano.

Preparação de células intactas em fase exponencial

As culturas com uma concentração celular inicial de 0.15 OD_{600} foram incubadas a 30°C a 160 rpm. Após dois ciclos de replicação, 10 ml da cultura foram recolhidos a uma concentração aproximada de 0,6 OD_{600}/mL, sendo esta concentração

confirmada no espectrofotómetro. Seguidamente, as células foram sujeitas a uma centrifugação durante 2 min a 3500 rpm numa centrífuga Hettich Rotofix32, lavadas com água destilada e novamente centrifugadas durante 2 min a 3500 rpm. Após esta centrifugação, as células foram ressuspendidas em tampão A no volume adequado para obter as células a uma concentração de 0,6 OD_{600}/mL.

Deste volume final, 5 ml foram utilizados para serem sujeitos à adição de sonda fluorescente e outros 5 ml foram utilizados para serem o branco da experiência.

Preparação de esferoblastos em fase exponencial

Para obter os esferoblastos seguiu-se o procedimento conforme descrito previamente (Vilella *et al.*, 2005). As culturas foram colocadas a crescer tal como na preparação de células em fase exponencial até à segunda centrifugação. Após esta centrifugação, as células foram lavadas com 10 ml de tampão B, sujeitas a uma nova centrifugação nas mesmas condições e o precipitado foi ressuspendido em tampão B num volume de forma a obter as células numa concentração de 0,5 OD_{600}/mL.

Após este tratamento, foi preparada uma solução de zimoliase dissolvendo o enzima em tampão B de modo a ter concentração 1,25 mg/ml. Adicionou-se à cultura 250 µl de enzima por cada 10 ml de células ressuspendidas em tampão B e seguidamente incubou-se durante 90 min a 35°C. De modo a confirmar que o processo de hidrólise da parede celular se encontrava concluído, observou-se a perda de turbidez da cultura e procedeu-se a uma centrifugação durante 5 min a 1000 rpm. O sobrenadante era removido cuidadosamente, dado não se observar o precipitado e para não lisar as células, até restar sensivelmente 1 ml de cultura, sendo adicionados em seguida cuidadosamente 4 ml de tampão A.

Deste volume final, 2,5 ml foram utilizados para serem sujeitos à adição de sonda fluorescente e outros 2,5 ml foram utilizados como o respectivo branco.

Extracção de lípidos totais de células *wt* de *S. cerevisiae*

As culturas foram colocadas a crescer com uma concentração celular inicial de 0.075 OD_{600}. Após a incubação das células a 30°C a 160 rpm durante dois ciclos de replicação, 600 ml de cultura foram recolhidos a uma concentração aproximada de 0,3 OD_{600}/mL, sendo esta concentração confirmada no espectrofotómetro. De seguida, as células foram sujeitas a uma centrifugação durante 5 min a 7200 rpm na centrífuga Beckman J2-21M/E, utilizando um rotor JA-14. O sedimento foi ressuspendido em 45 ml de solução de sacarose 0,4 M em tampão C e procedeu-se a nova centrifugação durante 10 min a 8000 rpm na centrífuga Sigma 4K10, utilizando um rotor JA-20. Posteriormente adicionou-se 2,4 ml de esferas de vidro ao precipitado, 2,25 ml de solução de sacarose em tampão C e 22,5 µl de inibidor de proteases PMSF. As células foram lisadas através do uso de *vortex* durante 2 min alternando com colocação em gelo igualmente durante 2 min, repetindo 3 vezes esta sequência. Adicionou-se 7,75 ml de solução de sacarose em tampão C e fez-se uma centrifugação durante 20 min a 2500 rpm na centrífuga Sigma 4K10, utilizando um rotor JA-20.

Após este procedimento, recolheu-se o sobrenadante cuidadosamente para uma proveta esmerilada medindo o seu volume, de modo a proceder-se à extracção dos lípidos através do método de Folch (Folch *et al.*, 1957). Resumidamente, adicionou-se uma mistura clorofórmio/metanol (2:1, v/v) numa proporção de 1:20 relativamente ao volume de extracto, procedia-se a uma filtração utilizando um filtro de separação de fases Whatman e no fim adicionava-se KCl 0,88 % (v/v) num volume correspondente a 20 % do volume total. Após separação das fases durante a noite a -20°C sob atmosfera de azoto, removia-se no dia seguinte a fase aquosa e a fase orgânica era evaporada sob fluxo suave de azoto.

Preparação de vesículas multilamelares (MLV's) a partir de extracto de lípidos totais

Após a evaporação da fase orgânica, os extractos lipídicos foram colocados em alto vácuo durante 4 h (Bomba de vácuo NALGENE™ desiccator) para remover totalmente o solvente orgânico. Seguidamente, foram adicionados 2 ml de tampão D para hidratar os lípidos sujeitando-os seguidamente a um vortéx progressivo. Procedeu-se a um conjunto de 5 ciclos de congelação usando azoto líquido / descongelação (T=75°C), seguido da adição de sonda correspondente e incubação durante 1 h a T=75°C. Após arrefecimento à temperatura ambiente, as amostras foram equilibradas a 4°C durante a noite procedendo-se no dia seguinte às medições de fluorescência.

Espectroscopia de fluorescência em estado estacionário

As medidas de fluorescência em estado estacionário foram realizadas num espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon FL3-22 com monocromadores duplos na excitação e na emissão em geometria de ângulo recto, polarizadores Glan-Thompson, sendo a fonte de radiação uma lâmpada de arco Xe de 450W e a referência um fotodíodo. O espectrofluorímetro vem equipado com sistema de agitação magnético e a temperatura do porta-células foi mantida com um banho de circulação de água Lauda-RM6.

Os espectros de excitação e emissão foram obtidos utilizando fendas de excitação e de emissão de 2 nm sem a presença de polarizadores. Os mesmos foram corrigidos usando os ficheiros de correcção fornecidos pelo fabricante.

A anisotropia em estado estacionário $\langle r \rangle$, foi determinada de acordo com a seguinte equação (Lakowicz, 2006):

$$< r >= \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}}$$ Equação 1.4

em que *G* é o factor de correcção instrumental do polarizador de emissão e é dado pela razão I_{HV}/I_{HH} (Lakowicz, 2006). "V" e "H" representam as orientações vertical e horizontal dos polarizadores e a ordem dos subscriptos corresponde aos polarizadores de excitação e de emissão respectivamente. Os valores de intensidade dos brancos relativos a cada amostra foram subtraídos componente a componente. Todas as medidas em estado estacionário foram efectuadas com agitação.

As amostras que continham a sonda DPH (Figura 7A) foram excitadas a 358 nm com emissão medida a 430 nm. As condições experimentais foram previamente determinadas (Folmer *et al.*, 2008): célula de quartzo de dimensões 1 cm × 1 cm (as dimensões das células de quartzo serão referenciadas em termos de percurso óptico na excitação × percurso óptico na emissão), fendas de excitação e emissão de 4 nm, [DPH] = 2 μM e tempo de incorporação da sonda de 20 min.

No caso do *t*-PnA (Figura 7B), as amostras foram excitadas a 320 nm de forma a evitar a excitação de proteínas no máximo de excitação desta sonda (303 nm) e a emissão foi medida a 404 nm. A determinação da melhor célula e das fendas de excitação e de emissão a usar nos estudos foi feita utilizando como critério a % de branco das intensidades de cada componente da membrana plasmática de *S. cerevisiae* obtida em várias combinações de células e fendas. Para essa optimização utilizou-se [*t*-PnA] = 2 μM e a sonda foi incubada durante 20 min à temperatura ambiente.

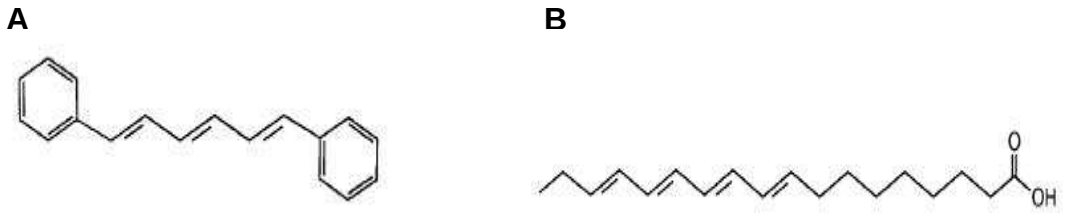

Figura 7 – Estrutura dos fluoróforos DPH (A) e *t*-PnA (B). (Adaptado de (Valeur, 2001))

Salvo referência contrária, as medidas em estado estacionário foram realizadas nas condições optimizadas sendo que a célula de quartzo possuía dimensões 1 cm × 0,4 cm, as fendas de excitação e emissão eram 4 nm, a [*t*-PnA] = 2 μM e o tempo de incorporação da sonda era 5 min.

Espectroscopia de fluorescência em estado transiente

As medidas de fluorescência em estado transiente foram realizadas no espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon FL3-22 utilizando a técnica de cronometragem de fotão único, SPT (*Single Photon Timing*) ou TCSPC (*Time-Correlated Single-Photon Counting*) tal como descrito na literatura (Lakowicz, 2006).

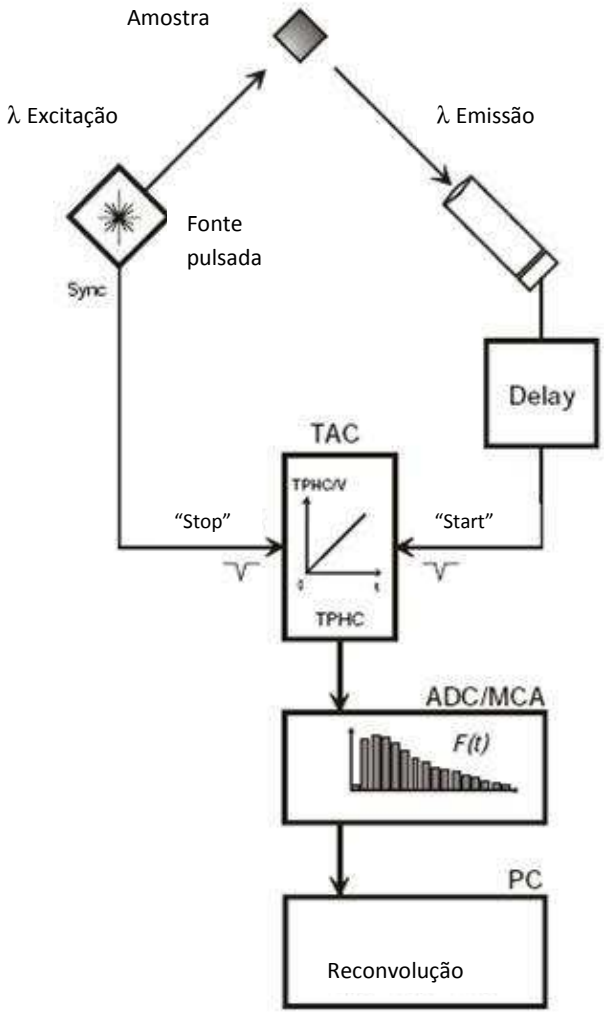

Figura 8 - Esquema representativo da técnica TCSPC adaptado de (The Jobin Yvon IBH DataStation Hub User Guide)

Resumidamente, o princípio desta técnica reside no pressuposto de que a distribuição da probabilidade da emissão dum fotão a um tempo t é dada pela distribuição temporal, na forma dum histograma, de todos os fotões emitidos pela amostra em regime de fotão único. A Figura 8 sumariza o processo: a chegada do primeiro fotão proveniente da amostra inicia a rampa de voltagem (sinal "Start"). Um pulso de excitação incide na amostra e envia um sinal ao conversor de tempo em amplitude (TAC) que pára a rampa de voltagem (sinal "Stop"). Um conversor analógico-digital (ADC) converte a voltagem obtida num valor numérico. O analisador multicanais (MCA) grava esse valor e constrói um histograma de contagens de fotões em função do tempo com base na soma de vários pulsos.

Um decaimento de fluorescência complexo é descrito por uma soma de exponenciais (Lakowicz, 2006), como referido na Equação 1.1, sendo o tempo de vida médio $<\tau>$ dum fluoróforo dado por (Lakowicz, 2006):

$$<\tau> = \frac{\sum_i a_i \tau_i^2}{\sum_i a_i \tau_i} \qquad \text{Equação 1.5}$$

onde I é a intensidade de fluorescência, a_i é a pré-exponencial (amplitude) normalizada à unidade e τ_i o tempo de vida da componente i.

As amostras sujeitas a estudo com o DPH foram excitadas a 370 nm com um nanoLED-370 (*Light Emitting Diode*) da Horiba Jobin Yvon utilizando um filtro UGI passa-baixo 370 nm fornecido pela Jobin Yvon, sendo a emissão recolhida a 450 nm, de modo a evitar a dispersão de Raman do solvente. Foram utilizadas células de quartzo de 1 cm por 1 cm e a fenda de emissão de 5 nm. A escala de tempo utilizada foi 55.5 ps/ canal.

As amostras sujeitas a estudo com o *t*-PnA foram excitadas a 315 nm com um nanoLED-320 da Horiba Jobin Yvon com emissão recolhida a 404 nm. A escala de tempo utilizada foi de 111.0 ps/ canal. Foi também realizada uma optimização das condições experimentais relativas à célula de quartzo a ser utilizada e à fenda de

emissão, utilizando como critério de optimização a % do número de contagens do branco no canal de contagens máximas (CCM).

Para ambas as sondas o valor de contagens no canal de contagens máximas situou-se nas 20000. O número de canais por curva de decaimento usado para análise foi aproximadamente 970 e 1005 para o DPH e o *t*-PnA, respectivamente. Para descrever os decaimentos de fluorescência foram necessárias duas exponenciais para o DPH e quatro exponenciais para o *t*-PnA.

Para obter o perfil do pulso de excitação foi utilizada uma suspensão aquosa de sílica coloidal com um valor de contagens no CCM de 50000.

Para se obter os parâmetros de ajuste aos decaimentos experimentais, foi usado um método de reconvolução iterativo de mínimos quadrados não linear baseado no algoritmo de Marquardt (Marquardt, 1963) através do programa TRFA (*Time-Resolved Fluorescence Analysis*) versão 1.4. A qualidade de ajuste foi avaliada através do valor de χ^2 reduzido e dos gráficos de resíduos relativos e de auto-correlação dos resíduos. Em todas as análises apresentadas os valores de χ^2 foram <1.3 e a distribuição dos resíduos e auto-correlação foi aleatória em torno de 0. As amostras com *t*-PnA foram sujeitas a ajuste por análise global.

Análise estatística

Os dados são expressos como a média do grupo ± SD (standard deviation). A análise estatística para diferenças significativas entre dois grupos foi conseguida com o teste t de *Student* com duas caudas. Um valor p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Ambos os tratamentos foram realizados com o programa SigmaStat versão 3.5.

Resultados

Neste trabalho pretendeu-se descrever os princípios biofísicos subjacentes à formação e à função de compartimentos membranares da membrana plasmática de *S. cerevisiae*. Foram aplicadas técnicas de fluorescência devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, utilizando o *t*-PnA e DPH como sondas fluorescentes capazes de reportar o ambiente membranar. A preferência do *t*-PnA por domínios ordenados e com um tempo de vida muito sensível à presença de domínios gel, em conjunto com a elevada sensibilidade do DPH para as propriedades globais da membrana reforçam a importância da combinação destes dois fluoróforos para a concretização dos objectivos propostos (Lentz, 1988;de Almeida *et al.*, 2002).

