

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Estudo da Regulação da Expressão do Sintase de  
Ácidos Gordos de *Saccharomyces cerevisiae* na  
Aquisição de Resistência ao Peróxido de Hidrogénio**

**Andreia Filipa Pereira Cepeda**

Mestrado em Bioquímica  
Especialização em Bioquímica Médica

2010



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Estudo da Regulação da Expressão do Sintase de  
Ácidos Gordos de *Saccharomyces cerevisiae* na  
Aquisição de Resistência ao Peróxido de Hidrogénio**

**Andreia Filipa Pereira Cepeda**

Mestrado em Bioquímica  
Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Luisa Cyrne

2010

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA .....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. O sintase de ácidos gordos (FAS) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>1</b>
I.1.1. Organização e função do FAS .....	2
I.1.2. Regulação da expressão dos genes <i>FAS1</i> e <i>FAS2</i> .....	4
I.1.2.1. Regulação a nível transcricional dos genes <i>FAS1</i> e <i>FAS2</i> .....	5
I.1.2.2. O elemento UAS <sub>INO</sub> e a biossíntese de fosfolípidos.....	7
I.1.2.3. Inositol como principal efector da regulação da expressão dos genes que contêm o elemento UAS <sub>INO</sub> .....	10
I.1.2.4. Inositol – derivados e fontes .....	12
<b>I.2. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo biológico .....</b>	<b>14</b>
<b>I.3. O peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o <i>stress</i> oxidativo .....</b>	<b>16</b>
I.3.1. O H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como indutor de <i>stress</i> oxidativo.....	16
I.3.2. O estado estacionário de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como indutor de <i>stress</i> oxidativo .....	18
I.3.3. A adaptação ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em <i>S. cerevisiae</i> .....	20
I.3.4. A regulação da expressão génica em condições de adaptação ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em estado estacionário .....	22
<b>II. OBJECTIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>III.1. Materiais .....</b>	<b>27</b>
<b>III.2. Material biológico .....</b>	<b>27</b>
<b>III.3. Métodos Experimentais.....</b>	<b>28</b>
III.3.1. Condições de Crescimento .....	28
III.3.2. Curvas de Crescimento.....	29
III.3.3. Determinação das constantes de consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pelas células .....	29
III.3.4. Adaptação das células a 150 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em estado estacionário .....	30
III.3.5. Translocação do factor nuclear GFP-Opi1p.....	31
III.3.5.1. Obtenção dos transformantes <i>opi1Δ</i> + GFP-Opi1p .....	31
III.3.5.2. Visualização da translocação por Microscopia de fluorescência .....	31

III.3.6.	Quantificação dos níveis de fosfolípidos totais em células controlo e tratadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , por Cromatografia em camada fina bidimensional .....	32
III.3.6.1.	Extracção dos lípidos totais.....	32
III.3.6.2.	Separação dos lípidos por TLC bidimensional .....	33
III.3.6.3.	Quantificação dos fosfatos.....	33
III.3.7.	Quantificação dos extractos proteicos pelo Método de Peterson .....	34
III.3.8.	PCR quantitativo em tempo real ( <i>Real-time Q-PCR</i> ) .....	35
III.3.8.1.	Preparação do RNA total da levedura <i>S. cerevisiae</i> .....	36
III.3.8.2.	Tratamento com DNase I .....	36
III.3.8.3.	Amplificação de uma sequência de ácidos nucleicos por PCR.....	37
III.3.8.4.	Síntese da primeira cadeia de cDNA usando RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas) .....	38
III.3.8.5.	Análise por PCR quantitativo em tempo real ( <i>Real-time Q-PCR</i> ).....	38
III.3.9.	Doseamento do Inositol Intracelular.....	40
III.3.9.1.	Obtenção de extractos totais .....	40
III.3.9.2.	Tratamento do extracto celular .....	41
III.3.9.2.1.	Precipitação da proteína .....	41
III.3.9.2.2.	Cromatografia de Troca Iónica.....	41
III.3.9.2.3.	Liofilização.....	42
III.3.9.2.4.	Remoção da interferência da glucose .....	42
III.3.9.3.	Método enzimático espectrofotométrico de doseamento do inositol.....	42
III.3.10.	Análise estatística.....	44
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>IV.1.</b>	<b>Translocação nuclear do factor GFP-Opi1p.....</b>	<b>45</b>
IV.1.1.	Caracterização das estirpes <i>wt</i> , <i>opi1Δ</i> e <i>opi1Δ</i> + GFP-Opi1p .....	46
IV.1.2.	Optimização das condições para estabelecer o estado estacionário de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ....	49
IV.1.2.1.	Actividade do enzima glucose oxidase.....	49
IV.1.2.2.	Consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pelas células intactas .....	49
IV.1.2.3.	Cálculo dos volumes de glucose oxidase e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para estabelecer o Estado Estacionário de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	51
IV.1.3.	Visualização da translocação nuclear do factor GFP-Opi1p por microscopia de fluorescência .....	51
<b>IV.2.</b>	<b>Quantificação dos níveis de fosfolípidos totais por TLC bidimensional .....</b>	<b>55</b>
<b>IV.3.</b>	<b>Quantificação de diversos transcritos regulados pelo inositol por PCR quantitativo em tempo real.....</b>	<b>59</b>

<b>IV.4. Determinação dos níveis de inositol em células controlo e tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</b>	<b>66</b>
IV.4.1. Optimização do Método de Doseamento .....	66
IV.4.2. Curva de Calibração do Método Espectrofotométrico .....	69
IV.4.3. Medição dos níveis intracelulares de inositol em células controlo e adaptadas a 150 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	69
<b>V. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>72</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Luisa Cyrne pela transmissão de conhecimentos e experiência científica, e pela confiança que demonstrou no meu trabalho. Agradeço pela capacidade de estar sempre presente, por contribuir para o meu desenvolvimento intelectual e pela disponibilidade para esclarecer as dúvidas sempre que necessário.

À Prof. Dra. Susana Marinho e ao Prof. Dr. Fernando Antunes por contribuírem com sugestões e discussões para o desenvolvimento do trabalho e pela ajuda prestada.

A todos os colegas do Grupo da Bioquímica de Oxidantes e Antioxidantes, pelo bom ambiente de trabalho, pela boa disposição e pelas brincadeiras que me faziam esquecer qualquer dia difícil.

À minha família e amigos, em particular:

Aos meus pais e irmã, pelo apoio e paciência demonstrados, e por compreenderem a dedicação exclusiva necessária a este trabalho.

À Rita, sem a qual não teria conseguido ultrapassar mais esta etapa. Obrigada pelo apoio, pela infinita paciência e por estares sempre presente!

À Filipa, que se tornou uma grande amiga e confidente nos momentos em que me sentia num beco sem saída.

E por último mas não menos importante, ao Juan pela boa disposição, pelo companheirismo, pelo apoio incondicional e por se ter revelado um amigo para a vida. Obrigada por tudo!

## LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

A nomenclatura relativa à levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada ao longo do trabalho teve por base as normas presentes na literatura (Cherry, 1995):

Estirpe selvagem – *wt* (*wild type*)

Gene – *OPI1*

Proteína – Opi1p

Estirpe mutante – *opi1Δ*

3P-PI – 3-fosfato fosfoinositol

Abs<sub>x nm</sub> – Absorvência a x nm

ATP – Trifosfato de adenosina

ATP-2Na – Trifosfato de adenosina disódico

bHLH – do inglês *basic Helix-Loop-Helix*

BrEt – Brometo de etídeo

BSA – do inglês *Bovine Serum Albumin*, albumina de soro bovino

CL – Cardiolipina

CDP – Difosfato de citidina

CDP-DAG – CDP-diacilglicerol

CTP – Trifosfato de citidina

Da – Dalton

DAG – Diacilglicerol

DAGPP - Pirofosfato de diacilglicerol

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase I – Desoxirribonuclease I

dNTP – Desoxirribonucleótido

dsDNA – do inglês *double stand DNA*

EROs – Espécies Reactivas de Oxigénio

FAS – do inglês *Fatty Acid Synthase*, sintase de ácidos gordos

G6PDH – 6-fosfato de glucose desidrogenase, o mesmo que ZWF1

GO – Glucose oxidase

GPx – Glutathione peroxidase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogénio

HO• – Radical hidroxilo



INT – Cloreto de iodonitrotetrazólio  
 IPC – Inositol fosfoceramida  
 MI – Mio-inositol  
 MIDH – Mio-inositol desidrogenase  
 MIPC – Manosilinositol fosfoceramida  
 M(IP)<sub>2</sub>C – Manosildiinositol fosfoceramida  
 mRNA – RNA mensageiro  
 NAD<sup>+</sup> – Dinucleótido de adenina e nicotinamida (forma oxidada)  
 NADH – Dinucleótido de adenina e nicotinamida (forma reduzida)  
 NADPH – Fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida (forma reduzida)  
 O<sub>2</sub> – Oxigénio molecular  
 O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Radical anião superóxido  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – Dioxigénio singleto  
 OD<sub>600</sub> – Densidade óptica a 600 nm  
 ONOO<sup>•</sup> – Peroxinitrito  
 PA – Ácido fosfatídico  
 pb – pares de bases  
 PC – Fosfatidilcolina  
 PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*  
 PDE ou PDME – Fosfatidildimetiletanolamina  
 PE – Fosfatidiletanolamina  
 PEG - Polietilenoglicol  
 PG – Fosfatidilglicerol  
 Pi – Fósforo inorgânico  
 PI – Fosfatidilinositol  
 PIP – 4-fosfato fostatidilinositol  
 PIP<sub>2</sub> ou PI(4,5)P<sub>2</sub> – 4,5-bifosfato de fostatidilinositol  
 PI(3,5)P<sub>2</sub> – 3,5-bifosfato de fostatidilinositol  
 PME ou PMME – Fosfatidilmonometiletanolamina  
 PMSF – Fluoreto dfenilmetilsuonilo  
 PS – Fosfatidilserina  
 RNA – Ácido ribonucleico  
 RNase – Ribonuclease  
 RO<sup>•</sup> – Radical alcóxido  
 ROO<sup>•</sup> – Radical peróxido

ROOH – Hidroperóxidos orgânicos

SC – do inglês *Synthetic Complete*, Sintético Completo

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SOD – Superóxido dismutase

ssDNA – do inglês *single stand DNA*, DNA de cadeia simples

TAG – Triacilglicerol

TFK – Tampão de fosfatos de potássio

TLC – do inglês *Thin Layer Chromatography*, Cromatografia em Camada Fina

Tris – Tris-hidroximetilaminometano

UAS<sub>INO</sub> – do inglês *inositol-sensitive upstream activating sequence*

UV – Ultravioleta

VLCFA – do inglês *Very Long Chain Fatty Acids*, Ácidos gordos de cadeia muito longa

YNB – do inglês *Yeast Nitrogen Base*

ZWF1 – ver G6PDH

## RESUMO

A exposição das células de *Saccharomyces cerevisiae* a doses sub-letais de  $H_2O_2$  torna-as mais resistentes a doses letais posteriores, ocorrendo alterações na permeabilidade da membrana plasmática. As células adaptadas ao  $H_2O_2$  apresentam uma menor expressão do gene *FAS1* e uma diminuição da actividade do sintase de ácidos gordos. O *FAS1* é regulado pelos níveis de inositol, possuindo a sequência  $UAS_{INO}$  na região promotora, sendo a expressão reprimida quando o inositol aumenta intracelularmente. Na tentativa de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do gene *FAS1* pelo  $H_2O_2$ , tomou-se como premissa que o  $H_2O_2$  reprime a expressão do gene *FAS1* através da indução dos níveis de inositol. Determinaram-se os níveis de inositol em células *wt* controlo e tratadas com 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário (10 min e 20 min), observando-se uma diminuição drástica destes níveis nas células tratadas, contrariando a hipótese inicial. Contudo, expondo células *opi1 $\Delta$*  + GFP-Opi1p ao  $H_2O_2$  nas mesmas condições, observou-se a translocação máxima da proteína Opi1p do retículo endoplasmático para o núcleo aos 20 min, de acordo com o mecanismo de regulação pelo inositol. Para apoiar a hipótese, quantificaram-se os fosfolípidos cuja síntese é regulada pelo inositol e analisou-se a expressão de alguns genes cujo produto regula essa síntese. Não foram observadas diferenças significativas na composição fosfolipídica total durante a exposição ao  $H_2O_2$ , excepto uma tendência para um aumento de fosfatidiletanolamina aos 5 min e uma diminuição aos 10 min, e um aumento dos níveis de fosfatidilcolina aos 20 min. O  $H_2O_2$  reprimiu (*INM1*, *INO2*, *CHO1*, *URA7* e *PIS1*) e induziu (*GPT2*) a expressão de vários genes da síntese de fosfolípidos. A expressão de *INO1* foi oscilatória, sendo induzida e reprimida aos 20 e 40 min, respectivamente. A expressão de *ITR1* foi reprimida logo aos 10 min. Estes resultados apoiam a existência nas células de levedura de uma resposta coordenada da expressão de genes envolvidos na biossíntese de fosfolípidos e ácidos gordos ao  $H_2O_2$ .

**Palavras-chave:** Peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), *FAS1*, inositol, Opi1p,  $UAS_{INO}$ , fosfolípidos.

## ABSTRACT

The exposure of *Saccharomyces cerevisiae* cells to sub-lethal doses of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> makes them more resistant to additional exposure to lethal doses, and induces changes in the plasma membrane permeability. Cells adapted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> show a decreased expression of the *FAS1* gene and a decreased activity of fatty acid synthase. *FAS1* is regulated by inositol levels, having a UAS<sub>INO</sub> sequence in its promoter region. *FAS1* expression is repressed when intracellular inositol is increased. To understand the molecular mechanisms of *FAS1* regulation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, it was hypothesized that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> represses *FAS1* expression through the induction of inositol levels. The levels of inositol in *wt* cells exposed to steady-state 150 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 min and 20 min) were determined, and a dramatic decrease in those levels in the treated cells was observed, contradicting the original hypothesis. However, when *opi1Δ* + GFP-Opi1p cells were exposed to the same H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conditions, a maximal translocation of Opi1p from the endoplasmic reticulum to the nucleus at 20 min was observed, which is in accordance with a regulatory role for inositol. In order to support the original hypothesis, phospholipids, whose synthesis is regulated by inositol, as well as the levels of expression of some genes whose products regulate that synthesis, were quantified. No significant differences were found in cellular phospholipid composition due to exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with the exception of a trend for increased phosphatidylethanolamine levels at 5 min and decreased levels at 10 min, and an increased phosphatidylcholine levels at 20 min. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> repressed (*INM1*, *INO2*, *CHO1*, *URA7* e *PIS1*) and induced (*GPT2*) the expression of several genes involved in phospholipid biosynthesis. The expression of *INO1* was oscillatory, being induced and repressed at 20 and 40 min, respectively. *ITR1* expression was immediately repressed at 10 min. These results support the existence in yeast cells of a coordinated response in the expression of genes involved in phospholipid and fatty acid biosynthesis to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Keywords:** hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), *FAS1*, inositol, Opi1p, UAS<sub>INO</sub>, phospholipids.

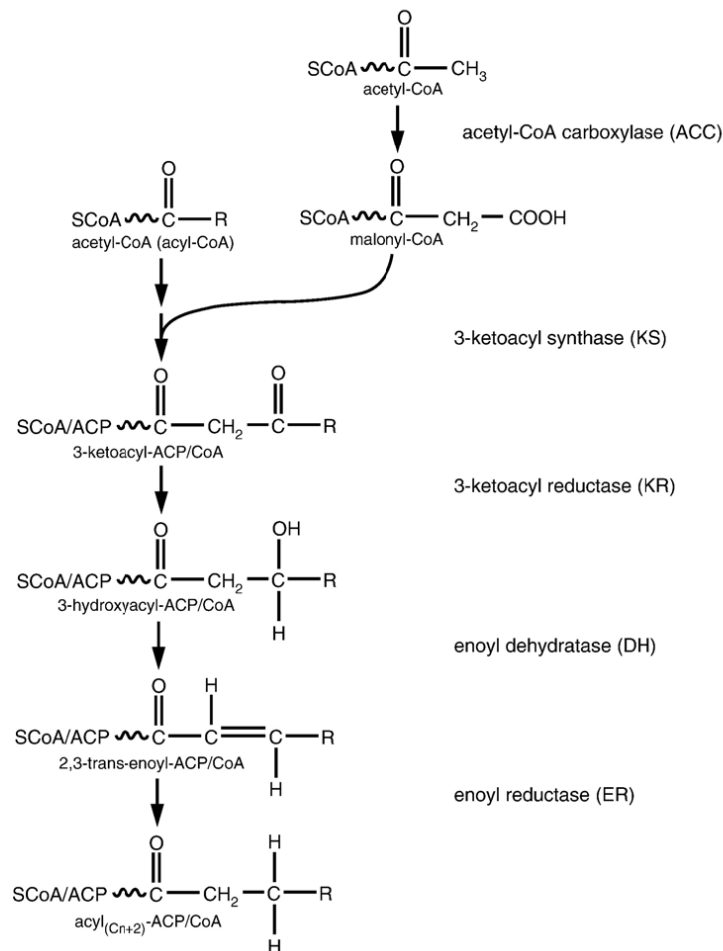
# I. INTRODUÇÃO

## I.1. O sintase de ácidos gordos (FAS) de *Saccharomyces cerevisiae*

Os ácidos gordos são compostos celulares essenciais, que apesar de apresentarem uma estrutura simples, apresentam funções biológicas muito diversas: (i) são essenciais à constituição das bicamadas lipídicas que são a base da compartimentalização subcelular; (ii) constituem uma forma de armazenamento de energia; (iii) alguns servem de precursores a compostos biológicos mais activos podendo, portanto, desempenhar funções de sinalização (Schweizer and Hofmann, 2004). São constituídos por um grupo carboxilo numa das extremidades da molécula, ligado a uma longa cadeia alifática que varia em tamanho (4 a 36 átomos de carbono) e grau de saturação (Nelson and Cox, 2004).

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, os ácidos gordos apresentam a particularidade de não existirem sob a forma de cadeias polinsaturadas (excepto em meios suplementados), sendo encontrados apenas ácidos gordos saturados e monoinsaturados. O espectro de ácidos gordos em *S. cerevisiae* é simples consistindo, principalmente, em ácidos gordos de 16 e 18 carbonos. O ácido palmítico (16:0), o ácido palmitoleico (16:1) e o ácido oleico (18:1) são os ácidos gordos de cadeia longa maioritários na membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Cipak *et al.*, 2006; Tehlivets *et al.*, 2007; Tuller *et al.*, 1999; van der Rest *et al.*, 1995).

Os ácidos gordos celulares podem ter origem em várias fontes, para além da síntese *de novo* a partir do acetil-CoA. Na levedura *S. cerevisiae* a síntese *de novo* dos ácidos gordos requer diversos enzimas de entre os quais se destacam o acetil-CoA carboxilase (ACC1, também designado por FAS3) e o sistema enzimático sintase de ácidos gordos (FAS - *fatty acid synthase*). O ACC1 catalisa a carboxilação do acetil-CoA pela adição de CO<sub>2</sub> para formar malonil-CoA, servindo este último como dador de dois carbonos numa série de reacções cíclicas catalisadas pelo sistema enzimático FAS e por elongases (Figura 1) (Tehlivets *et al.*, 2007).

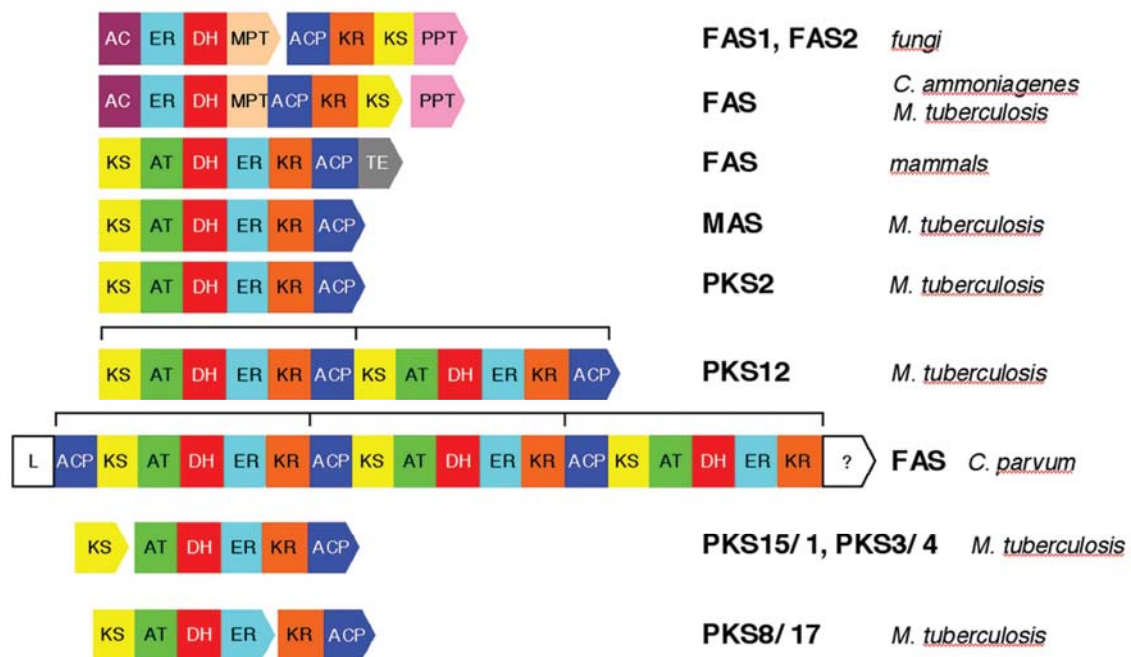


**Figura 1 – Sequência reaccional da síntese e elongação dos ácidos gordos.** ACC, Acetil-CoA carboxilase; KS, 3-oxoacil sintase; KR, 3-oxoacil redutase; DH, enoil desidratase; ER, enoil redutase. Adaptado de (Tehlivets *et al.*, 2007).

### I.1.1. Organização e função do FAS

A síntese *de novo* de ácidos gordos é levada a cabo pelo sistema enzimático FAS, que catalisa ciclos de reacções químicas com vários passos, essenciais a todos os organismos (Lomakin *et al.*, 2007). Apesar de apresentar variações estruturais consideráveis nas suas estruturas moleculares consoante o organismo, o mecanismo de reacção é essencialmente o mesmo em todos os sistemas biológicos. O sistema é composto por várias actividades enzimáticas [ac(et)il transferase (AC); malonil/acetil- ou malonil/palmitoil-transferase (AT, MPT); oxoacil sintase (KS); oxoacil redutase (KR); enoil desidratase (DH); enoil redutase (ER); acil *carrier protein* (ACP); tioesterase (TE)], havendo uma organização estrutural específica em cada organismo. As várias actividades enzimáticas podem (i) estar associadas numa única

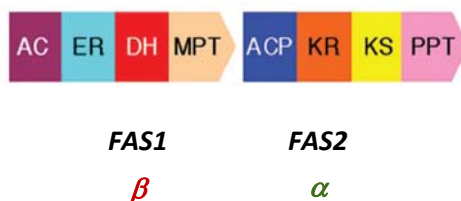
cadeia polipeptídica ou (ii) estar associadas em sistemas multienzimáticos (Figura 2). O sistema FAS difere também na sua localização subcelular consoante o organismo, podendo localizar-se não apenas no citoplasma, mas também em organelos e em membranas microssomais. Ocasionalmente, pode também ser encontrado associado a estruturas subcelulares, que subsequentemente servem de aceitadoras dos seus produtos reaccionais. De acordo com estas características, os sistemas FAS foram agrupados em 3 classes: tipo Ia, tipo Ib e tipo II (Lomakin *et al.*, 2007; Schweizer and Hofmann, 2004).



**Figura 2 – Organização dos domínios dos sistemas FAS tipo I em diversos organismos.** AC, ac(et)il transferase; AT ou MPT, malonil/acetil- ou malonil/palmitoil-transferase; KS, oxoacil sintase; KR, oxoacil redutase; DH, enoil desidratase; ER, enoil redutase; ACP, acil *carrier protein*; TE, tioesterase, PPT, fosfopanteteína transferase. Adaptado de (Schweizer and Hofmann, 2004).

A levedura *S. cerevisiae* possui um sistema multienzimático FAS tipo Ia citosólico, composto por duas subunidades, a subunidade  $\alpha$  ou Fas2 (com 207,863 kDa) e a subunidade  $\beta$  ou Fas1 (com 220,077 kDa), codificadas pelos genes *FAS2* e *FAS1*, respectivamente. Estas subunidades são proteínas multifuncionais, em que a subunidade Fas1 compreende as actividades enzimáticas acetil transferase (AC), enoil reductase (ER), enoil desidratase (DH) e malonil/palmitoil-transferase (MPT), enquanto a subunidade Fas2 é composta pelas actividades enzimáticas acil *carrier protein* (ACP), 3-oxoacil redutase (KR), 3-oxoacil sintase (KS) e fosfopanteteína transferase (PPT), como se encontra representado na Figura 3. As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  organizam-se em complexos hexaméricos  $\alpha_6\beta_6$  (6 subunidades  $\alpha$  e 6

subunidades  $\beta$ ) de massa molecular 2,5 MDa, para constituírem o sistema multienzimático FAS funcional (Kolodziej *et al.*, 1996; Schweizer and Hofmann, 2004; Tehlivets *et al.*, 2007).



**Figura 3 – Organização dos domínios do sistema FAS tipo Ia em *Saccharomyces cerevisiae*.** A subunidade  $\beta$ , que compreende as actividades AC-ER-DH-MPT, é codificada pelo gene *FAS1*; a subunidade  $\alpha$ , que compreende as actividades ACP-KR-KS-PPT, é codificada pelo gene *FAS2*. AC, acetil transferase; ER, enoil redutase; DH, enoil desidratase; MPT, malonil/palmitoil-transferase; ACP, acil carrier protein; KR, oxoacil redutase; KS, oxoacil sintase; PPT, fosfopanteteína transferase. Adaptado de (Schweizer and Hofmann, 2004).

Curiosamente, no mitocôndrio de levedura os ácidos gordos são sintetizados por um sistema FAS tipo II, em que as actividades enzimáticas individuais se encontram em polipéptidos distintos (Tehlivets *et al.*, 2007).

Na ausência de suplementação exógena de ácidos gordos o sistema FAS, composto por Fas1 e Fas2, é responsável pela síntese da maior parte dos ácidos gordos celulares. Os genes que codificam estas subunidades são essenciais para a viabilidade celular, sendo as mutações nos genes *FAS* letais em meio de crescimento não suplementado por ácidos gordos, devido à ausência de ácidos gordos de cadeia longa (Tehlivets *et al.*, 2007). A expressão dos dois genes *FAS* é reprimida na presença de ácidos gordos, levando a pensar que são regulados a nível transcrricional.

### 1.1.2. Regulação da expressão dos genes *FAS1* e *FAS2*

As subunidades Fas1 e Fas2 estão presentes em quantidades equimolares no complexo  $\alpha_6\beta_6$ , sugerindo uma regulação coordenada dos genes *FAS1* e *FAS2*. No entanto, foi observado que a quantidade do holoenzima FAS é determinada pelos níveis da proteína Fas1, e que o conteúdo desta proteína é controlado ao nível da expressão transcrricional do gene *FAS1* e da estabilidade da proteína (Tehlivets *et al.*, 2007). Por outro lado, quando o gene *FAS1* foi sobre-



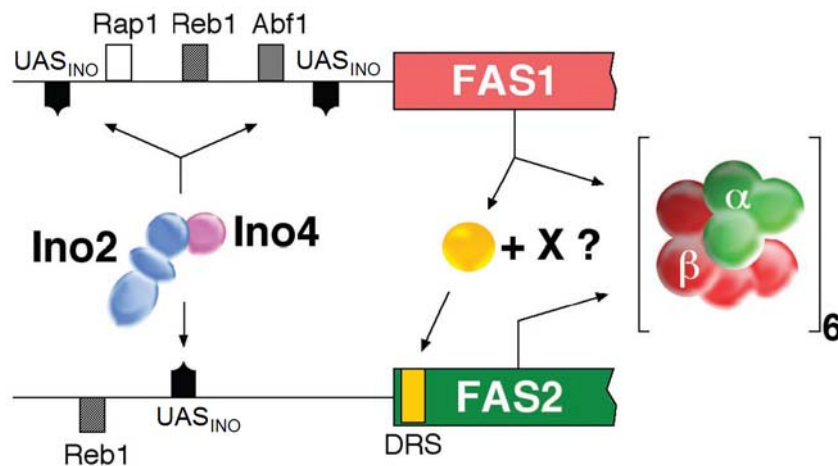
expresso observou-se um aumento concomitante dos níveis do mRNA do gene *FAS2*, enquanto os níveis do mRNA do gene *FAS2* diminuíram em células mutantes *fas1Δ*. Curiosamente, a expressão do gene *FAS1* é independente dos níveis de expressão de *FAS2* (Wenz *et al.*, 2001).