1. Optimização de condições experimentais com a sonda *t*-PnA em *S. cerevisiae*

Dada a inexistência de estudos de fluorescência com *t*-PnA em *S.cerevisiae*, foi necessário proceder à determinação das condições experimentais óptimas para o uso desta sonda no referido sistema. Com esse objectivo, determinaram-se as percentagens de sinal do branco relativamente a uma amostra (suspensão de células *wt*), quer usando células de quartzo com diversos percursos ópticos (Quadro 4), quer variando a largura das fendas de excitação e de emissão utilizadas nas medidas em estado estacionário e estado transiente (Quadro 5). Todas as medições neste organismo foram realizadas a uma concentração celular de 0,6 OD_{600}/ml correspondentes a dois ciclos de replicação, estando as células na fase exponencial de crescimento. Em estado estacionário, a célula de dimensões 1 cm × 1 cm apresentou menores valores de sinal do branco sugerindo ser a melhor célula para a realização daquele tipo de medidas de fluorescência (Quadro 4).

Quadro 4 – Percentagens de sinal do branco relativamente a uma amostra de células *wt* em suspensão nas diversas componentes de polarização da intensidade de fluorescência em estado estacionário, para diferentes combinações de percurso óptico de células de quartzo e de fendas de excitação e emissão. A concentração celular de *S. cerevisiae* foi de 0,6 OD_{600}/ml. As amostras foram excitadas a 320 nm e a emissão foi medida a 404 nm. b=branco

Célula	Fenda excitação (nm)	Fenda emissão (nm)	%b I_{VV}	%b I_{VH}	%b I_{HH}	%b I_{HV}
1 cm × 0,4 cm	4	4	12,8	18,0	17,9	18,7
	2	4	49,7	62,4	62,2	63,1
	2	8	51,9	63,6	62,7	65,4
	4	2	57,6	68,8	68,6	70,1
	8	2	69,9	81,0	81,1	83,7
	8	4	83,8	93,3	93,2	95,0
	4	8	92,6	102,9	103,0	102,9
1 cm × 1 cm	4	4	13,5	16,9	16,6	17,0
	2	4	10,4	13,3	12,8	13,4
	2	8	11,4	14,4	14,0	14,7
	4	2	15,3	19,2	18,7	19,5
	8	2	25,4	30,6	30,6	32,4
	8	4	38,6	44,2	44,3	45,7
	4	8	44,7	51,6	50,8	51,6

O sinal do branco provém da dispersão de luz (turbidez da suspensão de células) e da auto-fluorescência apresentada pelas células de *S. cerevisiae*, devido à presença de proteínas (Lakowicz, 2006) e esteróis (Mukhopadhyay *et al.*, 2002) que são excitados ao comprimento de onda de excitação utilizado nesta experiência. Contudo, os valores de anisotropia de fluorescência do *t*-PnA na membrana da levedura obtidos com a célula de 1 cm × 1 cm surgiram bastante diminuídos relativamente aos obtidos com a célula de dimensões 1 cm × 0,4 cm (resultados não apresentados). Estas diferenças nos valores de anisotropia podem ser explicadas com base na dispersão de luz por parte das células. A ocorrência de dispersão de luz que dá origem à turbidez das suspensões de células de *S. cerevisiae* pode resultar numa

menor anisotropia de fluorescência devido à dispersão tanto da luz incidente como de fotões emitidos. Eventos de dispersão podem diminuir valores de anisotropia para 0,85 a 0,7 vezes o valor na ausência de dispersante (Lakowicz, 2006). A magnitude deste efeito depende da dimensão e do número de moléculas do dispersante. Uma vez que a amostra é idêntica nos dois casos, a explicação para os diferentes valores de anisotropia obtidos prende-se com o maior número de células no percurso óptico do feixe emitido na célula de 1 cm × 1 cm, que causa um maior número de eventos de dispersão. Desta forma, a célula de dimensões 1 cm × 0,4 cm torna-se mais adequada para medições em estado estacionário, tendo ainda a vantagem de requerer um menor volume de amostra. Relativamente à largura das fendas de excitação e de emissão, que alteram a gama de comprimentos de onda que passam pelas fendas, controlando a intensidade de luz recebida pela amostra e a intensidade de fluorescência recebida pelo detector, respectivamente, observa-se no Quadro 4 que o melhor conjunto de fendas a utilizar tem uma largura de 4 nm tanto na excitação como na emissão.

Quadro 5 – Percentagem do número de contagens no canal de contagens máximas do branco em relação à amostra em estado transiente, quando se utilizam diferentes combinações de células de quartzo e fendas de emissão. A concentração celular de *S. cerevisiae* foi de 0,6 OD_{600}/ml. As amostras foram excitadas a 320 nm e a emissão foi medida a 404 nm. b = branco

Célula	Fenda emissão (nm)	% b (número de contagens)
1 cm × 0,4 cm	13	43,0
	10	40,7
	8	38,6
	6	40,8
1 cm × 0,2 cm	8	28,5

Em estado transiente, foram testadas diversas larguras de fenda de emissão utilizando a célula de quartzo seleccionada com base nos testes efectuados em estado estacionário. Observou-se que a utilização de uma largura de fenda de emissão de 8 nm permitia reduzir ao mínimo o valor do número de contagens do branco no CCM.

Por razões descritas no parágrafo anterior, foi igualmente testada uma célula de quartzo de menores dimensões (1 cm × 0,2 cm) com a fenda de emissão referida, que se revelou ser mais adequada para estas medidas.

Para a determinação da concentração óptima de *t*-PnA foi medida a intensidade de fluorescência em amostras com concentrações crescentes desta sonda (0-4 µM) e uma concentração constante de células (Figura 9A).

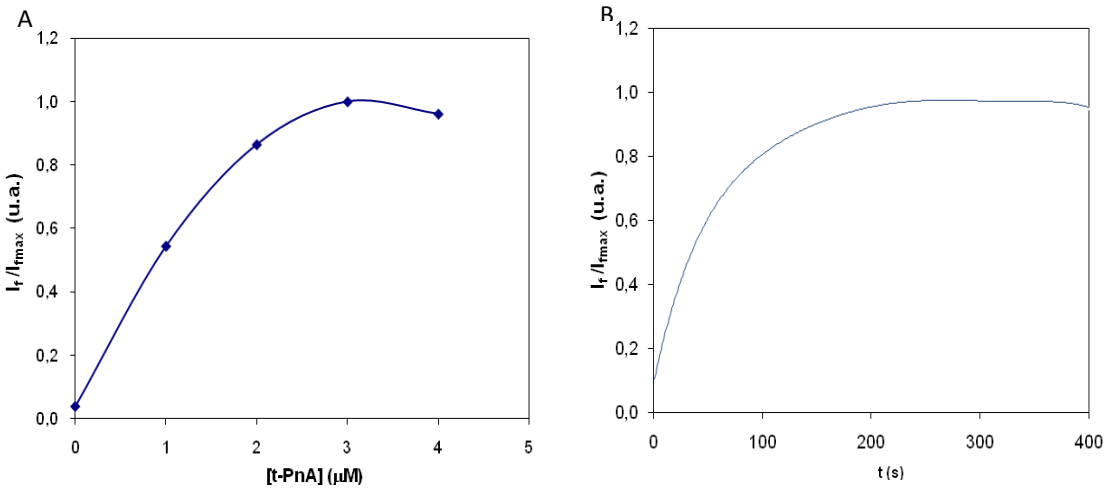

Figura 9 – Estudo de concentração de *t*-PnA (A) e da sua cinética de incorporação (B) na membrana plasmática de *S. cerevisiae*. As medidas em ambos os ensaios foram realizadas à temperatura ambiente para uma concentração celular de 0,6 OD_{600}/ml. As amostras foram excitadas a 320 nm, sendo a emissão de fluorescência detectada a 404 nm. u.a., unidades arbitrárias. A linha no painel A serve apenas para facilitar a leitura do gráfico, não resultando do ajuste duma equação aos dados.

Observou-se um claro aumento na intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de *t*-PnA até 3 µM mostrando não ocorrer saturação da membrana das células com a sonda (Figura 9A). Entre as concentrações de 2 µM e 3 µM já não existe linearidade entre a intensidade de fluorescência e a concentração de fluoróforo. Uma vez que uma maior concentração de sonda implica (i) um aumento do volume de etanol (solvente da sonda) adicionado às amostras, que se sabe provocar desordem e interdigitação em biomembranas (Simon and Mcintosh, 1984;Vierl *et al.*, 1994); (ii) uma maior perturbação da membrana plasmática pela sonda (Veatch and Keller, 2005); (iii) a possibilidade de ocorrência de agregação da sonda ou outro fenómeno

responsável pela não linearidade que torna a interpretação dos resultados menos óbvia (Valeur, 2001), optou-se por utilizar nos estudos subsequentes uma concentração de *t*-PnA igual a 2 μM. Aumentando a concentração de *t*-PnA para 4 μM foi observado um decréscimo na intensidade de fluorescência, possivelmente devido a efeitos de filtro interno. As medidas de intensidade de fluorescência só são proporcionais à concentração dum determinado fluoróforo da amostra quando a absorvência da amostra é baixa, não existe um composto interferente que absorva ao comprimento de onda de excitação e não ocorre reabsorção da luz emitida no ponto da célula onde a emissão é detectada. Estes fenómenos são conhecidos no seu conjunto como efeito de filtro interno. Para corrigir os valores da intensidade de fluorescência para a elevada absorvência das amostras foi aplicada a Equação 1.6 (Kubista *et al.*, 1994):

$$I_c = I \times 10^{0,5A} \qquad \text{Equação 1.6}$$

onde I_c é o valor da intensidade corrigida, I é o valor da intensidade obtido experimentalmente e A é a absorvência do fluoróforo ao comprimento de onda de excitação.

Pode-se observar no gráfico da Figura 10 que o desvio negativo à linearidade dos valores de intensidade de fluorescência em função da concentração de sonda é parcialmente devido ao efeito de filtro interno, uma vez que se obtém, após a correcção, linearidade até 3 μM. A 4 μM é observado um decréscimo de fluorescência, possivelmente, originado pela agregação de sonda. Esta agregação pode levar a uma extinção de fluorescência ao comprimento de onda em estudo por várias razões, nomeadamente, por deslocalização das orbitais moleculares pelo agregado, que terá diferentes propriedades de absorção e fluorescência, ou pela formação de excímeros, ou seja, formação de um complexo no estado excitado que emite fluorescência a comprimentos de onda mais elevados (Lakowicz, 2006).

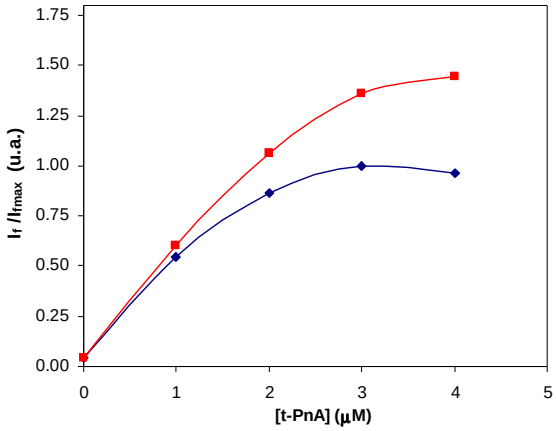

Figura 10 – Correcção das intensidades de fluorescência devido ao efeito de filtro interno no estudo de concentração de *t*-PnA óptima. A azul encontram-se os valores experimentais da intensidade de fluorescência (idêntico à Figura 9A) e a vermelho encontram-se os valores corrigidos aplicando a equação 1.6. As linhas servem apenas para facilitar a leitura do gráfico, não resultando do ajuste duma equação aos dados.

Para o estudo de tempo óptimo de incorporação do *t*-Pna foi realizado um ensaio cinético em que se mediu a intensidade de fluorescência em estado estacionário ao longo do tempo logo após a adição de *t*-PnA 2 µM. Na cinética de incorporação (Figura 9B), observa-se um aumento da intensidade de fluorescência do fluoróforo nas células de *S. cerevisiae* ao longo dos primeiros 5 min, seguida de uma estabilização. Noutros sistemas biológicos vivos, como em hepatócitos de rato (Schroeder, 1983) e plaquetas humanas (Mateo *et al.*, 1991), a incorporação desta sonda demora entre 1-5 min. O valor obtido encontra-se no limite superior deste intervalo de tempo, possivelmente devido à presença da parede celular a qual poderá actuar como um obstáculo cinético, impedindo a incorporação rápida da sonda no ambiente lipídico da membrana.

O Quadro 6 resume as principais conclusões do processo de optimização, indicando as condições experimentais para todas as medidas de fluorescência com a sonda *t*-PnA efectuadas posteriormente em *S. cerevisiae*, salvo indicação contrária.

Quadro 6 – Condições experimentais optimizadas para as medidas de fluorescência realizadas em *S. cerevisiae* com a sonda *t*-PnA.

Tipo de medidas	Condições experimentais optimizadas
Estado Estacionário e Transiente	[*t*-PnA] na suspensão = 2 μM
Estado Estacionário	Tempo de incorporação da sonda = 5 min Dimensão da célula = 1 cm × 0,4 cm Largura de fendas na excitação = 4 nm Largura de fendas na emissão = 4 nm
Estado Transiente	Dimensão da célula = 1 cm × 0,2 cm Largura de fendas na emissão = 8 nm

2. Caracterização fotofísica da sonda *t*-PnA na membrana plasmática de *S. cerevisiae*

2.1 Espectros de absorção, excitação e emissão do *t*-PnA

Na Figura 11 estão representados o espectro de absorção no UV-Vis do *t*-PnA em etanol e os espectros corrigidos de excitação e emissão de fluorescência do *t*-PnA na membrana plasmática de células *wt* de *S. cerevisiae*. O espectro de absorção do *t*-PnA apresentou uma banda de absorção intensa na gama dos 250 a 340 nm característica dos tetraenos (Hudson and Cavalier, 1988), que resulta duma transição electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ (Zsila and Bikadi, 2005). O *t*-PnA apresentou 3 picos de absorção a 287, 300 e 314 nm (com um máximo a 300 nm) que resultam da progressão vibracional do oscilador correspondente às ligações duplas do *t*-PnA. O espectro de absorção está de acordo com o descrito em solventes orgânicos (Sklar *et al.*, 1977;Zsila and Bikadi, 2005).

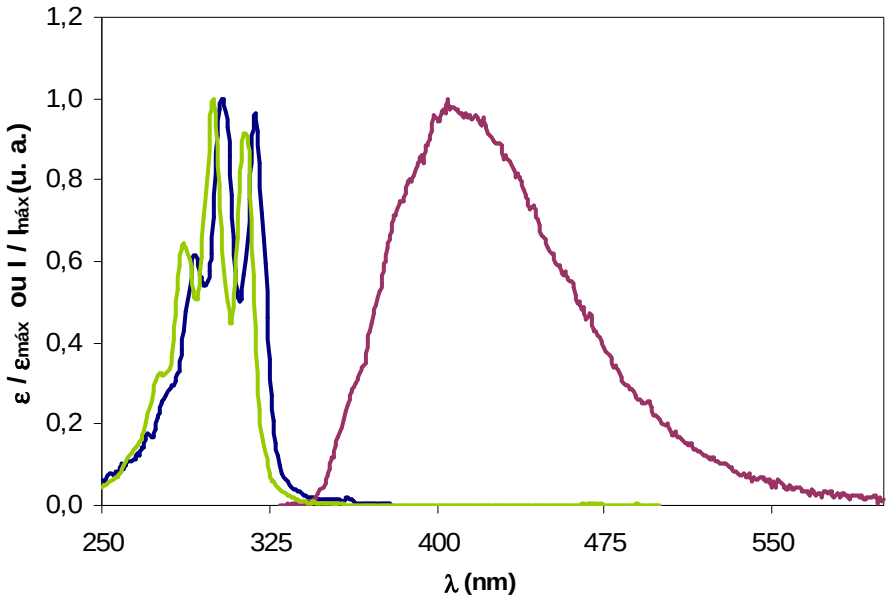

Figura 11 – Espectros normalizados de absorção, excitação e emissão do *t*-PnA. Espectro de absorção (verde) em etanol e espectros de excitação (azul) e emissão (vermelho) de fluorescência na membrana plasmática de *S. cerevisiae* a uma concentração celular de 0,6 OD/ml. Para o espectro de excitação, a emissão foi detectada a 404 nm e no espectro de emissão, a excitação foi realizada a 320 nm. u.a., unidades arbitrárias.

O espectro de excitação da sonda na membrana plasmática de células *wt* de *S. cerevisiae* apresentou a mesma forma e intensidade relativa de picos em relação ao espectro de absorção em etanol mas com um desvio para o vermelho de 6 nm (pico a 320 nm correspondente à transição vibrónica 0 ← 0). Este desvio, denominado efeito batocrómico, é devido essencialmente às diferenças de polarizabilidade do ambiente que rodeia a sonda, uma vez que o cromóforo é apolar (Suppan and Ghoneim, 1997). A maior polarizabilidade do ambiente membranar provoca uma maior estabilização do estado excitado (uma vez que este também é mais polarizável que o estado fundamental) e logo uma diminuição na diferença energética entre os níveis π e π^*. O espectro de excitação do *t*-PnA em vesículas lipídicas que mimetizam a membrana plasmática de *S. cerevisiae* está de acordo com o descrito (Cordeiro, 2009). O *t*-PnA é um fluoróforo cujo comprimento de onda de absorção, contrariamente ao de emissão, é sensível ao solvente (Petersen, 1985). O espectro de emissão de fluorescência do *t*-PnA apresentou uma banda larga entre os 340 nm e os 560 nm sem estrutura

vibracional e com um máximo de emissão a 404 nm. Não existe simetria entre os espectros de absorção e de emissão de fluorescência devido à estrutura do fluoróforo. O *t*-PnA é um polieno linear com 4 ligações duplas conjugadas que apresenta um estado fundamental simétrico (*g*), um estado excitado singuleto simétrico (*g*) e um estado excitado singuleto anti-simétrico (*u*) com energia ligeiramente superior. A absorção é devida a uma transição, permitida por simetria, para o estado excitado S_2 ($u \leftarrow g$) seguida duma rápida conversão interna que provoca a relaxação para o estado excitado S_1 (*g*) (Petersen, 1985). Este estado excitado possui um tempo de vida elevado, pois a transição $g \leftarrow g$ correspondente à emissão é proibida por simetria.

O perfil espectral das restantes populações estudadas não apresenta desvios espectrais em relação às células *wt* (resultados não apresentados).

2.2 Estudos de Fluorescência em Estado Transiente

Os decaimentos de intensidade de fluorescência do *t*-PnA foram também realizados nos sistemas em estudo devido à elevada sensibilidade dos tempos de vida do *t*-PnA à presença de diferentes tipos de domínios lipídicos. São várias as razões que imprimem uma grande importância a este tipo de estudos: (i) segundo a equação de Perrin, um aumento no valor da anisotropia de fluorescência (geralmente associado a uma diminuição da dinâmica rotacional) poderá ser devido a uma diminuição no tempo de vida médio de fluorescência da sonda (Lakowicz, 2006); (ii) a anisotropia em estado estacionário representa uma média de valores de intensidade de todos os fluoróforos, pelo que a presença de várias conformações da sonda apenas é detectada pelas várias componentes no decaimento de intensidade de fluorescência (Lakowicz, 2006); (iii) medidas em estado transiente não são afectadas por artefactos devido ao efeito filtro interno, ao contrário das medidas em estado estacionário (Coutinho and Prieto, 1993).

Na Figura 12 está representado um decaimento de intensidade de fluorescência do *t*-PnA em *S. cerevisiae* e a curva resultante do ajuste de uma soma de exponenciais efectuado por um método de análise global.

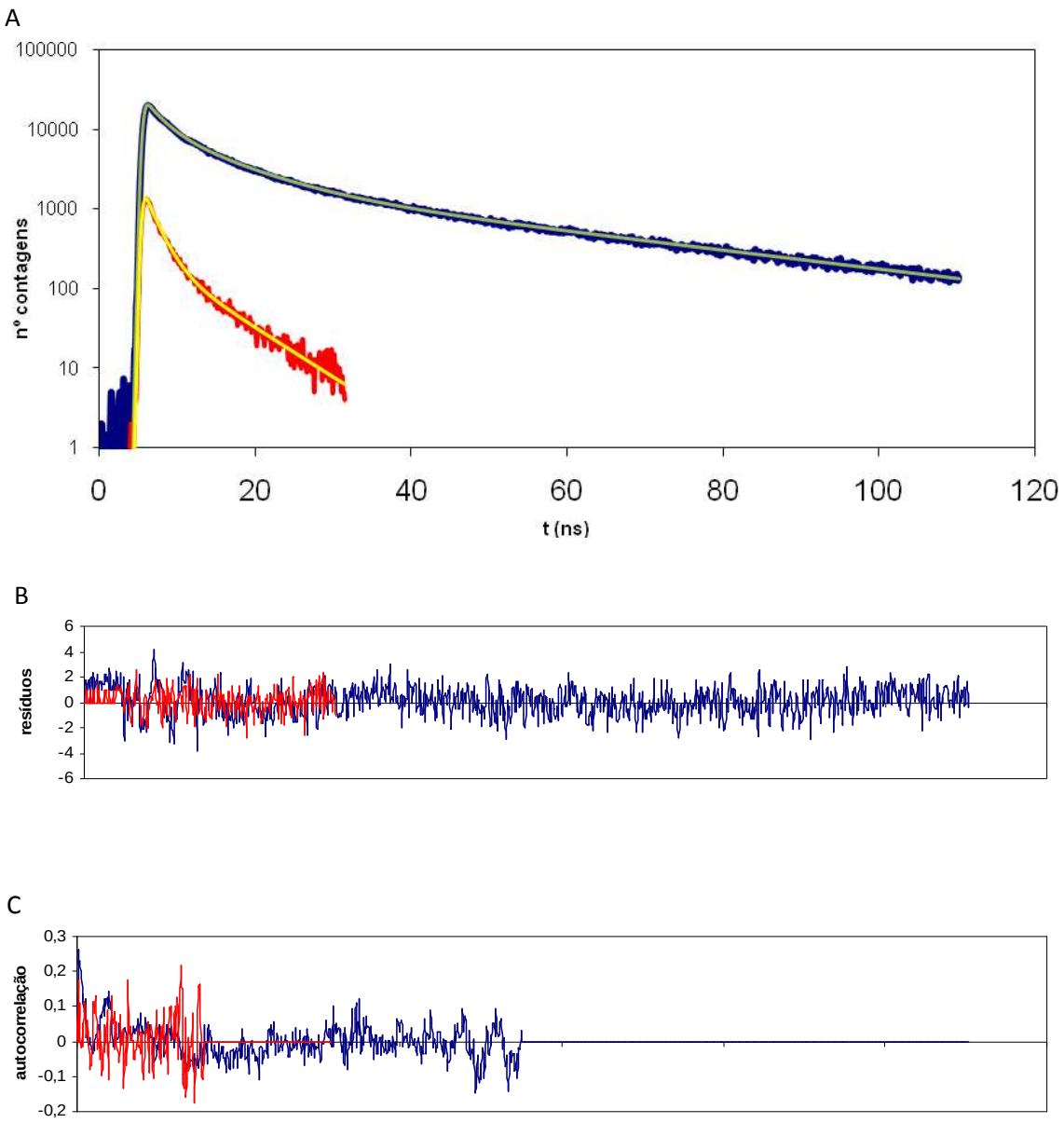

Figura 12 – Análise global de um decaimento de intensidade de fluorescência do *t*-PnA na membrana plasmática de células *wt* de *S. cerevisiae*. As determinações dos decaimentos da amostra (azul) e do branco (vermelho) foram realizadas à temperatura ambiente e a uma concentração celular de 0,6 OD_{600}/ml (A). As amostras foram excitadas a 315 nm, sendo a fluorescência detectada a 404 nm. As linhas verde e amarela correspondem ao melhor ajuste aos pontos experimentais da amostra e do branco, respectivamente. Também se mostram os resíduos dos ajustes (B) e a auto-correlação dos resíduos (C).

Os decaimentos de intensidade de fluorescência do *t*-PnA em *S. cerevisiae* são descritos pela soma de quatro exponenciais, ao passo que os decaimentos do branco são bi-exponenciais. Assim, tornou-se necessária a aplicação de uma análise global de forma a eliminar a contribuição da emissão de proteínas e esteróis fluorescentes nas

diferentes componentes do decaimento de fluorescência do *t*-PnA (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Este processo é estatisticamente mais robusto do que a análise separada de cada decaimento, dado a análise de dois decaimentos em simultâneo contribuir com um muito maior número de pontos experimentais. Uma vez que se obriga a que os tempos de vida presentes no decaimento do branco também façam parte do decaimento da amostra, para um aumento de centenas de pontos experimentais (número de canais de cada decaimento) apenas existem mais dois parâmetros de ajuste (as pré-exponenciais do branco). Observou-se que a componente mais curta do decaimento da sonda estava presente com contribuição idêntica no branco correspondendo apenas a dispersão de luz. Esta componente muito curta foi eliminada.

As duas componentes intermédias são associadas à partição do fluoróforo em regiões menos rígidas na membrana. Estas componentes apresentam tempos de vida na ordem dos ~3 ns e dos ~10 ns (resultados não apresentados). Devido à elevada sensibilidade do *t*-PnA à presença da fase gel e a partição preferencial para regiões rígidas em bicamadas lipídicas (de Almeida *et al.*, 2002), concentra-se o estudo dos decaimentos de intensidade de fluorescência na componente longa dos mesmos, em detrimento das componentes intermédias.

Finalmente, a quarta componente, que também não tem qualquer contribuição do branco sendo por isso devida exclusivamente à sonda incorporada na membrana plasmática de *S. cerevisiae* tem um valor de 37 ns. O aparecimento desta componente longa, com valor superior a 30 ns (Figura 13), traduz a presença de uma fase gel, ou fase sólida ordenada, na membrana plasmática da levedura. Esta componente longa (≥ 30 ns) foi extensamente reportada em sistemas modelo (Mateo *et al.*, 1993;de Almeida *et al.*, 2002) mas esta fase lipídica não terá sido encontrada até hoje em sistemas vivos, especialmente células eucariotas, em condições fisiológicas, havendo apenas a sugestão da sua existência em situações específicas de latência, stress ou patológicas (Welti *et al.*, 1981;Schulthess and Hauser, 1995;Wolf, 1995;Ragoonanan *et al.*, 2008). Mais ainda, tem sido defendido que este tipo de rigidez da membrana é incompatível com a natureza dinâmica duma célula viva em condições fisiológicas (Connell and Smith, 2006).

Uma vez que este resultado mostra que a sonda se encontra num ambiente bastante compacto, considerou-se a possibilidade da sonda poder estar intercalada na parede celular, uma vez que esta estrutura é bastante rígida. Para averiguar se o valor de 37 ns da componente longa seria devido à parede celular, procedeu-se à hidrólise enzimática da parede celular das células *wt* para obter esferoblastos. No entanto, a mesma componente longa obtida em células intactas foi detectada em esferoblastos (Figura 13), confirmando que o *t*-PnA se incorpora e traduz o comportamento da membrana plasmática.

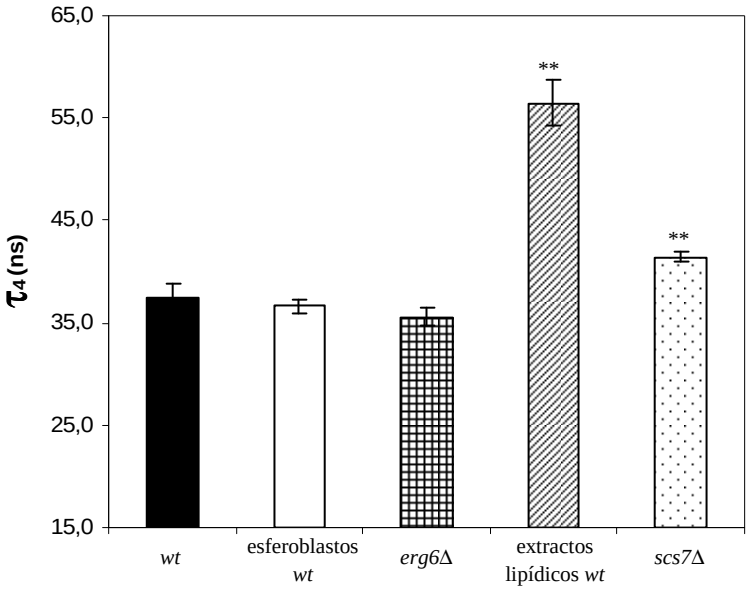

Figura 13 – Tempo de vida da componente longa dos decaimentos de intensidade de fluorescência do *t*-PnA nos vários sistemas estudados. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente. As amostras foram excitadas a 315 nm, sendo a fluorescência medida a 404 nm. **: p<0.001 em relação a *wt*.

Nesta fase, colocou-se a questão de qual o tipo de domínios de membrana que estão a ser detectados pelo *t*-PnA. Uma vez que as jangadas lipídicas em levedura são diferentes das dos mamíferos, pois tanto o principal esterol como os esfingolípidos que as formam são diferentes, estas poderiam ser mais rígidas em leveduras, dando origem a uma componente anormalmente longa no decaimento de intensidade de fluorescência do *t*-PnA. Para testar se o tempo de vida de fluorescência longo seria consequência da partição da sonda para domínios ordenados ricos em ergosterol,

recorreu-se a uma estirpe de levedura com uma mutação num dos enzimas da via de biossíntese do ergosterol e, portanto, incapaz de sintetizar o ergosterol. A estirpe *erg6*Δ possui uma *deleção* no gene *ERG6* que codifica para o enzima δ(24)-esterol C-metiltransferase, o qual catalisa a conversão de zimosterol em fecosterol. Portanto as células *erg6*Δ têm um perfil de esteróis distinto das células *wt* e, consequentemente, devido à ausência de ergosterol, a formação de jangadas lipídicas é alterada (Bagnat *et al.*, 2000). Não obstante, detectou-se a mesma componente longa de ~37 ns na estirpe *erg6*Δ (Figura 13), que já tinha sido detectada em células *wt* intactas e em esferoblastos *wt*, concluindo-se que essa componente não é devida a *t*-PnA incorporado em domínios domínios ricos em ergosterol.

Conclui-se que nestas três populações estudadas estão presentes domínios de gel com composição semelhante. De facto, estudos em sistemas modelo em bicamadas lipídicas mostram que os domínios gel formados com diferentes lípidos possuem sempre tempos de vida da componente longa superiores a 30 ns, mas que o valor particular desse tempo de vida depende da ordem/rigidez da membrana e, portanto, da composição lipídica da fase gel formada (de Almeida *et al.*, 2009).