#### **I.1.2.1. Regulação a nível transcricional dos genes *FAS1* e *FAS2***

A biossíntese de sistemas multienzimáticos com uma estequiometria de subunidades bem definida exige uma expressão coordenada dos respectivos genes estruturais. Nos eucariotas, a activação de genes por sequências localizadas a montante desses genes é um mecanismo geral que assegura o balanço da produção dos respectivos polipéptidos em resposta a sinais regulatórios (Struhl, 1989). No caso da expressão dos genes *FAS1* e *FAS2* de *S. cerevisiae*, foi observado por vários autores (Chirala, 1992; Schuller *et al.*, 1992) que estes são regulados em resposta à suplementação do meio de crescimento com ácidos gordos e inositol. A deleção das regiões promotoras dos genes *FAS1* e *FAS2* revelou a existência de vários *cis-acting element* localizados a montante dos genes, apresentados na Figura 4 (Chirala, 1992; Wenz *et al.*, 2001). As regiões promotoras dos genes *FAS1* e *FAS2* apresentam locais de ligação aos factores de transcrição gerais Abf1, Reb1 e Rap1 (Chirala, 1992; Wenz *et al.*, 2001). Foi visto que a remoção destes locais da região promotora do gene *FAS1* induz uma redução em 40% na expressão da construção *FAS1-lacZ* (Chirala, 1992). Curiosamente, estas deleções reduzem a expressão do gene *FAS1* sem, no entanto, afectarem a resposta à suplementação com ácidos gordos ou inositol.

Através da deleção das regiões promotoras dos genes *FAS1* e *FAS2* foi também possível identificar uma sequência comum localizada a montante desses genes, a sequência identificada na Figura 4 por UAS<sub>INO</sub> (*inositol-sensitive upstream activating sequence*). Esta sequência UAS<sub>INO</sub> é a responsável pela resposta coordenada da expressão dos genes *FAS1* e *FAS2*, quando as células são suplementadas com os precursores lipídicos inositol e colina (Wenz *et al.*, 2001). A regulação transcricional dos genes dependentes do elemento UAS<sub>INO</sub> é mediada pelo produto dos genes *INO2* e *INO4*, os factores de transcrição com o mesmo nome (Ino2p e Ino4p, respectivamente) e que se ligam aos motivos UAS<sub>INO</sub>. Estes factores de transcrição contêm um motivo estrutural bHLH – *basic helix-loop-helix* – e ligam-se como heterodímero Ino2p-Ino4p à sequência de *consensus* WYTTCA YRTG (Schweizer and Hofmann, 2004). Esta sequência encontra-se presente nos motivos UAS<sub>INO</sub> de ambos os genes *FAS* (Schweizer and Hofmann, 2004), embora em diferente número (Figura 4). Schüller e colaboradores (Schuller *et al.*, 1992) observaram que quando o inositol e/ou a colina estão em

excesso ou em quantidades reduzidas, inibem ou activam, respectivamente, a transcrição dos genes que possuem o elemento  $UAS_{INO}$  nos seus promotores. Mais tarde foi visto que a expressão dos genes *FAS* é reprimida quando há aumento do inositol intracelular, independentemente da presença de colina (Jesch *et al.*, 2005). Para além da necessidade dos factores Ino2p e Ino4p, a repressão/activação da expressão dos genes que possuem o elemento  $UAS_{INO}$  nas suas regiões promotoras é controlada pela proteína reguladora negativa Opi1p, cuja função é determinada pela sua localização nuclear (ver I.1.2.3).



**Figura 4 – Representação e localização dos locais de regulação da expressão dos genes *FAS1* e *FAS2*.** Estão evidenciados os locais de activação da transcrição gerais (Rap1, Rep1, Abf1) e a sequência  $UAS_{INO}$ , *cis-acting elements* localizados nas regiões promotoras a montante dos genes *FAS1* e *FAS2*. Presume-se que a sequência DRS, na sequência codificante do gene *FAS2*, interage com Fas1 directamente ou em combinação com um factor X desconhecido. Abf1, Reb1 e Rap1, locais de ligação dos factores de transcrição com o mesmo nome; Ino2p e Ino4p, factores de transcrição; DRS, *Downstream Repression Site*;  $UAS_{INO}$ , *inositol-sensitive upstream activating sequence*. Adaptado de (Schweizer and Hofmann, 2004).

A presença de elementos de controlo semelhantes nas regiões promotoras dos genes *FAS1* e *FAS2* pode explicar a sua expressão coordenada. No entanto, são necessários mecanismos adicionais para assegurar o balanço exacto das duas subunidades FAS, como observado *in vivo*. Os estudos da expressão de *FAS2* numa estirpe *fas1Δ* e de *FAS1* numa estirpe *fas2Δ*, feitos por Wenz e colaboradores (Wenz *et al.*, 2001), sugerem que os dois genes não são expressos independentemente um do outro. Na verdade, a subunidade Fas1 actua como um repressor da expressão do gene *FAS2*. Usando diferentes genes repórter *FAS2-lacZ*, com diferentes sequências da região codificante do gene *FAS2*, os autores demonstraram que

a sequência DRS (*downstream repression site*) presente na região codificante do gene *FAS2* (Figura 4) era responsável por este efeito repressor. Quando se delectou a sequência DRS, houve uma desrepressão da expressão de *FAS2*, mesmo na ausência de *FAS1*. Portanto, *FAS1* obviamente interfere com o retardamento da transcrição de *FAS2* dependente de DRS. O mecanismo pelo qual isso acontece é ainda desconhecido. De acordo com o esquema hipotético apresentado na Figura 4, um excesso de subunidade  $\beta$  (codificada por *FAS1*) pode aliviar a acção de DRS tanto por interacção directa ou em associação com um factor X desconhecido. Assim, a síntese de subunidade  $\alpha$  é estimulada até um nível em que as duas subunidades estão presentes em concentrações celulares equivalentes (Schweizer and Hofmann, 2004).

Os níveis celulares de FAS estão ainda sujeitos a controlo pós-traducional. Foi demonstrada a ocorrência de degradação das subunidades FAS não associadas, por proteases vacuolares (subunidade  $\beta$ ) e citoplasmáticas (subunidade  $\alpha$ ) (Schweizer and Hofmann, 2004). Enquanto o oligómero FAS  $\alpha_6\beta_6$  é proteoliticamente estável, as suas subunidades livres são rapidamente degradadas (Han *et al.*, 2002; Kvam *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 1995).

#### **I.1.2.2. O elemento UAS<sub>INO</sub> e a biossíntese de fosfolípidos**

A membrana plasmática separa fisicamente os componentes intracelulares do ambiente extracelular, controlando a entrada e saída de compostos. A sua estrutura é regulável, podendo reorganizar-se quando sujeita a condições extracelulares adversas. De entre os componentes mais importantes das biomembranas encontram-se os fosfolípidos, estruturalmente divididos em glicerofosfolípidos e em esfingolípidos. Embora sejam estruturalmente distintos, as vias metabólicas destes dois grupos de fosfolípidos encontram-se associadas, como é possível observar na Figura 5.

A fosfatidilcolina (PC), a fosfatidiletanolamina (PE), o fosfatidilinositol (PI) e a fosfatidilserina (PS) são os principais fosfolípidos presentes nas membranas de *S. cerevisiae*. As membranas mitocondriais contêm também fosfatidilglicerol (PG) e cardiolipina (CL) (Iwanyshyn *et al.*, 2004).

O metabolismo de fosfolípidos em *S. cerevisiae* é um processo complexo que envolve regulação génica e bioquímica dos enzimas envolvidos nas suas vias de biossíntese (Carman and Zeimet, 1996). Os níveis e actividades desses enzimas são controlados a nível transcricional e de estabilidade do mRNA, afectando a expressão génica. Podem ser também

controlados por vários factores como lípidos (ex. PA, CDP-DAG), precursores lipídicos (inositol e/ou colina, etanolamina), produtos fosfolipídicos, assim como por nucleótidos (ex. ATP e CTP) e por modificações pós-traducionais (ex. (des)fosforilação). A disponibilidade de nutrientes (zinco e azoto), a fase de crescimento, o pH e a temperatura também se revelam factores importantes no processo de regulação da biossíntese dos fosfolípidos (Carman and Han, 2009b; Carman and Henry, 2007; Carman and Zeimetz, 1996; Iwanyshyn *et al.*, 2004).

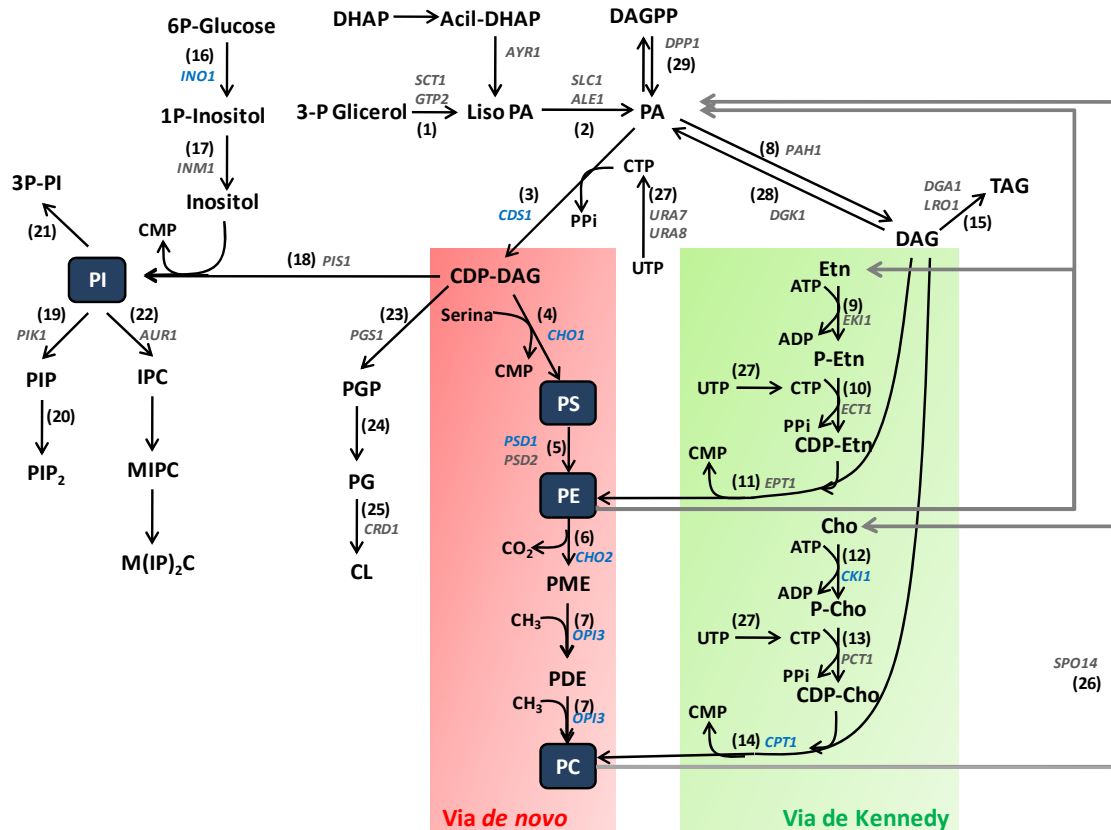
Os fosfolípidos PE e PC podem ser sintetizados por duas vias distintas: (i) a partir de CDP-diacilglicerol (CDP-DAG) pela via de síntese *de novo* (assinalada a vermelho na Figura 5), como todos os outros fosfolípidos, ou (ii) através da via metabólica de Kennedy (assinalada a verde na Figura 5) (Carman and Zeimetz, 1996).

O ácido fosfatídico (PA) assume um papel fulcral na biossíntese de fosfolípidos, não só por ser um intermediário principal, como também por desempenhar um papel ao nível da sinalização celular neste processo (Loewen *et al.*, 2004). O PA é sintetizado *de novo* a partir do 3-fosfato de glicerol (Gro-3P) que, por sua vez, é transformado em ácido lisofosfatídico (LisoPA) numa reacção catalisada pelo produto do gene *GPT2*, o enzima 3-fosfato de glicerol aciltransferase. O PA pode ainda ser formado por outras vias, tais como (i) a acilação do ácido lisofosfatídico pelo lisoPA-aciltransferase (LPAAT); (ii) via hidrólise da ligação P-O da fosfatidilcolina (PC) para produzir PA e colina, catalisada pelo fosfolipase D (codificado pelo gene *SPO14*); (iii) por fosforilação do diacilglicerol (DAG), catalisada pelo DAG cinase 1 dependente de CTP (codificado pelo gene *DGK1*); (iv) por desfosforilação do DAGPP (pirofosfato de diacilglicerol) a PA e Pi, catalisada pelo DAGPP fosfatase (codificado pelo gene *DPP1*) (Carman and Han, 2009b; Carman and Henry, 2007).

Uma via de ramificação na biossíntese de fosfolípidos envolve os enzimas PS sintase (codificado pelo gene *CHO1*) e PI sintase (codificado pelo gene *PIS1*) que catalisam a síntese de PS e PI, respectivamente, utilizando CDP-DAG como substrato. Ao contrário do que acontece com o PS sintase, a actividade do PI sintase não é regulada por precursores fosfolipídicos, fosfolípidos, bases esfingóides ou fosforilação. A partição de CDP-DAG entre PS e PI não é governada pelas afinidades que o PS sintase e o PI sintase têm para o CDP-DAG. Dados os baixos níveis intracelulares de inositol, é provável que a síntese de PI pelo PI sintase *in vivo* seja regulada pela disponibilidade deste substrato (Carman and Zeimetz, 1996).

O fosfolípido PI é um intermediário para a síntese de fosfoinositóis (PIP, PIP<sub>2</sub> e 3P-PI) e esfingolípido (IPC, MIPC e M(IP)<sub>2</sub>C), como se encontra representado Figura 5. Visto isto, a regulação das actividades enzimáticas PI 4-cinase (codificado pelo gene *PIK1*), que catalisa a conversão de PI a PIP, e IPC sintase (codificado pelo gene *AUR1*), que catalisa a conversão de PI

a IPC, podem desempenhar um papel central na partição de PI por estes lípidos (Carman and Zeimetz, 1996).

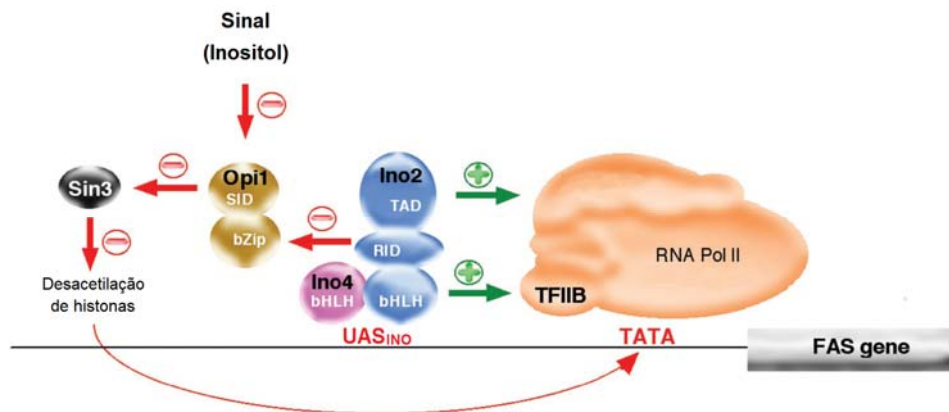


**Figura 5 – Vias biossintéticas de síntese de fosfolípidos em *S. cerevisiae*.** A via *de novo* está assinalada a vermelho e a via de Kennedy a verde. Encontram-se indicados os genes estruturais, estando evidenciados a azul os genes regulados pelo inositol. As reacções indicadas são catalisadas pelos seguintes enzimas: 1. 3-fosfato de glicerol aciltransferase; 2. lisoPA aciltransferase (LPAAT); 3. CDP-diacylglicerol sintase (CDS); 4. PS sintase (PSS); 5. PS descarboxilase (PSD); 6. PE metiltransferase (PEMT); 7. fosfolípido metiltransferase (PLMT); 8. PA fosfatase (PAP); 9. Etanolamina cinase (EK); 10. fosfoetanolamina citidiltransferase (ECT); 11. Etanolamina fosfotransferase (EPT); 12. Colina cinase; (CK); 13. fosfocolina citidiltransferase (CCT); 14. Colina fosfotransferase (CPT); 15. DAG aciltransferase (DGT); 16. 1-fosfato de inositol sintase (IPS); 17. 1-fosfato de inositol fosfatase (IPP); 18. PI sintase (PIS); 19. PI cinase (PIK); 20. PIP cinase (PIPK); 21. PI 3-cinase; 22. IPC sintase (IPCS); 23. PGP sintase (PGPS); 24. PGP fosfatase (PGPP); 25. CL sintase (CLS); 26. Fosfolipase D (PLD); 27. CTP sintase (CTPS); 28. DAG cinase 1 dependente de CTP (DGK1); 29. DAGPP fosfatase (DPP1). 6P-Glucose, 6-fosfato de glucose; 1P-Inositol, 1-fosfato de inositol; 3-P Glicerol, 3-fosfato de glicerol (Gro-3P); LisoPA, ácido lisofosfatídico; PA, Ácido fosfatídico; DAGPP, pirofosfato de diacylglicerol; DAG, Diacylglicerol; TAG, Triacylglicerol; CDP-DAG, CDP-diacylglicerol; PI, Fosfatidilinositol; PIP, 4-fosfato fosfatidilinositol; PIP<sub>2</sub>, 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol; IPC, Inositol fosfoceramida; M(IP)<sub>2</sub>C, Manosilinositol fosfoceramida; M(IP)<sub>2</sub>C, Manosildiinositol fosfoceramida; 3P-PI, 3-fosfato fosfoinositol; PG, Fosfatidilglicerol; CL, Cardiolipina; PS, Fosfatidilserina; PE, Fosfatidiletanolamina; PME, Fosfatidilmonometiletanolamina; PDE, Fosfatidildimetiletanolamina; PC, Fosfatidilcolina; Cho, Colina; Etn, Etanolamina. Adaptado de (Carman and Zeimetz, 1996; Chen *et al.*, 2007).

Na Figura 5 estão assinalados os genes que codificam enzimas envolvidos na biossíntese dos fosfolípidos. Na levedura *S. cerevisiae* a expressão desses genes é fortemente regulada, havendo uma série deles regulados pelo inositol (genes assinalados a azul) e que possuem o elemento UAS<sub>INO</sub>, responsável por essa regulação e que depende dos factores de transcrição Ino2p, Ino4p e da proteína Opi1p (Iwanyshyn *et al.*, 2004).

### I.1.2.3. Inositol como principal efector da regulação da expressão dos genes que contêm o elemento UAS<sub>INO</sub>

Na levedura *S. cerevisiae* a biossíntese de fosfolípidos dá-se de um modo coordenado com a síntese de outras classes de lípidos, nomeadamente, ácidos gordos (levada a cabo pelo sistema enzimático FAS), triacilgliceróis (TAG), esteróis e esfingolípido (Carman and Han, 2009b). Alguns dos genes envolvidos na síntese destas moléculas contêm nas suas regiões promotoras o elemento UAS<sub>INO</sub>, que é regulado pelos factores de transcrição Ino2p, Ino4p, e por Opi1p (Iwanyshyn *et al.*, 2004).



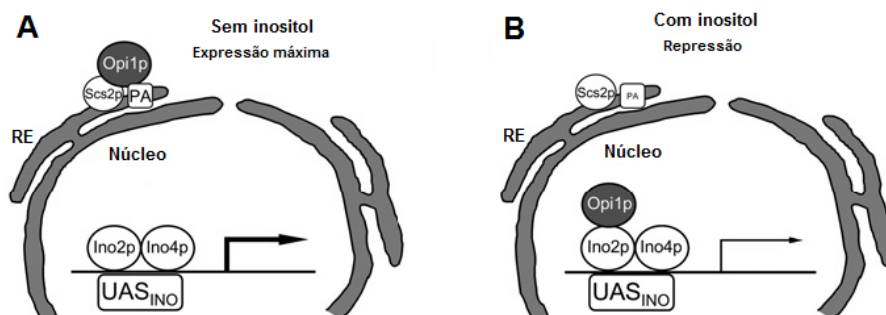
**Figura 6 – Interações regulatórias dos factores de transcrição envolvidos na expressão dos genes FAS dependente de UAS<sub>INO</sub>, em *S. cerevisiae*.** As interações que activam (a verde) ou reprimem (a vermelho) a transcrição dos genes FAS encontram-se assinaladas com diferentes cores. Sin3, *histone deacetylase complex*; Ino2p e Ino4p, factores de transcrição; RNA Pol II, RNA polimerase II; TAD, domínio de activação da transcrição; RID, domínio de interacção repressor; SID, domínio de interacção com Sin3; bHLH, *basic helix-loop-helix*; UAS<sub>INO</sub>, *inositol-sensitive upstream activating sequence*. Adaptado de (Schweizer and Hofmann, 2004).

Foi visto que quando é adicionado inositol ao meio de células em crescimento (aumento de inositol), há uma alteração profunda do padrão celular lipídico, ocorrendo uma reprogramação dramática da síntese e *turnover* dos lípidos celulares (principalmente dos lípidos membranares) (Gaspar *et al.*, 2006). Por outro lado, a adição de inositol induz a expressão de um pequeno número de genes, sendo maioritariamente um agente repressor (genes induzidos: *OPI1*, *DPP1*, *AUR1*, *INM1*; genes reprimidos: *INO1*, *PSS1/CHO1*, *CDS1*, *PSD1*, *CHO2/PEM1*, *OPI3/PEM2*, *CKI1*, *CPT1*, *FAS1*, *ITR1*, *PGS1*, *ACC1*) (Gaspar *et al.*, 2006; Jesch *et al.*, 2005). Jesch e colaboradores observaram que muitas das actividades enzimáticas envolvidas na biossíntese de fosfolípidos são reprimidas quando as células de levedura são expostas ao inositol (Jesch *et al.*, 2005). As principais alterações observadas devidas à adição de inositol ao meio de cultura foram um aumento do consumo de PA (Jesch *et al.*, 2005) e de CDP-DAG, precursores intermediários do PI, observando-se um aumento da velocidade de síntese de PI que, simultaneamente, desencadeia uma alteração na expressão de uma série de genes (Gaspar *et al.*, 2006).

A expressão sincronizada destes genes (que ocorre na ausência de inositol) requer a participação de Ino2p e Ino4p, como já foi referido. Estes dois factores ligam-se como heterodímeros à sequência UAS<sub>INO</sub> (Jesch *et al.*, 2005). Quando há um aumento dos níveis de inositol no interior da célula, o complexo Ino2p-Ino4p interage com a proteína repressora Opi1p. A proteína Opi1p, por sua vez, interage também com Sin3 (*histone deacetylase complex*), um desacetilase de histonas que provoca alterações na estrutura do DNA reprimindo a transcrição (Jesch *et al.*, 2005) (Figura 6).

O regulador negativo Opi1p, necessário à repressão dos genes que contêm as sequências UAS<sub>INO</sub>, foi localizado no retículo endoplasmático (RE) como parte de um complexo proteico do qual também faz parte a proteína Scs2p (*membrane-spanning protein*). A proteína Opi1p interage com a proteína Scs2p através de um domínio denominado FFAT, e esta interacção é necessária para a retenção da Opi1p no RE (Loewen *et al.*, 2003). No entanto, a Opi1p também se liga ao PA, que se acumula no RE como intermediário na ausência de inositol, e esta ligação é necessária em adição à interacção com Scs2p para que a Opi1p permaneça no RE (Gaspar *et al.*, 2006) (Figura 7A). Quando é adicionado inositol ao meio, os níveis de PA no RE baixam, como consequência do aumento da síntese de PI (Gaspar *et al.*, 2006). Esta diminuição dos níveis de PA é sentida directamente pela Opi1p (Jesch *et al.*, 2005), resultando na sua libertação do RE e na sua subsequente translocação para o núcleo, onde actua como repressora de vários genes alvo (Gaspar *et al.*, 2006; Jesch *et al.*, 2005) (Figura 7B). Essa translocação já foi observada por microscopia de fluorescência, recorrendo a uma estirpe

*opi1Δ* transformada com um plasmídeo que possui uma região GFP-Opi1p (Loewen *et al.*, 2004).



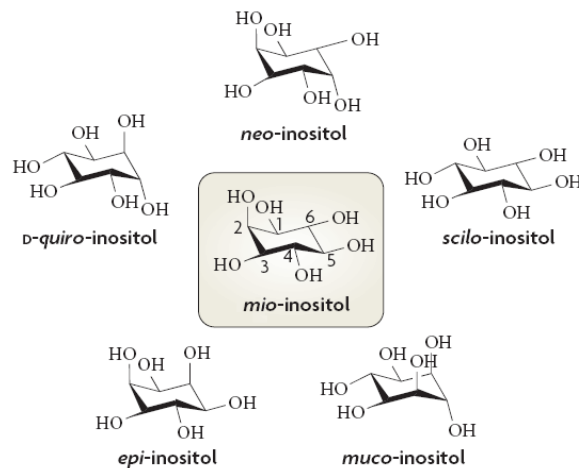
**Figura 7 – Modelo de regulação da expressão dos genes que possuem o elemento UAS<sub>INO</sub> pelo inositol, em *S. cerevisiae*.** **A.** Quando o inositol está ausente, a proteína Opi1p localiza-se no RE, associada à proteína Scs2p e ao PA, sendo os genes que possuem as sequências UAS<sub>INO</sub> nas regiões promotoras expressos. **B.** Quando o inositol está presente, os níveis de PA baixam no RE, o complexo Scs2p-Opi1p-PA é dissociado, e a proteína Opi1p é translocada para o núcleo das células, ligando-se ao heterodímero Ino2p-Ino4p nas sequências UAS<sub>INO</sub>, sendo a expressão dos genes reprimida. Scs2, *membrane-spanning protein*; PA, ácido fosfatídico; Ino2p e Ino4p, factores de transcrição; UAS<sub>INO</sub>, *inositol-sensitive upstream activating sequence*; RE, retículo endoplasmático. Adaptado de (Carman, 2005).

Tendo em consideração o que foi dito, é reconhecido o papel do inositol como factor determinante na regulação da expressão dos genes que contêm o elemento UAS<sub>INO</sub> nas suas regiões promotoras.

#### I.1.2.4. Inositol – derivados e fontes

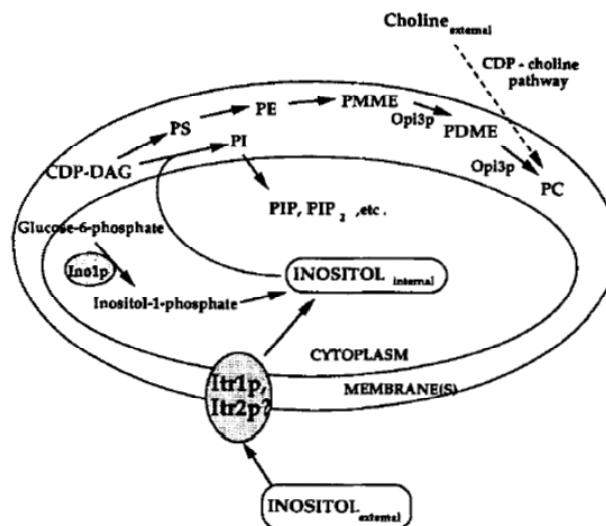
Os inositóis são as nove formas isoméricas do ciclohexanohexol, com a fórmula empírica C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>. São um grupo de moléculas polares pequenas e quimicamente muito estáveis, que têm propriedades versáteis. Dos nove inositóis encontrados na natureza, o mio-inositol (D-mio-inositol) é a forma mais abundante. Porém, cinco das outras formas (*scilo-*, *epi-*, *neo-*, *D-qui-* e *muco-*inositol) são também utilizadas mas em menor proporção (Figura 8) (Michell, 2008).





**Figura 8 – Diversidade e nomenclatura dos cinco isômeros de inositol mais comuns na natureza.** Adaptado de (Michell, 2008).

As duas principais fontes de inositol em levedura e nos eucariotas superiores são a biossíntese endógena e o *uptake* a partir do meio extracelular (Lai and McGraw, 1994), como se encontra representado na Figura 9. O inositol tem um papel central na regulação da biossíntese dos ácidos gordos e dos fosfolípidos em *S. cerevisiae* (Gaspar *et al.*, 2006; Jesch *et al.*, 2005), assim como na sua própria biossíntese endógena (Lai and McGraw, 1994) e *uptake* a partir do meio extracelular (Miyashita *et al.*, 2003).



**Figura 9 – Vias para a biossíntese de fosfolípidos, biossíntese de inositol e *uptake* de inositol em *S. cerevisiae*.** Encontra-se apresentado um esquema das vias relevantes. PE, fosfatidiletanolamina; PDME, fosfatidildimetiletanolamina; PMME, fosfatidilmonometiletanolamina; PA, ácido fosfatídico; CDP-DAG, CDP-diacilglicerol; Ino1p, 1-fosfato de inositol sintase; Itr1p e Itr2p, transportadores de inositol localizados na membrana plasmática. Adaptado de (Lai and McGraw, 1994).

A síntese *de novo* do inositol parte do 6-fosfato de glucose (G6P), sendo a reacção catalisada pelo enzima 1-fosfato de inositol sintase (Ino1p), codificado pelo gene *INO1* (Figura 9) (Lai and McGraw, 1994). Este enzima catalisa a conversão do 6-fosfato de glucose a 1-fosfato de inositol (Ins-1-P), que é depois desfosforilado a inositol, sendo esta reacção catalisada pelo enzima Inm1p, codificado pelo gene *INM1*. O gene *INO1* possui na sua região promotora a sequência UAS<sub>INO</sub> (Gaspar *et al.*, 2006) sendo, portanto, um gene regulado pelo inositol. Deste modo, tanto a actividade deste enzima como a expressão do gene *INO1* são reprimidas quando o inositol está presente no meio de crescimento (Lai and McGraw, 1994).

O inositol pode ainda ser incorporado na célula a partir do meio extracelular (Figura 9) por intermédio de transportadores. A levedura *S. cerevisiae* possui dois transportadores de inositol do meio extracelular para o meio intracelular, as proteínas Itr1p e Itr2p, que se encontram na membrana plasmática e que são codificadas pelos genes *ITR1* e *ITR2*, respectivamente (Lai and McGraw, 1994; Miyashita *et al.*, 2003). Tanto a actividade como a regulação destes transportadores são muito diferentes em células tipo selvagem (*wt*). O transportador principal é a proteína Itr1p, sendo Itr2p um transportador secundário, dado que a deleção do gene *ITR2* não provoca uma alteração dramática da actividade de transporte de inositol. Já a deleção de ambos os genes elimina totalmente o transporte de inositol, o que indica que as proteínas Itr1p e Itr2p são os únicos transportadores de inositol. Por outro lado, a localização dos transportadores na membrana plasmática é regulada pela presença de inositol. Foi demonstrado que após a adição de inositol ao meio de cultura há um aumento drástico da velocidade de degradação dos transportadores, diminuindo assim o *uptake* do inositol extracelular. Para a degradação dos transportadores é necessária a internalização endocítica destes, seguida de degradação em vacúolos (Miyashita *et al.*, 2003).

## **I.2. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico**

As leveduras são fungos unicelulares pertencentes ao filo *Ascomycete*. Têm vindo a ser reconhecidas como um sistema modelo bastante importante, representando um eucariota simples cujo genoma pode ser facilmente manipulado (Sherman, 2002). Embora possuam uma complexidade genética superior à dos procariotas, partilham com eles algumas características que tornam a sua utilização vantajosa em estudos biológicos: (i) crescimento simples e rápido; (ii) facilidade de isolamento de mutantes e células transformantes; (iii) sistema genético bem

definido (genoma já se encontra totalmente sequenciado); (iv) sistema de transformação de DNA altamente versátil. Para além destas características possuem ainda a vantagem de não serem patogénicas e a sua manutenção requerer baixos custos (Sherman, 2002).

Por outro lado, *S. cerevisiae* partilha também algumas características com as bactérias, tornando-a um modelo biológico importante: cresce rapidamente em qualquer tipo de meio nutritivo, líquido ou sólido, desde que os nutrientes sejam suficientes, conseguindo duplicar a sua população em menos de duas horas (Gralla, 1997). Pode ser manipulada fisiologicamente, mediante a manipulação do meio de cultura (Jamieson, 1998). Possui uma multiplicidade de marcadores de selecção, incluindo marcadores de selecção nutricional (ex. *HIS3*, *URA3*), resistência a fármacos (ex. *kanMX*, *patMX*, *natMX*) e susceptibilidade a fármacos (ex. *cyhR*) (Auerbach *et al.*, 2005). Este microrganismo adequa-se a estudos de *stress* oxidativo uma vez que consegue alterar o grau de utilização da respiração, consoante o tipo de fonte de carbono disponível (Gralla, 1997).

A levedura *S. cerevisiae* foi o primeiro eucariota cujo genoma foi totalmente sequenciado (Goffeau *et al.*, 1996). O seu genoma é pequeno, contendo numa célula haplóide cerca de 6000 genes em 16 cromossomas (Hudson, Jr. *et al.*, 1997). Esta estirpe reproduz-se quer por gemulação (reprodução assexuada) quer por conjugação (reprodução sexuada). A viabilidade dos estados haplóide e diplóide possibilita diversas aplicações genéticas, nomeadamente, a obtenção de estirpes com mais do que um gene mutado ou o estudo de mutações em genes recessivos, situação que em outros organismos mais complexos seria mais complicada (Sherman, 2002). Partilha a mesma organização subcelular que as células eucariotas mais evoluídas (núcleo, mitocôndrios, complexo de Golgi) e variados enzimas, vias metabólicas e genes reguladores (Gralla, 1997). Por todas as características referidas, *S. cerevisiae* tornou-se um dos organismos chave em investigação genética (Sherman, 2002).

A versatilidade experimental aliada à notável conservação da função génica ao longo da evolução, faz da levedura *S. cerevisiae* um modelo biológico amplamente requisitado, consistindo num ponto de partida para estudos de fenómenos biológicos (ex. *stress* oxidativo) e processos celulares (ex. vias de sinalização celular) em eucariotas, podendo ser os conhecimentos adquiridos posteriormente aplicados a eucariotas superiores. Como modelo de processos celulares fundamentais e vias metabólicas em humanos, melhorou o conhecimento e facilitou a análise molecular de variados genes associados a doenças (Snyder and Kumar, 2002). O aparecimento de várias patologias com origem em processos oxidativos aumentou o interesse no estudo da sua origem e desenvolvimento, nomeadamente doenças neurodegenerativas e doenças oncológicas. Porém, o estudo destes processos em células

animais é bastante demorado e complexo, pelo que a levedura é um bom modelo de partida para simular as condições encontradas nas células animais (Cunha, 2001).

### **I.3. O peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o *stress* oxidativo**

#### **I.3.1. O $\text{H}_2\text{O}_2$ como indutor de *stress* oxidativo**

A grande maioria dos organismos sobrevive à custa de um ambiente aeróbio. O aparecimento de oxigénio na atmosfera durante o processo evolutivo inicial tornou possível o metabolismo respiratório e o desenvolvimento de sistemas de geração de energia eficientes (Temple *et al.*, 2005), mas conduziu também a uma variedade de processos de *stress* celular devido à natureza reactiva do oxigénio molecular ( $\text{O}_2$ ), levando à produção de moléculas e de radicais livres resultantes do seu metabolismo. Estes produtos, conhecidos geralmente por espécies reactivas de oxigénio (EROs), incluem um grande leque de moléculas que podem ser tidas como oxidantes (como o peróxido de hidrogénio,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou redutoras (como o radical anião superóxido,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), e todas têm a capacidade de afectar a homeostase *redox* da célula (Perrone *et al.*, 2008). São espécies químicas altamente reactivas podendo conduzir a variados efeitos nocivos, tendo a capacidade de lesar constituintes celulares como o DNA, os lípidos e as proteínas (Jamieson, 1998; Perrone *et al.*, 2008; Temple *et al.*, 2005).

As EROs são geradas endogenamente como consequência de processos metabólicos, mas podem também ser formadas por exposição das células a condições ambientais adversas, como aumento da pressão de oxigénio, choque térmico, exposição a radiação ionizante, metais pesados ou oxidantes químicos (Jamieson, 1998; Moradas-Ferreira *et al.*, 1996). As EROs podem também ser formadas em concentrações elevadas durante processos de resposta imune levadas a cabo por células especializadas do sistema imunitário, os fagócitos, por exemplo através da acção do enzima NADPH oxidase – explosão respiratória (Barja, 1993; Forman, 2007; Suzuki *et al.*, 1997).

Em ambiente celular podem ser produzidas várias EROs, nomeadamente, os vários radicais como o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), radicais peróxido ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), os radicais alcóxido ( $\text{RO}^{\bullet}$ ), mas também moléculas como o dioxigénio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e outros hidroperóxidos orgânicos ( $\text{ROOH}$ ) e ainda o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Cadenas, 1998).

Devido à natureza ubíqua das EROs, não é de estranhar que a maioria (senão todos) os organismos tenham desenvolvido formas de protegerem os seus componentes celulares contra o *stress* oxidativo (Jamieson, 1998). Sob condições fisiológicas normais, os mecanismos de defesa antioxidantes são quase certamente adequados para manter as EROs em níveis basais, não lesivos, e para reparar os danos celulares infligidos. As defesas primárias neutralizam as EROs, enquanto as secundárias reparam ou removem os produtos do dano oxidativo ao DNA, proteínas e lípidos (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996). Todos os organismos que sobrevivem à custa do metabolismo aeróbio são continuamente expostos a estes agentes, levando a uma situação de *stress* oxidativo. O *stress* oxidativo representa um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante da célula para destoxificar rapidamente os intermediários reactivos ou para reparar os danos celulares induzidos, a favor da produção de EROs (Jamieson, 1998; Sies, 1997).

O peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) é a principal ERO formada endogenamente e a que apresenta uma maior estabilidade (Giorgio *et al.*, 2007), daí que tenha vindo a receber especial atenção por parte da comunidade científica devido a ser um forte oxidante e à sua presença ubíqua em todos os organismos aeróbios (Chance *et al.*, 1979). Os organismos estudados até ao momento demonstraram uma elevada sensibilidade a pequenas variações na concentração desta molécula, pelo que se torna óbvia a necessidade de possuírem mecanismos de eliminação desta espécie química e de obviação dos seus efeitos (Giorgio *et al.*, 2007). Esta ERO tem uma dualidade funcional, uma vez que surge associada a variadas reacções químicas de oxidação de tióis e inactivação de enzimas (Grant, 2001) mas também à sinalização celular em diversos processos (desenvolvimento, proliferação, morte celular, transdução de sinal).

O  $H_2O_2$  pode ser gerado endogenamente através de variadas reacção catalisadas enzimaticamente (Chance *et al.*, 1979). Uma das principais fontes endógenas de  $H_2O_2$  é a reacção de dismutação do  $O_2^{\bullet -}$ , catalisada pelos superóxido dismutases (SOD). O  $H_2O_2$  pode também ser gerado directamente devido à actividade enzimática de oxidases ou ainda durante o processo de  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos (Cai, 2005; Forman, 2007; Temple *et al.*, 2005; Zhang and Gutterman, 2007). Por outro lado, o  $H_2O_2$  pode igualmente ser produzido extracelularmente em concentrações elevadas durante a resposta imunitária inata levada a cabo pelos fagócitos, através da dismutação do anião superóxido catalisada pelo enzima NADPH oxidase, actuando depois intracelularmente (Barja, 1993; de Oliveira-Marques *et al.*, 2007; Forman, 2007; Suzuki *et al.*, 1997).

À semelhança de outras EROs, quando em concentrações elevadas promove diversos tipos de danos celulares: (i) o aumento do nível de oxidação de tióis de proteínas específicas; (ii) carbonilação de proteínas; (iii) peroxidação lipídica e danos no DNA (Costa *et al.*, 2002;

Jamieson, 1998; Le Moan *et al.*, 2006). Os danos induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ocorrer de forma indirecta, através da formação do radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>), extremamente reactivo, que reage indiscriminadamente com a maioria dos constituintes celulares. A produção de HO<sup>•</sup> ocorre via reacção de Fenton (Equação 1) por reacção com iões de metais de transição reduzidos como o Fe<sup>2+</sup> e o Cu<sup>+</sup>, que são oxidados durante o processo (Temple *et al.*, 2005; Toledano *et al.*, 2003).

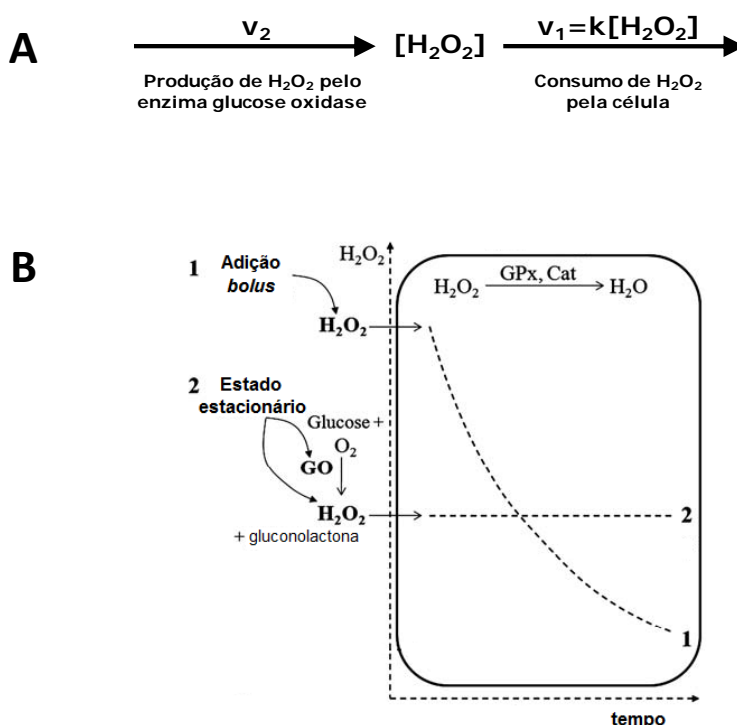


Em concentrações fisiológicas (10<sup>-9</sup>–10<sup>-7</sup> M), têm sido atribuídas várias funções importantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao nível da sinalização celular: (i) indução da fosforilação de proteínas; (ii) indução dos níveis de Ca<sup>2+</sup>; (iii) alteração do grau de oxidação de tióis em proteínas específicas; (iv) papel de segundo mensageiro como resposta a citocinas e factores de crescimento (Forman, 2007; Le Moan *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 1997).

### 1.3.2. O estado estacionário de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como indutor de *stress* oxidativo

No sentido de simular as condições existentes *in vivo* aquando da exposição das células ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nomeadamente em situações de *stress* oxidativo, têm sido feitas várias abordagens em diversos sistemas biológicos. Porém, a grande maioria delas baseia-se na adição de uma dose *bolus* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondente à concentração desejada, sendo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido pelos peroxidases intracelulares, como é o caso do catalase, sem que haja qualquer fonte de produção do mesmo no sentido de o repor, pelo que a sua concentração será decrescente ao longo do tempo em que decorre a experiência (Antunes and Cadenas, 2001). Esta situação não se assemelha à que ocorre *in vivo*, que é caracterizada por uma concentração constante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao longo do tempo. Quando se adiciona H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em condições *bolus*, a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vai decrescendo ao longo do tempo (Figura 10B) pelo que há, frequentemente, uma necessidade de adicionar doses iniciais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muito elevadas, na ordem dos 10<sup>-5</sup>–10<sup>-3</sup> M, duas a cinco vezes superior à concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontrada *in vivo*. Estes níveis elevadíssimos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> representam um choque agudo não fisiológico, provocam modificações oxidativas severas (algumas das quais irreversíveis), disrompem a homeostase celular e induzem respostas celulares que podem não estar relacionadas com as induzidas pelas baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontradas *in vivo*. Como tal, a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *bolus* não é um método adequado para estudar questões fundamentais sobre os efeitos biológicos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a

nível regulatório (Antunes and Cadenas, 2001). Foi, portanto, desenvolvida uma abordagem experimental que permite mimetizar a concentração constante de  $\text{H}_2\text{O}_2$  observada *in vivo*, a aproximação de adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em estado estacionário (Antunes and Cadenas, 2001) (Figura 10B). O estado estacionário de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é obtido adicionando ao meio de cultura uma fonte geradora de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o enzima glucose oxidase (GO) (Figura 10A), que compensa o consumo levado a cabo pelos peroxidases intracelulares (catalase e glutathione peroxidases). O enzima glucose oxidase utiliza como substrato a glucose presente em excesso no meio de cultura (Antunes and Cadenas, 2001).



**Figura 10 – A. Geração de um estado estacionário de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** O glucose oxidase produz  $\text{H}_2\text{O}_2$  a uma velocidade constante ao longo do tempo ( $v_2$ ), enquanto as células o consomem a uma velocidade  $v_1$ , exibindo uma cinética de primeira ordem. **B. Comparação de métodos de entrega de  $\text{H}_2\text{O}_2$  às células.** Após a adição exógena de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  difunde-se para o interior das células e é rapidamente consumido devido à acção dos enzimas antioxidantes, como o Glutathione peroxidase (GPx) e o catalase (Cat). Devido a este consumo, na adição em *bolus* (1) têm de ser usadas elevadas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para serem induzidas respostas celulares. Na aproximação de estado estacionário (2) a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é mantida constante durante o ensaio devido à adição de glucose oxidase (GO), simultaneamente com uma dose inicial de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à concentração desejada. Adaptado de (Oliveira-Marques *et al.*, 2009).

A adição de  $H_2O_2$  em estado estacionário é vantajosa relativamente à adição em *bolus* porque: (i) mimetiza a produção endógena de  $H_2O_2$  contínua *in vivo*, contrariamente à adição em *bolus* que disrompe a homeostase celular; (ii) uniformiza a entrega do  $H_2O_2$ , porque este é fornecido numa concentração de estado estacionário (concentração de  $H_2O_2$  mantém-se constante); (iii) na adição em *bolus* a dose efectiva de  $H_2O_2$  entregue por célula é desconhecida porque depende tanto da densidade celular como do consumo de  $H_2O_2$  pelo meio de crescimento, o que torna a comparação de dados entre laboratórios difícil; (iv) permite a distinção de respostas celulares de acordo com a concentração de  $H_2O_2$  que as desencadeia, contrariamente à adição em *bolus*, onde as respostas celulares surgem todas associadas; (v) permite determinar a concentração de  $H_2O_2$  ao longo do ensaio.

O modelo de estado estacionário consiste, então, numa melhor aproximação às condições fisiológicas, com a vantagem de não disromper a homeostase celular.

### **I.3.3. A adaptação ao $H_2O_2$ em *S. cerevisiae***

Durante os processos de *stress* oxidativo é desencadeada uma série de mecanismos que permite às células adaptarem-se às condições adversas no sentido de sobreviverem. Foi observado que o peróxido de hidrogénio induz uma resposta adaptativa ao *stress* oxidativo em *S. cerevisiae* (Collinson and Dawes, 1992), em células previamente expostas a uma dose subletal do agente, e submetidas posteriormente a uma dose letal do mesmo. A pré-exposição das células ao  $H_2O_2$  desencadeia uma série de processos celulares e moleculares que conferem uma maior resistência às células quando confrontadas com doses letais deste agente (Branco *et al.*, 2004).

Os processos biológicos que estão na base da resposta adaptativa ao *stress* oxidativo têm vindo a ser amplamente estudados não só em *S. cerevisiae* mas também em outros organismos. Em *S. cerevisiae* os estudos são focados essencialmente nos mecanismos de remoção das EROs, nos danos causados e nos mecanismos de reparação dos mesmos.

A resposta celular ao  $H_2O_2$  consiste numa diversidade de respostas de sinalização celular, com activação de factores de transcrição e mecanismos de sinalização intracelulares responsáveis pela regulação da expressão de genes que codificam proteínas cujos níveis são alterados como resultado do *stress* oxidativo induzido pelo  $H_2O_2$  (Hasan *et al.*, 2002; Toledano *et al.*, 2003).



Um aspecto interessante da resposta adaptativa ao  $H_2O_2$  é que a indução de diferentes padrões de alterações proteicas e de expressão génica em *S. cerevisiae* é também observada em outras situações de *stress* oxidativo. Muitas das proteínas cuja expressão génica se encontra alterada em resposta ao  $H_2O_2$ , vêem também a sua expressão alterada quando expostas a outros fenómenos indutores de *stress* oxidativo que não os provocados pelo  $H_2O_2$ . Estas observações indiciam uma resposta comum entre fenómenos de *stress* (Godon *et al.*, 1998; Moradas-Ferreira *et al.*, 1996).

Recorrendo ao uso de *microchips* de DNA e a técnicas genómicas avançadas foi possível observar alterações nos níveis de mRNA durante a resposta adaptativa ao  $H_2O_2$ . Foram observadas alterações em cerca de um terço do genoma de *S. cerevisiae* sendo que, de entre o grande número de genes que viram a sua expressão alterada, aproximadamente 500 estão envolvidos na resposta a fenómenos de *stress* (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000). Destes são induzidos aqueles associados ao metabolismo glicídico, resposta ao *stress* celular e geração de energia (via glicólise). Os reprimidos estão ligados à tradução e síntese proteicas (Godon *et al.*, 1998). Foi observado que a resposta ao  $H_2O_2$  caracteriza-se principalmente por uma forte indução de genes associados à destoxificação de EROs (Superóxido dismutases – SOD e glutathione peroxidases – GPx) e de genes relacionados com reacções de oxidação-redução intracelulares. Porém, estes resultados foram obtidos através da adição de uma dose *bolus* (letal) de  $H_2O_2$ , que resulta em concentrações de  $H_2O_2$  em nada semelhantes às observadas *in vivo*. Neste tipo de aproximação experimental a resposta observada envolve muito mais genes devido quer à própria resposta da célula ao *stress* oxidativo quer à enorme alteração do estado *redox* da célula, havendo uma junção de diferentes respostas que conduzem a resultados inespecíficos e em muitos casos inconclusivos. Recentemente, foi estudada a resposta génica das células de *S. cerevisiae* adaptadas a 150  $\mu$ M de  $H_2O_2$  em estado estacionário durante 90 min (Pedroso, 2008) (ver capítulo I.3.4). Nestas condições experimentais foi analisada a expressão génica por análise de *microarrays*, tendo sido observadas variações na expressão de um total de 385 genes, correspondendo esses genes a 6% do total existente no genoma de *S. cerevisiae* (Pedroso, 2008). Verificou-se, portanto, uma resposta distinta daquela observada com adição de  $H_2O_2$  em *bolus*, devido sobretudo às doses sub-letais de  $H_2O_2$  às quais as células foram expostas e à maior especificidade da resposta celular (Pedroso, 2008).

### **1.3.4. A regulação da expressão génica em condições de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário**

O peróxido de hidrogénio é uma ERO que é continuamente produzida *in vivo* (i) intracelularmente, como produto secundário do metabolismo aeróbio, e (ii) extracelularmente, como resultado da activação dos fagócitos. É uma molécula pequena e neutra e, portanto, difunde-se facilmente através das membranas biológicas (Pedroso *et al.*, 2009). Recentemente, foi demonstrado que a difusão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da membrana plasmática de *S. cerevisiae* limita a velocidade de consumo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular (Branco *et al.*, 2004; Sousa-Lopes *et al.*, 2004). Estas evidências refutam o paradigma vigente de que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se difunde livremente através das biomembranas. Este novo modelo implica que sejam formados gradientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através das membranas (Pedroso *et al.*, 2009).

Um dos aspectos mais notáveis da resposta das células à presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é a capacidade de se adaptarem à presença deste agente através da aquisição de resistência. Foi visto que células expostas a doses sub-letais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 15-90 min) conseguem adaptar-se a exposições posteriores com doses letais (700 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 60 min) através da aquisição de resistência. Isto é reflectido numa maior velocidade de sobrevivência das células quando expostas a concentrações letais do mesmo agente (Pedroso, 2008).

Na levedura *S. cerevisiae* a resposta adaptativa ao *stress* oxidativo baseia-se principalmente no aumento da expressão dos enzimas que catalisam a eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e dos sistemas responsáveis pela reparação dos danos induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pedroso *et al.*, 2009). Porém, foi recentemente demonstrado que, durante a adaptação de células de *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, há também uma diminuição da permeabilidade da membrana plasmática ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, limitando o influxo deste agente (Branco *et al.*, 2004). A alteração da permeabilidade ocorre rapidamente durante a adaptação e é acompanhada por um decréscimo da fluidez da membrana (Folmer *et al.*, 2008). Portanto, a diminuição da permeabilidade da membrana associada ao aumento da actividade dos enzimas que removem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, leva a um aumento do gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da membrana (Branco *et al.*, 2004).

De forma a entender o mecanismo que modula o decréscimo da permeabilidade da membrana ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, averiguou-se quais os componentes na membrana plasmática que podem ser responsáveis pelas alterações observadas. Foi observado que a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modula rapidamente a expressão de genes que codificam para enzimas envolvidos na via de biossíntese do ergosterol (*ERG1*, *ERG3*, *ERG7*, *ERG25*, *ERG6*) e no metabolismo lipídico (*ELO1*,

*ELO2, ELO3, OLE1, FAS1, FAS3, LAC1, LIP1, GPT2*) (Quadro 1). Verificou-se também que há uma alteração do perfil lipídico da membrana plasmática: a adaptação das células ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leva a uma redistribuição dos domínios ricos em esterol e a um aumento dos domínios ordenados da membrana plasmática (Pedroso *et al.*, 2009).

Um dos genes cuja expressão se encontra reprimida nos instantes iniciais após exposição a doses adaptativas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é o gene *FAS1* (Pedroso, 2008) que codifica para a subunidade β do sintase de ácidos gordos (FAS), cuja regulação é objecto de estudo do presente trabalho.

**Quadro 1 – A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> altera a expressão de genes que codificam enzimas envolvidos na via de biossíntese do ergosterol e no metabolismo lipídico.** Adaptado de (Pedroso, 2008).

Gene	ORF	Descrição	Expressão de mRNA ao longo da adaptação ao $H_2O_2$			
			15 min	30 min	60 min	90 min
Metabolismo ergosterol						
ERG1	YGR175C	Esqualeno epoxidase	-2,2			
ERG3	YLR056W	C-5 esterol desaturase	-1,9			-2,0
ERG7	YHR072W	Lanosterol sintase	-1,4			
ERG2	YGR060W	C-4 metil esterol oxidase	-1,0			
ERG6	YML008C	$\Delta$ (24)-esterol c-metiltransferase				-0,5
Metabolismo lípidos						
ELO1	YJL196C	Elongase		1,2		
ELO2	YCR034W	Elongase	-1,3			
ELO3	YLR372W	Elongase	-1,2		-1,1	
OLE1	YGL055W	Desaturase de ácidos gordo		1,1		
FAS1	YKL182W	Subunidade beta do ácido gordo sintase	-1,6			
FAS3	YNR016C	Acetil-CoA carboxilase				1,3
LAC1	YKL008C	Componente do ceramida sintase	-1,3	-1,4		
LIP1	YMR298W	Subunidade do ceramida sintase			-1,8	
GPT2	YKR067W	3-fosfato de glicerol aciltransferase	2,0			

Foi observado que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  reprime a expressão do gene *FAS1* em 1,5x após 15 min de exposição a 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em estado estacionário, havendo uma recuperação para os valores iniciais após 60 min de adaptação. A determinação dos níveis de mRNA do gene *FAS1* por *Northern blot* confirmou estes resultados (Matias *et al.*, 2007). Esses níveis diminuíram em 90 e 80% relativamente aos níveis controlo após exposição a 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 15 e 30 min, respectivamente, regressando aos valores controlo após 60 min de exposição. Foi demonstrado pela primeira vez que o FAS tem um papel importante na resposta celular da *S. cerevisiae* ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , visto que durante a adaptação destas células a 150  $\mu\text{M}$  em estado estacionário de  $\text{H}_2\text{O}_2$  houve um decréscimo tanto da expressão como da actividade FAS. Mais relevante ainda foi o facto de que a diminuição da actividade FAS em 50%, através de deleção de um dos alelos *FAS*, aumentou a resistência das células a doses letais deste agente (Matias *et al.*, 2007).

Os mecanismos pelos quais o decréscimo da expressão do FAS leva a um aumento da resistência ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  ainda não foram completamente elucidados. No entanto, verificou-se um aumento dos níveis de ácidos gordos de cadeia muito longa (VLCFA) na membrana plasmática, sugerindo que estes ácidos gordos podem diminuir a permeabilidade da membrana ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , conferindo assim uma maior resistência a este agente (Matias *et al.*, 2007).

## II. OBJECTIVOS

A membrana plasmática separa fisicamente os componentes intracelulares do ambiente extracelular, controlando a entrada e saída de compostos. A estrutura da membrana plasmática é regulável, podendo reorganizar-se quando sujeita a condições extracelulares adversas. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a velocidade de difusão do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) através da membrana plasmática diminui durante a adaptação ao  $H_2O_2$  (dose baixa de  $H_2O_2$ ), tornando as células mais resistentes a doses letais de  $H_2O_2$ . Este aumento de resistência ao  $H_2O_2$  resulta de um decréscimo da permeabilidade da membrana plasmática que, em conjunto com o aumento da actividade dos enzimas que removem o  $H_2O_2$ , leva a um aumento do gradiente de  $H_2O_2$  através da membrana plasmática. A alteração da permeabilidade ocorre rapidamente durante a adaptação, e é acompanhada por um decréscimo da fluidez da membrana. O mecanismo pelo qual o  $H_2O_2$  leva a alterações da permeabilidade da membrana plasmática durante a adaptação não é conhecido sabendo-se, no entanto, que ocorrem alterações na composição lipídica da membrana plasmática e nos níveis de diversas proteínas da fracção isolada da membrana plasmática.

As células de *S. cerevisiae* adaptadas ao  $H_2O_2$  apresentam uma menor expressão do gene *FAS1*, que codifica para a subunidade Fas1 do sintase de ácidos gordos (FAS), assim como uma diminuição da respectiva actividade enzimática. O gene *FAS1* pertence a um grupo de genes regulados pelo inositol, sendo a sua expressão reprimida quando aumenta o inositol intracelular. Por outro lado, o aumento de inositol induz uma profunda alteração do padrão celular dos lípidos, o que poderá influenciar a composição/organização da membrana plasmática com consequências ao nível da permeabilidade da membrana plasmática.