Outra possível interpretação do resultado obtido seria a da componente longa observada ser devida à ligação do *t*-PnA a proteínas membranares, obrigando a sonda a estar imóvel e, consequentemente, mostrando propriedades de fluorescência típicas duma fase lipídica muito ordenada e compacta. Assim, para testar se os lípidos, por si só, teriam a capacidade de formar domínios suficientemente rígidos para se obter um tempo de vida da componente longa superior a 30 ns, obtiveram-se extractos lipídicos totais de células *wt* de *S. cerevisiae*, reconstituíram-se estes em lipossomas que foram marcados com *t*-PnA. As propriedades fluorescentes foram determinadas e observou-se que não só a componente longa existia, como o tempo de vida era muito superior (~55 ns) ao obtido na membrana plasmática de células intactas. Ou seja, a componente longa está associada a interacções lípido-lípido. Portanto, os lípidos de leveduras possuem a capacidade de formar domínios ainda mais rígidos na ausência de proteínas. Uma vez que foram obtidos extractos lipídicos totais, esta maior rigidez da membrana observada nos extractos lipídicos poderá ser devida a uma reorganização

dos lípidos da membrana plasmática e das membranas intracelulares aquando da formação dos lipossomas.

Em paralelo, foram conduzidos estudos em sistemas modelo contendo misturas lipídicas de fungos com composição bem definida (Cordeiro, 2009). Foi detectado um tempo de vida da componente longa de valor ~41 ns em misturas binárias de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC)/fitoceramida, que são, respectivamente, o fosfolípido mais abundante na membrana plasmática de *S. cerevisiae* e o esqueleto da maioria dos esfingolípidos complexos de leveduras. Tendo em conta estes resultados e os resultados apresentados na Figura 13 começou a tornar-se evidente que os domínios detectados pelo *t*-PnA poderiam ser domínios ricos em esfingolípidos.

Uma forma de averiguar se os esfingolípidos eram os componentes principais dos domínios de gel detectados na membrana plasmática da levedura seria utilizar um tipo celular que tenha uma grande alteração na composição em esfingolípidos relativamente às células *wt*. Esta alteração deveria então reflectir-se numa composição diferente daqueles domínios. Assim, recorreu-se a um mutante, denominado *scs7*Δ, que possui uma *deleção* no gene *SCS7* que codifica para um α-hidroxilase de ácidos gordos de cadeia longa ligados à ceramida. São estas cadeias acilo que compõem maioritariamente os esfingolípidos complexos (da membrana plasmática). Consequentemente as células *scs7*Δ possuem um perfil de esfingolípidos diferente das células *wt* como apresentado na Figura 3. Desta forma, se a componente longa do *t*-PnA fosse devida a domínios ricos em esfingolípidos, alterações na composição de esfingolípidos iriam originar alterações no valor da componente longa do decaimento de fluorescência. De facto, observa-se na Figura 13 que a componente longa do *t*-PnA é significativamente diferente neste mutante em relação às células *wt*, constituindo evidência que os domínios detectados pelo *t*-PnA são ricos em esfingolípidos. Na Figura 14 estão representadas as amplitudes normalizadas correspondentes ao tempo de vida da componente longa do *t*-PnA já apresentadas na Figura 13.

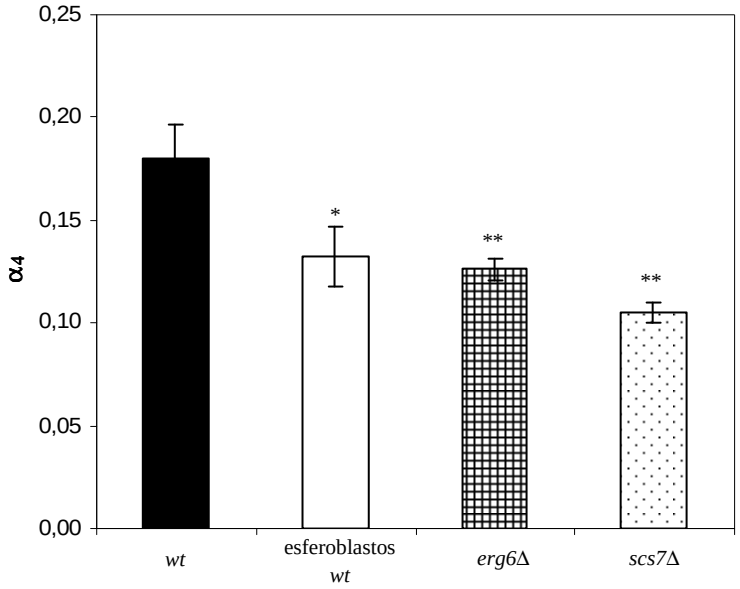

Figura 14 – Pré-exponenciais normalizadas da componente longa dos decaimentos de intensidade de fluorescência do *t*-PnA nos vários sistemas estudados. As medidas foram realizados à temperatura ambiente a uma concentração celular de 0,6 OD_{600}/ml. As amostras foram excitadas a 315 nm, sendo a fluorescência recolhida a 404 nm. *: p<0,05; **: p<0.001 em relação a *wt*.

Foi demonstrado em sistemas modelo que a amplitude da componente longa do *t*-PnA é proporcional à fracção de domínios ordenados presentes na membrana (Sklar *et al.*, 1977). Tanto o mutante *erg6*Δ como os esferoblastos de *wt* possuem uma menor abundância de domínios de gel em relação às células *wt* intactas. As diferenças são significativas mas não dramáticas permitindo às células serem viáveis, caso estes domínios sejam essenciais para a viabilidade celular. Assim, pode-se inferir que mudanças na fisiologia das células induzem alterações na abundância de domínios de tipo gel da membrana plasmática da levedura (ver Discussão). No caso do mutante *scs7*Δ, uma vez que os domínios têm composição diferente, a constante de partição do *t*-PnA entre esses domínios e os restantes domínios da membrana poderá ser diferente, pelo que não é possível comparar quantitativamente a abundância dos domínios de esfingolípidos em células *scs7*Δ e *wt*.

Outro parâmetro de fluorescência em estado transiente avaliado foi o tempo de vida médio de fluorescência ou tempo de vida pesado pelas intensidades (Figura 15).

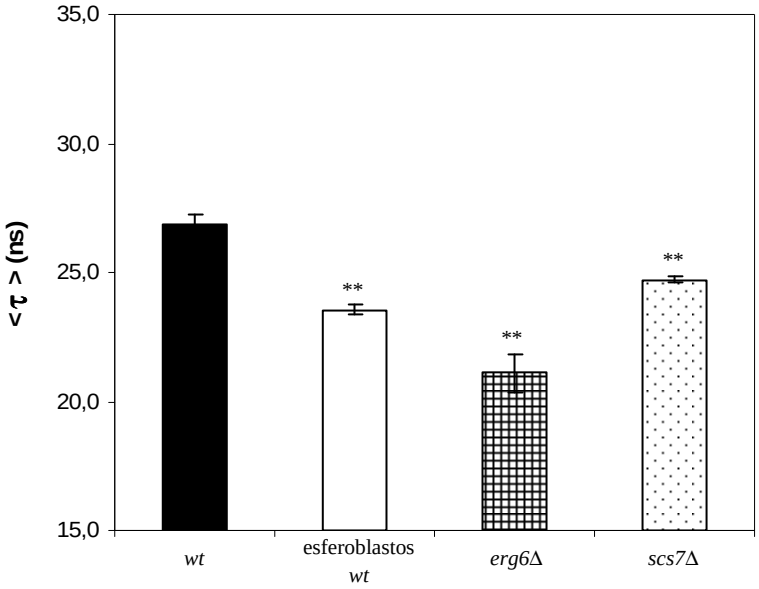

Figura 15 – Tempo de vida médio de fluorescência do *t*-PnA incorporado nos vários sistemas estudados. As medidas foram realizados à temperatura ambiente a uma concentração celular de 0,6 OD_{600}/ml. As amostras foram excitadas a 315 nm, sendo a fluorescência medida a 404 nm. **: p<0.001 em relação a *wt*.

Este parâmetro é frequentemente utilizado para descrever a cinética de fluorescência dada a dificuldade em se atribuir significado físico a algumas exponenciais utilizadas para se fazer o ajuste aos pontos experimentais do decaimento (de Almeida *et al.*, 2009). O tempo de vida médio é influenciado não só pelos tempos de vida de todas as componentes do decaimento, mas também pela intensidade de luz (fraccionária) associada a cada componente. Como o rendimento quântico do *t*-PnA é bastante superior quando está incorporado numa fase gel, a fracção de luz associada à componente longa é mais elevada e nos sistemas em estudo encontrou-se entre 0,5 e 0,6 (resultados não apresentados). Assim, a componente longa será a que mais se vai reflectir no valor do tempo de vida médio. Observando a Figura 15, tanto em esferoblastos como no mutante *erg6*Δ, o tempo de vida médio foi significativamente mais curto nestes sistemas do que na estirpe *wt*. Apesar de possuírem o mesmo valor de tempo de vida na componente longa em relação às células *wt*, estes resultados são um reflexo da menor quantidade de domínios muito ordenados nos sistemas considerados (Figura 14). Em relação ao mutante *scs7*Δ, o tempo de vida médio também foi significativamente inferior ao obtido para a estirpe *wt*, pese embora ter um valor de tempo de vida da componente longa significativamente superior (tal como referido anteriomente, a amplitude da componente longa é cerca de metade da que se

obtem em células *wt*). Com base neste parâmetro, pode-se novamente concluir que variações fisiológicas em *S. cerevisiae* induzem alterações nos domínios membranares muito ordenados do tipo gel, nomeadamente os domínios ricos em esfingolípidos.

2.3 Estudos de Anisotropia de Fluorescência em Estado Estacionário

Foram igualmente realizadas medidas de anisotropia de fluorescência em estado estacionário da sonda *t*-PnA na membrana plasmática de *S. cerevisiae* e em extractos lipídicos totais da estirpe *wt* de *S. cerevisiae* (Figura 16) de forma a complementar e legitimar os resultados dos decaimentos de intensidade de fluorescência (secção anterior). Este tipo de medições, para além de necessitar duma instrumentação mais simples em relação às medidas temporais, permite observar a extensão da polarização da emissão da sonda (Lakowicz, 2006). Assim, as variações angulares médias do fluoróforo que ocorrem entre a absorção e a consequente emissão de um fotão são entendidas.

Na estirpe *wt*, a anisotropia de fluorescência atingiu valores de ~0,285, revelando uma baixa difusão rotacional do *t*-PnA na membrana plasmática, consequência da partição preferencial do fluoróforo para domínios do tipo gel. Este valor de anisotropia é bastante superior aos valores usualmente encontrados na literatura, referentes a medições efectuadas em células intactas. Por exemplo, a anisotropia de fluorescência do *t*-PnA é de ~0,255 na membrana plasmática de plaquetas a 25°C (Mateo *et al.*, 1991).

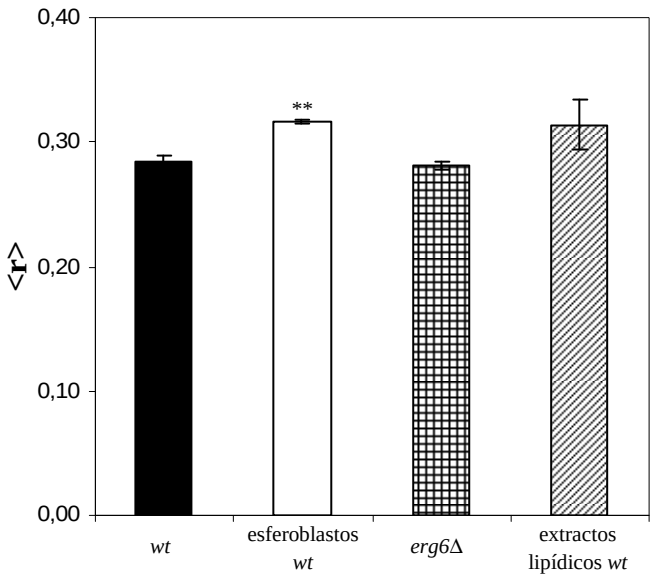

Figura 16 – Anisotropia de fluorescência em estado estacionário do *t*-PnA nos vários sistemas estudados. As medidas foram realizados à temperatura ambiente. As amostras foram excitadas a 320 nm, sendo a fluorescência medida a 404 nm. **: p<0.001

O único valor significativamente diferente relativamente às células *wt* intactas é foi o que se obteve em esferoblastos. No entanto, antes de interpretar este valor como uma verdadeira alteração da dinâmica rotacional da sonda naquelas células, é necessário ter em conta que uma suspensão de esferoblastos é muito menos turva que uma suspensão de células intactas (resultados não apresentados). Como já foi anteriormente referido, a parede celular das células intactas contribui para essa turbidez, ou seja, aumenta a intensidade de luz dispersa, o que poderá ser um factor de despolarização da radiação diminuindo o valor obtido da anisotropia de fluorescência. O valor obtido em esferoblastos foi significativamente superior (~0,32) ao valor registado em células intactas, mas essa diferença pode ser devida apenas a uma diminuição da turbidez da amostra (Lakowicz, 2006). Assim, para averiguar o efeito que a turbidez (densidade óptica) pode ter no valor de anisotropia de fluorescência em estado estacionário do *t*-PnA na membrana plasmática de células de *S. cerevisiae* intactas, foi realizado um estudo da anisotropia de fluorescência em função da concentração celular de leveduras (Figura 17). O estudo foi realizado variando apenas um décimo de unidade de densidade óptica relativamente ao valor utilizado nos restantes estudos, de modo a que a partição da sonda entre a membrana

e a água, bem como a cinética de incorporação não fossem significativamente afectadas.

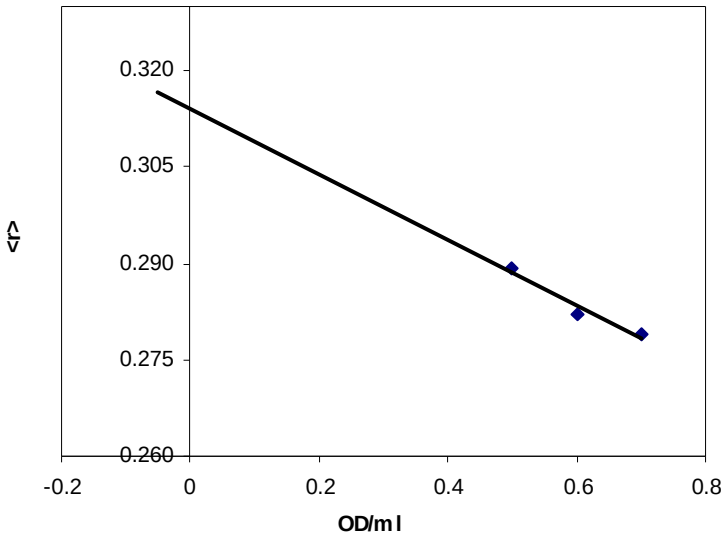

Figura 17– Correcção da densidade óptica na anisotropia de fluorescência em estado estacionário do *t*-PnA na estirpe *wt*. As células cresceram até à concentração de 0,6 OD_{600}/ml e precipitadas por centrifugação. A ressuspensão por adição do tampão A foi efectuada para diferentes concentrações finais de células. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente. As amostras foram excitadas a 320 nm, sendo a fluorescência medida a 404 nm. Por regressão linear obteve-se a equação y = -0,051x + 0,314.

Ao fazer uma extrapolação dos valores de anisotropia obtidos para 0 OD_{600}/ml (ordenada na origem do ajuste da equação de uma recta), isto é, uma situação ideal em que não ocorre dispersão de luz, obteve-se um valor de ~0,31 que é bastante semelhante ao obtido em esferoblastos (Figura 16) cuja suspensão apresenta uma turbidez muito baixa. Os resultados deste estudo indicam fortemente que a turbidez da suspensão de células intactas, em grande parte devida à dispersão da radiação promovida pela parede celular, está a afectar os valores de anisotropia em estado estacionário do *t*-PnA. Pode-se, então, concluir que o valor corrigido de anisotropia de fluorescência do *t*-PnA na membrana plasmática de *S. cerevisiae wt* deverá ser semelhante ao apresentado pelos esferoblastos, sendo muito superior ao registado até hoje em células vivas (tal como o tempo de vida da componente longa registada na secção anterior).

Em relação às células *erg6*Δ, observou-se que não existem alterações significativas na anisotropia de fluorescência em relação às células *wt*. Este resultado indica que a rigidez dos domínios detectados pelo *t*-PnA nos dois sistemas é semelhantes, estando de encontro ao resultado observado na componente longa do decaimento de intensidade de fluorescência do fluoróforo (Figura 13).

Relativamente aos extractos lipídicos *wt*, obtem-se novamente um valor de anisotropia elevado, típico da fase gel, sem diferenças significativas em relação às células intactas.

3. Caracterização fotofísica da sonda DPH na membrana plasmática de *S. cerevisiae*

3.1 Espectros de absorção, excitação e emissão do DPH

Na Figura 18 estão representados o espectro de absorção no UV-Vis do DPH em etanol e os espectros corrigidos e normalizados de excitação e emissão de fluorescência do DPH na membrana plasmática de células *wt* de *S. cerevisiae*.

O espectro de absorção do DPH em etanol apresenta uma banda de absorção intensa na gama dos 300 a 400 nm com picos a 336, 352 e 371 nm resultantes da progressão vibracional típica dos polienos e já anteriormente descrita para o *t*-PnA (Figura 11). O máximo de absorção do DPH em etanol situa-se aos 352 nm. A forma do espectro de absorção está de acordo com o descrito para este fluoróforo (Lentz, 1988). O espectro de excitação do DPH na membrana plasmática de células *wt* apresenta forma idêntica à do espectro de absorção possuindo, tal como o *t*-PnA, um desvio do espectro para o vermelho de 6 nm (pico a 377 nm correspondente à transição 0← 0). A explicação para este fenómeno já foi avançada previamente na secção 2.1. As diferenças na intensidade relativas dos picos são também devidas ao solvente, uma vez que este também pode influenciar a progressão vibracional (Valeur, 2001).

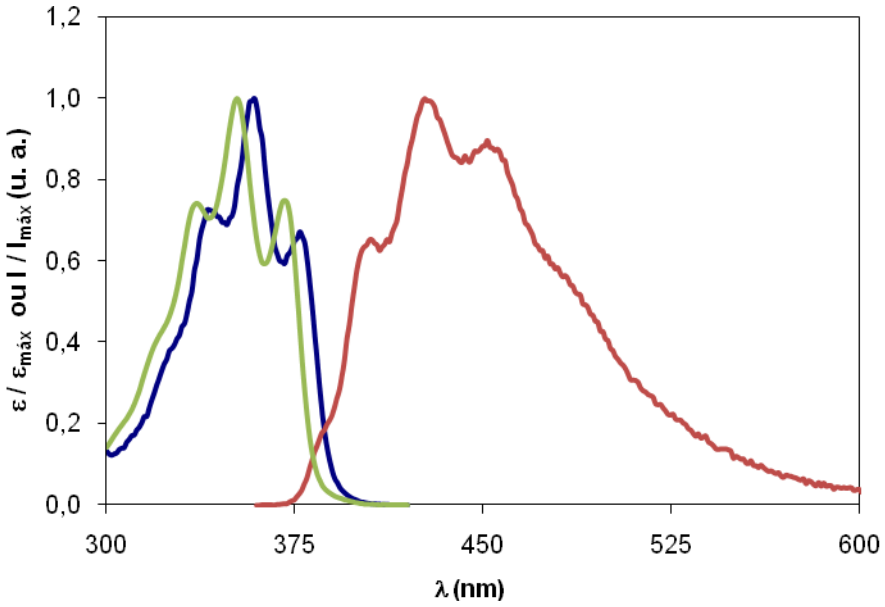

Figura 18 – Espectros normalizados de absorção, excitação e emissão do DPH. Espectro de absorção (verde) em etanol e espectros de excitação (azul) e emissão (vermelho) de fluorescência na membrana plasmática de *S. cerevisiae* a uma concentração celular de 0,6 OD/ml. Para o espectro de excitação, a emissão foi medida a 428 nm e no espectro de emissão, a excitação foi realizada a 358 nm. u.a., unidades arbitrárias

O espectro de emissão de fluorescência do DPH possui uma banda bastante intensa, igualmente com três máximos a 406, 428 (máximo absoluto) e 452 nm. A fotofísica do DPH, tal como o seu largo desvio de Stokes e a ausência de simetria entre os espectros de excitação e emissão são características espectroscópicas dos difenilpolienos que são bastante semelhantes às do *t*-PnA (Petersen, 1985). Contudo, como se pode observar na Figura 18, não há total perda de simetria espectral no DPH dada a estrutura vibracional dos dois espectros serem semelhantes, indicando que o espaçamento energético dos níveis vibracionais do estado electrónico excitado emissor é semelhante à do estado excitado atingido por absorção de radiação. Assim, no caso do DPH, a conversão interna deve ocorrer sem que seja necessária uma alteração configuracional tão drástica como no *t*-PnA.

O perfil espectral das restantes populações estudadas não apresenta desvios espectrais em relação às células *wt* (resultados não apresentados).

3.2 Estudos de Anisotropia de Fluorescência em Estado Estacionário

Os sistemas estudados foram também caracterizados com o DPH, sendo este um fluoróforo que se particiona igualmente entre as fases fluida e gel nas membranas em sistemas modelo (Lentz, 1988), sendo sensível às propriedades globais da membrana, em detrimento de um tipo de domínio particular. Em geral, também não apresenta partição preferencial entre domínios de líquido ordenado e de líquido desordenado (de Almeida *et al.*, 2005). Na Figura 19 está representada a anisotropia de fluorescência em estado estacionário do DPH em diferentes sistemas celulares.

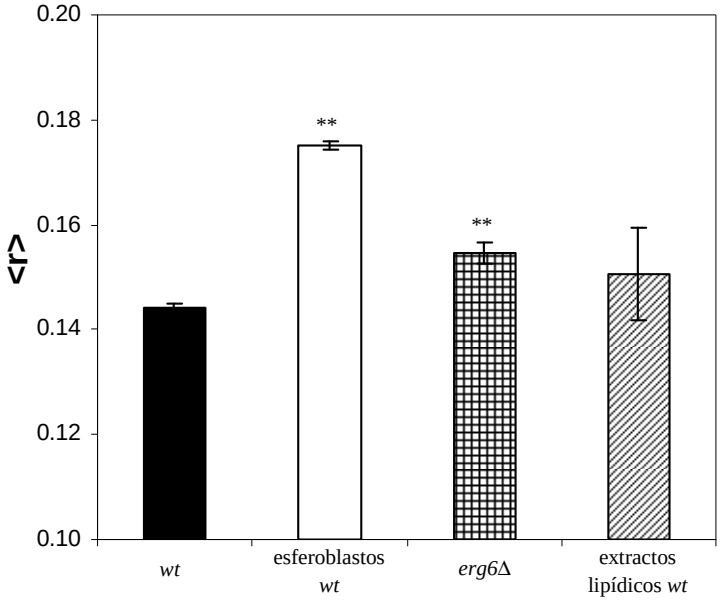

Figura 19 – Anisotropia de fluorescência em estado estacionário do DPH nos vários sistemas estudados. As medidas foram realizados à temperatura ambiente. As amostras foram excitadas a 358 nm, sendo a fluorescência medida a 428 nm. **: p<0.001

As células *wt* apresentaram um valor de anisotropia de fluorescência de ~0,14, concordante com estudos prévios (Folmer *et al.*, 2008;Sharma, 2006). Observou-se um decréscimo deste valor por comparação ao obtido com o *t*-PnA, consequência da partição do DPH em toda a membrana (o *t*-PnA incorpora preferencialmente em domínios ordenados). Esta comparação de valores de anisotropia entre sondas é

possível porque ambas apresentam um valor de anisotropia fundamental semelhante (Valeur, 2001). Nas células *erg6*Δ, a anisotropia de fluorescência do DPH foi significativamente superior ao valor obtido para as células *wt*. Estes resultados obtidos estão de acordo com o descrito previamente para estas duas estripes (Folmer *et al.*, 2008). No entanto, o resultado mais óbvio seria um valor inferior de anisotropia de fluorescência da estirpe *erg6*Δ em relação à *wt*, uma vez que na primeira não existe ergosterol. O ergosterol faz parte dum conjunto especial de esteróis que tem a capacidade de induzir um aumento na ordem de membrana e a concomitante formação de jangadas lipídicas. Assim, torna-se necessário elaborar um modelo consistente que explique simultaneamente todos os resultados obtidos com o DPH e com o *t*-PnA nos diferentes sistemas estudados.

O DPH em esferoblastos apresenta igualmente uma anisotropia de fluorescência superior à que se obtém em células *wt* intactas. Nos esferoblastos obtidos a partir de células *wt*, o ergosterol encontra-se igualmente presente, mas existe menor abundância de domínios muito ordenados (Figura 14). Finalmente, os extractos lipídicos não apresentam diferenças significativas na anisotropia de fluorescência do DPH, o que deverá mais uma vez ser uma consequência da sensibilidade desta sonda apenas às propriedades globais da membrana. O valor típico de anisotropia do DPH num fluido muito desordenado é de cerca de 0,1 ou até inferior, e o valor típico de gel é de 0,3 ou maior. O valor de líquido ordenado pode variar entre 0,2 e 0,3. Assim, em todos os casos, o valor obtido é compatível com a coexistência de vários tipos de domínios lipídicos (de Almeida *et al.*, 2003).

3.3 Estudos de Fluorescência em Estado Transiente

Na Figura 20 está representado um decaimento de intensidade de fluorescência do DPH. Estes decaimentos não necessitaram de análise global, dado que a excitação foi realizada a 370 nm, já distante da excitação de proteínas e esteróis originando um baixo número de contagens do branco (< 5%). A dispersão de Rayleigh também é bastante reduzida relativamente às experiências com o *t*-PnA, uma vez que

a intensidade de luz dispersa varia com o inverso de uma potência do comprimento de onda. A dispersão de Raman, tal como explicado nos Materiais e Métodos, foi evitada com a escolha de um comprimento de onda de emissão superior ao máximo de emissão do DPH.

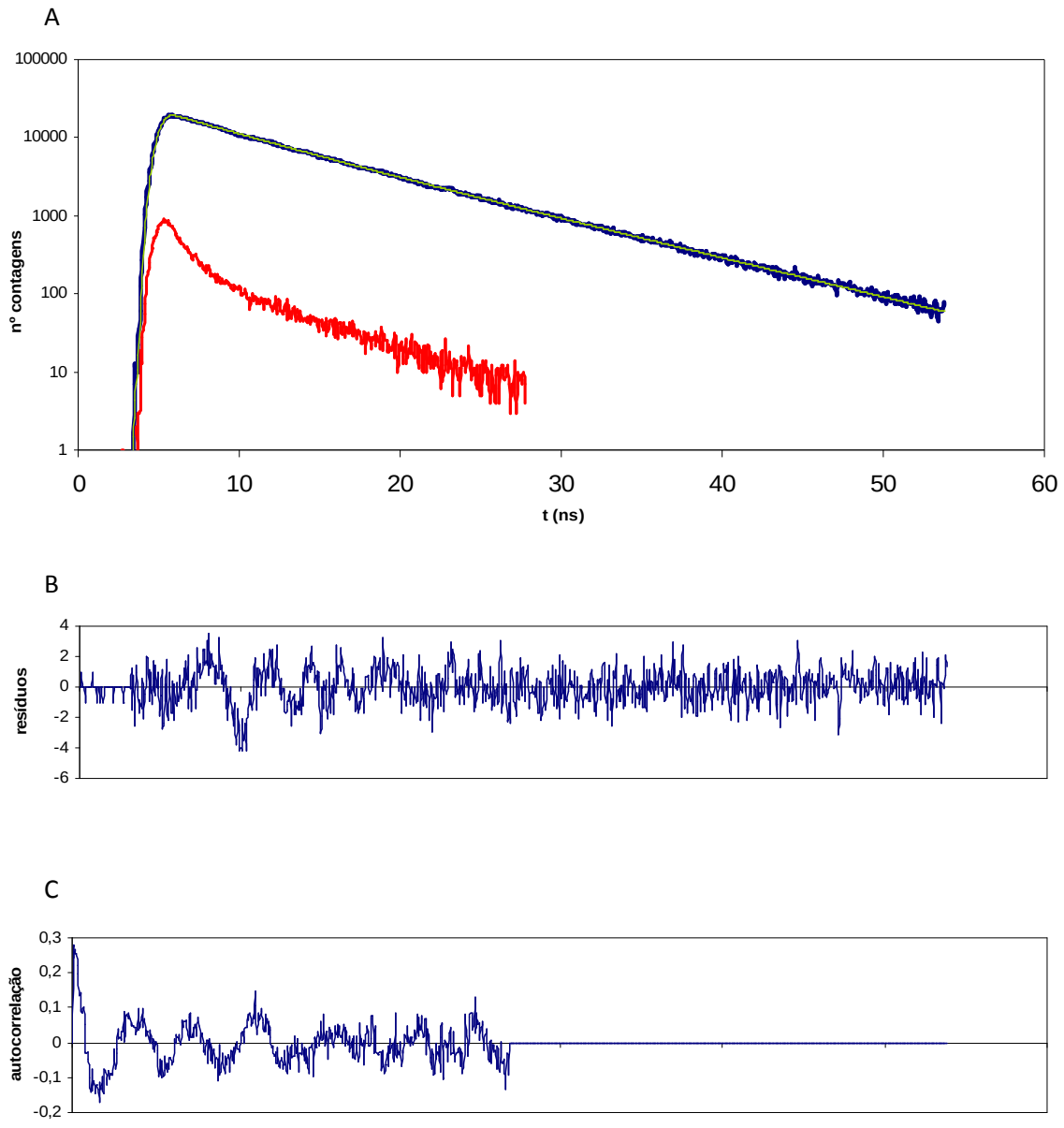

Figura 20 – Decaimento de intensidade de fluorescência do DPH na membrana plasmática de *S. cerevisiae wt*. Os decaimentos da sonda (azul) e do branco (vermelho) foram realizados à temperatura ambiente a uma concentração celular de 0,6 OD_{600}/ml (A). As amostras foram excitadas a 370 nm, sendo a fluorescência determinada a 450 nm. A linha verde corresponde ao melhor ajuste aos pontos experimentais da sonda. Também se mostram os resíduos dos ajustes (B) e a auto-correlação dos resíduos (C).

Os decaimentos de intensidade de fluorescência do DPH em *S. cerevisiae* são bi-exponenciais. É possível observar que o decaimento de intensidade de fluorescência não tem a mesma forma e não possui a componente longa detectada pelo *t*-PnA. O decaimento é descrito por duas exponenciais, uma componente com um tempo de vida mais curto, ~5 ns, e uma componente com um tempo de vida mais longo, ~8,6 ns (resultados não apresentados). Os decaimentos de intensidade de fluorescência do DPH em membranas são descritos por um tempo de vida de ~8-12 ns onde o valor no limite superior deste intervalo estará associado a uma fase gel (Konopasek *et al.*, 2004;Guillen *et al.*, 2009) e um tempo de vida que varia de 1-5 ns que estará associado à população do fluoróforo que está próximo da interface lípido-água (Konopasek *et al.*, 2004). Na Figura 21 estão representados os tempos de vida médio de fluorescência do DPH.