O objectivo deste trabalho insere-se na tentativa de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do gene *FAS1* induzidos pelo  $H_2O_2$ . Como hipótese de trabalho propõe-se que o  $H_2O_2$  reprime a expressão do gene *FAS1* através da indução dos níveis de inositol nas células de *S. cerevisiae*. Para testar esta hipótese é proposta uma abordagem qualitativa e quantitativa usando metodologias complementares de bioquímica e biologia molecular e celular, no sentido de elucidar o mecanismo molecular pelo qual a adaptação ao  $H_2O_2$  das células de *S. cerevisiae* reprime a expressão do gene *FAS1*.

No sentido de atingir o objectivo proposto, o trabalho foi dividido em várias etapas tendo por base as seguintes premissas:

**a) O  $H_2O_2$  induz o aumento dos níveis de inositol**

Abordagem experimental: Determinação dos níveis de inositol em células controlo e submetidas a doses adaptativas de  $H_2O_2$  recorrendo a um método espectrofotométrico

**b) O  $H_2O_2$ , através do aumento dos níveis de inositol, induz a translocação da Opi1p para o núcleo**

Abordagem experimental: Análise da translocação nuclear do factor GFP-Opi1p, na presença e ausência de  $H_2O_2$  por microscopia de fluorescência

**c) O  $H_2O_2$ , através do aumento dos níveis de inositol, leva a uma alteração do perfil fosfolipídico global**

Abordagem experimental: Quantificação dos níveis de fosfolípidos totais em células controlo e tratadas com  $H_2O_2$ , por TLC bidimensional

**d) O aumento dos níveis de inositol induzido pelo  $H_2O_2$  leva à alteração da expressão de vários genes**

Abordagem experimental: Quantificação de diversos transcritos regulados pelo inositol por PCR quantitativo em tempo real (real-time Q-PCR)

Como modelo experimental são utilizadas células de *Saccharomyces cerevisiae*, tratadas com 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário até 40 min, utilizando o eléctrodo de oxigénio para monitorizar a concentração de  $H_2O_2$ .

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### III.1. Materiais

A Bacto peptona, o YNB (Yeast Nitrogen Base), o Bacto agar e o extracto de levedura foram adquiridos da Difco (Detroit, MI, EUA). A glucose e o peróxido de hidrogénio foram obtidos da Merck (Whitehouse Station, NJ). O catalase (de fígado de bovino), o glucose oxidase (de *Aspergillus niger*), o cloreto de iodonitrotetrazólio (INT), o mio-inositol desidrogenase (de *Enterobacter aerogenes*), o diaforase (de *Clostridium kluyveri*), o hexocinase, os aminoácidos do meio de crescimento, o fluoreto de fenilmetilsulfanilo (PMSF), o  $\beta$ -NAD, o trifosfato de adenosina disódico (ATP-2Na), o Triton X-100 e o reagente de Folin foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). As placas de sílica gel 20 cm x 20 cm para TLC e a resina Dowex 50W 200-400 mesh foram obtidas da Fluka (St Louis, MO, EUA). A membrana de separação de fases 1PS foi obtida da Whatman (Kent, UK). A membrana TYPE HA 0,45  $\mu$ m do sistema de vácuo para recolha das células foi obtida da Millipore (Billerica, MA, USA). O kit de extracção de RNA total de *S. cerevisiae* foi adquirido à Ambion (Austin, TX, USA). A DNase I e o kit para a síntese da primeira cadeia de cDNA *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus Reverse Transcriptase* foram adquiridos à Fermentas (Maryland, USA). O *Brilliant SYBR Green Master Mix* para amplificação em PCR quantitativo em tempo real foi obtido da Stratagen (Kirkland, MA, USA).

#### III.2. Material biológico

Ao longo do trabalho experimental foram utilizadas as estirpes “selvagem” BY4741 (*wt*), a estirpe *opi1* $\Delta$ , que é isogénica da estirpe *wt* (com o gene *OPI1*, que codifica para a proteína Opi1p, mutado), e a estirpe *opi1* $\Delta$  + GFP-Opi1p (estirpe *opi1* $\Delta$  transformada com o plasmídeo GFP-Opi1p).

As estirpes *wt* e *opi1* $\Delta$  foram adquiridas na EUROSCARF encontrando-se os respectivos genótipos descritos no Quadro 2. A estirpe *opi1* $\Delta$  + GFP-Opi1p foi obtida após transformação da estirpe *opi1* $\Delta$  com o plasmídeo pTL212, plasmídeo de expressão da GFP-Opi1p, centromérico, construído a partir do plasmídeo pRS416. Este plasmídeo foi oferta do Prof. Tim Levine (Loewen *et al.*, 2003).

Quadro 2 – Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas no trabalho experimental.

Designação	Estirpe	Genótipo
<b>wt</b> (haplóide)	Y00000	BY4741; MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0
<b>opi1<math>\Delta</math></b>	Y00943	BY4741; MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YHL020c::kanMX4

### III.3. Métodos Experimentais

#### III.3.1. Condições de Crescimento

O crescimento das culturas foi realizado em meio Sintético Completo (SC – *Synthetic Complete*) (Branco *et al.*, 2004). O meio SC é constituído por glucose 2% (m/v), YNB 6,85% (m/v), aminoácidos e bases – 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), Serina 0,04% (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). As soluções 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 o armazenamento foi usado meio YPD sólido, feito a partir de meio YP - peptona 2% (m/v); extracto de levedura 1% (m/v) - suplementado com Bacto agar 2% (m/v) e glucose 2% (m/v). O armazenamento foi feito: a) em placas com meio YPD sólido, a 4 °C (com um máximo de duas passagens para uma nova placa a cada 20 dias); b) em suspensão numa solução de glicerol 20% (v/v), a – 80 °C.

O crescimento das células foi feito em meio líquido, a 30 °C e 160 rpm num agitador orbital. Os estudos foram efectuados com culturas em fase de crescimento exponencial após a ocorrência de pelo menos dois ciclos de duplicação, feitas a partir de pré-culturas com 14-16 horas de crescimento. As leituras de densidade óptica das culturas foram efectuadas a 600 nm (OD<sub>600</sub>) num espectrofotómetro *Beckman DU-68* (1 OD<sub>600</sub> ~ 2 x 10<sup>7</sup> células).



### III.3.2. Curvas de Crescimento

Foi necessário realizar um estudo do perfil de crescimento das estirpes (*wt*, *opi1Δ*, *opi1Δ* + GFP-Opi1p), conseguido através da realização das suas curvas de crescimento. Este procedimento foi necessário para se poder determinar o tempo que as culturas demoravam a atingir as diferentes fases de crescimento.

Para cada estirpe as culturas foram inoculadas a 0,03 OD<sub>600</sub>/mL, colocadas a crescer a 30 °C e 160 rpm num agitador orbital, e efectuadas leituras de densidade óptica (OD) a 600 nm em intervalos de tempo relativamente curtos (1h ou 1h30).

### III.3.3. Determinação das constantes de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas células

As culturas foram inoculadas a 0,03 OD<sub>600</sub>/mL a partir de pré-culturas, colocadas a crescer a 30 °C e 160 rpm num agitador orbital até atingirem 0,15 OD<sub>600</sub>/mL. Nessa altura adicionou-se às culturas um volume de uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 9 mM para que a concentração final na cultura fosse de 150 μM (dose sub-letal a que queremos sujeitar as células durante o processo de adaptação).

Foi medido o decréscimo da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente nas culturas durante 60 min. As determinações foram efectuadas num eléctrodo de Clark (*Hansatech Instruments, UK*). A medição foi realizada adicionando a 400 μL de água uma alíquota de 400 μL da cultura, adicionando seguidamente 10 μL de uma solução de catalase 1 mg/mL. O sinal do eléctrodo corresponde ao oxigénio libertado pela dismutação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A partir desse sinal é possível determinar a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente na cultura num determinado instante, recorrendo a uma curva de calibração feita diariamente. A curva de calibração foi feita com soluções padrão de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, feitas a partir de uma solução de aproximadamente 9 mM. A concentração real dessa solução de 9 mM foi determinada a partir do seu valor de absorvência a 240 nm ( $\epsilon = 43,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

A constante de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $k$  (min<sup>-1</sup>), corresponde ao declive da recta relativa à regressão linear ajustada aos pontos da representação gráfica de  $\ln [\text{H}_2\text{O}_2]$  vs. tempo (min). Há que ter em conta que o consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende da concentração de células presentes em cada ensaio e, para que este valor pudesse ser utilizado para o cálculo dos volumes de adaptação para estabelecer o estado estacionário de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, efectuou-se uma normalização em função da densidade celular do ensaio. Assim, o consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (min<sup>-1</sup>.(OD/mL)<sup>-1</sup>) é

determinado fazendo a razão entre  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) e a  $\text{OD}_{600}/\text{mL}$  a que a cultura se encontra no início do ensaio ( Equação 2).

$$\text{Consumo de H}_2\text{O}_2 (\text{min}^{-1} \cdot (\text{OD}/\text{mL})^{-1}) = \frac{k (\text{min}^{-1})}{\text{OD}_{600}/\text{mL}} \quad \text{Equação 2}$$

### III.3.4. Adaptação das células a 150 $\mu\text{M}$ de $\text{H}_2\text{O}_2$ em estado estacionário

A adaptação das células ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi induzida por exposição das células a uma dose sub-letal de 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em estado estacionário, durante 15-90 min (Branco *et al.*, 2004). A adaptação iniciou-se com as células em fase de crescimento exponencial (0,15  $\text{OD}_{600}/\text{mL}$ ) ( $1\text{OD}_{600} = 2-3 \times 10^7$  células).

Para a criação do estado estacionário adicionou-se, simultaneamente, 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  e o enzima glucose oxidase às células em cultura, de modo a que a velocidade de produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por parte do glucose oxidase igualasse a velocidade de consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelas células. Deste modo, consegue-se uma concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  constante no decorrer dos ensaios.

Foi efectuada a quantificação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  presente nas culturas ao longo do tempo de adaptação, com o intuito de confirmar a criação do estado estacionário à concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pretendida.

Como ao longo do tempo dos ensaios a densidade óptica da cultura vai aumentando, significando um maior número de células, o consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é cada vez mais acentuado. Portanto, a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na cultura vai diminuindo, pelo que é necessário repor tanto o  $\text{H}_2\text{O}_2$  como o glucose oxidase. Os volumes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de glucose oxidase adicionados inicialmente para o estabelecimento do estado estacionário assim como os acertos necessários no decorrer do tempo de adaptação foram calculados a partir da densidade óptica da cultura no início da adaptação, da actividade do glucose oxidase e da constante de consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelas células, determinadas experimentalmente.

A actividade do glucose oxidase foi determinada em meio SC, seguindo a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelo enzima ao longo do tempo. O ensaio foi feito em 10 mL de meio de cultura ao qual foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de glucose oxidase 0,0531U diluída 1000x. Assumindo uma reacção de primeira ordem, a actividade em  $\mu\text{M}/\text{min}$  corresponderá ao declive da recta ajustada aos pontos do gráfico da  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  ( $\mu\text{M}$ ) vs. tempo (min). Tendo em consideração os volumes do ensaio (meio de cultura e solução de glucose oxidase) calculou-se a actividade específica do enzima em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{L}$ .

As determinações da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram efectuadas num eléctrodo de Clark (*Hansatech Instruments, UK*), como explicado em III.3.3.

### **III.3.5. Translocação do factor nuclear GFP-Opi1p**

#### **III.3.5.1. Obtenção dos transformantes *opi1Δ* + GFP-Opi1p**

A transformação das células *opi1Δ* foi efectuada de acordo com o método descrito por Ito e colaboradores (Ito *et al.*, 1983). A transformação foi feita a partir de uma pré-cultura *opi1Δ* com 14-16h de crescimento, colocada a crescer a 30 °C, com agitação a 160 rpm. Recolheu-se 1 mL dessa pré-cultura para um tubo *ependorf* de 1,5 mL. Após centrifugação durante 2 min a 3000 rpm (centrífuga *Eppendorf 5415*), lavou-se o sedimento de células com 500 µL de água estéril. Após nova centrifugação, ressuspendeu-se o sedimento das células em 500 µL de uma solução TE/LiAc (Acetato de lítio 0,1 M; Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). Deixou-se a suspensão obtida a 4 °C durante 1 hora. Para cada transformação preparou-se, em tubos *ependorf* de 1,5 mL, a mistura de reacção de transformação contendo 50 µL de suspensão celular, 5 µL (~100 µg) do DNA plasmídico (pTL212), 5 µL de DNA carrier (25 µg) previamente desnaturado na placa térmica a 90 °C durante 2 min, e 300 µL de uma solução LiAc/TE com PEG 40% (m/v). Após incubação a 30 °C, durante 30 min com agitação a 160 rpm, a mistura de reacção de transformação incubou a 42 °C durante 20 min. No final desta incubação colocou-se a mistura reaccional a 4 °C, durante 30 min. Por fim, centrifugou-se a 7000 rpm na centrífuga *Eppendorf 5415* durante 2 min. O sedimento obtido foi ressuspendido em 100 µL de água estéril e plaqueado em placas com meio sintético sem uracilo (SC Ura<sup>-</sup>). As placas foram invertidas e deixadas durante cerca de 3 dias a 30 °C.

#### **III.3.5.2. Visualização da translocação por Microscopia de fluorescência**

Preparou-se uma cultura da estirpe *opi1Δ* + GFP-Opi1p, inoculando 25 mL de meio SC Ura<sup>-</sup> a uma densidade celular de 0,03 OD<sub>600</sub>/mL. A cultura cresceu até atingir 0,15 OD<sub>600</sub>/mL. Foram recolhidos 800 µL da cultura para um tubo *ependorf* (controlo) e procedeu-se à adaptação das células com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário. Foram também recolhidos 800 µL da cultura aos vários tempos de adaptação. Centrifugou-se a suspensão celular

equivalente a cada amostra durante 1 min a 8 500 x g (centrífuga *Eppendorf miniSpin*) e recolheram-se 10 µL do sedimento celular para a montagem de uma lâmina de microscópio e lamela. A emissão de fluorescência por parte das células foi observada num microscópio *Olympus BX41*, tendo-se procedido à recolha de imagens utilizando uma máquina fotográfica *Olympus Digital Camera Camedia C-4040 ZOOM*, CCD 4 100 000 Pixels. As imagens foram tratadas com o auxílio do software *ImageJ 1.42q* (Abramoff *et al.*, 2004; Rasband, 1997). Como controlo de auto-fluorescência analisou-se uma amostra de uma cultura *opi1Δ*.

### **III.3.6. Quantificação dos níveis de fosfolípidos totais em células controlo e tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por Cromatografia em camada fina bidimensional**

#### **III.3.6.1. Extracção dos lípidos totais**

Os lípidos totais das células de levedura *S. cerevisiae* foram extraídos de acordo com o método descrito por Folch e colaboradores (Folch *et al.*, 1957), a partir de 25 OD totais de células de cada uma das amostras. Inoculou-se meio SC a partir de uma pré-cultura da estirpe *wt*, a uma densidade celular de 0,03 OD<sub>600</sub>/mL e recolheu-se as células a 0,15 OD<sub>600</sub>/mL, após vários tempos de adaptação com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou sem adaptação. As células equivalentes a 500 mL de cultura foram recolhidas com o auxílio de um sistema de vácuo, através de uma membrana *Millipore TYPE HA* 0,45 µm. Após filtração, as células filtradas foram ressuspensas em cerca de 20 mL de uma solução tampão de fosfatos de potássio 0,1M, pH 7,4 (TFK 0,1M pH 7,4), passando a suspensão celular para tubos *falcon* de 50 mL e centrifugando a 4 000 rpm, 1 min (centrífuga *Sigma 302*). Os sedimentos celulares obtidos foram congelados em azoto líquido e guardados a – 80 °C até se proceder à extracção dos lípidos totais. Para a extracção dos lípidos totais, os sedimentos celulares foram ressuspensos num total de 30 mL de tampão TFK 0,1M pH 7,4. Transferiu-se os ressuspensos para um tubo do rotor JA-20 (centrífuga *Beckman J2-21 M/E*) e centrifugou-se a 8 000 rpm (5 000 x g), 10 min. Adicionou-se ao sedimento 1,5 mL de solução tampão TFK 0,1M pH 7,4, 2 volumes de *glass beads* e 15 µL de PMSF. Vortexou-se 3x durante 2 min, alternando com colocação no gelo. Diluiu-se 2x (adicionando 3 mL de tampão TFK) e misturou-se no vortex. Centrifugou-se a 2 500 rpm (530 x g), 20 min, no rotor JA-20.

Após este processo, recolheu-se o sobrenadante para uma proveta esmerilhada de 100 mL, medindo o volume exacto de extracto recolhido, de forma a proceder-se à extracção de

lípidos de acordo com o método de Folch. Antes de se proceder à extracção retirou-se 50 µL para um tubo *eppendorf* e congelou-se a – 80 °C, para uma posterior quantificação de proteína pelo método de Peterson. Ao sobrenadante na proveta adicionou-se clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) numa proporção 1:20 (20x o volume do extracto). Filtrou-se com um filtro de separação de fases (*1PS Whatman*) para outra proveta esmerilada de 100 mL. Adicionou-se KCl 0,88% (v/v) num volume correspondente a 20% do volume total de filtrado. Agitou-se bem, aliviando a pressão. Saturou-se com atmosfera de azoto e deixou-se as fases orgânica e aquosa a separar durante cerca de 16h a – 20 °C. Removeu-se cuidadosamente a maior parte da fase superior (aquosa) à trompa. Lavou-se 2x as paredes da proveta com metanol:H<sub>2</sub>O:clorofórmio (48:47:3) cuidadosamente de modo a não perturbar as fases. Retirou-se toda a fase aquosa à trompa com muito cuidado de modo a não perturbar a separação de fases. A fase orgânica foi evaporada sob fluxo suave de azoto.

#### **III.3.6.2. Separação dos lípidos por TLC bidimensional**

Os lípidos totais foram analisados por TLC bidimensional de acordo com o método de Connerth e colaboradores (Connerth *et al.*, 2009). Activou-se uma placa de sílica gel 20 cm x 20 cm para TLC (Fluka 99570) numa estufa a 110 °C durante 30 min. Ressuspendeu-se o extracto lipídico em 100 µL de clorofórmio:metanol (1:1). Aplicou-se 80 µL do extracto no canto inferior esquerdo da placa com a ajuda de um capilar de vidro. Guardou-se os restantes 20 µL para quantificação de fosfatos totais. Desenvolveu-se o cromatograma na primeira dimensão usando o sistema de eluentes clorofórmio:metanol:amónia (65:35:5). Retirou-se a placa da câmara de eluição e deixou-se secar muito bem ao ar na *hotte*. Rodou-se a placa 90° para a esquerda e desenvolveu-se o cromatograma na segunda dimensão usando o sistema de solventes clorofórmio:acetona:metanol:ácido acético:água (50:20:10:10:5). Após secagem da placa revelou-se por exposição a iodo. Marcou-se as manchas correspondentes aos vários fosfatos com o auxílio de um lápis de TLC, para posterior recuperação da placa.

#### **III.3.6.3. Quantificação dos fosfatos**

Os níveis de fósforo nos fosfolípidos separados por TLC foram determinados usando o ensaio de Bartlett (Dittmer and Wells, 1969). Retirou-se as porções de sílica onde se

encontravam as manchas correspondentes a cada um dos fosfolípidos e transferiu-se para tubos de ensaio novos. Retirou-se 3 porções de sílica de regiões onde não eram visíveis manchas correspondentes a fosfolípidos para utilizar como branco. Preparou-se amostras padrão contendo 0, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 µL de uma solução  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5 mM. Adicionou-se a todos os tubos (padrões e amostras com sílica) 0,3 mL de ácido perclórico 70% (v/v). Aqueceram-se as amostras durante 45 min a 170 °C num banho de areia. Adicionou-se 1 mL de água destilada, 400 µL de uma solução de molibdato de amónio 1,24% (m/v) e 400 µL de ácido ascórbico 5% (m/v) a todos os tubos (padrões e amostras). Aqueceram-se todos os tubos durante 5 min a 100 °C. Deixou-se sedimentar a sílica dos tubos das amostras e transferiu-se 1,5 mL para tubos *falcon* de 15 mL. Centrifugou-se durante 20 min a 2 500 rpm numa centrífuga *Hettich Rotofix 32*. Recolheu-se 1 mL do sobrenadante, com muito cuidado para não arrastar a sílica, e mediu-se a absorvência de cada uma das amostras e das soluções padrão a 797 nm num espectrofotómetro *Camspec M350 Double Beam UV-Visible*.

### **III.3.7. Quantificação dos extractos proteicos pelo Método de Peterson**

A concentração de proteína nos extractos proteicos foi determinada pelo método de Peterson (Peterson, 1977), uma modificação do método inicialmente proposto por Lowry.

Para o doseamento proteico adicionou-se 100 µL de extracto proteico (diluído 1/40 no caso das amostras a analisar por TLC ou 1/75 no caso das amostras para dosear o inositol) a 900 µL de  $\text{H}_2\text{O}$ , ao qual se adicionou 1 mL de reagente de cobre e tartarato constituído por 1 volume de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,1% (m/v), tartarato de sódio 0,2% (m/v) e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10% (m/v), 2 volumes de SDS 5% (m/v) e 1 volume de NaOH 0,8 M. Agitou-se e esperou-se 10 min. Seguidamente, adicionou-se o reagente de Folin diluído 1/7 a todos os tubos e agitou-se de imediato. Passada 1 hora, leu-se a absorvência a 750 nm num espectrofotómetro *Camspec M350 Double Beam UV-Visible*. A curva padrão foi feita adicionando volumes adequados de uma solução de BSA 0,1 mg/mL ao volume de  $\text{H}_2\text{O}$  necessário para perfazer 1 mL ao qual se adicionou 1 mL, de modo a obter padrões com as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. De seguida, adicionou-se 1 mL do reagente de cobre e tartarato e procedeu-se como descrito para as amostras. As amostras e os padrões foram feitos em triplicado.

### III.3.8. PCR quantitativo em tempo real (*Real-time Q-PCR*)

A transcrição reversa seguida de PCR quantitativo (*quantitative polymerase chain reaction*), ou Q-PCR, é um método bastante sensível para quantificação de transcritos génicos (Udvardi *et al.*, 2008), podendo detectar variações muito pequenas na expressão génica (Nailis *et al.*, 2006). A disponibilidade de fluoróforos de ligação específica a dsDNA, tais como *SYBR Green*, e de aparelhos de PCR em tempo real (*real-time PCR*) para placas de 384 poços que permitem medir fluorescência no final de cada ciclo de PCR, possibilita a realização de Q-PCR para centenas de genes em paralelo. Devido à precisão, sensibilidade e flexibilidade da técnica, este é o método de eleição da maioria dos laboratórios para medir os níveis de mRNA (Udvardi *et al.*, 2008).

No presente trabalho experimental a quantificação dos mRNA foi feita por PCR quantitativo em tempo real (*real-time Q-PCR*) em dois passos, onde o produto de uma única reacção de PCR é usado como *template* em múltiplas reacções de PCR. Usou-se um procedimento de isolamento de RNA de forma a que se produzisse RNA total de grande qualidade (*kit* da AMBION) a partir de todas as amostras a serem analisadas. Seguidamente, digeriu-se o RNA purificado com DNase I para remover o DNA genómico contaminante, que pode actuar como *template* durante a reacção de PCR. Confirmou-se a inexistência de DNA genómico nas amostras de RNA tratadas após uma reacção de amplificação por PCR usando um par de *primers* que amplificam apenas sequências de DNA. A análise dos produtos resultantes foi feita por separação electroforética num gel de agarose de elevada resolução. Após este processo, partiu-se para a síntese da primeira cadeia de cDNA por transcrição reversa, usando *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus Reverse Transcriptase* (Fermentas). A síntese do cDNA foi confirmada após uma reacção de amplificação por PCR usando um par de *primers* específicos para amplificação apenas de sequências de DNA e os produtos resultantes foram novamente analisados por separação electroforética num gel de agarose de elevada resolução. O cDNA obtido no processo anterior foi finalmente analisado por Q-PCR em tempo real, usando os *primers* específicos (sequências determinadas com o auxílio do software *Primer Express 3.0*) para a quantificação dos transcritos dos genes em estudo, tendo as reacções de amplificação decorrido na presença de *Brilliant SYBR Green Master Mix* (Stratagene). Foi usado *SYBR Green* para monitorizar a síntese de DNA visto ser um fluoróforo que se liga a dsDNA mas não a ssDNA, e quando se liga a dsDNA fluoresce com grande intensidade aumentando a razão entre a fluorescência na presença de dsDNA relativamente à fluorescência na presença de ssDNA.

#### III.3.8.1. Preparação do RNA total da levedura *S. cerevisiae*

A preparação do RNA total foi feita usando o *kit* da AMBION para extracção de RNA total de levedura *S. cerevisiae*, de acordo com o protocolo dos fornecedores.

O RNA total foi preparado a partir de 75 mL de cultura a 0,15 OD<sub>600</sub>/mL em fase exponencial de crescimento, sem ou com adaptação das células a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário. As células foram recolhidas por centrifugação a 4 000 rpm, durante 1 min, à temperatura ambiente, na centrífuga *Sigma 302*. Após lavagem do sedimento com água estéril e passado para um tubo *eppendorf*, foi congelado com azoto líquido e guardado a – 80 °C.

Ao tubo com o sedimento de células adicionou-se as seguintes soluções, pela ordem apresentada: 480 µL da solução de lise, 48 µL de SDS 10% (m/v) e 480 µL da solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, sendo as células completamente lisadas após a adição de 750 µL de *beads* Zirconia e agitadas num *vortex* durante 10 min. Seguidamente, centrifugou-se a suspensão celular a 16 000 x g durante 5 min à temperatura ambiente na centrífuga *Eppendorf miniSpin* e transferiu-se 400 µL da fase aquosa para tubos *falcon* frescos de 15 mL. Adicionou-se 1,4 mL de tampão de ligação à fase aquosa, misturou-se bem e de seguida adicionou-se 940 µL de etanol absoluto. Aplicou-se 700 µL da mistura ao *Filter Cartridge* junto ao tubo de recolha e centrifugou-se durante 0,5 – 1 min à velocidade máxima na centrífuga *Eppendorf miniSpin* até a mistura passar pelo filtro. Deitou-se fora o eluído e repetiu-se todo o processo até acabar a solução. Por fim, lavou-se o filtro com 700 µL de solução de lavagem 1 e centrifugou-se durante 1 min, nas mesmas condições. Lavou-se o filtro 2x com 500 µL da solução de lavagem 2/3. Centrifugou-se durante 1 min para remover o excesso de solução de lavagem. O RNA foi eluído do *Filter Cartridge* para um tubo de recolha novo, aplicando 2 x 50 µL de solução de eluição aquecida e centrifugando durante 1 min entre cada aplicação.

A quantificação do RNA efectuou-se recorrendo ao sistema de quantificação *NanoDrop*.

#### III.3.8.2. Tratamento com DNase I

Para remover o DNA genómico contaminante que pudesse ainda estar presente no extracto de RNA, fez-se um tratamento com DNase I (Desoxirribonuclease I) que degrada ssDNA e dsDNA não desejado.



Para o tratamento de 2 µg do RNA total preparado em III.3.8.1. com DNase I, num volume final de 20 µL, adicionou-se 2 µL da solução tampão de DNase *buffer* 10x e 2 µL de DNase I (Fermentas). Incubou-se a mistura a 37 °C durante 30 min. Após esse tempo, adicionou-se 1 µL de EDTA 25 µM e incubou-se a 65 °C durante 10 min. As amostras foram guardadas a – 80 °C para posterior utilização na síntese de cDNA, após confirmação da ausência de DNA em cada amostra.

### III.3.8.3. Amplificação de uma sequência de ácidos nucleicos por PCR

A ausência de DNA nas amostras tratadas com DNase I foi confirmada após uma reacção de amplificação por PCR usando um par de *primers* que apenas amplificam sequências de DNA. Escolheu-se a sequência do gene *ZWF1*, que codifica para o 6-fosfato de glucose desidrogenase, para a confirmação anterior.

**Quadro 3 - Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados para as reacções de amplificação PCR do fragmento do gene *ZWF1*.**

Gene	Nome <i>primer</i>	Tamanho <i>primer</i> (nt)	T <sub>m</sub> (°C)	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>ZWF1</i>	ZWF1F	21	66	CCAGAGGCTTACGAGGTGTTG	227
	ZWF1R	22	66	GGGTGCTTTTCGGGCATAACAT	

Obteve-se a mistura reaccional juntando 200 ng de DNA genómico de *S. cerevisiae* (controlo positivo) ou 1 µL do RNA tratado com DNase I a 5 µL de cada um dos *primers* a uma concentração final de 1 pmol/mL, 3,76 L de dNTP com uma concentração final de 150 µM, 10 µL da solução tampão completa, com uma concentração final de MgCl<sub>2</sub> de 2,5 mM, 1 µL de Taq polimerase e adicionando H<sub>2</sub>O estéril para um volume final de 50 µL. A reacção de amplificação ocorreu em 30 ciclos num aparelho de PCR, *PTC-100 Peltier Thermal Cycler* da RJ Recharch, sendo que, em cada ciclo, a desnaturação ocorria a 95 °C durante 1 min, o *annealing* a 55 °C durante 1 min e a extensão a 72 °C durante 1,5 min, após uma desnaturação inicial a 95 °C durante 4 min.