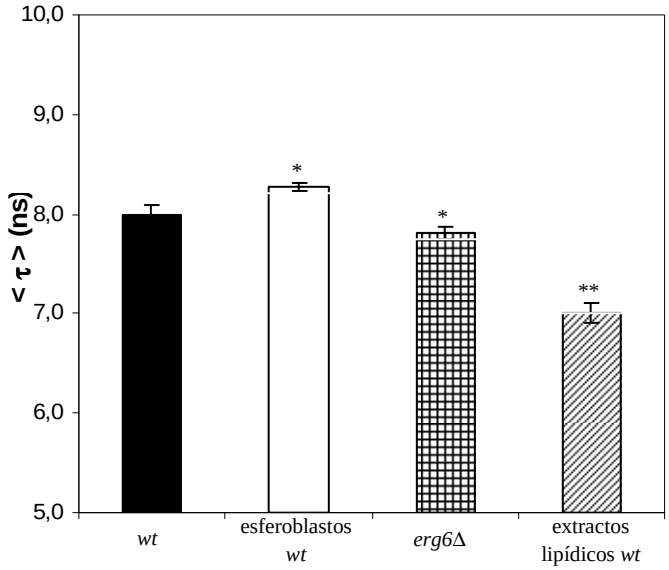

Figura 21 – Tempo de vida médio de fluorescência do DPH incorporado nos vários sistemas estudados. As medidas foram realizados à temperatura ambiente. As amostras foram excitadas a 370 nm, sendo a fluorescência medida a 450 nm. *: $p<0.05$; **: $p<0.001$

O DPH possui um tempo de vida médio significativamente superior em esferoblastos em relação às células intactas. Tendo em conta que a anisotropia de fluorescência é igualmente superior em esferoblastos, estes resultados implicam que a

ordem de membrana é superior nestes. Nas células *erg6*Δ, o tempo de vida médio foi significativamente inferior às células *wt*, possivelmente devido a fenómenos de quenching do DPH por água que penetra na bicamada. Em extractos lipídicos, o tempo de vida é ligeiramente inferior ao dos restantes sistemas, o que se deverá provavelmente à ausência de proteínas e/ou à reorganização dos lípidos das várias membranas celulares que compõem os extractos.

Discussão

Neste trabalho foi estudada, por espectroscopia de fluorescência, a membrana plasmática de *S. cerevisiae* utilizando mutantes de enzimas da síntese de componentes lipídicos da mesma e sujeitando o sistema à remoção da parede celular. Esta técnica foi utilizada com as sondas fluorescentes (i) DPH, uma das sondas de membrana mais utilizada e com uma distribuição equivalente entre a maioria dos domínios de membrana (de Almeida *et al.*, 2003); e (ii) *t*-PnA, que é uma das poucas sondas que incorpora preferencialmente em domínios ordenados, onde apresenta um aumento do rendimento quântico de fluorescência, sendo especialmente sensível a alterações na quantidade e composição desses domínios ordenados (de Almeida *et al.*, 2009). Assim, a informação dada pelos parâmetros de fluorescência destes dois fluoróforos é complementar.

Ao estudar a membrana plasmática da levedura com o *t*-PnA, por espectroscopia de fluorescência em estado transiente, detectou-se uma componente longa de aproximadamente 37 ns (secção Resultados 2.2), valor típico da presença de uma fase gel (> 30 ns (Castro *et al.*, 2009)). O *t*-PnA foi utilizado anteriormente para detectar domínios ordenados em células de mamífero, tendo-se detectado valores da componente longa, que correspondiam a domínios líquido ordenado ricos em colesterol, inferiores a 21 ns (Schroeder *et al.*, 1984). Até à data era considerada improvável a ocorrência de domínios tipo gel estáveis em organismos vivos em fase de crescimento devido às elevadas rigidez e ordem, que impunham uma menor dinâmica membranar em relação à necessária para o desenvolvimento dos processos bioquímicos na membrana (Connell and Smith, 2006). Neste trabalho, foi posta de parte a hipótese de os valores obtidos para a componente longa serem devidos à incorporação da sonda na parede celular, que constitui um ambiente muito rígido, e, aquando do estudo do tipo de domínios detectados, concluiu-se que estes eram domínios ricos em esfingolípidos com baixo ou nenhum conteúdo de esteróis. A obtenção do mesmo valor da componente longa obtido nas células *wt* nas células *erg6*Δ excluiu o ergosterol (esterol maioritário na membrana plasmática) como

molécula fundamental nos domínios detectados, e o aumento do valor do mesmo parâmetro nas células *scs7*Δ indicou os esfingolípidos complexos como constituintes desses domínios. Como nas células *scs7*Δ não ocorre hidroxilação das cadeias acilo dos esfingolípidos, há uma diminuição da área superficial coberta por grupos polares e com capacidade para estabelecer ligações de hidrogénio na interface membrana-água. Esta diminuição deverá induzir por sua vez um maior empacotamento das cadeias acilo destes lípidos na membrana. O cromóforo do *t*-PnA está localizado na região central da bicamada - cadeias acilo dos lípidos de membrana - e é sensível às alterações que ocorrem nessa região (Castanho *et al.*, 1996). Um aumento de empacotamento e rigidez nos domínios ricos em esfingolípidos na região das cadeias acilo justifica o aumento do tempo de vida na componente longa observado em células *scs7*Δ.

Contudo, a amplitude da componente longa em *scs7*Δ é menor que em células *wt*, sugerindo que a quantidade de domínios detectados pelo *t*-PnA seja também menor. A quantidade total de esfingolípidos é semelhante nas duas estirpes (Figura 3). Assim, para justificar uma menor abundância de domínios de gel na membrana plasmática da levedura, poder-se-á, numa primeira aproximação, considerar que os domínios de gel e de fluido da membrana plasmática de *S. cerevisiae* podem ser descritos no âmbito de um diagrama de fases para um sistema lipídico binário, composto por um fosfolípido de T_m baixa e por um esfingolípido de Tm elevada. Considere-se, então, a região de coexistência de fases gel/fluido nesse diagrama e o ponto (composição, temperatura) em análise. Este é o mesmo para os dois sistemas, uma vez que a fracção de esfingolípidos não difere significativamente e que foram estudados à mesma temperatura. No diagrama de fases gel/fluido representativo das células *scs7*Δ poderá haver uma região mais larga de coexistência gel/fluido, devido a uma maior diferença de T_m entre os lípidos do mutante, uma vez que os domínos de gel neste sistema são mais compactos, em que a solubilidade do lípido de menor T_m no gel seja muito baixa. No outro sistema, o gel contém uma quantidade maior de lípido de baixa T_m. Em relação ao fluido, como em ambos os casos se está a uma temperatura muito afastada da temperatura de fusão, que é negativa para PC insaturadas, a composição será mais próxima. Assim, é possível que na *tie-line* à temperatura ambiente, para a mesma percentagem de esfingolípidos, se esteja mais longe da linha

solidus (linha que separa as fases gel e gel/fluido) no diagrama representativo de *scs7*Δ. De acordo com a regra da alavanca, isto implica que a fracção gel seja menor. Posto de outra forma, uma vez que os domínios de gel em *scs7*Δ são mais ricos em esfingolípidos, seria necessária uma maior quantidade desses lípidos para formar a mesma fracção de gel que em células *wt*. Uma caracterização biofísica mais aprofundada com estudos em estado estacionário usando DPH nas células *scs7*Δ dará mais informação para se compreender o tipo de mudanças que a alteração destes domínios poderá induzir na ordem global da membrana (ver Considerações Gerais e Perspectivas).

É provável que os domínios ricos em esfingolípidos detectados pelo *t*-PnA estejam relacionados com o compartimento da membrana plasmática MCP. A proteína Pma1p que se encontra neste compartimento é importante para criar um gradiente electroquímico e de pH ao longo da membrana de modo a permitir o co-transporte de aminoácidos, glícidos e iões inorgânicos dependente de protões (Morsomme *et al.*, 2000). Contudo, estudos onde se utilizaram células com mutações que afectavam a estrutura da cabeça polar de esfingolípidos ou o seu padrão de hidroxilação – como é o caso das células *scs7*Δ – demonstraram que estas alterações nos esfingolípidos não afectavam a associação da Pma1p a jangadas membranares ou a sua degradação (Toulmay and Schneiter, 2007). Estes domínios devem constituir uma pequena fracção do MCP, o qual abrange grande parte da membrana plasmática. Neste trabalho, a amplitude da componente longa é sempre inferior a 20%, e em sistemas modelo de membrana totalmente na fase gel, essa componente é maioritária. Recentemente, microdomínios ricos em esfingolípidos e independentes de colesterol que contém moléculas sinalizadoras foram detectados na membrana plasmática de células de mamífero (Hofman *et al.*, 2008). Estes domínios podem ser os homólogos de mamífero dos domínios identificados neste trabalho em levedura.

Os resultados obtidos com o *t*-PnA nas células *erg6*Δ mostraram não haver diferenças na rigidez dos domínios ricos em esfingolípidos em relação à estirpe *wt*, uma vez que o valor tanto da componente longa do decaimento como da anisotropia de fluorescência foi o mesmo nas duas estirpes (Figuras 13 e 16). As células de levedura possuem a capacidade de modificar a sua composição de esfingolípidos em

resposta às alterações de composição em esteróis nas membranas (Guan *et al.*, 2009), como está apresentado na Figura 5. O mecanismo pelo qual ocorre a adaptação dos níveis dos esfingolípidos ainda não se encontra descrito. No entanto, este é dependente não da ausência de ergosterol, mas sim da presença de níveis anormais de diferentes intermediários da biossíntese do ergosterol conforme as mutações nos genes *ERG* (Guan *et al.*, 2009). Comparando o perfil de esfingolípidos nas células *erg6*Δ com as células *wt*, observa-se um aumento dos níveis dos esfingolípidos manosilados, ocorrendo a diminuição de apenas um inositol fosfoceramida. Apesar destas diferenças, as interacções lípido-lípido referentes aos esfingolípidos e fosfolípidos nos domínios detectados pelo *t*-PnA nas células *erg6*Δ deverão ser semelhantes às observadas em células *wt*. Contudo, a quantidade de domínios ordenados detectados pelo *t*-PnA nas células *erg6*Δ é menor (Figura 14), tendo influência no valor inferior do tempo de vida médio de fluorescência em relação à estirpe *wt*. A menor quantidade de domínios poderá estar relacionada com um modelo que será explicado adiante nesta secção.

Em relação aos resultados obtidos com a sonda DPH, seria expectável obter um valor de anisotropia de fluorescência menor para o mutante *erg6*Δ do que na estirpe *wt*, isto porque o zimosterol, principal esterol acumulado nas células *erg6*Δ, não induz um aumento da ordem da membrana comparável ao do ergosterol, não sendo classificado como um esterol promotor de jangadas (Megha *et al.*, 2006) e, portanto, esperava-se uma menor ordem de membrana nas células *erg6*Δ, como reportado noutros trabalhos (Sharma, 2006), ou seja, um valor de anisotropia do DPH inferior ao valor de *wt*. Muitos estudos sobre fluidez membranar têm sido levados a cabo em *S. cerevisiae* utilizando difenilpolienos, a maioria utilizando um derivado do DPH, o 1-(4-trimetilamoniofenil)-DPH (TMA-DPH). Este derivado catiónico possui a sua cabeça polar na interface lipído-água da membrana, tendo o grupo DPH incorporado a uma menor profundidade comparado com o DPH livre (TMA-DPH encontra-se a uma distância de 11 Å do centro da bicamada contra os 8 Å do DPH livre) (Kaiser and London, 1998), reportando, transversalmente, uma região da bicamada lipídica distinta, mas com propriedades fotofísicas bastante similares ao DPH (Prendergast *et al.*, 1981). Também com este derivado fluorescente, está descrita uma maior fluidez

membranar do mutante *erg6*Δ em relação à estirpe *wt* (Guan *et al.*, 2009;Abe and Hiraki, 2009). A maior ordem de membrana reportada neste trabalho, e que já havia sido descrita por Pedroso *et al.* (2008), pode igualmente ser explicada pela alteração do perfil de fosfolípidos e esfingolípidos apresentada na Figura 5. Observa-se que na estirpe *erg6*Δ existe menor quantidade de PE e maior quantidade de PC e PS. Como a PE tem uma forma cónica truncada invertida resultante duma pequena área de secção da cabeça polar (de Kroon, 2007), dá origem a um maior empacotamento dos fosfolípidos e das cadeias acilo devido ao reduzido tamanho do grupo polar e da sua hidratação. No caso do mutante *erg6*Δ ocorre o efeito contrário devido à menor quantidade de PE, havendo menor espaçamento entre os fosfolípidos que se correlaciona com uma maior fluidez membranar. Terá de haver um mecanismo, que será proposto adiante nesta secção, que compense a maior fluidez membranar de modo a que o balanço das interacções entre os fosfolípidos, esfingolípidos e esteróis (todos estes lípidos possuem alteração de perfis neste mutante) origine uma menor fluidez na região interior das cadeias acilo em relação às células *wt* como reportado pelo DPH. Observando o tempo de vida médio do DPH nesta estirpe, o facto de se obter um valor menor que na estirpe *wt* parece entrar em contradição com os resultados em estado estacionário que mostram uma ordem de membrana superior. As células *erg6*Δ possuem uma maior permeabilidade de membrana e uma maior susceptibilidade a drogas (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Possivelmente, a membrana terá zonas mais permeáveis à penetração de água permitindo o *quenching* do fluoróforo e, consequentemente, diminuindo o tempo de vida médio da sonda, como descrito recentemente com o péptido de fusão viral da glicoproteína S2 do coronavírus do síndrome respiratório agudo (SARS-CoV) (Guillen *et al.*, 2009) e em sistemas modelo (Gonzalez-Baro *et al.*, 2000).

Para estudar o efeito da parede celular foi necessário obter esferoblastos através de hidrólise da parede celular. A partir dos estudos com as duas sondas em esferoblastos é possível retirar algumas ilações: (i) não se observaram diferenças significativas na rigidez dos domínios ricos em esfingolípidos presentes neste sistema em relação aos da estirpe *wt* (Figura 13); (ii) estes domínios existem em menor quantidade neste sistema (Figura 14); (iii) a ordem global da membrana plasmática é

superior em esferoblastos (Figura 19). Uma possível explicação para estas observações poderá ser uma estabilização dos domínios ricos em esfingolípidos da membrana plasmática por parte da parede celular. Propõe-se um modelo que se encontra representado na Figura 22 onde a remoção da parede celular desestabiliza esses domínios, ocorrendo uma distribuição de esfingolípidos ao longo da restante membrana. Como consequência, o seio da membrana torna-se mais rico em esfingolípidos quando comparado com as células intactas e, desta forma, há um aumento da ordem da membrana no seu todo. Um raciocínio semelhante pode explicar a maior ordem de membrana no mutante *erg6*Δ onde a distribuição de esfingolípidos pela membrana ajudará a compensar a maior fluidez membranar resultante das alterações nos perfis dos lípidos membranares. Esta disrupção de domínios ricos em esfingolípidos origina um aumento na ordem global de membrana (Figura 19) e diminuição da quantidade de domínios detectados pelo *t*-PnA (Figura 14).

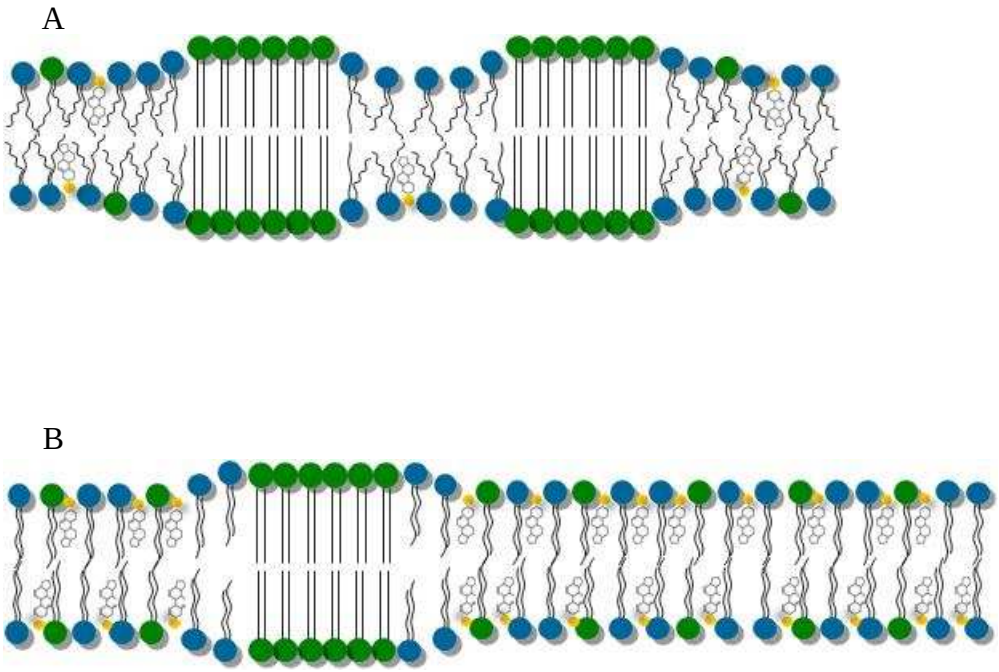

Figura 22 – Modelo explicativo da relação entre a abundância de domínios ricos em esfingolípidos e a ordem global da membrana plasmática de *S. cerevisiae.* Na presença de parede celular (A) ocorre segregação de esfingolípidos (a verde) em domínios ordenados. Quando a parede celular é removida por acção da zimoliase (B), ocorre uma distribuição dos esfingolípidos dos domínios ordenados ao longo da membrana estabelecendo interacções lípido-lípido com fosfolípidos (a azul) e ergosterol (a amarelo). O aumento da ordem global da membrana em *erg6*Δ também pode ser explicado por este modelo.

De acordo com este modelo especula-se a existência de um mecanismo de retroacção através do qual a célula utiliza os esfingolípidos de elevada temperatura de transição acumulados nos domínios ordenados, de modo a imprimir uma maior resistência mecânica à membrana plasmática em resposta à remoção ou dano da parede celular. Recentemente foi demonstrado que danos causados na parede celular pelo enzima zimoliase levam à activação de duas vias, a CWI (do inglês *Cell Wall Integrity*) e a HOG (do inglês *High Osmotic Response*) como resposta adaptativa (Garcia *et al.*, 2009). A activação destas vias induz uma resposta a nível da transcrição, através de cascatas de sinalização de cinases, que se traduz em dois passos: adaptação a nível da transcrição a choque osmótico e uma resposta principal relacionada com o dano na parede celular regulada pela cinase Slt2p e pelo factor de transcrição Rlm1p. Foram detectadas alterações na transcrição de 87 genes ao fim de três h, tempo que poderá ser demasiado longo caso seja necessária uma resposta rápida à situação de stress. O mecanismo proposto na Figura 22, correspondente à solubilização de alguns domínios de gel, poderá ocorrer numa escala de tempo mais rápida, permitindo à célula sobreviver enquanto as respostas CWI e HOG estarão a ser preparadas pelas células, ou até poderá acontecer que as respostas adaptativas sejam desencadeadas pelas alterações na organização dos domínios ricos em esfingolípidos.

A nível molecular, como ocorrerá a estabilização dos domínios ricos em esfingolípidos pela parede celular? Esta questão levou a procurar uma relação estabelecida em *S. cerevisiae* entre esfingolípidos e a parede celular. Essa relação foi encontrada nas proteínas com âncoras GPI (de Sampaio *et al.*, 1999). Em levedura, as âncoras GPI interagem com a parede celular e são importantes para o *targeting* de proteínas para a parede celular que posteriormente estabelecem ligações covalentes com a parede celular como é o caso da proteína ancorada a GPI Gas1p. Além disso, os esfingolípidos mas não o ergosterol são indispensáveis para o transporte de proteínas ancoradas a GPI como é o caso do transporte da Gas1p do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e para estabilizar a associação das mesmas com membranas (Watanabe *et al.*, 2002;Heese-Peck *et al.*, 2002). Este tipo de proteínas possui mesmo um transporte vesicular composto especificamente por ceramidas e esfingolípidos complexos, sendo as interacções hidrófobas entre a ceramida e a parte lipídica da GPI

importantes para a estabilização da associação em membranas. Em mutantes incapazes de sintetizar esfingolípidos, as proteínas ancoradas a GPI comportam-se como proteínas periféricas, sendo solubilizadas por acção do detergente não iónico Triton X-100, o que não ocorre na estirpe *wt*. Assim é possível estabelecer uma forte associação entre esfingolípidos e proteínas ancoradas a GPI, e entre as últimas e a parede celular em células de *S cerevisiae*. A associação transiente entre proteínas com âncora GPI com a parede celular poderá fornecer pontos de nucleação para a formação e estabilização de domínios ricos em esfingolípidos.

Considerações Finais e Perspectivas

O estudo detalhado da biofísica da membrana plasmática de *S. cerevisiae* revelou novos aspectos que poderão ajudar a esclarecer os mecanismos de regulação de processos celulares. Para tal, a utilização da sonda *t*-PnA em conjunto com espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo foi fundamental para detectar os domínios ordenados ricos em esfingolípidos e observar que alterações fisiológicas imprimem mudanças na organização desses domínios na membrana plasmática. Foi possível ainda, com base em todos os resultados, apresentar um mecanismo de regulação da ordem global da membrana em situações de alteração fisiológica das células.

Ainda assim é necessário ressalvar que foi importante acompanhar este trabalho por estudos em sistemas modelo (Cordeiro, 2009) para ajudar à interpretação dos resultados e desenvolver ideias que dinamizaram o projecto, uma vez que existem muito poucos estudos de biofísica de esfingolípidos de levedura.

Os resultados obtidos deixaram, contudo, algumas questões em aberto. Foi observado que o mutante *scs7*Δ, apesar de possuir domínios ricos em esfingolípidos mais rígidos, terá uma fracção na membrana plasmática desses domínios menor do que células *wt*. Posto isto, é necessário investigar se ocorrem alterações a nível da ordem global de membrana como ocorreu em esferoblastos e no mutante *erg6*Δ. Estudos de fluorescência em estado estacionário e em estado transiente com o DPH poderão permitir desvendar esta questão.

De modo a perceber com maior detalhe a nível molecular as alterações nas propriedades globais da membrana que ocorrem concomitantemente à alteração na composição e/ou abundância dos domínios ricos em esfingolíopidos, poder-se-á realizar medidas de anisotropia em estado transiente, uma vez que com este tipo de medidas é possível obter o(s) coeficiente(s) de difusão rotacional da sonda, a sua contribuição para o decaimento de anisotropia e ainda a anisotropia limite a tempo infinito, que contém informação quantitativa sobre a restrição angular à rotação da

sonda, reflectindo de forma muito directa o grau de empacotamento das cadeias acilo dos lípidos.

A interacção entre proteínas ancoradas a GPIs e os domínios ordenados detectados foi invocada para justificar a nível molecular a estabilização dos domínios ricos em esfingolípidos pela parede celular. Deste modo, seria importante avaliar se a presença de âncoras GPI constituídas por esfingolípidos é essencial para a estabilização desses domínios (note-se que em mamíferos, as ancoras GPI são constituídas por glicerofosfolípidos). A utilização de uma estirpe mutante que não possua a capacidade de remodelação das âncoras GPI, ou seja, que não consegue proceder às alterações na componente lipídica das âncoras GPI que se processam, principalmente, no reticulo endoplasmático após a transferência de proteínas para a âncora, poderá ajudar a responder àquela questão. Quando a célula não comsegue proceder à remodelação, o transporte das proteínas ancoradas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e, consequentemente, para a membrana plasmática, fica comprometido. O estudo deste mutante indicará se a presença das âncoras GPI é fulcral para a estabilização dos domínios ricos em esfingolípidos detectados pelo *t*-PnA.

Encontra-se descrito que em condições de adaptação ao H_2O_2, a membrana plasmática de *S. cerevisiae* possui uma ordem de membrana superior em relação a células não adaptadas (Folmer *et al.*, 2008). A caracterização da membrana plasmática da levedura em condições de adaptação com o fluoróforo *t*-PnA poderá ser importante para desvendar se os domínios ricos em esfingolípidos terão algum papel na capacidade de resposta da célula na adaptação, nomeadamente, no aumento da ordem global de membrana.

Outro estudo interessante será utilizar um meio rico em colesterol para o crescimento de leveduras. A incorporação de colesterol na membrana poderá ser um factor de disrupção dos domínios ricos em esfingolípidos por alteração das propriedades biofísicas da membrana e os parâmetros fornecidos pela sonda, nomeadamente uma menor rigidez desses domínios. Esta experiência tem por base a capacidade conhecida do colesterol de eliminar a transição gel/fluido em inúmeros fosfolípidos (de Almeida and Loura, 2004) e ser capaz de dissolver inclusivamente o gel

de palmitoilceramida (Castro *et al.*, 2009) que é um gel bastante compacto. Além disso, não se encontram domínios de gel na membrana plasmática de células de mamífero em situações fisiológicas (Connell and Smith, 2006), o que deverá ser devido à elevada concentração de colesterol nessas membranas. Ao solubilizar os domínios de gel ricos em esfingolípidos na membrana plasmática de *S. cerevisiae* por incorporação de colesterol, haverá um suporte experimental adicional relativo à natureza dos domínios detectados, ou seja, domínos de membrana na fase gel, formados com base em interacções lípido-lípido. Além disso, sujeitar estas células crescidas num meio rico em colesterol a condições de *stress* osmótico ou térmico e observar a sua sensibilidade e sobrevivência poderá ser um ponto de partida para a atribuição de uma função biológica para esses domínios ricos em esfingolípidos.

Por forma a estabelecer uma possível relação entre os domínios ricos em esfingolípidos e os compartimentos MCC e MCP poder-se-á proceder à despolarização das células de *S. cerevisiae*, por exemplo, com carbonil cianida 4-(trifluorometoxi)fenil-hidrazona (FCCP), e estudar as alterações ocorridas naqueles domínios, uma vez que, em células despolarizadas, o MCC é aparentemente desmontado, enquanto que o MCP parece não sofrer alterações muito severas na sua organização (Grossmann *et al.*, 2007).

Finalmente, termina-se este trabalho com a conclusão mais geral de que o estudo detalhado das propriedades biofísicas da membrana plasmática das células de determinados organismos podem ser bastante importantes para perceber a Bioquímica e Biologia desses organismos.

Lista de Referências Bibliográficas

1. Abe,F. and T.Hiraki. 2009. Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes* 1788:743-752.

2. Alvarez,F.J., L.M.Douglas, and J.B.Konopka. 2007. Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. *Eukaryot. Cell* 6:755-763.

3. Anderson,R.G.W. and K.Jacobson. 2002. Cell biology - A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296:1821-1825.

4. Bagnat,M., S.Keranen, A.Shevchenko, A.Shevchenko, and K.Simons. 2000. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:3254-3259.

5. Bottema,C.D.K., C.A.Mcleanbowen, and L.W.Parks. 1983. Role of Sterol Structure in the Thermotropic Behavior of Plasma Membranes of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 734:235-248.

6. Branco,M.R., H.S.Marinho, L.Cyrne, and F.Antunes. 2004. Decrease of H_2O_2 Plasma Membrane Permeability during Adaptation to H_2O_2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279:6501-6506.

7. Bratton,D.L., V.A.Fadok, D.A.Richter, J.M.Kailey, L.A.Guthrie, and P.M.Henson. 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* 272:26159-26165.

8. Cantor,C.R. and P.R.Schimmel. 1980. Biophysical Chemistry Part I: The conformation of biological molecules. W.H.Freeman and Company, New York, USA.

9. Castanho,M., M.Prieto, and A.U.Acuna. 1996. The transverse location of the fluorescent probe trans-parinaric acid in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* 1279:164-168.

10. Castro,B.M., L.C.Silva, A.Fedorov, R.F.M.de Almeida, and M.Prieto. 2009. Cholesterol-Rich Fluid Membranes Solubilize Ceramide Domains. Implications for the Structure and Dynamics of Mammalian Intracellular and Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.*M109.

11. Cerantola,V., I.Guillas, C.Roubaty, C.Vionnet, D.Uldry, J.Knudsen, and A.Conzelmann. 2009. Aureobasidin A arrests growth of yeast cells through both ceramide intoxication and deprivation of essential inositolphosphorylceramides. *Mol. Microbiol.* 71:1523-1537.

12. Connell,S.D. and D.A.Smith. 2006. The atomic force microscope as a tool for studying phase separation in lipid membranes (Review). *Mol. Membr. Biol* .23:17-28.

13. Cordeiro, A. Estudos Biofísicos em Sistemas Modelo da Membrana Plasmática da Levedura. 2009. Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa.

14. Coutinho,A. and M.Prieto. 1993. Ribonuclease-T(1) and Alcohol-Dehydrogenase Fluorescence Quenching by Acrylamide - A Laboratory Experiment for Undergraduate Students. *J. Chem. Educ.* 70:425-428.

15. Daum,G., G.Tuller, T.Nemec, C.Hrastnik, G.Balliano, L.Cattel, P.Milla, F.Rocco, A.Conzelmann, C.Vionnet, D.E.Kelly, S.Kelly, E.Schweizer, H.J.Schuller, U.Hojad, E.Greiner, and K.Finger. 1999. Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast* 15:601-614.

16. de Almeida,R.F., L.M.Loura, A.Fedorov, and M.Prieto. 2005. Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J. Mol. Biol.* 346:1109-1120.

17. de Almeida,R.F.M., A.Fedorov, and M.Prieto. 2003. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: Boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J.* 85:2406-2416.

18. de Almeida,R.F.M., L.M.S.Loura, A.Fedorov, and M.Prieto. 2002. Nonequilibrium phenomena in the phase separation of a two-component lipid bilayer. *Biophys. J.* 82:823-834.

19. de Almeida,R.F.M., L.M.S.Loura, and M.Prieto. 2009. Membrane lipid domains and rafts: current applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging. *Chem. Phys. Lipids* 157:61-77.

20. de Almeida,R.F.M. and L.M.S.Loura. 2004. Tópicos de Biofísica de Membranas. LIDEL, Lisboa.

21. de Kroon,A.I.P.M. 2007. Metabolism of phosphatidylcholine and its implications for lipid acyl chain composition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. L.* 1771:343-352.

22. de Sampaio,G., J.P.Bourdineaud, and G.J.M.Lauquin. 1999. A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol. Microbiol.* 34:247-256.

23. Dickson,R.C. 2008. Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *J. Lipid Res.* 49:909-921.

24. Fisher,K.A. and W.Stoeckenius. 1983. Biomembranes Models. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

25. Folch,J., M.Lees, and G.H.S.Stanley. 1957. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.

26. Folmer,V., N.Pedroso, A.C.Matias, S.C.D.N.Lopes, F.Antunes, L.Cyrne, and H.S.Marinho. 2008. H_2O_2 induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1778:1141-1147.