Após a amplificação, procedeu-se à análise de 15 µL dos produtos resultantes da reacção de amplificação por electroforese num gel de agarose a 2% (m/v), utilizando como tampão de electroforese a solução TAE 1x concentrada (Tris-HCl 0,4 M pH 7,9, NaAc 1 mM e EDTA<sub>Na</sub> 1 mM) contendo BrEt a 0,2 µg/mL. Após a separação electroforética a 80 V durante cerca de 1 hora, o gel foi irradiado com UV e fotografado de modo a averiguar se ocorrera formação de produto, se este possuía o tamanho correspondente ao fragmento pretendido e se apenas se tinha formado um produto.

#### **III.3.8.4. Síntese da primeira cadeia de cDNA usando RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas)**

Para um volume final de reacção de 12 µL usou-se 1 µg de RNA total tratado com DNase I, 1 µL de *random hexamer primers* (100 µM; 0,2 µg/µL), e completou-se o volume com água destilada. Aqueceu-se a mistura até 65 °C durante 5 min, colocando-a posteriormente no gelo. Fez-se um *spin down* rápido e adicionou-se as seguintes soluções por esta ordem: 4 µL de tampão de reacção 5x, 1 µL de inibidor de RNase RiboLock (20 unid/µL), 2 µL de uma mistura de dNTP (10 mM cada) e 1 µL RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/µL). O conteúdo foi gentilmente misturado e centrifugado, procedendo-se, posteriormente, a uma incubação a 25 °C durante 10 min. Incubou-se novamente a mistura de reacção mas a 45 °C durante 60 min e inactivou-se o enzima aquecendo a mistura a 70 °C durante 10 min. Por fim, adicionou-se 40 µL de H<sub>2</sub>O a cada reacção e guardaram-se as amostras a – 20 °C durante uma semana ou a – 80 °C por mais tempo.

A síntese do cDNA foi confirmada após uma reacção de amplificação por PCR usando um par de *primers* específicos para a amplificação de uma sequência do gene *ZWF1*, tal com descrito em III.3.8.3. Neste caso, analisou-se no gel de agarose apenas 1 µL do produto de reacção de PCR.

#### **III.3.8.5. Análise por PCR quantitativo em tempo real (Real-time Q-PCR)**

O cDNA obtido no ponto anterior foi analisado por PCR quantitativo em tempo real (Real-time Q-PCR) usando o termociclador *Mx3000P*® Q-PCR e o software *MXPRO*™ Q-PCR (Stratagene, LaJolla, CA). No Quadro 4 encontram-se as sequências nucleotídicas dos *primers*

utilizados para a quantificação da expressão dos genes em estudo. As sequências dos *primers* foram determinadas utilizando o software *Primer Express 3.0*.

**Quadro 4 – Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados para as reacções de amplificação por PCR quantitativo em tempo real.**

Gene	Nome <i>primer</i>	Sequência (5' – 3')
URA7	URA7F URA7R	ATTTAGGCAAAACCGTGCAAA CCACGCGCTCAATCCAAT
GPT2	GPT2F GPT2R	TTCTCATGACCGTCCTTCGTT ACTGCGCCCAGAGCCATA
INM1	INM1F INM1R	ACCGTGATTACTGATGATCCTACCT CGCCTACTACGGGCTCTTTG
INO1	INO1F INO1R	TGGACGAGTATTACAGTGAGTTGATG AGCCAGTAAAGAATCTTCGCAAA
PIS1	PIS1F PIS1R	GTTTCCCTGGTTACGTGTTCAAG TGGCATCGTTGTCTGCTAAAA
ITR1	ITR1F ITR1R	TGTCATTGGCGCAATCTTACA ACCGAAACCCATGATCAGTCTAC
U2	U2F U2R	GCTTTCTGTTTCTCCCTTAGTTTGG AATCCCGCGTTGGACATAAA
CDS1	CDS1F CDS1R	CCACCTCAAAGGCGATTGA CGGCGTGACGGATTCTG
CHO1	CHO1F CHO1R	CATTAAGCAGAAGGGCCTCAA TGATGTTTCGTCACCTGTAAATTTTG
INO2	INO2F INO2R	GCAGATGTGCCAACTGAGTTCA GGCGGGTTGTAGTGGTCATT

As reacções de amplificação decorreram na presença de *Brilliant SYBR Green Master Mix* (Stratagene), num aparelho de PCR *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System*, segundo o esquema apresentado no Quadro 5.

**Quadro 5 – Programa de amplificação utilizado nas reacções de amplificação por PCR quantitativo em tempo real.**

Etapa	Programa de amplificação
Activação do enzima	95 °C, 10 min
Amplificação	(95 °C, 15 seg; 60 °C, 60 seg) x 40 ciclos
Finalização	4 °C

A quantificação dos níveis de mRNA foi feita com o auxílio do *SDS Software 2.3* da *Applied Biosystems*, tendo os valores sido normalizados relativamente aos níveis de transcrito U2 na amostra (controlo interno).

### III.3.9. Doseamento do Inositol Intracelular

#### III.3.9.1. Obtenção de extractos totais

Os extractos totais para o doseamento do inositol foram obtidos de acordo com o método descrito por Azab e colaboradores (Azab *et al.*, 2009), com algumas modificações. Inoculou-se 1500 mL de meio SC a partir de uma pré-cultura da estirpe *wt*, a uma densidade celular de 0,03 OD<sub>600</sub>/mL e recolheu-se as células a 0,15 OD<sub>600</sub>/mL, após vários tempos de adaptação das células com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 e 10 min) ou sem adaptação. As células equivalentes a 500 mL de cultura foram recolhidas com o auxílio de um sistema de vácuo, através de uma membrana *Millipore TYPE HA* 0,45 µm. Após filtração, as células filtradas foram ressuspensas em cerca de 20 mL de água estéril, passando a suspensão celular para tubos *falcon* de 50 mL e centrifugando a 4 000 rpm, 1 min (centrífuga *Sigma 302*). Os sedimentos celulares obtidos foram congelados em azoto líquido e guardados a – 80 °C até se proceder à extracção. Ressuspendeu-se os sedimentos celulares em 1 mL de água e passou-se para tubos *epENDORF*. Centrifugou-se a 7 000 rpm durante 2 min (centrífuga *Eppendorf miniSpin*). Lavou-se 3 vezes com água, centrifugando entre cada lavagem. Ressuspendeu-se o sedimento final em 750 µL de água. Adicionou-se esferas de vidro (~50% volume da suspensão) e vortexou-se cada amostra 30 vezes em ciclos de 1 min, intercalando com 2 min em gelo. Os extractos

celulares foram clarificados por centrifugação: 2 min, 3 500 rpm, 4 °C (centrífuga *Sigma 4K10 refrigerada* – Rotor *ependorf 5804 R*); transferiu-se os sobrenadantes para novos tubos *ependorf* e recentrifugou-se durante 15 min a 12 000 rpm na mesma centrífuga. Recolheu-se os sobrenadantes e conservou-se a 4 °C. Do extracto obtido, retirou-se uma alíquota de 50 µL para quantificação proteica pelo método de Peterson.

### **III.3.9.2. Tratamento do extracto celular**

#### **III.3.9.2.1. Precipitação da proteína**

De forma a eliminar toda a proteína das amostras, procedeu-se ao tratamento destas com ácido perclórico de acordo com o método descrito por Ashizawa e colaboradores (Ashizawa *et al.*, 2000).

Tendo em conta que para cada ensaio são precisos um branco e três replicados (4 amostras no total), para saber o volume de extracto a submeter ao tratamento de forma a que a cada uma das amostras correspondessem 1500 µg de proteína, procedeu-se primeiramente à quantificação proteica pelo Método de Peterson. Esta massa de proteína foi calculada de forma a ter-se uma quantidade de inositol possível de ser medida pelo método de Ashisawa, dado que a sensibilidade do método é muito baixa (> 2 nmol de inositol).

Cada 125 µL de amostra (onde se completa com água a alíquota de extracto recolhida equivalente a 1500 µg de proteína) foram desproteinizados com 125 µL de ácido perclórico 16% (p/v), sendo tudo centrifugado a 5 000 x g durante 10 min, a 4 °C (centrífuga *Sigma 4K10 refrigerada* – Rotor *ependorf 5804 R*). Os sobrenadantes foram neutralizados com 65 µL de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M e centrifugados novamente.

#### **III.3.9.2.2. Cromatografia de Troca Iónica**

Para medir apenas inositol (por 1500 µg de proteína) no ensaio espectrofotométrico, as amostras desproteinizadas foram resolvidas numa coluna de troca iónica, de forma a recolher-se apenas o inositol, ficando os restantes contaminantes retidos na coluna, de acordo com o método descrito por Maslanski e Busa (Maslanski and Busa, 1990).

Antes da primeira utilização, as colunas foram lavadas com água (aproximadamente 5 vezes o volume total da coluna).

As amostras desproteinizadas foram diluídas em 5 mL de água estéril e aplicadas a uma coluna de troca iônica (contendo aproximadamente 2 mL de resina Dowex 50W 200-400 mesh), tendo-se recolhido o eluído. Lavou-se a coluna com 10 mL de água estéril e recolheu-se novamente o eluído. As amostras foram conservadas a 4 °C.

#### **III.3.9.2.3. Liofilização**

As amostras obtidas após cromatografia foram congeladas em azoto líquido e colocadas num liofilizador durante 36 horas, para secarem totalmente.

#### **III.3.9.2.4. Remoção da interferência da glucose**

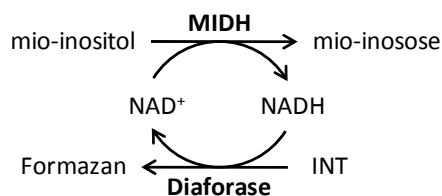
As amostras liofilizadas foram incubadas com 50 µL de uma solução de hexocinase [200 mM tampão Tris-HCl, 400 mM trifosfato de adenosina disódico (ATP-2Na) (o pH da solução foi ajustado a 8,6 pela adição de 10M NaOH) e 115 U/mL hexokinase], durante 1 hora a 37 °C para eliminar a glucose (que interfere com o ensaio) (Ashizawa *et al.*, 2000), tendo sido a reacção terminada por incubação a 100 °C durante 3 min. As amostras foram depois colocadas a 4 °C.

A quantidade de inositol foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Ashizawa e colaboradores (Ashizawa *et al.*, 2000).

#### **III.3.9.3. Método enzimático espectrofotométrico de doseamento do inositol**

Os níveis de inositol intracelulares foram determinados tendo por base o método descrito por Ashizawa e colaboradores (Ashizawa *et al.*, 2000), com algumas modificações. Trata-se de um método espectrofotométrico enzimático. Baseia-se na oxidação do mio-inositol (MI) e na redução do NAD<sup>+</sup> pelo enzima mio-inositol desidrogenase (MIDH), acoplado à reacção catalisada pelo enzima diaforase que converte o cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) a

formazan, reoxidando-se o NADH. O formazan resultante é medido espectrofotometricamente a 492 nm (Figura 11).



**Figura 11 – Esquema reaccional do método espectrofotométrico enzimático de doseamento do inositol intracelular.** O mio-inositol (MI) é oxidado pelo enzima mio-inositol desidrogenase (MIDH), sendo o NAD<sup>+</sup> reduzido. Na reacção acoplada o substrato cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) é convertido a formazan, cuja formação é seguida espectrofotometricamente a 492 nm, sendo o NADH reoxidado. Adaptado de (Ashizawa *et al.*, 2000).

As medições foram feitas em microplacas de 96 poços. Misturou-se 50 µL de solução padrão ou extracto celular tratado com 50 µL de reagente MI (constituído pelos seguintes componentes nas concentrações finais indicadas: tampão 210 mM hidrocloreto de trietanolamina – 32 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – KOH (pH 8.6), 1.2% (v/v) Triton X-100, 10 mM β-NAD, 1.0 U/mL diaforase, 0.1% (p/v) albumina de soro bovino – BSA, 2 mM INT). Diluiu-se a mistura em 100 µL do tampão 210 mM hidrocloreto de trietanolamina – 32 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – KOH (pH 8.6), no sentido de resolver um problema com a solubilização do produto INT. Seguiu-se a evolução da absorvência da solução a 492 nm durante breves instantes. Depois, iniciou-se a reacção pela adição de 5 µL da solução MIDH 2,1 U/mL, dissolvido em tampão de fosfatos de potássio 20 mM (pH 7,0) (TFK), a cada poço (excepto aos poços dos brancos). Deixou-se a mistura a 25 °C e fez-se medições de absorvência a 492 nm ao longo do tempo até que a reacção terminasse. A partir da  $\Delta Abs_{492nm}$  calculou-se o conteúdo em MI.

Foi preparada uma curva de calibração com vários padrões de MI na gama de concentrações pretendida (1 – 20 nmol inositol), tendo-se seguido a evolução da  $Abs_{492nm}$  após adição do enzima MIDH até a reacção finalizar.

Todas as medições foram realizadas em triplicado. Os brancos dos padrões da curva de calibração e dos extractos celulares consistiram em amostras submetidas ao mesmo tratamento das amostras normais, mas às quais não foi adicionado MIDH.

O aumento da  $Abs_{492nm}$  devido à formação de Formazan, por conversão do inositol devida à acção do MIDH ( $\Delta Abs_{492nm}$ ), foi calculado segundo a Equação 3.

$$\Delta Abs_{492nm} = (Abs_{492nm\ final} - Abs_{492nm\ inicial})_{amostra} - (Abs_{492nm\ final} - Abs_{492nm\ inicial})_{branco}$$

A quantidade de inositol nas amostras (nmol inositol/100 µg proteína) foi calculada por extrapolação dos valores de  $\Delta Abs_{492nm}$  na curva de calibração, efectuando as correcções para as diluições efectuadas e contabilizando os µg totais em cada amostra.

### III.3.10. Análise estatística

Os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de  $n$  experiências independentes. A comparação de valores entre dois grupos distintos foi feita realizando o teste  $t$  de *Student* bilateral, assumindo variâncias iguais entre os grupos. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Ambos os tratamentos foram realizados recorrendo ao programa *SigmaStat* versão 3.5.



## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objectivo central do presente trabalho consiste em compreender os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do gene *FAS1* induzidos pelo  $H_2O_2$ . É proposto que o  $H_2O_2$  reprime a expressão do gene *FAS1* por indução dos níveis de inositol. É, portanto, essencial quantificar os níveis de inositol em células controlo e expostas a doses adaptativas de  $H_2O_2$ , no sentido de observar se, de facto, o  $H_2O_2$  induz o aumento dos níveis de inositol intracelularmente.

Os níveis de inositol já foram medidos em *S. cerevisiae* (Azab *et al.*, 2007), pelo método fluorimétrico de Maslanski e Busa (Maslanski and Busa, 1990). No entanto, surgiram diversos problemas para o reproduzir, nunca tendo sido obtidos resultados reprodutíveis (ver IV.4.1). Portanto, optou-se pela optimização de um método espectrofotométrico. Como houve uma série de problemas, tendo-se conseguido resultados reprodutíveis apenas no final do trabalho experimental, durante a duração do projecto foram sido adiantadas todas as restantes etapas propostas.

Assim, a ordem de trabalhos proposta nos objectivos foi alterada. São, portanto, apresentados primeiramente os resultados referentes à translocação da proteína Opi1p do retículo endoplasmático para o núcleo das células quando submetidas a 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário. Seguidamente, os resultados relativos à quantificação dos fosfolípidos e à expressão dos diversos transcritos regulados pelo inositol. Finalmente, os resultados respeitantes ao doseamento do inositol, sendo inicialmente feita uma breve descrição da optimização do método.

### IV.1. Translocação nuclear do factor GFP-Opi1p

A translocação da proteína Opi1p do retículo endoplasmático (RE) para o núcleo das células já foi observada em *Saccharomyces cerevisiae*, por microscopia de fluorescência, por Loewen e colaboradores (Loewen *et al.*, 2004). Os autores recorreram a uma estirpe *opi1Δ* transformada com um plasmídeo que possui uma região GFP-Opi1p. Submeteram as células a uma dose de 100  $\mu M$  de inositol e recolheram imagens a vários tempos de incubação. Nas células controlo (não incubadas com inositol) observou-se fluorescência apenas na periferia do núcleo, apontando para uma localização da proteína Opi1p ao nível do retículo

endoplasmático. Quando as células foram sujeitas a uma dose de 100  $\mu\text{M}$  de inositol observou-se o aumento da intensidade de fluorescência no núcleo das células com o aumento do tempo de incubação.

O objectivo desta etapa do trabalho foi observar o mesmo tipo de translocação, mas submetendo as células da estirpe *opi1 $\Delta$*  + GFP-Opi1p não a um aumento da dose de inositol mas sim a uma dose de 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em estado estacionário, com o intuito de apoiar a hipótese de que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  induz o aumento dos níveis de inositol no interior das células. É importante referir que no presente trabalho experimental as células cresceram sempre na presença de 11  $\mu\text{M}$  de inositol.

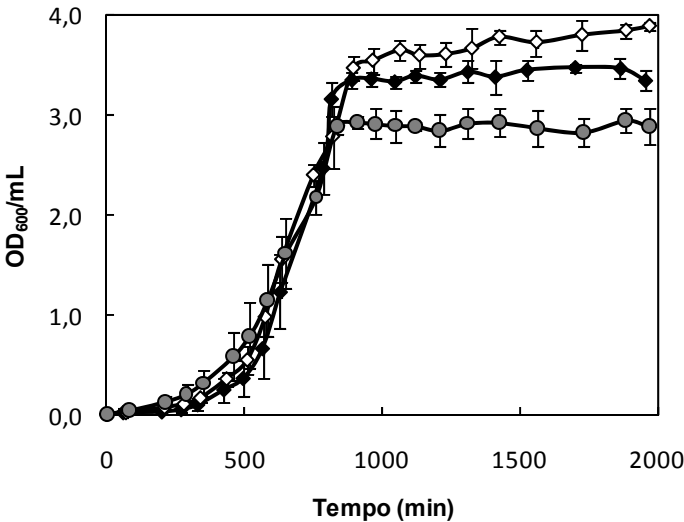
#### **IV.1.1. Caracterização das estirpes *wt*, *opi1 $\Delta$* e *opi1 $\Delta$* + GFP-Opi1p**

Os estudos da adaptação de *S. cerevisiae* ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  são normalmente feitos com as células em fase exponencial de crescimento. Nesta fase as células encontram-se em maior actividade metabólica, transcricional e traducional, pelo que a resposta adaptativa ao *stress* é mais robusta e eficaz (Sousa-Lopes *et al.*, 2004).

Como etapa inicial foi necessário caracterizar as estirpes *wt*, *opi1 $\Delta$*  e *opi1 $\Delta$*  + GFP-Opi1p no que diz respeito ao seu perfil de crescimento, objectivo este conseguido através da realização das respectivas curvas de crescimento. A comparação do crescimento das estirpes *opi1 $\Delta$*  e *opi1 $\Delta$*  + GFP-Opi1p com o crescimento da estirpe *wt* é relevante, uma vez que permite analisar se tanto a mutação no gene *OPI1* como a transformação têm efeitos no funcionamento metabólico e biológico da levedura. Por outro lado, este estudo é importante dado que permite ter uma perspectiva do tempo que as culturas demoram a atingir as diferentes fases de crescimento, permitindo também definir as condições de adição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  às células para estabelecer o estado estacionário. As curvas de crescimento das estirpes *wt*, *opi1 $\Delta$*  e *opi1 $\Delta$*  + GFP-Opi1p encontram-se, assim, apresentadas na Figura 12.

Analisando a curva de crescimento das estirpes *wt*, *opi1 $\Delta$*  e *opi1 $\Delta$*  + GFP-Opi1p (Figura 12), é possível observar um crescimento bastante lento nas primeiras 3 - 4 horas, onde as células se encontram em adaptação aos nutrientes existentes no meio de cultura - fase *lag*. A fase de crescimento exponencial foi observada entre as 4 e 13 horas de crescimento, sendo que a partir desse período é atingida a fase estacionária com um valor máximo de densidade celular variável de estirpe para estirpe. A estirpe *wt* atinge um valor de densidade celular máxima de 3,5 OD<sub>600</sub>/mL. A estirpe *opi1 $\Delta$*  atinge valores de densidade celular superiores (3,8

OD<sub>600</sub>/mL) aos da estirpe *wt* quando atinge a fase estacionária, enquanto a estirpe *opi1Δ* + GFP-Opi1p atinge valores inferiores (2,9 OD<sub>600</sub>/mL), estatisticamente diferentes dos da estirpe *wt* (Figura 12).

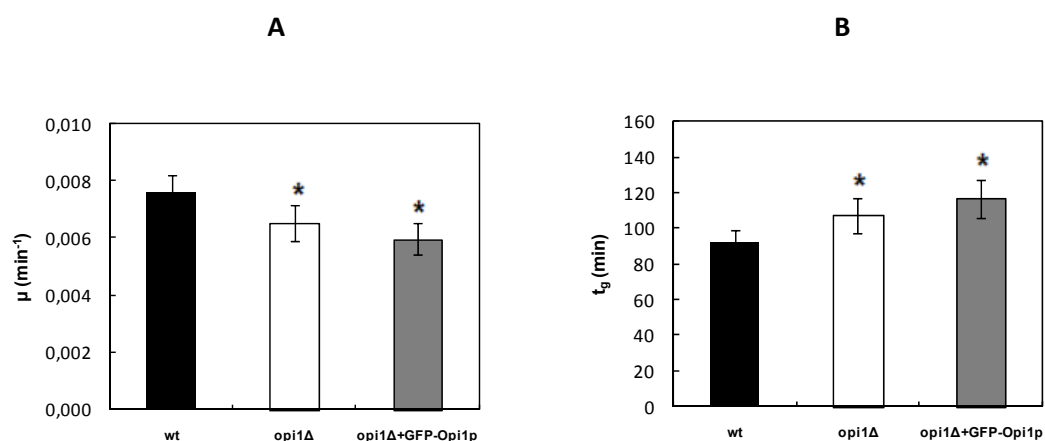


**Figura 12 – Representação das curvas de crescimento das estirpes *wt*, *opi1Δ* e *opi1Δ* + GFP-Opi1p.** Representação gráfica de OD<sub>600</sub>/mL vs. tempo (min) para as estirpes: ♦ estirpe *wt*; ◇ estirpe *opi1Δ*; ● estirpe *opi1Δ* + GFP-Opi1p. Para cada ensaio foram inoculadas culturas a 0,03 OD<sub>600</sub>/mL (1 OD<sub>600</sub>/mL ~ 2 x 10<sup>7</sup> células/mL), a partir de pré-culturas, colocadas a crescer a 30 °C e 160 rpm num agitador orbital, sendo o seu crescimento seguido medindo a densidade óptica a 600 nm. Os pontos experimentais correspondem à média ± desvio padrão das leituras obtidas em cinco experiências independentes. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de *p* < 0.05.

Através da linearização dos valores de OD<sub>600</sub>/mL vs. tempo (min) foram determinados a taxa de crescimento específico ( $\mu$ ) e o tempo de geração ( $t_g$ ) a partir da fase exponencial de crescimento, para as três estirpes. Os valores calculados para as diferentes estirpes encontram-se apresentados no Quadro 6 e representados graficamente na Figura 13.

**Quadro 6 – Valores de  $\mu$  (taxa de crescimento específico) e  $t_g$  (tempo de geração) calculados para as estirpes *wt*, *opi1Δ* e *opi1Δ* + GFP-Opi1p, a partir das respectivas curvas de crescimento.** Os resultados apresentados correspondem à média ± desvio padrão de cinco experiências independentes. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de *p* < 0.05.

	$\mu$ (min <sup>-1</sup> )	$t_g$ (min)
<i>wt</i>	0,00759 ± 0,000617	91,810 ± 6,839
<i>opi1Δ</i>	0,00651 ± 0,000639	107,196 ± 9,813
<i>opi1Δ</i> + GFP-Opi1p	0,00597 ± 0,000560	116,927 ± 10,708



**Figura 13 – Representação gráfica dos valores de taxa de crescimento específico e tempo de geração calculados para as estirpes *wt*, *opi1Δ* e *opi1Δ* + GFP-*Opi1p*.** Representação gráfica dos valores de (A)  $\mu$  (taxa de crescimento específico) e (B)  $t_g$  (tempo de geração) calculados para as estirpes *wt*, *opi1Δ* e *opi1Δ* + GFP-*Opi1p*, com base nas respectivas curvas de crescimento. Os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de cinco experiências independentes. \* $p < 0.05$  vs. *wt*.

Tal como já havia sido observado em estudos anteriores, a estirpe *wt* demora aproximadamente 90 min a duplicar a sua população ( $t_g = 91,810 \pm 6,839$  min). Esperava-se que a introdução da mutação (*opi1Δ*) acarretasse consequências no funcionamento metabólico e, consequentemente, no crescimento, facto esse que se verificou visto haver uma diminuição da taxa de crescimento específico e um aumento do tempo de geração (Quadro 6 e Figura 13), assim como o aumento do valor máximo de densidade celular que a estirpe atinge em fase estacionária (Figura 12). Com a transformação e reintrodução de *Opi1p*, esperar-se-ia recuperar a funcionalidade perdida com a introdução da mutação, esperando obter-se valores de taxa de crescimento e de tempo de geração semelhantes aos observados para a estirpe *wt*. Isto não se verificou, tendo-se obtido valores de taxa de crescimento ainda mais baixos que os da estirpe *opi1Δ* e valores de tempo de geração mais elevados (Quadro 6 e Figura 13), assim como um valor máximo de densidade celular em fase estacionária inferior ao da estirpe *wt*. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto de as células estarem transformadas com um plasmídeo não integrativo multicópia. Desta transformação resultam elevados níveis de *Opi1p* na célula, que poderão afectar negativamente as vias que dependem da regulação desta proteína.

#### **IV.1.2. Optimização das condições para estabelecer o estado estacionário de $H_2O_2$**

Para estabelecer o estado estacionário de 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  foi necessário determinar a constante de consumo de  $H_2O_2$  pelas células intactas e a actividade do enzima glucose oxidase no meio de cultura, de modo que a produção de  $H_2O_2$  pelo glucose oxidase iguale o consumo pelas células.

Desta forma, começou por determinar-se a actividade do enzima glucose oxidase no meio de cultura (meio SC) para saber qual a quantidade necessária a adicionar às culturas para contrabalançar o consumo de  $H_2O_2$  pelas células.

##### **IV.1.2.1. Actividade do enzima glucose oxidase**

A actividade do enzima glucose oxidase no meio SC foi determinada conforme explicado em III.3.4. Determinou-se uma actividade de 27,392  $\mu M/min$ , correspondente ao declive da recta ajustada aos pontos do gráfico da  $[H_2O_2]$  ( $\mu M$ ) vs tempo (min). Tendo em conta os volumes reaccionais obteve-se uma actividade específica de  $5,478 \times 10^{-3}$   $\mu mol/min/\mu L$ .

##### **IV.1.2.2. Consumo de $H_2O_2$ pelas células intactas**

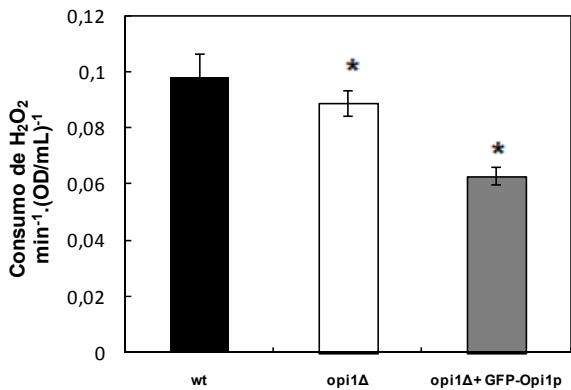
A determinação do consumo de  $H_2O_2$  pelas células intactas foi feita de acordo com o procedimento referido em III.3.3. Os valores das constante de consumo  $k$  ( $min^{-1}$ ) e de consumo de  $H_2O_2$  ( $min^{-1} \cdot (OD/mL)^{-1}$ ) obtidos, considerando a normalização referida encontram-se apresentados no Quadro 7 e representados na Figura 14.

Analisando os valores de consumo de  $H_2O_2$  para as estirpes *wt*, *opi1Δ* e *opi1Δ* + GFP-Opi1p, apresentados no Quadro 7 e representados na Figura 14, pode observar-se que as células mutadas *opi1Δ* consomem  $H_2O_2$  a uma velocidade menor, o que pode ser justificado pela introdução da mutação, que interfere com o metabolismo celular, nomeadamente com o metabolismo dos fosfolípidos. Relativamente à estirpe *opi1Δ* + GFP-Opi1p esperar-se-ia, mais uma vez, observar um comportamento semelhante ao da estirpe *wt*, o que não se verificou possivelmente devido ao facto de as células estarem transformadas com plasmídeo não

integrativo multicópia, estando presente uma concentração da proteína Opi1p maior que nas células controlo, o que pode estar a influenciar negativamente, por exemplo, o metabolismo de alguns fosfolípidos.

**Quadro 7 – Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (min<sup>-1</sup>.(OD/mL)<sup>-1</sup>) e constantes de consumo k (min<sup>-1</sup>) determinados para as estirpes *wt*, *opi1Δ* e *opi1Δ* + GFP-Opi1p.** Os resultados do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (min<sup>-1</sup>.(OD/mL)<sup>-1</sup>) correspondem à media ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes considerando as OD/mL medidas no início de cada ensaio (variável de dia para dia). As constantes de consumo k (min<sup>-1</sup>) foram calculadas com base nos consumos (min<sup>-1</sup>.(OD/mL)<sup>-1</sup>) considerando 0,15 OD<sub>600</sub>/mL como densidade celular representativa de todos os ensaios. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de *p* < 0.05.

	<i>wt</i>	<i>opi1Δ</i>	<i>opi1Δ</i> + GFP-Opi1p
<b>k (min<sup>-1</sup>)</b>	0,015	0,013	0,009
<b>Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (min<sup>-1</sup>.(OD/mL)<sup>-1</sup>)</b>	0,098 ± 0,009	0,089 ± 0,005	0,063 ± 0,003



**Figura 14 – Representação dos valores do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (min<sup>-1</sup>.(OD/mL)<sup>-1</sup>) para as estirpes *wt*, *opi1Δ* e *opi1Δ* + GFP-Opi1p.** Os resultados do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (min<sup>-1</sup>.(OD/mL)<sup>-1</sup>) correspondem à media ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. \**p* < 0,05 vs. *wt*.

Para uma melhor compreensão destes resultados seria interessante comparar a actividade dos enzimas que catalisam a remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalase e glutathione peroxidase, para as diferentes estirpes. Se as actividades enzimáticas referidas fossem semelhantes entre as estirpes, os diferentes consumos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observados podem ser justificados pelo explicado anteriormente. No entanto, as diferenças de consumo observadas para as diferentes estirpes

podem indiciar diferentes actividades de catalase e glutathione peroxidase. O aumento de actividade destes enzimas poderá indicar uma desrepressão dos genes envolvidos na resposta ao  $H_2O_2$  e que afectam a permeabilidade da membrana plasmática a este agente. Nestas condições, a membrana das células de *S. cerevisiae* torna-se mais impermeável ao  $H_2O_2$ , justificando a diminuição de consumo de  $H_2O_2$  observada.

#### **IV.1.2.3. Cálculo dos volumes de glucose oxidase e $H_2O_2$ para estabelecer o Estado Estacionário de $H_2O_2$**

A partir da determinação experimental do consumo de  $H_2O_2$  pelas células intactas e da actividade do enzima glucose oxidase em meio SC, foram determinados os volumes de glucose oxidase a adicionar às culturas de modo a contrapor o consumo de  $H_2O_2$  pelas células, no sentido de se estabelecer um estado estacionário de 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$ .

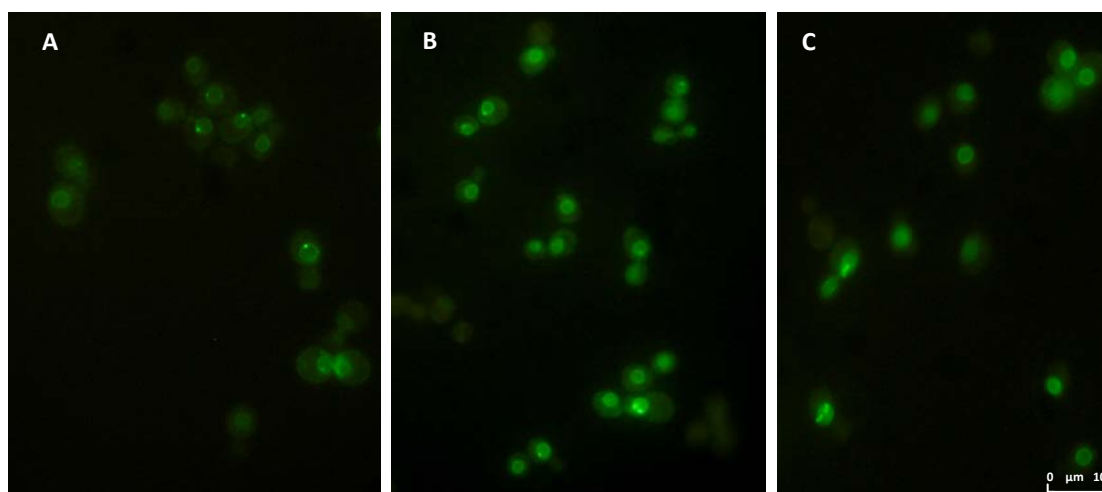
#### **IV.1.3. Visualização da translocação nuclear do factor GFP-Opi1p por microscopia de fluorescência**

Uma vez estabelecidas as condições de adição de 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário à cultura *opi1 $\Delta$*  + GFP-Opi1p, analisou-se a translocação nuclear do factor GFP-Opi1p.

Recorrendo a microscopia de fluorescência procedeu-se à visualização da proteína Opi1p-GFP em células *opi1 $\Delta$*  + GFP-Opi1p controlo e sujeitas a uma dose de 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário. De forma a ter-se uma noção temporal da translocação da proteína do retículo endoplasmático para o núcleo das células foram recolhidas imagens a vários tempos de adaptação.

Para cada ensaio, antes do início da adaptação das células *opi1 $\Delta$*  + GFP-Opi1p, foi feito um controlo de auto-fluorescência recorrendo à estirpe *opi1 $\Delta$*  não tido sido observada fluorescência para as células desta estirpe (dados não apresentados). Relativamente às células *opi1 $\Delta$*  + GFP-Opi1p controlo, não sujeitas a incubação com  $H_2O_2$ , foi possível observar de forma clara a marcação apenas na periferia do núcleo (Figura 15A), indicando que a GFP-Opi1p se encontra localizada externamente à membrana nuclear. Quando se submeteu as células a uma dose de 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário observou-se um aumento da intensidade de fluorescência no interior do núcleo com o aumento do tempo de incubação das células com

este agente. Aos 5 min de incubação as diferenças observadas foram pouco notórias, mas aos 10 min já começou a observar-se uma grande quantidade das células marcadas no núcleo (Figura 15B), sendo que o máximo do número de células marcadas com a proteína fluorescente neste compartimento foi observado aos 20 min de exposição ao  $H_2O_2$  (Figura 15C). Aos 30 min já foi notória uma diminuição do número de células marcadas fluorescentemente no núcleo, sendo que aos 40 min o número de células com esse fenótipo era já bastante reduzido (dados não apresentados). Estes resultados apoiam a hipótese de que a proteína Opi1p está a deslocar-se do retículo endoplasmático para o núcleo das células quando expostas a uma dose sub-letal de  $H_2O_2$  em estado estacionário.

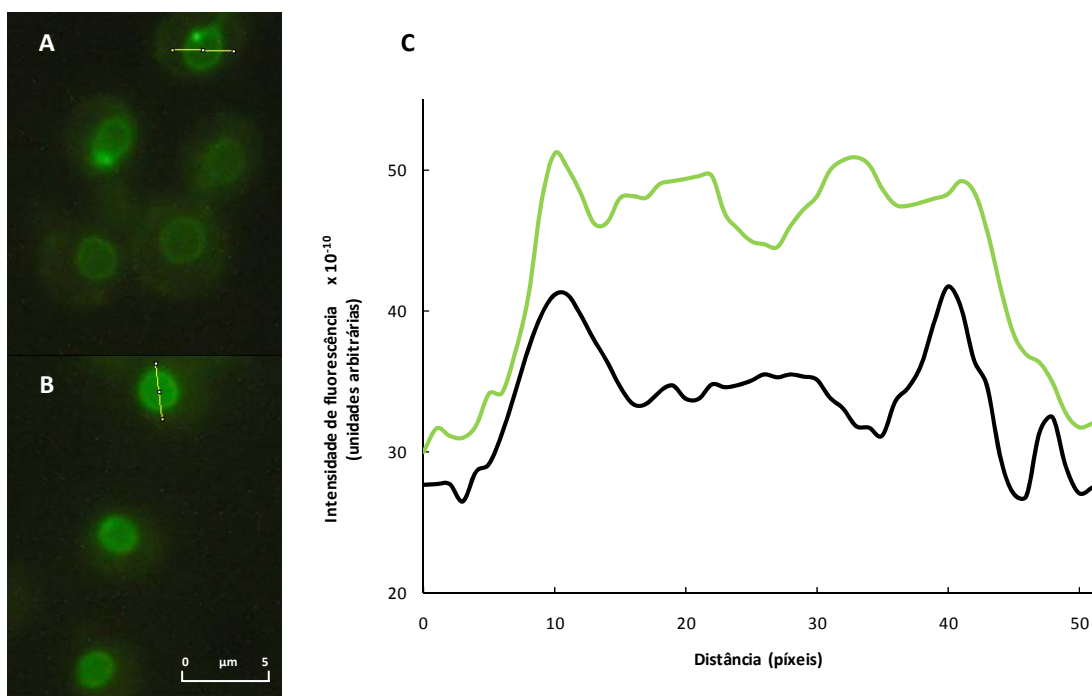


**Figura 15 – Microscopia de fluorescência de células *opi1Δ* + GFP-Opi1p controlo e expostas a 150  $\mu M$   $H_2O_2$  em estado estacionário. (A) células controlo (sem  $H_2O_2$ ); células expostas a 150  $\mu M$   $H_2O_2$  em estado estacionário aos (B) 10 min e (C) 20 min. As imagens apresentadas são representativas de um conjunto de três experiências independentes.**

Para comprovar que, de facto, se observou um aumento da fluorescência no núcleo das células quando expostas ao  $H_2O_2$ , fez-se um tratamento das imagens recorrendo ao programa *ImageJ* (Abramoff *et al.*, 2004; Rasband, 1997) que possibilita a aquisição do perfil de intensidade de fluorescência ao longo das células, traçando uma linha que atravessa a célula, passando pelo núcleo. Analisando os resultados apresentados na Figura 16, é possível observar dois picos de intensidade de fluorescência localizados na periferia do núcleo nas células controlo, havendo uma quebra notória da intensidade de fluorescência no interior do núcleo (Figura 16C). Já para as células expostas ao  $H_2O_2$  aos 20 min, observa-se um aumento da intensidade de fluorescência à medida que se caminha do citoplasma para a periferia do



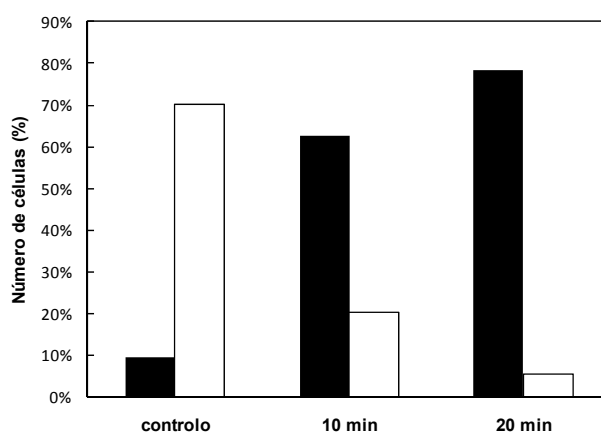
núcleo das células, sendo essa intensidade de fluorescência observada na periferia do núcleo mantida quando se atinge o núcleo, como pode observar-se pelo patamar de intensidade de fluorescência representado na Figura 16D.



**Figura 16 – Perfis de intensidade de fluorescência ao longo das células *opi1Δ* + GFP-Opi1p controle e expostas a 150  $\mu$ M de  $H_2O_2$ .** Imagem de microscopia de fluorescência de: (A) Células controle (sem  $H_2O_2$ ); (B) células expostas a 150  $\mu$ M  $H_2O_2$  em estado estacionário aos 20 min. Perfil de intensidade de fluorescência de: — células controle (sem  $H_2O_2$ ); — células expostas a 150  $\mu$ M  $H_2O_2$  em estado estacionário aos 20 min. Os resultados apresentados são representativos de um conjunto de três experiências independentes.

Aquando da visualização das células ao microscópio notou-se sempre uma certa heterogeneidade em cada preparação, isto é, algumas células com fenótipo distinto daquele observado para a maioria. Não é de estranhar esta heterogeneidade pois as células *opi1Δ* + GFP-Opi1p estão transformadas com um plasmídeo não integrativo, o que faz com que possa haver um número diferente de plasmídeos em cada célula transformada, logo com intensidade de expressão diferente. Para uma melhor quantificação do fenômeno observado, em cada preparação, células controle e adaptadas com  $H_2O_2$  aos 10 e 20 min, foi contado o número de células correspondentes aos vários fenótipos observados, tendo-se achado por bem distribuí-los por três categorias: (a) células marcadas apenas na periferia; (b) células marcadas no

núcleo; (c) células aberrantes ou de fenótipo duvidoso. Depois de uma análise detalhada das várias imagens recolhidas e das contagens efectuadas, representou-se graficamente a percentagem de células com os fenótipos maioritários (a e b) relativamente ao total de células contadas, para as células controlo e células submetidas a 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 e 20 min, considerando sempre as células de fenótipo minoritário (c) para o total de células contadas. Como é possível observar na Figura 17, quando não há exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controlo) a maioria das células encontra-se marcada apenas na periferia do núcleo (70,2%), indicando que a Opi1p se encontra associada ao retículo endoplasmático. Aos 10 min esse número começa a decair, observando-se um aumento do número de células marcadas no núcleo (62,6%), indicando que a Opi1p está a translocar-se para este compartimento. Aos 20 min após a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a maioria das células encontra-se marcada no núcleo (78,4%), sendo residual o número de células marcadas apenas na periferia (5,4%) (Figura 17). Para os vários tempos observados, o número de células aberrantes ou duvidosas correspondeu a aproximadamente 18% do total de células analisadas.



**Figura 17 – Número de células *opi1Δ* + GFP-Opi1p com os fenótipos maioritários, durante a exposição a 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário.** *controlo* – células controlo, não expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; *10 min* - células expostas a 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário aos 10 min; *20 min* - células expostas a 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário aos 20 min. ■ Percentagem de células marcadas no núcleo; □ Percentagem de células marcadas apenas na periferia. Os dados apresentados resultam de três experiências independentes, tendo sido contado um total de 476 células controlo, 374 células expostas a 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aos 10 min e 445 células expostas a 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aos 20 min.

Os dados apresentados confirmam a translocação da proteína Opi1p do retículo endoplasmático para o núcleo das células quando estas são expostas a uma dose sub-letal de 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário, apoiando a hipótese de que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actua como

indutor de um aumento dos níveis de inositol no interior das células sendo desencadeado, posteriormente, este mecanismo de translocação.

## **IV.2. Quantificação dos níveis de fosfolípidos totais por TLC bidimensional**

Como foi referido na introdução, a biossíntese dos fosfolípidos em *S. cerevisiae* é um processo bastante complexo que envolve tanto regulação génica como bioquímica. Todas as reacções da via de biossíntese de fosfolípidos estão dependentes da regulação dos enzimas e pelos próprios metabolitos. Tanto a expressão como a actividade desses enzimas afectam o comportamento global da via (Carman and Han, 2009b).

Viu-se que quando é adicionado inositol (75  $\mu$ M) ao meio de células *S. cerevisiae* em crescimento, há uma reprogramação dramática da síntese e *turnover* dos lípidos celulares (Gaspar *et al.*, 2006) que, em última análise, poderá influenciar a composição/organização da membrana plasmática com resultados na permeabilidade da mesma. Sabe-se ainda que o inositol é um dos factores responsáveis pelo controlo transcricional dos genes que codificam para muitos dos enzimas necessários à biossíntese de fosfolípidos. Além disso, viu-se que muitas das actividades enzimáticas para a biossíntese de fosfolípidos são reprimidas quando células de levedura são expostas a inositol (Gaspar *et al.*, 2006; Jesch *et al.*, 2005).

Vários autores viram que as principais alterações observadas devidas à adição de inositol ao meio de cultura foram um aumento do consumo de PA (Jesch *et al.*, 2005) e de CDP-DAG, precursores intermediários de PI, verificando-se um aumento da velocidade de síntese de PI que, simultaneamente, desencadeia uma alteração na expressão de muitos genes (Gaspar *et al.*, 2006).

Tendo em conta que se espera observar um aumento dos níveis de inositol quando as células de *S. cerevisiae* são expostas a doses adaptativas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, colocou-se a hipótese de que este agente, através do aumento dos níveis de inositol, leve a uma alteração do perfil fosfolipídico global. Foi visto também que, quando as células são expostas a doses adaptativas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ocorre a translocação da proteína Opi1p do retículo endoplasmático para o núcleo (resultados obtidos em IV.1.). No modelo proposto por Loewen e colaboradores (Loewen *et al.*, 2004) a translocação da Opi1p para o núcleo das células deve-se à diminuição dos níveis de PA, resultante da mobilização deste para a síntese de PI, quando na presença de inositol.

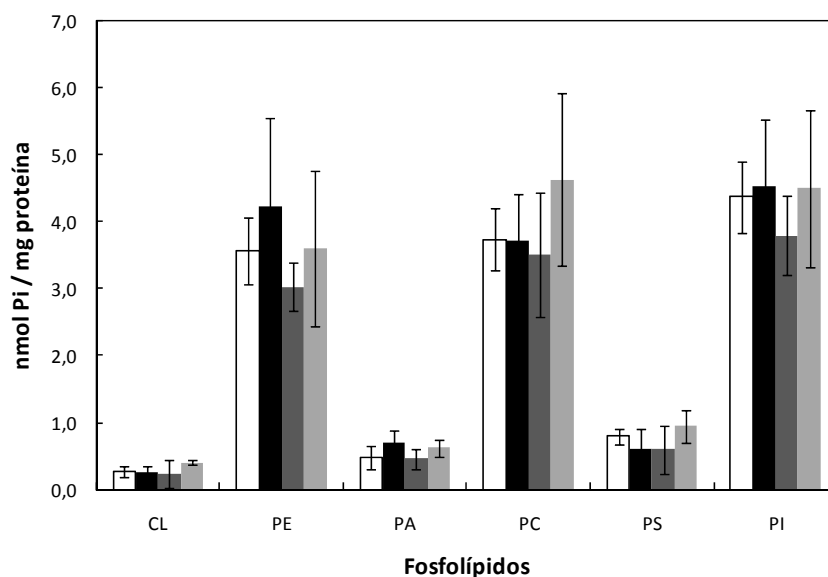
Com o intuito de compreender melhor esta regulação tão complexa, quantificou-se os níveis totais dos vários fosfolípidos em células controlo e sujeitas a 150  $\mu$ M de  $H_2O_2$  em estado estacionário, por TLC bidimensional. Os tempos de adaptação ao  $H_2O_2$  foram escolhidos de acordo com os resultados da microscopia de fluorescência. Na análise da translocação da Opi1p para o núcleo, foi visto que quando as células foram expostas a doses adaptativas de  $H_2O_2$ , aos 10 min de adaptação já se observou um número significativo de células marcadas fluorescentemente no núcleo, sendo que aos 20 min já a proteína Opi1p se encontrava no núcleo da maioria das células visualizadas. Foram, portanto, escolhidos os tempos de adaptação de 10 e 20 min para análise dos níveis de fosfolípidos. Partindo do pressuposto que as alterações que se pretendem observar nos níveis dos fosfolípidos ocorrem antes deste mecanismo de translocação, escolheu-se o tempo de 5 min como referência para as alterações ocorridas nos momentos iniciais de exposição ao  $H_2O_2$ .

Quantificou-se, então, os níveis de fosfolípidos em extractos totais de células *wt* controlo e expostas a 150  $\mu$ M de  $H_2O_2$  em estado estacionário aos 5, 10 e 20 min de adaptação a este agente, encontrando-se os resultados apresentados no Quadro 8 e na Figura 18.

Analisando os resultados da Figura 18 e após o tratamento estatístico dos mesmos, observou-se que não houve diferenças significativas no que respeita aos fosfolípidos totais durante a exposição das células ao  $H_2O_2$  comparativamente com as células controlo. Porém, pode observar-se uma tendência para um aumento de PE aos 5 min e uma diminuição dos níveis deste fosfolípido aos 10 min de exposição a 150  $\mu$ M de  $H_2O_2$  em estado estacionário. De igual forma, pode dizer-se que há uma tendência para um aumento dos níveis de PC aos 20 min de exposição. No que diz respeito aos níveis de PI, esperava observar-se um aumento dos mesmos, tal como referido atrás. No entanto, não foram observadas alterações, o que pode ser justificado por uma provável mobilização de PI para fosfoinositóis e esfingolípidos durante o processo adaptativo (ver Figura 5). Relativamente aos níveis de PA, dado que se observou uma translocação da Opi1p para o núcleo das células, que resulta de uma diminuição dos níveis de PA, esperar-se-ia observar uma diminuição durante a adaptação das células ao  $H_2O_2$ , o que não se observou. Visto que se procedeu à quantificação dos fosfolípidos totais é provável que, a haver alterações, estas possam ocorrer localmente na célula e, desde modo, estarem a passar despercebidas quando a análise é global. Uma abordagem alternativa seria isolar a fracção do retículo endoplasmático no sentido de quantificar os níveis deste fosfolípido neste compartimento e poder concluir acerca do efeito do  $H_2O_2$  sobre esses níveis e, consequentemente, justificar a translocação da Opi1p para o núcleo das células, de acordo com o modelo de Loewen e colaboradores (Loewen *et al.*, 2004).

**Quadro 8 - Quantificação dos níveis de fosfolípidos totais em células wt controlo e expostas a 150  $\mu$ M de  $H_2O_2$  em estado estacionário.** CL – cardiolipina; PE – fosfatidiletanolamina; PA – ácido fosfatídico; PC – Fosfatidilcolina; PS – Fosfatidilserina; PI – fosfatidilinositol. Os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos seis experiências independentes. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de  $p < 0.05$ .

nmol Pi / mg proteína		Fosfolípidos					
		CL	PE	PA	PC	PS	PI
<b>Controlo</b>		0,26 $\pm$ 0,08	3,56 $\pm$ 0,51	0,48 $\pm$ 0,17	3,74 $\pm$ 0,46	0,79 $\pm$ 0,12	4,37 $\pm$ 0,53
<b>Adaptação 150 <math>\mu</math>M <math>H_2O_2</math></b>	<b>5 min</b>	0,25 $\pm$ 0,10	4,23 $\pm$ 1,32	0,69 $\pm$ 0,19	3,71 $\pm$ 0,70	0,61 $\pm$ 0,30	4,52 $\pm$ 1,01
	<b>10 min</b>	0,24 $\pm$ 0,21	3,03 $\pm$ 0,36	0,46 $\pm$ 0,15	3,51 $\pm$ 0,92	0,60 $\pm$ 0,36	3,79 $\pm$ 0,59
	<b>20 min</b>	0,41 $\pm$ 0,03	3,59 $\pm$ 1,16	0,62 $\pm$ 0,12	4,63 $\pm$ 1,29	0,94 $\pm$ 0,24	4,50 $\pm$ 1,17



**Figura 18 – Quantificação dos níveis de fosfolípidos totais em células wt controlo e expostas a 150  $\mu$ M de  $H_2O_2$  em estado estacionário.** □ Células controlo; ■ Células adaptadas a 150  $\mu$ M  $H_2O_2$  aos 5 min; ■ Células adaptadas a 150  $\mu$ M  $H_2O_2$  aos 10 min; ■ Células adaptadas a 150  $\mu$ M  $H_2O_2$  aos 20 min. CL – cardiolipina; PE – fosfatidiletanolamina; PA – ácido fosfatídico; PC – Fosfatidilcolina; PS – Fosfatidilserina; PI – fosfatidilinositol. Os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos seis experiências independentes. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de  $p < 0.05$ .

Anteriormente foram quantificados os níveis de fosfolípidos na membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Pedroso *et al.*, 2009), tendo sido observado um aumento em 44% dos níveis de PC aos 90 min de adaptação ao  $H_2O_2$ . Relativamente à quantificação dos níveis de PC totais

observou-se também um aumento dos níveis deste fosfolípido aos 20 min de adaptação (Figura 18), confirmando a tendência para a manutenção desses níveis aumentados com o tempo de adaptação das células ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No que diz respeito aos níveis de PE foi observada uma diminuição em 46% deste fosfolípido na membrana plasmática aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não tendo sido observada a mesma tendência nos níveis totais de fosfolípidos (Figura 18).

É interessante referir que as alterações dos níveis de fosfolípidos induzidos pelo inositol observadas por Gaspar e colaboradores (Gaspar *et al.*, 2006) representam uma situação em que as células crescem na presença de 75 µM de inositol, sendo os níveis de fosfolípidos destas células comparados aos de células que crescem na ausência de inositol (controlo). No presente estudo, as células crescem normalmente na presença de 11 µM de inositol, o que poderá não facilitar a visualização de alterações nos níveis totais de fosfolípidos após o tratamento com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário, podendo este tratamento induzir apenas pequenas alterações nos níveis de inositol, não atingindo os 75 µM de inositol utilizados no estudo anterior.

Relativamente à proporção de cada fosfolípido nas células controlo observou-se, do fosfolípido presente em maior quantidade para o fosfolípido presente em menor quantidade, PI > PC > PE > PS > PA > CL (Figura 18). Há que referir que esta ordem não se alterou quando foi contabilizado o total de fosfolípidos em cada ensaio (dados não apresentados). Comparando estes valores com os obtidos por Iwanyshyn e colaboradores (Iwanyshyn *et al.*, 2004), PC > PE > PI > PS > PA > CL, é possível observar que há diferenças para os fosfolípidos presentes em maior quantidade. No entanto, estas discrepâncias podem ser explicadas analisando os resultados apresentados por Daum e colaboradores (Daum *et al.*, 1999), onde se observam diferenças nas proporções dos vários fosfolípidos em diferentes tipos de células. Porém, estas diferenças podem também ser justificadas pelas diferentes composições dos meios de crescimento utilizados. No presente trabalho experimental, as células crescem num meio sintético (meio pobre) na presença de 11 µM inositol. O meio de crescimento das células utilizado por Iwanyshyn e colaboradores (meio sintético) é totalmente desprovido de inositol. No caso de Daum e colaboradores as células crescem num meio com 0,1M de inositol e desprovido de colina. Por outro lado, as diferenças observadas podem dever-se à sensibilidade da técnica que conduz a erros significativos (ver desvios-padrão na Figura 18). Se os desvios-padrão forem tidos em conta, pode dizer-se que a quantidade dos fosfolípidos PC, PE e PI são equiparáveis, só podendo fazer-se uma comparação mais exacta aumentando o número de replicados experimentais.

As dificuldades na análise dos níveis dos fosfolípidos devem-se essencialmente à sensibilidade da técnica. A TLC é uma técnica sujeita a bastantes erros, sendo que os resultados vêm afectados por eles. Esses efeitos são notórios essencialmente para os fosfolípidos cujos níveis são reduzidos, como o caso do PA, não sendo possível observar diferenças significativas entre células controlo e adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por este motivo, é necessário um grande número de replicados experimentais. Futuramente, poder-se-ia quantificar os níveis dos fosfolípidos através de técnicas mais sensíveis, recorrendo a marcação com isótopos radioactivos, como <sup>32</sup>P<sub>i</sub> e <sup>32</sup>P, como já foi feito por Iwanyshyn e colaboradores (Iwanyshyn *et al.*, 2004) e por Jani e Lopes (Jani and Lopes, 2009), respectivamente. O isolamento de fracções celulares, no sentido de analisar o que acontece aos níveis dos fosfolípidos a nível local, é também uma hipótese a considerar. Neste caso, teria de ser analisado o conteúdo de fosfolípidos no RE, nomeadamente os níveis de PA, que é tida como a molécula sinalizadora dos níveis celulares de inositol.

Pode, então, concluir-se que a esta abordagem de quantificação total dos fosfolípidos não foi conclusiva relativamente aos resultados esperados. Pensa-se, no entanto, que estes resultados advêm de estar a fazer-se uma análise global dos níveis de fosfolípidos e não em fracções celulares isoladas.

### **IV.3. Quantificação de diversos transcritos regulados pelo inositol por PCR quantitativo em tempo real**

No seguimento dos resultados obtidos para a análise da translocação da Opi1p para o núcleo das células quando expostas a doses adaptativas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e tendo esta proteína uma função repressora da transcrição dos genes que possuem a sequência UAS<sub>INO</sub> nos seus promotores, determinou-se os níveis de expressão de diversos transcritos regulados pelo inositol.

Com o intuito de analisar a expressão de vários genes que codificam enzimas das vias de síntese dos fosfolípidos, cuja expressão de alguns deles se pensa estar alterada em resposta ao aumento dos níveis de inositol induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quantificou-se vários transcritos por PCR quantitativo em tempo real.