27. Gaigg,B., B.Timischl, L.Corbino, and R.Schneiter. 2005. Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *J. Biol. Chem.* 280:22515-22522.

28. Garcia,R., J.M.Rodriguez-Pena, C.Bermejo, C.Nombela, and J.Arroyo. 2009. The High Osmotic Response and Cell Wall Integrity Pathways Cooperate to Regulate Transcriptional Responses to Zymolyase-induced Cell Wall Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 284:10901-10911.

29. Gennis,R.B. 1989. Biomembranes: Molecular Structure and Function. Springer-Verlag, New York, USA.

30. Goffeau,A., B.G.Barrell, H.Bussey, R.W.Davis, B.Dujon, H.Feldmann, F.Galibert, J.D.Hoheisel, C.Jacq, M.Johnston, E.J.Louis, H.W.Mewes, Y.Murakami, P.Philippsen, H.Tettelin, and S.G.Oliver. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274:546-563.

31. Gonzalez-Baro,M.R., H.Garda, and R.Pollero. 2000. Effect of fenitrothion on dipalmitoyl and 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* 1468:304-310.

32. Grossmann,G., J.Malinsky, W.Stahlschmidt, M.Loibl, I.Weig-Meckl, W.B.Frommer, M.Opekarova, and W.Tanner. 2008. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J. Cell Biol.* 183:1075-1088.

33. Grossmann,G., M.Opekarova, J.Malinsky, I.Weig-Meckl, and W.Tanner. 2007. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *Embo J.* 26:1-8.

34. Grossmann,G., M.Opekarova, L.Novakova, J.Stolz, and W.Tanner. 2006. Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 5:945-953.

35. Guan,X.L., C.M.Souza, H.Pichler, G.Dewhurst, O.Schaad, K.Kajiwara, H.Wakabayashi, T.Ivanova, G.A.Castillon, M.Piccolis, F.Abe, R.Loewith, K.Funato, M.R.Wenk, and H.Riezman. 2009. Functional Interactions between Sphingolipids and Sterols in Biological Membranes Regulating Cell Physiology. *Mol. Biol. Cell* 20:2083-2095.

36. Guan,X.L. and M.R.Wenk. 2006. Mass spectrometry-based profiling of phospholipids and sphingolipids in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23:465-477.

37. Guillen,J., R.F.M.de Almeida, M.Prieto, and J.Villalain. 2009. Interaction of a peptide corresponding to the loop domain of the S2 SARS-CoV virus protein with model membranes. *Mol. Membr. Biol.* 26:236-248.

38. Hauss,T., S.Dante, N.A.Dencher, and T.H.Haines. 2002. Squalane is in the midplane of the lipid bilayer: implications for its function as a proton permeability barrier. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* 1556:149-154.

39. Heerklotz,H. 2002. Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys. J.* 83:2693-2701.

40. Heese-Peck,A., H.Pichler, B.Zanolari, R.Watanabe, G.Daum, and H.Riezman. 2002. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 13:2664-2680.

41. Hofman,E.G., M.O.Ruonala, A.N.Bader, D.van den Heuvel, J.Voortman, R.C.Roovers, A.J.Verkleij, H.C.Gerritsen, and P.M.P.V.Henegouwen. 2008. EGF induces coalescence of different lipid rafts. *J. Cell Sci.* 121:2519-2528.

42. Hudson,B. and S.Cavalier. 1988. Studies of Membrane Dynamics and Lipid-Protein Interaction with Parinaric Acid. *In* Spectroscopic Membrane Probes. M.Loew, editor. Boca Raton, USA. 43-62.

43. Iwaki,T., H.Iefuji, Y.Hiraga, A.Hosomi, T.Morita, Y.Giga-Hama, and K.Takegawa. 2008. Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* 154:830-841.

44. Jin,H., J.M.McCaffery, and E.Grote. 2008. Ergosterol promotes pheromone signaling and plasma membrane fusion in mating yeast. *J. Cell Biol.* 180:813-826.

45. Joshi,A.S., J.M.Zhou, V.M.Gohil, S.L.Chen, and M.L.Greenberg. 2009. Cellular functions of cardiolipin in yeast. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1793:212-218.

46. Kaiser,R.D. and E.London. 1998. Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: Comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry* 37:8180-8190.

47. Konopasek,I., J.Vecer, K.Strzsalka, and E.Amler. 2004. Short-lived fluorescence component of DPH reports on lipid-water interface of biological membranes. *Chem. Phys. Lipids* 130:135-144.

48. Kraft,M.L., P.K.Weber, M.L.Longo, I.D.Hutcheon, and S.G.Boxer. 2006. Phase separation of lipid membranes analyzed with high-resolution secondary ion mass spectrometry. *Science* 313:1948-1951.

49. Kubista,M., R.Sjoback, S.Eriksson, and B.Albinsson. 1994. Experimental Correction for the Inner-Filter Effect in Fluorescence-Spectra. *Analyst* 119:417-419.

50. Kusumi,A., Y.Sako, and M.Yamamoto. 1993. Confined Lateral Diffusion of Membrane-Receptors As Studied by Single-Particle Tracking (Nanovid Microscopy) - Effects of Calcium-Induced Differentiation in Cultured Epithelial-Cells. *Biophys. J.* 65:2021-2040.

51. Lakowicz,J.R. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer Science, New York, USA.

52. Langmuir,I. 1917. The shapes of group molecules forming the surfaces of liquids. *Natl Acad. Sci.* 3:251-257.

53. Lees,N.D., M.Bard, and D.R.Kirsch. 1997. Biochemistry and Molecular Biology of Sterol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *In* Biochemistry and Function of Sterols. E.J.Parish and W.D.Nes, editors. CRC Press LLC, Boca Raton, FL. 85-98.

54. Lentz,B.R. 1988. Membrane "Fluidity" from Fluorescent Anisotropy Measurements. *In* Spectroscopic Membrane Probes. Loew,ML, Boca Raton, USA. 13-41.

55. Lodish,H., A.Berk, L.S.Zipursky, P.Matsudaira, D.Baltimore, and J.Darnell. 2000. Molecular Cell Biology. W.H.Freeman and Company, New York, USA.

56. Malinska,K., J.Malinsky, M.Opekarova, and W.Tanner. 2003. Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell* 14:4427-4436.

57. Malinska,K., J.Malinsky, M.Opekarova, and W.Tanner. 2004. Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J. Cell Sci.* 117:6031-6041.

58. Marguet,D., P.F.Lenne, H.Rigneault, and H.T.He. 2006. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J.* 25:3446-3457.

59. Marquardt,D.W. 1963. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11:431-441.

60. Marsh,D. 1990. Handbook of lipid bilayers. CRC Press, Boca Raton, FL.

61. Mateo,C.R., J.C.Brochon, M.P.Lillo, and A.U.Acuna. 1993. Lipid Clustering in Bilayers Detected by the Fluorescence Kinetics and Anisotropy of Trans-Parinaric Acid. *Biophys. J.* 65:2237-2247.

62. Mateo,C.R., M.P.Lillo, J.Gonzalezrodriguez, and A.U.Acuna. 1991. Molecular Order and Fluidity of the Plasma-Membrane of Human Platelets from Time-Resolved Fluorescence Depolarization. *Eur. Biophys. J.* 20:41-52.

63. Maxfield,F.R. 2002. Plasma membrane microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:483-487.

64. Megha,M., O.Bakht, and E.London. 2006. Cholesterol precursors stabilize ordinary and ceramide-rich ordered lipid domains (lipid rafts) to different degrees - Implications for the bloch hypothesis and sterol biosynthesis disorders. *J. Biol. Chem.* 281:21903-21913.

65. Moreira,K.E., T.C.Walther, P.S.Aguilar, and P.Walter. 2009. Pil1 Controls Eisosome Biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 20:809-818.

66. Morsomme,P., C.W.Slayman, and A.Goffeau. 2000. Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H+-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Biomembranes* 1469:133-157.

67. Mukhopadhyay,K., A.Kohli, and R.Prasad. 2002. Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3695-3705.

68. Nelson,D.L. and M.M.Cox. 2005. Lehninger, Principles of Biochemistry. W.H.Freeman and Company, New York, USA.

69. Obeid,L.M., Y.Okamoto, and C.Mao. 2002. Yeast sphingolipids: metabolism and biology. *Biochim. Biophys. Acta* 1585:163-171.

70. Opekarova,M., K.Malinska, L.Novakova, and W.Tanner. 2005. Differential effect of phosphatidylethanolamine depletion on raft proteins: further evidence for diversity of rafts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1711:87-95.

71. Parks,L.W. and W.M.Casey. 1995. Physiological Implications of Sterol Biosynthesis in Yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:95-116.

72. Patton,J.L. and R.L.Lester. 1991. The Phosphoinositol Sphingolipids of *Saccharomyces Cerevisiae* Are Highly Localized in the Plasma-Membrane. *J. Bacteriol.* 173:3101-3108.

73. Pedroso, N. Papel da Membrana Plasmática na adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* ao H_2O_2. 2008. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.

74. Pedroso,N., A.C.Matias, L.Cyrne, F.Antunes, C.Borges, R.Malhó, R.F.de Almeida, E.Herrero, and H.S.Marinho. 2009. Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H_2O_2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.* 46:289-298.

75. Petersen,N.O. 1985. Intramolecular Fluorescence Energy-Transfer in Nitrobenzoxadiazole Derivatives of Polyene Antibiotics. *Can. J. Chem.* 63:77-85.

76. Pomorski,T., J.C.M.Holthuis, A.Herrmann, and G.van Meer. 2004. Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J. Cell Sci.* 117:805-813.

77. Prendergast,F.G., R.P.Haugland, and P.J.Callahan. 1981. 1-[4-(Trimethylamino)Phenyl]-6-Phenylhexa-1,3,5-Triene - Synthesis, Fluorescence Properties, and Use As A Fluorescence Probe of Lipid Bilayers. *Biochemistry* 20:7333-7338.

78. Quinn,P.J. and C.Wolf. 2009. The liquid-ordered phase in membranes. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* 1788:33-46.

79. Ragoonanan,V., J.Malsam, D.R.Bond, and A.Aksan. 2008. Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of Geobacter sulfurreducens. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1778:2283-2290.

80. Rodriguez,R.J., C.Low, C.D.Bottema, and L.W.Parks. 1985. Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 837:336-343.

81. Schneiter,R., B.Brugger, R.Sandhoff, G.Zellnig, A.Leber, M.Lampl, K.Athenstaedt, C.Hrastnik, S.Eder, G.Daum, F.Paltauf, F.T.Wieland, and S.D.Kohlwein. 1999. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 146:741-754.

82. Schroeder,F. 1983. Lipid Domains in Plasma-Membranes from Rat-Liver. *Eur. J. Biochem.* 132:509-516.

83. Schroeder,F., I.E.Goetz, and E.Roberts. 1984. Membrane Anomalies in Huntingtons-Disease Fibroblasts. *J. Neurochem.* 43:526-539.

84. Schulthess,G. and H.Hauser. 1995. A Unique Feature of Lipid Dynamics in Small-Intestinal Brush-Border Membrane. *Mol. Membr.Biol.* 12:105-112.

85. Schulz,T.A. and W.A.Prinz. 2007. Sterol transport in yeast and the oxysterol binding protein homologue (OSH) family. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. L.* 1771:769-780.

86. Sharma,S.C. 2006. Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Res.* 6:1047-1051.

87. Sherman,F. 2002. Getting started with yeast. ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO.

88. Simon,S.A. and T.J.Mcintosh. 1984. Interdigitated Hydrocarbon Chain Packing Causes the Biphasic Transition Behavior in Lipid Alcohol Suspensions. *Biochim. Biophys. Acta* 773:169-172.

89. Simons,K. and E.Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.

90. Simons,K. and D.Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31-39.

91. Sklar,L.A., B.S.Hudson, M.Petersen, and J.Diamond. 1977. Conjugated Polyene Fatty-Acids on Fluorescent-Probes - Spectroscopic Characterization. *Biochemistry* 16:813-819.

92. Smith,S.J., J.H.Crowley, and L.W.Parks. 1996. Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16:5427-5432.

93. Sousa-Lopes,A., F.Antunes, L.Cyrne, and H.S.Marinho. 2004. Decreased cellular permeability to H_2O_2 protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Letters* 578:152-156.

94. Suppan,P. and N.Ghoneim. 1997. Solvatochromism. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

95. Swain,E., K.Baudry, J.Stukey, V.McDonough, M.Germann, and J.T.Nickels. 2002. Sterol-dependent regulation of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277:26177-26184.

96. Toulmay,A. and R.Schneiter. 2007. Lipid-dependent surface transport of the proton pumping ATPase: A model to study plasma membrane biogenesis in yeast. *Biochimie* 89:249-254.

97. Tyurina,Y.Y., V.A.Tyurin, S.X.Liu, C.A.Smith, A.A.Shvedova, N.F.Schor, and V.E.Kagan. 2002. Phosphatidylserine Peroxidation During Apoptosis: *A signaling pathway for phagocyte clearance*. *In* Phospholipid Metabolism in Apoptosis. P.J.Quinn and V.E.Kagan, editors. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. 79-96.

98. Umebayashi,K. and A.Nakano. 2003. Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* 161:1117-1131.

99. Valeur,B. 2001. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

100. van der Rest,M.E., A.H.Kamminga, A.Nakano, Y.Anraku, B.Poolman, and W.N.Konings. 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59:304-322.

101. van Meer,G., D.R.Voelker, and G.W.Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:112-124.

102. Veatch,S.L. and S.L.Keller. 2005. Seeing spots: Complex phase behavior in simple membranes. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1746:172-185.

103. Vierl,U., L.Lobbecke, N.Nagel, and G.Cevc. 1994. Solute Effects on the Colloidal and Phase Behavior of Lipid Bilayer Membranes Ethanol Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures. *Biophys. J.* 67:1067-1079.

104. Vilella,F., E.Herrero, J.Torres, and M.de la Torre-Ruiz. 2005. Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 280:9149-9159.

105. Walther,T.C., J.H.Brickner, P.S.Aguilar, S.Bernales, and P.Walter. 2006. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439:998-1003.

106. Watanabe,R., K.Funato, K.Venkataramam, A.H.Futerman, and H.Riezman. 2002. Sphingolipids are required for the stable membrane association of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast. *J. Biol. Chem.* 277:49538-49544.

107. Welti,R., D.A.Rintoul, F.Goodsaid-Zalduondo, S.Felder, and D.F.Silbert. 1981. Gel phase phospholipid in the plasma membrane of sterol-depleted mouse LM cells. Analysis by fluorescence polarization and x-ray diffraction. *J. Biol. Chem.* 256:7528-7535.

108. Wolf,D.E. 1995. Lipid Domains in Sperm Plasma-Membranes. *Mol. Membr. Biol.* 12:101-104.

109. Zhong,Q. and M.L.Greenberg. 2005. Deficiency in mitochondrial anionic phospholipid synthesis impairs cell wall biogenesis. *Biochem. Soc. T.* 33:1158-1161.

110. Zinser,E., C.D.Sperka-Gottlieb, E.V.Fasch, S.D.Kohlwein, F.Paltauf, and G.Daum. 1991. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 173:2026-2034.

111. Zsila,F. and Z.Bikadi. 2005. *trans*-Parinaric acid as a versatile spectroscopic label to study ligand binding properties of bovine beta-lactoglobulin. *Spectrochim. Acta A* 62:666-672.