Para este estudo, foram seleccionados vários genes potencialmente relevantes na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De acordo com a hipótese de trabalho proposta (o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induz um aumento de inositol na célula), foram escolhidos genes que podem estar relacionados com esse possível

aumento. Os genes *INO1* e *INM1*, cujos produtos estão envolvidos na síntese *de novo* de inositol a partir de 6P-glucose (Figura 5), foram escolhidos devido à sua importância na síntese endógena de inositol. O gene *ITR1*, que codifica para o transportador Itr1p, foi seleccionado devido à sua relevância no mecanismo de transporte de inositol do exterior para o interior da célula. O gene *INO2* codifica para o factor de transcrição Ino2p, um dos factores que se liga à sequência UAS<sub>INO</sub>, que tal como se disse anteriormente é uma sequência regulada pelo inositol. A análise da sua expressão é também de extrema importância visto estar a estudar-se os mecanismos moleculares da expressão do gene *FAS1*, um dos genes que possuem a sequência UAS<sub>INO</sub> nas suas regiões promotoras. É de referir que quer o *INO1*, quer o *ITR1*, quer o *INO2*, são genes regulados pelo inositol.

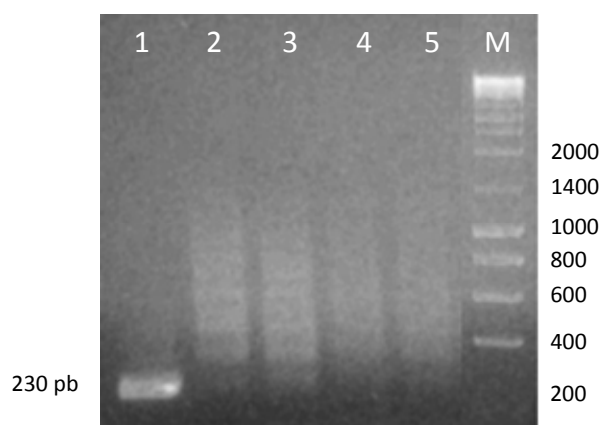
Foram ainda seleccionados alguns genes relevantes nas vias de biossíntese dos fosfolípidos. O gene *PIS1* está envolvido na síntese de PI a partir do inositol e de CDP-DAG. O gene *GPT2* codifica o enzima 3-fosfato de glicerol aciltransferase 2, importante na conversão de 3-fosfato de glicerol a ácido lisofosfatídico, que é depois convertido a PA. O gene *CDS1* responsável pela codificação do enzima CDP-diacilglicerol sintase, que catalisa a conversão de PA em CDP-DAG. O gene *CHO1*, que codifica o enzima fosfatidilserina sintase (PS sintase), envolvido na síntese de PS, é relevante para a análise da via *de novo* da biossíntese dos fosfolípidos. O gene *URA7*, cujo produto é o enzima CTP sintetase, relevante nas vias de síntese de CDP-DAG a partir de PA, mas também na síntese de PE e PC. É importante referir que a expressão dos genes *CDS1* e *CHO1* é controlada pelos níveis de inositol intracelulares.

Para a determinação dos níveis de transcrito, analisou-se quais as alterações ocorridas aos 10, 20 e 40 min de adaptação das células a uma dose de 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário, por comparação com células controlo. Os tempos de adaptação escolhidos estão relacionados com as alterações observadas nos estudos de translocação da Opi1p para o núcleo das células por microscopia de fluorescência, já explicado anteriormente. Observou-se o início da translocação da Opi1p para o núcleo aos 10 min estando a Opi1p totalmente translocada aos 20 min. Daí se deduz que as alterações observadas ao nível da expressão dos genes serão iniciadas próximo dos 10 min de adaptação ou depois. Como tal, escolheram-se os 10, 20 e 40 min de adaptação das células ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para analisar essas possíveis alterações.

Os RNA totais foram preparados de acordo com o kit da AMBION, como descrito em III.3.9.1., sendo posteriormente quantificados no *NanoDrop*. De forma a remover o DNA contaminante que possivelmente estaria presente no extracto de RNA tratou-se as amostras com DNase I (*Fermentas*), que degrada o ssDNA e o dsDNA. Para confirmar a ausência de DNA genómico contaminante nas amostras tratadas com DNase I, fez-se uma reacção de amplificação por PCR usando um par de *primers* que apenas amplificam sequências de DNA.

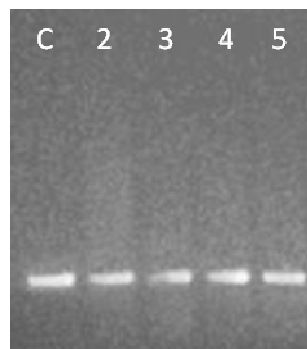


Foram usados os *primers* ZWF1F e ZWF1R para as reacções de amplificação do fragmento do gene *ZWF1*, que codifica para o enzima 6-fosfato de glucose desidrogenase. Foi usado DNA genómico como controlo positivo e uma alíquota dos vários RNAs tratados. Após amplificação, procedeu-se à análise dos produtos resultantes da reacção de amplificação por electroforese num gel de agarose a 2 % (m/v) com BrEt 0,2 µg/mL, tal como descrito em III.3.9.3. Na Figura 19 encontram-se apresentados resultados representativos da separação electroforética efectuada para as várias amostras.



**Figura 19 – Análise dos produtos de PCR dos RNAs após tratamento com DNase, utilizando o par de *primers* ZWF1F e ZWF1R.** (1) DNA genómico; (2) a (5) RNA tratado com DNase; (2) RNA controlo de células não tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (3), (4) e (5) RNA de células tratadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 10 min, 20 min e 40 min, respectivamente. Os resultados são representativos de seis experiências independentes.

Como é possível observar pela análise da Figura 19, não houve formação de produto de PCR nas amostras tratadas com DNase, pelo que pode concluir-se que o tratamento com o enzima foi eficaz (Figura 19). Assim, prosseguiu-se para a síntese da primeira cadeia de cDNA, tal como descrito em III.3.8.4., para depois ser analisada por PCR quantitativo em tempo real. A síntese de cDNA foi confirmada por PCR utilizando os *primers* do gene *ZWF1*, tal como descrito anteriormente, tendo os produtos resultantes da reacção de amplificação sido analisados por electroforese num gel de agarose a 2 % (m/v) com BrEt 0,2 µg/mL (Figura 20).

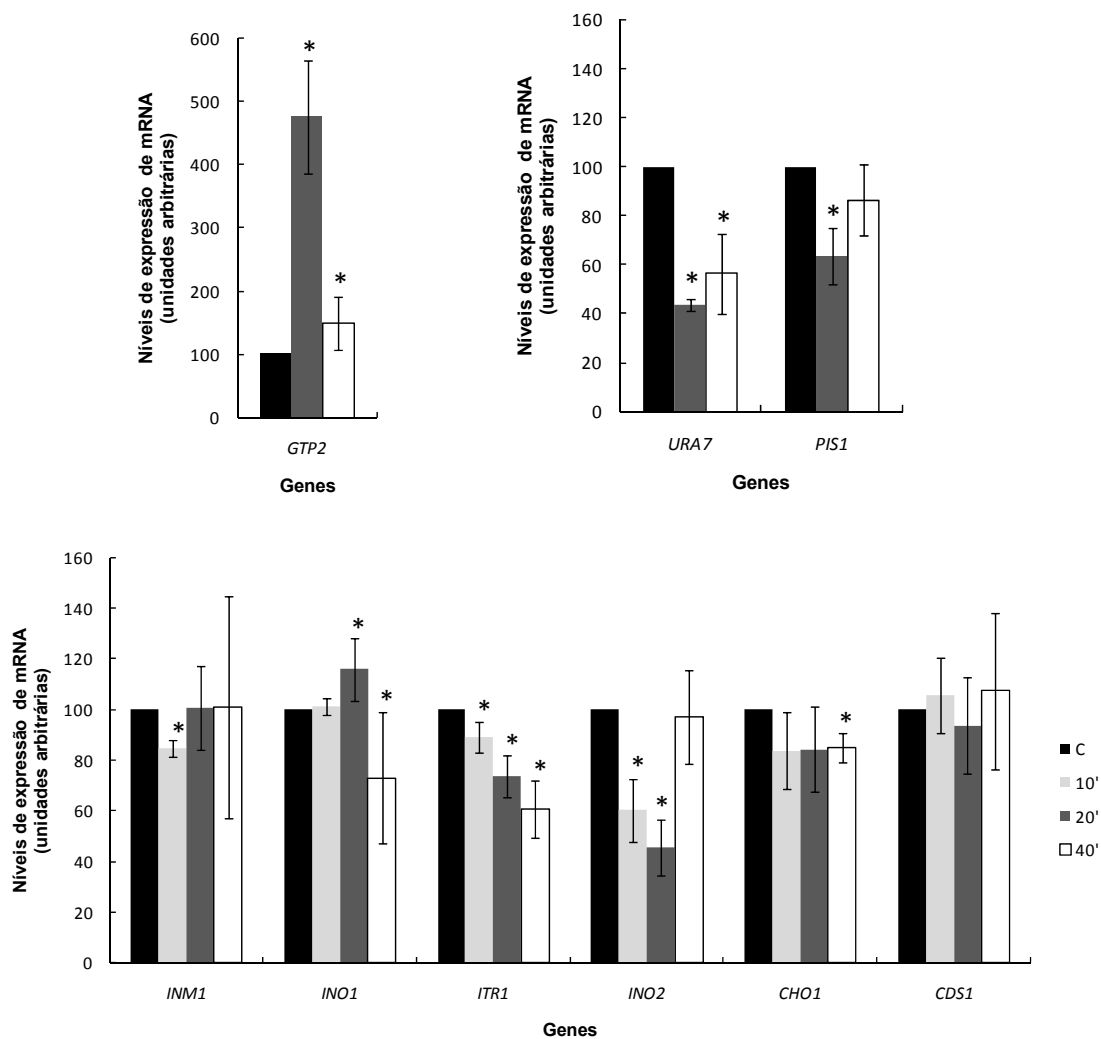


**Figura 20 – Análise dos produtos de PCR após a síntese da primeira cadeia de cDNA, utilizando o par de *primers* ZWF1F e ZWF1R.** (C) DNA genómico; (2) cDNA de células não tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (3), (4) e (5) cDNA de células tratadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 10 min, 20 min e 40 min, respectivamente. Os resultados são representativos de seis experiências independentes.

As amostras de cDNA foram analisadas por PCR quantitativo em tempo real, sendo feita a determinação dos níveis de mRNA do conjunto de genes seleccionados, encontrando-se os resultados da expressão génica apresentados na Figura 21.

Relativamente aos genes envolvidos na síntese endógena de inositol, observou-se uma diminuição significativa da expressão de *INM1* aos 10 min de exposição a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário. Os resultados da expressão deste gene aos 20 e 40 min de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não são conclusivos pois obtiveram-se valores com um grande erro. Estes dados estão de acordo com os resultados de Gasch e colaboradores (Gasch *et al.*, 2000), onde foi vista uma diminuição da expressão deste gene aos 20 min de exposição a 0,32 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No que diz respeito à expressão do gene *INO1*, esta permaneceu praticamente inalterada, embora os resultados aos 40 min de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estejam afectados por um grande erro. Aos 20 min observou-se um ligeiro aumento da expressão de *INO1*, embora os níveis de expressão ainda não sejam estatisticamente diferente do controlo. Isto pode indicar um esforço da célula para a produção do enzima 1-fosfato de inositol sintase, que catalisa a conversão de 6-fosfato de glucose a 1-fosfato de inositol, podendo este ser o passo limitante para a síntese de inositol. É interessante notar que há um comportamento oscilatório da expressão deste gene induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, notando-se um aumento da expressão aos 20 min, seguida de uma diminuição aos 40 min. Gasch e colaboradores observaram o mesmo tipo de resposta oscilatória com uma repressão do gene *INO1* aos 10 min e no intervalo de tempo de 30 a 50 min de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e uma indução da expressão deste gene aos 20 min de exposição a 0,32 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A expressão do gene *ITR1* diminuiu gradualmente ao longo do tempo de adaptação das células ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, havendo valores estatisticamente diferentes relativamente ao controlo para os tempos de 20 e 40 minutos de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Embora estejam a ser analisados os níveis de expressão dos mensageiros deste gene, e não podendo extrapolar para os níveis de proteína, é

provável que também estes estejam diminuídos na membrana plasmática. Se assim for, a haver aumento de inositol na célula, este não advém de um maior *uptake* a partir do exterior, mas sim da síntese *de novo*. A diminuição da expressão do gene *ITR1* está de acordo com o aumento de inositol esperado, dado que se sabe que tanto a expressão como os níveis deste transportador diminuem quando há um aumento de inositol intracelularmente. Relativamente aos dados de Gasch e colaboradores, observou-se uma repressão da expressão de *ITR1* aos 10 min e novamente entre os 30 e os 50 min de exposição ao  $H_2O_2$ , o que está de acordo com os nossos dados.



**Figura 21 – Variações da expressão de vários genes, devidas à exposição a 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário em *S. cerevisiae*.** ■ C, células não tratadas com  $H_2O_2$ ; ■ 10', células tratadas com 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário durante 10 min; ■ 20', células tratadas com 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário durante 20 min; □ 40', células tratadas com 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário durante 40 min. Os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de seis experiências independentes. \* $p < 0,05$  vs. wt.

A expressão do gene *INO2*, que codifica o factor de transcrição Ino2p, diminuiu aos 10 e aos 20 min de exposição ao  $H_2O_2$ , havendo uma reposição dos níveis de expressão para os níveis controlo aos 40 min. Estes resultados podem ser explicado pelo facto do gene *INO2* ser regulado pelo inositol. Por outro lado, foi observada a translocação da proteína Opi1p para o núcleo em resposta ao  $H_2O_2$ , concordante com a activação do mecanismo de regulação da expressão dos genes que possuem a sequência  $UAS_{INO}$  nas regiões promotoras. Estes dados estão de acordo com os de Gasch e colaboradores, em que foi observada uma diminuição da expressão de *INO2* durante a exposição ao  $H_2O_2$  nos instantes iniciais. É importante referir que o facto de o gene *INO2* estar reprimido não significa que a proteína Ino2p (factor de transcrição) não esteja em quantidade e com actividade suficientes para exercerem a sua função no mecanismo de regulação da expressão dos genes que possuem as sequências  $UAS_{INO}$ , como é o caso do *FAS1*.

Os níveis de expressão do gene *GTP2* aumentam drasticamente durante a exposição das células ao  $H_2O_2$ , resultados estes concordantes com os obtidos por Gasch e colaboradores. Isto leva a crer que os níveis de PA deverão estar aumentados, visto este gene codificar para o enzima 3-fosfato de glicerol aciltransferase 2 que catalisa a conversão de 3-fosfato de glicerol a ácido lisofosfatídico, um dos precursores de PA. Por outro lado, há uma manutenção dos níveis de expressão do gene *CDS1* (também observada por Gasch e colaboradores), que codifica o enzima CDP-diacilglicerol sintase que catalisa a conversão de PA em CDP-DAG, e uma diminuição da expressão de *URA7* (igualmente observada por Gasch e colaboradores), envolvido na síntese de CTP que actua como cofactor nesse processo de conversão, o que indica que poderá estar a ocorrer uma acumulação de PA, conduzindo ao aumento dos níveis deste fosfolípido intracelularmente. Na verdade, tal como se viu anteriormente, não foram observadas neste trabalho variações significativas nos valores totais de PA na célula. No entanto, o PA pode estar simultaneamente a ser convertido em pirofosfato de diacilglicerol (DAGPP) ou DAG, sendo este último utilizado na síntese de TAG ou na síntese de PE e PC pela via de Kennedy (ver Figura 5).

Parece haver uma tendência para a manutenção dos níveis de expressão de *CHO1*, envolvido na síntese de PS a partir de CDP-DAG, o que está de acordo com a tendência para uma diminuição dos níveis deste fosfolípido observada, ainda que essa diminuição não seja significativa (Figura 18). Estes dados estão de acordo com os resultados de Gasch e colaboradores, onde se observou uma manutenção da expressão de *CHO1*, havendo apenas uma ligeira indução da expressão aos 30 min de exposição ao  $H_2O_2$ . Observou-se uma diminuição da expressão do gene *PIS1*, envolvido na síntese de PI a partir de CDP-DAG e inositol, o que pode indiciar uma diminuição dos níveis deste fosfolípido. Na verdade, esta

observação não está de acordo com o modelo de regulação pelo inositol, em que a um aumento de inositol corresponde um aumento de PI. No entanto, aquando da quantificação total deste fosfolípido na célula não se notaram variações dos seus níveis ao longo do tempo de exposição ao  $H_2O_2$ . Porém, tal como discutido anteriormente, o PI pode estar a ser mobilizado para os seus derivados, fosfoinositóis e esfingolípidos. Os resultados obtidos por Gasch e colaboradores estão de acordo com o que seria esperado, observando-se uma repressão da expressão do gene *PIS1*.

Analisando os níveis de expressão de *URA7* sob o ponto de vista da via de Kennedy, a diminuição da expressão desse gene poderia justificar uma diminuição da síntese de PE a partir da etanolamina e de PC a partir da colina e, consequentemente, uma diminuição dos níveis destes fosfolípidos. Tendo em consideração os resultados da quantificação dos fosfolípidos totais, em que se observou uma tendência para um aumento dos níveis de PE aos 5 min de exposição ao  $H_2O_2$  e uma diminuição aos 10 min, observando-se também uma tendência para um aumento dos níveis de PC aos 20 min, pode concluir-se que a biossíntese destes fosfolípidos é bastante complexa e está sujeita a uma regulação bastante apertada, sendo necessária uma análise mais detalhada dos vários genes envolvidos nas vias que conduzem à sua síntese. Os dados de Gesch e colaboradores apoiam esta hipótese, visto que observaram uma diminuição da expressão deste gene aquando da exposição das células a 0,32 mM de  $H_2O_2$ .

Todos os resultados relativos à expressão dos genes regulados pelo inositol (*INO1*, *CDS1*, *CHO1*, *ITR1* e *INO2*) são idênticos aos já obtidos por Gasch e colaboradores, ainda que as concentrações de  $H_2O_2$  sejam ligeiramente superiores (0,32 mM) às utilizadas no presente trabalho (0,15 mM). Estes dados apoiam, portanto, a hipótese proposta da regulação da expressão da expressão dos genes que possuem as sequências  $UAS_{INO}$  (como é o caso do *FAS1*) pelo  $H_2O_2$  ser feita por intermédio do inositol, através do sistema Opi1p-Ino2p-Ino4p.

Embora esteja sempre a falar-se em expressão génica, o mais correcto seria a determinação das actividades dos diferentes enzimas envolvidos nas vias de biossíntese dos fosfolípidos. Tendo em conta os resultados obtidos, e visto ainda permanecerem algumas dúvidas acerca dos mecanismos de regulação inerentes à biossíntese de fosfolípidos, é fundamental determinar os níveis de inositol no interior das células, no sentido de observar quais as diferenças a nível quantitativo deste precursor fosfolipídico quando as células são submetidas a 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário.

#### **IV.4. Determinação dos níveis de inositol em células controlo e tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

O objectivo central do presente trabalho consiste em compreender os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do gene *FAS1* induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É proposto que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reprime a expressão do gene *FAS1* por indução dos níveis de inositol. É, portanto, essencial quantificar os níveis de inositol em células controlo e expostas a doses adaptativas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no sentido de verificar se, de facto, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que induz o aumento dos níveis de inositol intracelularmente.

Após uma vasta pesquisa, optimizou-se um método espectrofotométrico para determinar os níveis de inositol em células de *S. cerevisiae* (ver IV.1.3.1).

##### **IV.4.1. Optimização do Método de Doseamento**

O inositol está envolvido em muitos processos fisiológicos, e as alterações no seu metabolismo estão na base de variados estados patológicos. Uma das maiores dificuldades nos estudos dessas patologias tem sido a inexistência de um método simples e específico para medição dos níveis de inositol (Inouye *et al.*, 1988).

A medição da concentração de inositol em amostras biológicas tem sido feita por ensaios de microbiologia (Eastcott, 1928), cromatografia gasosa (GC) (Clements, Jr. and Reynertson, 1977), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (Niwa *et al.*, 1983; Ostlund, Jr. *et al.*, 1993), cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC) (Kuroda *et al.*, 1994) e por ensaio fluorimétrico enzimático (MacGregor and Matschinsky, 1984). Porém, estes métodos apresentam uma série de desvantagens, visto que as amostras necessitam de tratamento prévio e as várias etapas desse tratamento são complicadas, levando a metodologias que resultam numa baixa sensibilidade dos métodos. Para além destes métodos, foi já descrito um método enzimático muito sensível, usando por princípio a ciclicização de NADH (Kato *et al.*, 1973; MacGregor and Matschinsky, 1984). No entanto, este método consiste em muitos passos, que dificultam o processo.

Os níveis de inositol já foram medidos em *S. cerevisiae*, por Azab e colaboradores (Azab *et al.*, 2007). Estes autores mediram os níveis de inositol recorrendo ao método fluorimétrico de Maslanski e Busa (Maslanski and Busa, 1990), no qual foi medido 0,8 - 0,9 nmol de inositol por 100 µg de proteína em células wt. Este método é bastante sensível e tem

um limite de detecção baixo. O facto do limite de detecção ser baixo é vantajoso, pois permite detectar quantidades reduzidas de inositol. No entanto, a grande sensibilidade faz com que haja uma maior susceptibilidade a erros devido à grande propagação de pequenas variações que possam ser introduzidas no sistema. No presente trabalho experimental, tentou medir-se os níveis de inositol por este método, mas nunca foram obtidos resultados reprodutíveis. A elevada sensibilidade do método conduziu a grandes variações de intensidade de fluorescência entre os vários replicados de uma mesma amostra, não se tendo também observado diferenças entre os poços do branco e do teste.

Procurou-se, então, outro método que permitisse dosear o inositol no interior das células. Recentemente, Ashizawa e colaboradores (Ashizawa *et al.*, 2000) optimizaram um método espectrofotométrico enzimático para medição de inositol em soro de rato. Baseia-se na oxidação de mio-inositol (MI) e na redução do  $\text{NAD}^+$  pelo enzima mio-inositol desidrogenase (MIDH), acoplado à reacção catalisada pelo enzima diaforase que converte cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) a formazan, reoxidando-se o NADH. O formazan resultante é medido espectrofotometricamente a 492 nm (Figura 11). Este método tem a vantagem de ter brancos da curva e das amostras baixos, havendo apenas um aumento da absorvência quase imperceptível no decorrer do ensaio. No entanto, a sensibilidade do método é bastante baixa, de aproximadamente 2 nmol, tornando-se complexa a sua optimização quando se querem medir quantidades baixas de inositol.

Antes de tudo, fez-se um estudo teórico para definir quais as concentrações de cada um dos enzimas e metabolitos no sistema reaccional, de forma a que o sistema evoluísse de forma controlada, tendo em atenção que o INT e o  $\beta$ -NAD devem estar em excesso relativamente aos enzimas do sistema reaccional. As concentrações e actividades enzimáticas definidas encontram-se referidas em III.3.9.3.

Como foi efectuado por Ashizawa e colaboradores, reproduziu-se a curva de calibração até 30 nmol de inositol, tendo-se observado linearidade até 20 nmol, tal como referido pelos autores.

Seguidamente, partiu-se para os ensaios com os extractos citosólicos de levedura, tendo surgido uma série de problemas. Inicialmente, efectuou-se o ensaio com extracto final sem ser sujeito a qualquer tipo de tratamento. Quando se adicionou MIDH ao sistema viu-se um aumento muito rápido da absorvência para valores superiores ao limite de detecção do leitor de microplacas. Tentou efectuar-se várias diluições do extracto antes de adicionar ao poço de reacção, tendo-se observado valores de absorvência inferiores mas, no entanto, perdeu-se sensibilidade pois ao diluir-se o extracto está também a diminuir-se a quantidade de inositol que se quer medir. Para além deste problema viu-se que, quando se adicionava MIDH

em adições sucessivas ocorria um incremento nos valores de absorvência em todas as adições, indiciando que o MIDH estaria a interferir com a medição, ou algum dos componentes do sistema reaccional estaria a contribuir para estes aumentos sucessivos de absorvência após a adição de MIDH.

Dados os problemas observados, resolveu fazer-se um tratamento das amostras logo após a obtenção do extracto final. Tal como indicado por Ashizawa e colaboradores, tratou-se o extracto com ácido perclórico 16% (p/v), neutralizando seguidamente com  $K_2CO_3$  2M, para precipitar toda a proteína do extracto e que poderá estar a interferir com o ensaio. Após este tratamento, incubou-se ainda as amostras com hexocinase, no sentido de eliminar toda a glucose que se observou interferir com o ensaio (Ashizawa *et al.*, 2000). Foi feito novamente o ensaio, com o extracto tratado e sem qualquer diluição, tendo-se observado um aumento de absorvência tanto no poço do branco como no poço teste, devido ao aumento da turbidez das amostras nos poços (formação de um precipitado) quando se adicionou o reagente MI ao extracto tratado. Testou-se ainda um ensaio em que se retirou ao reagente MI alguns dos componentes que se pensou interferirem com o ensaio: a) sem Triton; b); sem BSA; c) sem Triton e sem BSA. Em todos os casos continuou a haver aumento de absorvência devido ao referido aumento de turbidez nos poços dos brancos e teste. Essa turbidez só deixou de ser tão acentuada quando se diluiu o extracto 100x, mas aí temos o problema de estar a diluir também 100x o inositol a quantificar.

Dado que o mais provável é que ainda houvesse interferentes no extracto convinha arranjar um método que eliminasse a maioria deles sem que o inositol fosse perdido ao longo do processo. Maslanski e Busa (Maslanski and Busa, 1990) referem um método de cromatografia de troca iónica, usando uma resina Dowex 50W 200-400 mesh, no qual as amostras são eluídas com água recuperando-se o inositol. O volume de água com o qual as amostras foram eluídas e o volume de água a aplicar no final para lavar a coluna foram optimizados de forma a recuperar todo o inositol a aplicar à coluna.

No entanto, ainda tínhamos o problema da baixa sensibilidade do método, que aliado a todos os processos de tratamento poderia conduzir a perdas significativas. Como tal, fez-se um *upscaling* da cultura de forma a que no final, em cada poço, tivéssemos quantidade suficiente de inositol para que se pudesse efectuar uma medida minimamente rigorosa. Optimizou-se a quantidade de cultura e, consequentemente, a quantidade de proteína ( $\mu$ g) de forma a ter-se, pelo menos, aproximadamente 6 nmol de inositol em cada poço de reacção. Assim, todo o processo de preparação da amostra e o método de doseamento encontram-se descritos em pormenor em III.3.9. Resumidamente:



- A. Preparação do extracto
- B. Quantificação de proteína, de forma a aplicar ~6nmol inositol em cada poço
- C. Precipitação da proteína com ácido perclórico e neutralização
- D. Cromatografia de troca iónica, para eluir o inositol
- E. Tratamento com hexocinase
- F. Ensaio espectrofotométrico de Ashizawa e colaboradores

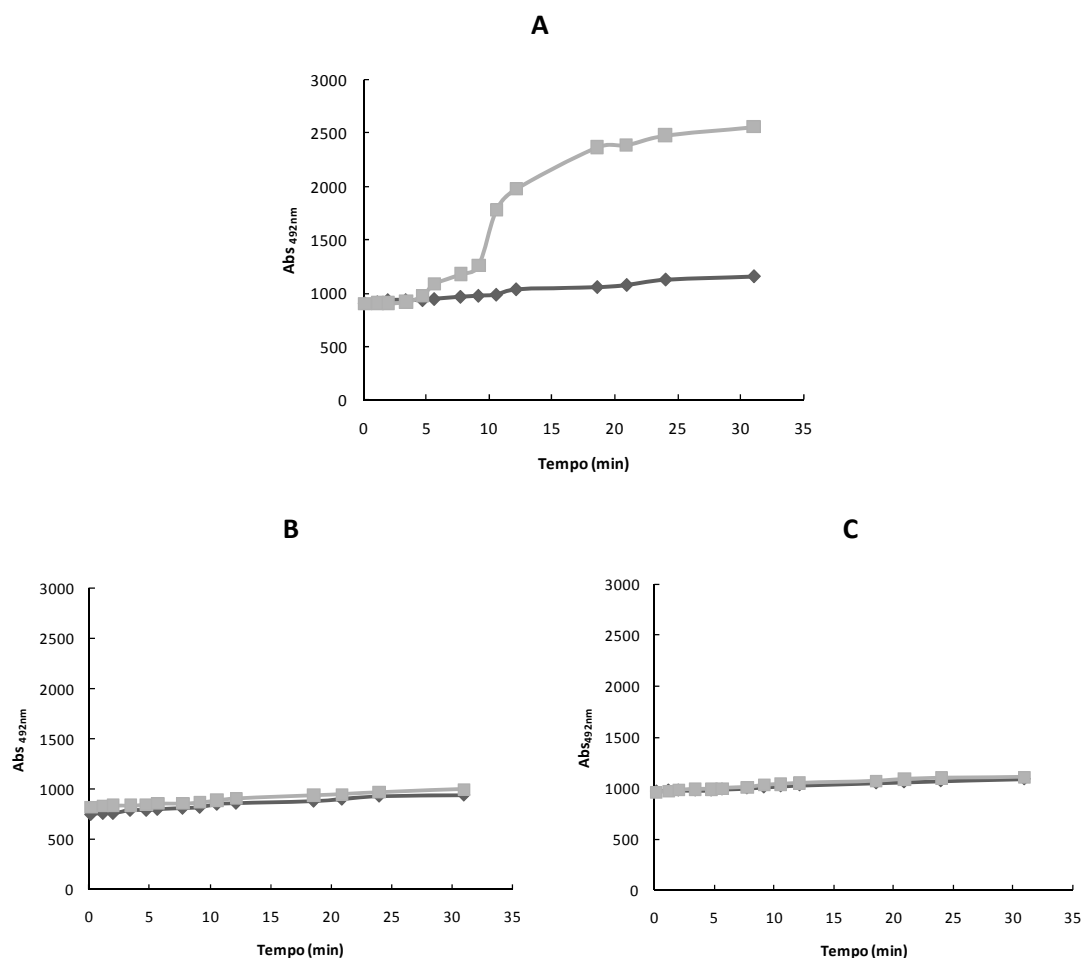
#### **IV.4.2. Curva de Calibração do Método Espectrofotométrico**

Para a medição do inositol intracelular foi necessário traçar primeiro uma curva de calibração. Reproduziu-se a curva de calibração apresentada por Ashizawa e colaboradores (Ashizawa *et al.*, 2000) de acordo com a metodologia apresentada em III.3.9.3., tendo-se observado linearidade até 20 nmol, tal como referido pelos autores.

#### **IV.4.3. Medição dos níveis intracelulares de inositol em células controlo e adaptadas a 150 $\mu$ M de $H_2O_2$**

A reprodução da curva de calibração do método foi relativamente simples. No que diz respeito à medição dos níveis de inositol em amostras biológicas, nomeadamente em *S. cerevisiae*, o processo foi algo complicado. Teve de ser feito um conjunto de testes e optimizações, já referidos em IV.4.1.

Após todas as optimizações efectuadas, foram analisadas amostras de células controlo e amostras recolhidas aos tempos de adaptação de 5 e 10 min de incubação das células com 150  $\mu$ M de  $H_2O_2$ . Para as células controlo observou-se um aumento dos valores de absorvência a 492 nm nos poços aos quais foi adicionado o enzima MIDH (Figura 22A). Para as células submetidas a 150  $\mu$ M de  $H_2O_2$  durante 5 e 10 min, não houve um aumento de absorvência a 492nm significativamente diferente do observado para as amostras com o enzima MIDH relativamente à absorvência nas amostras às quais não foi adicionado o enzima MIDH (Figura 22B e Figura 22C). Isto indica que há uma diminuição dos níveis de inositol quando as células são expostas a doses adaptativas de  $H_2O_2$ .



**Figura 22 – Ensaio representativo do doseamento do inositol intracelular em células controlo e expostas a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Encontram-se apresentados os resultados obtidos para um dos ensaios efectuados. É representada a variação de absorvência a 492 nm em função do tempo (min). **A.** Células controlo; **B.** Células expostas a 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aos 5 min; **C.** Células expostas a 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aos 10 min. —◆— Branco do ensaio (sem MIDH); —■— Teste (com MIDH). Os resultados apresentados são representativos de três experiências independentes.

Para os ensaios efectuados nas células controlo, foram quantificados os níveis de inositol, tendo sido obtido o valor de 0,9 nmol inositol / 100 µg proteína. Não foi possível quantificar a diminuição dos níveis de inositol que ocorreu quando as células foram submetidas a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mesmo partindo de amostras com três vezes mais inositol, tendo-se verificado o mesmo perfil de evolução de absorvência ao longo do tempo (dados não apresentados). O facto de não se ter conseguido dosear o inositol em células submetidas a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário pode estar relacionado com a baixa sensibilidade do método, já discutida antes, não permitindo detectar quantidades muito baixas deste precursor fosfolipídico.

Conclui-se, assim, que os níveis de inositol diminuíram drasticamente durante a adaptação das células ao  $H_2O_2$ , ao contrário do que se esperava observar, ou seja, um aumento dos níveis de inositol aquando da adaptação das células.

A diminuição dos níveis de inositol observada nos instantes iniciais do processo adaptativo ao  $H_2O_2$  poderá dever-se a uma baixa sensibilidade do método de doseamento utilizado. Os vários tratamentos a que as amostras biológicas são sujeitas, anteriores ao ensaio de doseamento, poderão de alguma forma induzir alterações, nomeadamente degradação ou conversão do inositol noutra(s) intermediária(s), que se reflectem aquando do ensaio. O inositol pode ainda estar a ser mobilizado para a síntese de PI ou dos seus derivados (fosfoinositóis e esfingolípido). Outra hipótese para a diminuição dos níveis de inositol poderá ser a presença nas amostras de algum componente desconhecido, provavelmente produzido durante o processo de adaptação das células, cuja síntese é provavelmente induzida pelo  $H_2O_2$ , e que estará a interferir com o método de doseamento utilizado.

## V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objectivo do presente trabalho centrou-se no estudo da regulação do gene *FAS1* pelo  $H_2O_2$ , nomeadamente ao nível da compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nessa regulação. Como hipótese de trabalho propôs-se que o  $H_2O_2$  terá uma acção repressora sobre a expressão do gene *FAS1* por intermédio da indução dos níveis de inositol intracelulares nas células de *S. cerevisiae*.

Quando as células de *S. cerevisiae* foram expostas a 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário observou-se uma diminuição acentuada dos níveis de inositol. Embora a metodologia utilizada para o doseamento do inositol ainda tenha que ser optimizada, nomeadamente na determinação da presença de interferentes no extracto das células tratadas com  $H_2O_2$ , este resultado contraria a hipótese de trabalho. No entanto, a apoiar a hipótese proposta foi observada a translocação da proteína Opi1p do retículo endoplasmático para o núcleo das células quando expostas ao  $H_2O_2$  nas mesmas condições experimentais. Por outro lado, os resultados da expressão dos genes que possuem as sequências  $UAS_{INO}$  nas regiões promotoras, e regulados pelo sistema Opi1p-Ino2p-Ino4p, estão de acordo com o modelo proposto, apoiando mais uma vez a presente hipótese de trabalho. Assim, tudo indica para que a regulação da expressão do gene *FAS1* pelo  $H_2O_2$  seja feita através do sistema Opi1p-Ino2p-Ino4p.

Porém, os resultados da quantificação dos fosfolípidos não foram conclusivos. Esperava observar-se uma diminuição dos níveis de PA e um aumento dos níveis de PI, resultantes do aumento de inositol (Loewen *et al.*, 2004). Contudo, a diminuição dos níveis de inositol pode resultar de uma mobilização do inositol para a formação de PI (havendo um aumento da síntese de PI) e este fosfolípido estar a ser simultaneamente modificado para dar origem aos seus derivados fosfoinositóis, justificando a não observação do aumento dos níveis de PI (Carman and Zeimet, 1996; Michell, 2008). É de salientar que alguns dos fosfatos de fosfatidilinositol são moléculas de sinalização que actuam nas vias de secreção e endocitose ( $PI(4,5)P_2$ ) e que regulam, nomeadamente, o tráfico membranar ( $PI-3P$  e  $PI(3,5)P_2$ ) (Michell, 2008), cujos níveis poderão estar aumentados quando as células são expostas ao  $H_2O_2$ . A não observação da diminuição dos níveis de PA na análise de fosfolípidos totais, resulta não só da baixa sensibilidade da técnica utilizada para a quantificação dos fosfolípidos, assim como do facto de estar a fazer-se o doseamento deste fosfolípido numa amostra de extractos totais e não um doseamento no retículo endoplasmático.

Alguns dos resultados obtidos ao longo deste trabalho apoiam a hipótese de a expressão do gene *FAS1*, quando as células são expostas ao  $H_2O_2$ , ser regulada pelo inositol via os elementos  $UAS_{INO}$ . No entanto, o facto de não terem sido observados o aumento dos níveis de inositol e induções nos níveis de PA e PI, indica que provavelmente o sistema poderá estar a sofrer regulação por outros factores que não o inositol. Vários autores viram já que a regulação da expressão dos genes com os elementos  $UAS_{INO}$  pode ser controlada pela presença/ausência de zinco (disponibilidade de nutrientes) ou ainda nas diferentes fases de crescimento da levedura (Carman, 2005; Carman and Han, 2009a; Carman and Henry, 2007; Iwanyshyn *et al.*, 2004).

Globalmente, os resultados da expressão génica obtidos neste trabalho estão de acordo com as observações de Gasch e colaboradores (Gasch *et al.*, 2000), apesar de as células terem sido expostas a concentrações diferentes de  $H_2O_2$ .

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho é possível constatar que as vias de biossíntese dos fosfolípidos estão sujeitas a um controlo bastante apertado e, tendo em vista a sua melhor compreensão e estudo, é necessária uma análise mais pormenorizada dos vários genes envolvidos nessas vias assim como o uso de técnicas mais sensíveis de quantificação dos fosfolípidos e metabolitos das vias.

Já havia sido visto que o gene *FAS1* é regulado pelo inositol via o elemento  $UAS_{INO}$ . Embora os resultados do presente trabalho não confirmem que há uma regulação pelo inositol induzida pelo  $H_2O_2$ , de qualquer modo há uma regulação coordenada da expressão do gene *FAS1* e de genes envolvidos na síntese de fosfolípidos que apresentam a mesma sequência  $UAS_{INO}$  nas regiões promotoras. Não sendo o inositol o elemento regulador induzido pelo  $H_2O_2$ , é provável que haja um outro factor indutor que actue via este elemento  $UAS_{INO}$  responsável pela expressão coordenada desses genes anteriores.

Todos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho experimental apontam mais uma vez para a existência de uma resposta global complexa e multifactorial durante a adaptação das células de *S. cerevisiae* ao  $H_2O_2$  (Pedroso, 2008) ocorrendo, neste caso, a resposta celular ao nível da expressão génica e da composição fosfolipídica.

## VI. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos durante o presente trabalho experimental revelam-se importantes para a compreensão da resposta adaptativa das células de *S. cerevisiae* ao  $H_2O_2$ , nomeadamente na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do gene *FAS1*. No entanto, o processo de integração desses resultados no sentido de estabelecer uma relação entre as alterações observadas e quaisquer modelos dos processos biológicos relacionados com a resposta adaptativa das células ao  $H_2O_2$  é sempre uma tarefa complexa. Tendo em vista este objectivo, os resultados apresentados deverão ser complementados com novas abordagens experimentais.

A premissa principal do presente trabalho foi a repressão da expressão do gene *FAS1* pelo  $H_2O_2$  através da indução dos níveis de inositol intracelulares. Porém, foi observada uma diminuição dos níveis de inositol durante a exposição de 10 e 20 min a 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário, justificados de várias formas já amplamente discutidas. Seria de todo interessante, senão essencial, dosear este precursor fosfolipídico com recurso a outros métodos menos susceptíveis de erro e mais sensíveis, no sentido de confirmar ou contrariar os resultados obtidos. Apesar da diminuição dos níveis de inositol obtidos através do ensaio espectrofotométrico utilizado, foram obtidos outros resultados que apoiam a hipótese proposta (aumento de inositol). No sentido de esclarecer esta controvérsia, deveriam ainda ser quantificados os fosfoinositóis e/ou os fosfatos de fosfatidilinositol e/ou os esfingolípidos.

Seria também interessante quantificar os níveis do transportador de inositol Itr1p na membrana plasmática assim como os níveis do factor de transcrição Ino2p no núcleo, por *Western blot*. Poder-se-ão ainda efectuar estudos de Imunofluorescência para o Itr1p e para o Ino2p, no sentido de ter uma percepção visual e temporal da localização celular destes factores e do que está de facto a ocorrer, e complementar assim os dados de *Western blot*.

Os dados da quantificação dos fosfolípidos totais permitiram tirar algumas conclusões, mas não foram suficientemente esclarecedores. Seria de todo interessante recorrer a técnicas mais sensíveis de os dosear, recorrendo a marcação com isótopos radioactivos, como  $^{32}P$ i e  $^{32}P$ , como já foi feito por Carman e colaboradores (Iwanyshyn *et al.*, 2004) e por Jani e Lopes (Jani and Lopes, 2009), respectivamente. A análise de fracções celulares isoladas é também uma hipótese a considerar, tendo em vista a análise do que ocorre aos níveis de fosfolípidos a nível local. Esta abordagem pode revelar-se importante para a compreensão do mecanismo de translocação da proteína Opi1p para o núcleo, pelo que a quantificação dos níveis de PA numa fracção isolada no retículo endoplasmático é de todo o interesse.

Para a análise da expressão génica foram seleccionados alguns genes-chave que, possivelmente, poderiam esclarecer acerca das principais alterações ocorridas durante o processo de adaptação das células ao  $H_2O_2$ . Os dados de expressão génica obtidos ajudaram a compreender algumas alterações ocorridas nomeadamente nas vias de biossíntese dos fosfolípidos. Porém, uma análise incompleta pode ser uma fonte de erro no que respeita à elação de conclusões, pelo que uma análise mais pormenorizada da expressão de mais genes que regulam as vias ou que codificam para enzimas das vias de biossíntese dos fosfolípidos será um ponto a ter consideração em estudos futuros. Uma vez que uma maior expressão génica nem sempre significa maior quantidade de proteína (ou enzima) e, consequentemente, não significa maior actividade enzimática, caso os resultados de expressão génica se revelem inconclusivos poderão ser procuradas formas de determinar as respectivas actividades enzimáticas dos enzimas controladores das vias.

Para além dos genes envolvidos directamente nas vias de biossíntese dos fosfolípidos, seria de todo o interesse a análise da expressão de outros genes, nomeadamente os envolvidos no mecanismo de translocação da proteína Opi1p para o núcleo das células, associado à regulação da expressão dos genes que possuem a sequência  $UAS_{INO}$  nos seus promotores. Este estudo já foi iniciado no presente trabalho, com a análise da expressão do gene *INO2*. Porém, seria interessante analisar a expressão do gene *SCS2*, que codifica para a proteína Scs2p, que faz parte do complexo PA-Opi1p-Scs2p. Poderia também estudar-se a expressão do gene *OPI1* e quantificar o produto da expressão no sentido de analisar se o aumento de fluorescência observado no núcleo das células durante o processo adaptativo se deveu à translocação da proteína Opi1p do retículo endoplasmático para o núcleo das células ou a um aumento de expressão do gene que se traduziu numa maior quantidade de proteína. Estes estudos poderiam ainda ser complementados por Imunofluorescência.

Todos estes pontos devem ser tidos em conta em estudos futuros, de forma a compreender de forma mais integrada os mecanismos associados à resposta adaptativa das células de *S. cerevisiae* ao  $H_2O_2$ , nomeadamente na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do gene *FAS1*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abramoff, M. D., Magalhães, P. J., and Ram, S. J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 11 (7), 36-42.
2. Antunes, F. and Cadenas, E. (2001) Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: submicromolar levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic.Biol.Med.* 30 (9), 1008-1018.
3. Ashizawa, N., Yoshida, M., and Aotsuka, T. (2000) An enzymatic assay for myo-inositol in tissue samples. *J.Biochem.Biophys.Methods*. 44 (1-2), 89-94.
4. Auerbach, D., Arnoldo, A., Bogdan, B., Fetchko, M., and Stagljar, I. (2005) Drug Discovery Using Yeast as a Model System: A Functional Genomic and Proteomic View. *Current Proteomics*. 2 (1), 1-13.
5. Azab, A. N., He, Q., Ju, S., Li, G., and Greenberg, M. L. (2007) Glycogen synthase kinase-3 is required for optimal *de novo* synthesis of inositol. *Mol.Microbiol.* 63 (4), 1248-1258.
6. Azab, A. N., Mehta, D. V., Chesebro, J. E., and Greenberg, M. L. (2009) Ethylbutyrate, a valproate-like compound, exhibits inositol-depleting effects - a potential mood-stabilizing drug. *Life Sci.* 84 (1-2), 38-44.
7. Barja, G. (1993) Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free Radic.Res.Comm.* 18 (2), 63-70.
8. Branco, M. R., Marinho, H. S., Cyrne, L., and Antunes, F. (2004) Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 279 (8), 6501-6506.
9. Cadenas, E. (1998) Mechanisms of Antioxidant Action. *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants*, Ozben, ed.Plenum Press. pp. 237-251.
10. Cai, H. (2005) NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ.Res.* 96 (8), 818-822.
11. Carman, G. M. (2005) Regulation of phospholipid synthesis in yeast by zinc. *Biochem.Soc.Trans.* 33 (Pt 5), 1150-1153.
12. Carman, G. M. and Han, G. S. (2009a) Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis. *J.Biol.Chem.* 284 (5), 2593-2597.
13. Carman, G. M. and Han, G. S. (2009b) Regulation of phospholipid synthesis in yeast. *J.Lipid Res.* 50 Suppl 69-73.
14. Carman, G. M. and Henry, S. A. (2007) Phosphatidic acid plays a central role in the transcriptional regulation of glycerophospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 282 (52), 37293-37297.



15. Carman, G. M. and Zeimet, G. M. (1996) Regulation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 271 (23), 13293-13296.
16. Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., Lee, T. I., True, H. L., Lander, E. S., and Young, R. A. (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol.Biol.Cell.* 12 (2), 323-337.
17. Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59 (3), 527-605.
18. Chen, M., Hancock, L. C., and Lopes, J. M. (2007) Transcriptional regulation of yeast phospholipid biosynthetic genes. *Biochim.Biophys.Acta.* 1771 (3), 310-321.
19. Cherry, J. M. (1995) Genetic nomenclature guide. *Saccharomyces cerevisiae. Trends Genet.* 11-12.
20. Chirala, S. S. (1992) Coordinated regulation and inositol-mediated and fatty acid-mediated repression of fatty acid synthase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89 (21), 10232-10236.
21. Cipak, A., Hasslacher, M., Tehlivets, O., Collinson, E. J., Zivkovic, M., Matijevic, T., Wonisch, W., Waeg, G., Dawes, I. W., Zarkovic, N., and Kohlwein, S. D. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing a plant fatty acid desaturase produces polyunsaturated fatty acids and is susceptible to oxidative stress induced by lipid peroxidation. *Free Radic.Biol.Med.* 40 (5), 897-906.
22. Clements, R. S., Jr. and Reynertson, R. (1977) Myoinositol metabolism in *diabetes mellitus*. Effect of insulin treatment. *Diabetes.* 26 (3), 215-221.
23. Collinson, L. P. and Dawes, I. W. (1992) Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J.Gen.Microbiol.* 138 (2), 329-335.
24. Connerth, M., Grillitsch, K., Kofeler, H., and Daum, G. (2009) Analysis of lipid particles from yeast. *Methods Mol.Biol.* 579, 359-374.
25. Costa, V. M., Amorim, M. A., Quintanilha, A., and Moradas-Ferreira, P. (2002) Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radic.Biol.Med.* 33 (11), 1507-1515.
26. Cunha, M. L. (2001) Papel do glutatono na resposta ao stress oxidativo induzido pelo AAPH (di-hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) em *Saccharomyces cerevisiae* na fase de crescimento exponencial e estacionária. Relatório de estágio científico da licenciatura em Bioquímica, FCUL.
27. Daum, G., Tuller, G., Nemec, T., Hrastnik, C., Balliano, G., Cattell, L., Milla, P., Rocco, F., Conzelmann, A., Vionnet, C., Kelly, D. E., Kelly, S., Schweizer, E., Schuller, H. J., Hojad, U., Greiner, E., and Finger, K. (1999) Systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast.* 15 (7), 601-614.
28. de Oliveira-Marques, V., Cyrne, L., Marinho, H. S., and Antunes, F. (2007) A quantitative study of NF-kappaB activation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha. *J.Immunol.* 178 (6), 3893-3902.

29. Dittmer, J. C. and Wells, M. A. (1969) Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components. *Methods in Enzymology*. 14, 482-530.
30. Eastcott, E. V. (1928) Wilders "Bios." The isolation and identification of "Bios I.". *J.Phys.Chem.* 32, 1094-1111.
31. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226 (1), 497-509.
32. Folmer, V., Pedroso, N., Matias, A. C., Lopes, S. C., Antunes, F., Cyrne, L., and Marinho, H. S. (2008) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim.Biophys.Acta.* 1778 (4), 1141-1147.
33. Forman, H. J. (2007) Use and abuse of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in studies of signal transduction. *Free Radic.Biol.Med.* 42 (7), 926-932.
34. Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol.Biol.Cell.* 11 (12), 4241-4257.
35. Gaspar, M. L., Aregullin, M. A., Jesch, S. A., and Henry, S. A. (2006) Inositol induces a profound alteration in the pattern and rate of synthesis and turnover of membrane lipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 281 (32), 22773-22785.
36. Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., and Pelicci, P. G. (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8 (9), 722-728.
37. Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B., and Labarre, J. (1998) The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 273 (35), 22480-22489.
38. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*. 274 (5287), 546, 563-7.
39. Gralla, E. (1997) Superoxide dismutase: Studies in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. 495-523.
40. Grant, C. M. (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol.Microbiol.* 39 (3), 533-541.
41. Han, G., Gable, K., Kohlwein, S. D., Beaudoin, F., Napier, J. A., and Dunn, T. M. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* YBR159w gene encodes the 3-ketoreductase of the microsomal fatty acid elongase. *J.Biol.Chem.* 277 (38), 35440-35449.
42. Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A. D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E., and Toledano, M. B. (2002) The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol.Microbiol.* 45 (1), 233-241.
43. Hudson, J. R., Jr., Dawson, E. P., Rushing, K. L., Jackson, C. H., Lockshon, D., Conover, D., Lanciault, C., Harris, J. R., Simmons, S. J., Rothstein, R., and Fields, S. (1997) The

complete set of predicted genes from *Saccharomyces cerevisiae* in a readily usable form. *Genome Res.* 7 (12), 1169-1173.

44. Inouye, M., Mio, T., and Sumino, K. (1988) Measurement of inositol in uremic serum by selected ion monitoring. *Jpn.J.Med.* 27 (1), 29-33.
45. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J.Bacteriol.* 153 (1), 163-168.
46. Iwanyshyn, W. M., Han, G. S., and Carman, G. M. (2004) Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc. *J.Biol.Chem.* 279 (21), 21976-21983.
47. Jamieson, D. J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14 (16), 1511-1527.
48. Jani, N. M. and Lopes, J. M. (2009) Regulated transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol biosynthetic gene, *PIS1*, yields pleiotropic effects on phospholipid synthesis. *FEMS Yeast Res.* 9 (4), 552-564.
49. Jesch, S. A., Zhao, X., Wells, M. T., and Henry, S. A. (2005) Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast. *J.Biol.Chem.* 280 (10), 9106-9118.
50. Kato, T., Berger, S. J., Carter, J. A., and Lowry, O. H. (1973) An enzymatic cycling method for nicotinamide-adenine dinucleotide with malic and alcohol dehydrogenases. *Anal.Biochem.* 53 (1), 86-97.
51. Kuroda, N., Tada, S., Kajikawa, T., Niimi, M., Ishida, T., and Kawanishi, K. (1994) Determination of sugars and polyols in red cells by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J.Jpn.Diabetes.* 37, 695-698.
52. Kvam, E., Gable, K., Dunn, T. M., and Goldfarb, D. S. (2005) Targeting of Tsc13p to nucleus-vacuole junctions: a role for very-long-chain fatty acids in the biogenesis of microautophagic vesicles. *Mol.Biol.Cell.* 16 (9), 3987-3998.
53. Lai, K. and McGraw, P. (1994) Dual control of inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* by irreversible inactivation of permease and regulation of permease synthesis by *INO2*, *INO4*, and *OPI1*. *J.Biol.Chem.* 269 (3), 2245-2251.
54. Le Moan, N., Clement, G., Le, M. S., Tacnet, F., and Toledano, M. B. (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J.Biol.Chem.* 281 (15), 10420-10430.
55. Loewen, C. J., Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Delon, C., Ktistakis, N. T., Henry, S. A., and Levine, T. P. (2004) Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science.* 304 (5677), 1644-1647.
56. Loewen, C. J., Roy, A., and Levine, T. P. (2003) A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J.* 22 (9), 2025-2035.
57. Lomakin, I. B., Xiong, Y., and Steitz, T. A. (2007) The crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together. *Cell.* 129 (2), 319-332.

58. MacGregor, L. C. and Matschinsky, F. M. (1984) An enzymatic fluorimetric assay for myo-inositol. *Anal.Biochem.* 141 (2), 382-389.
59. Maslanski, J. A. and Busa, W. B. (1990) A Sensitive and Specific Mass Assay for myo-Inositol and Inositol Phosphates in *Methods in Inositide Research* (Irvine, R. F., ed), Raven Press, Ltd., New York, 113-126.
60. Matias, A. C., Pedroso, N., Teodoro, N., Marinho, H. S., Antunes, F., Nogueira, J. M., Herrero, E., and Cyrne, L. (2007) Down-regulation of fatty acid synthase increases the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radic.Biol.Med.* 43 (10), 1458-1465.
61. Michell, R. H. (2008) Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9 (2), 151-161.
62. Miyashita, M., Shugyo, M., and Nikawa, J. (2003) Mutational analysis and localization of the inositol transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biosci.Bioeng.* 96 (3), 291-297.
63. Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., and Mager, W. (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol.Microbiol.* 19 (4), 651-658.
64. Nailis, H., Coenye, T., Van, N. F., Deforce, D., and Nelis, H. J. (2006) Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC.Mol.Biol.* 7, 25-33.
65. Nelson, D. A. and Cox, M. M. (2004) Lehninger, Principles of Biochemistry. *W.H.Freeman*.
66. Niwa, T., Yamamoto, N., Maeda, K., Yamada, K., Ohki, T., and Mori, M. (1983) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of polyols in urine and serum of uremic patients. Identification of new deoxyalditols and inositol isomers. *J.Chromatogr.* 277, 25-39.
67. Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., and Antunes, F. (2009) Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxid.Redox.Signal.* 11 (9), 2223-2243.
68. Ostlund, R. E., Jr., McGill, J. B., Herskowitz, I., Kipnis, D. M., Santiago, J. V., and Sherman, W. R. (1993) D-chiro-inositol metabolism in *diabetes mellitus*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90 (21), 9988-9992.
69. Pedroso, N. (2008) Papel da membrana plasmática na adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tese de Doutoramento em Bioquímica - Regulação Bioquímica, FCUL.
70. Pedroso, N., Matias, A. C., Cyrne, L., Antunes, F., Borges, C., Malho, R., de Almeida, R. F., Herrero, E., and Marinho, H. S. (2009) Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic.Biol.Med.* 46 (2), 289-298.
71. Perrone, G. G., Tan, S. X., and Dawes, I. W. (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochim.Biophys.Acta.* 1783 (7), 1354-1368.

72. Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal.Biochem.* 83 (2), 346-356.
73. Rasband, W. S. (1997) ImageJ. U.S.National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
74. Schneider, R., Massow, M., Lisowsky, T., and Weiss, H. (1995) Different respiratory-defective phenotypes of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* after inactivation of the gene encoding the mitochondrial acyl carrier protein. *Curr.Genet.* 29 (1), 10-17.
75. Schuller, H. J., Hahn, A., Troster, F., Schutz, A., and Schweizer, E. (1992) Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* by an upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis. *EMBO J.* 11 (1), 107-114.
76. Schweizer, E. and Hofmann, J. (2004) Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 68 (3), 501-517.
77. Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350, 3-41.
78. Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp.Physiol.* 82 (2), 291-295.
79. Snyder, M. and Kumar, A. (2002) Yeast genomics: past, present, and future promise. *Funct.Integr.Genomics.* 2 (4-5), 135-137.
80. Sousa-Lopes, A., Antunes, F., Cyrne, L., and Marinho, H. S. (2004) Decreased cellular permeability to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Lett.* 578 (1-2), 152-156.
81. Struhl, K. (1989) Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Annu.Rev.Biochem.* 58, 1051-1077.
82. Suzuki, Y. J., Forman, H. J., and Sevanian, A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic.Biol.Med.* 22 (1-2), 269-285.
83. Tehlivets, O., Scheuringer, K., and Kohlwein, S. D. (2007) Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim.Biophys.Acta.* 1771 (3), 255-270.
84. Temple, M. D., Perrone, G. G., and Dawes, I. W. (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.* 15 (6), 319-326.
85. Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., and Azevedo, D. (2003) Oxidative stress responses in yeast. in *Topics in Current Genetics*, Springer-Verlag. 241-303.
86. Tuller, G., Nemec, T., Hrastnik, C., and Daum, G. (1999) Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeast.* 15 (14), 1555-1564.
87. Udvardi, M. K., Czechowski, T., and Scheible, W. R. (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell.* 20 (7), 1736-1737.

88. van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., and Konings, W. N. (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol.Rev.* 59 (2), 304-322.
89. Wenz, P., Schwank, S., Hoja, U., and Schuller, H. J. (2001) A downstream regulatory element located within the coding sequence mediates autoregulated expression of the yeast fatty acid synthase gene *FAS2* by the *FAS1* gene product. *Nucleic Acids Res.* 29 (22), 4625-4632.
90. Zhang, D. X. and Gutterman, D. D. (2007) Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 292 (5), 2023-2031.