

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**ACTIVAÇÃO TRANSCRICIONAL EM MUTANTES *GIM* DE
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Ana Mafalda de Almeida Cavaleiro

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**ACTIVAÇÃO TRANSCRICIONAL EM MUTANTES *GIM* DE
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Ana Mafalda de Almeida Cavaleiro

Tese orientada por: Prof^a. Doutora Lisete Fernandes^{1,2}

Orientador interno: Prof. Doutor Júlio Duarte³

¹ Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras.

² Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Lisboa.

³ Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa.

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2009



FUNDAÇÃO CALOUSTE GULBENKIAN

Instituto Gulbenkian de Ciência

O trabalho conducente a esta Tese foi desenvolvido exclusivamente no Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras

FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Trabalho realizado integralmente no âmbito do projecto PDCT/BIA-BCM/55501/2004 aprovado pela FCT e pelo PDCT, participado pelo fundo comunitário europeu FEDER.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Gulbenkian de Ciência, local onde o trabalho conducente a esta Tese foi desenvolvido, pelas excelentes condições de trabalho.

À Doutora Lisete Fernandes por me ter dado a oportunidade de realizar o trabalho experimental no seu grupo de investigação e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao meu colega João Coelho por toda a paciência e disponibilidade, e pelo bom ambiente de trabalho.

Um agradecimento muito especial à minha mãe pelo apoio incondicional e por ter tornado esta Tese possível.

À Maria João Teixeira, Carolina Albuquerque, Vanessa Nunes e à minha irmã Mariana Cavaleiro por serem as minhas melhores amigas e por estarem sempre comigo.

Ao meu namorado Tiago Teixeira pela compreensão, paciência e companheirismo.

À Ana Vaz, Bárbara Fekete e Jaqueline Garcia, colegas do IGC que se tornaram grandes amigas, pelos almoços, conversas, discussões, desabafos e boa disposição.

Aos meus amigos e colegas de curso Sofia Fernandes e André Grilo pelas discussões sobre o trabalho.

À minha família por estar sempre comigo.

ABREVIATURAS

- Δ** indica a deleção total ou parcial de um gene
- μm** micrómetro
- Abs_{420nm}** absorvância a 420 nanómetros
- ADH1** do inglês *alcohol dehydrogenase*
- Arr1** do inglês *Arsenical resistance*
- Cad1** do inglês *Cadmium resistance*
- CEN** do inglês *Chromosome centromere*
- D.O._{600nm}** densidade óptica a 600 nanómetros
- EDTA** ácido etilenodiaminatetraacético
- HA** hemaglutinina
- Ifh1** do inglês *Interacts with fork head protein*
- kDa** quilo-Dalton
- MAT** do inglês *mating type*
- ml** mililitro
- mg** miligrama
- M** Molar
- mM** milimolar
- Msn2/Msn4** do inglês *Multicopy suppressor of SNF1 mutation*
- NLS** do inglês *Nuclear Localization Signal*
- PCR** do inglês *Polymerase Chain Reaction*
- Rap1** do inglês *Repressor activator protein*
- Rpn4** do inglês *Regulatory particle non-ATPase*
- SDS** do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*
- Sfp1** do inglês *Split finger protein*
- Sok2** do inglês *Supressor of kinase*
- TRiC/CCT** TCP-1 Ring Complex/ Chaperonin containing TCP-1

RESUMO

Em *Saccharomyces cerevisiae* existem 6 genes *GIM* que codificam as subunidades do complexo GimC, um complexo citoplasmático que participa na biogénese dos componentes do citosqueleto, a actina e a tubulina. Em levedura estes genes não são essenciais.

Diversos dados na literatura sugerem que a actina e as subunidades Gim2, Gim5 e Gim1 podem assumir um papel na regulação da transcrição. Juntamente com a observação de que os mutantes *gim* exibem fenótipos distintos e padrões de expressão genética distintos em condições de stress, estes dados fazem com que seja de toda a pertinência o estudo de potenciais relações entre as várias proteínas Gim e activadores da transcrição de genes de resposta ao stress.

Yap1 e Gcn4 são activadores transcricionais que regulam a resposta celular ao stress oxidativo e nutricional, respectivamente. Perceber se a actividade de ambos os activadores é afectada em mutantes *gim*, e se este efeito se deve a possíveis relações com subunidades Gim, pode justificar a observação de fenótipos distintos entre mutantes *gim* quando sujeitos a diferentes stresses e contribuir para a identificação de novas funções as subunidades Gim.

Os resultados obtidos sugerem que a activação da transcrição apresenta diferenças entre mutantes *gim* e estirpe selvagem e apoiam a ideia de diferentes importâncias de cada subunidade Gim na célula. A subunidade Gim2 parece exercer um efeito negativo na activação da transcrição por Yap1 e Gcn4, ao contrário da subunidade Gim1 que parece desempenhar um papel na indução da actividade do Gcn4. Adicionalmente, todos os mutantes *gim*, à excepção do mutante $\Delta gim1$, exibem um fenótipo de resistência ao 3-aminotriazol que não se verifica para a estirpe selvagem.

Palavras-chave: Gim, Stress, Transcrição, Yap1, Gcn4

ABSTRACT

In *Saccharomyces cerevisiae* exist 6 *GIM* genes that encode the Gim subunits of the GimC complex, a cytoplasmatic complex that participates in the biogenesis of the cytoskeleton components, actin and tubulin. In yeast, these genes are not essential.

Several data in the literature suggest that actin and Gim2, Gim5 and Gim1 subunits can assume a role in transcription regulation. Together with the observation that *gim* mutants exhibit distinct phenotypes and distinct patterns of gene expression in stress conditions, these data makes the study of potential relations between the several Gim proteins and transcription activators of genes involved in stress response extremely significant.

Yap1 and Gcn4 are transcription activators that play central roles in the responses they regulate, respectively, in oxidative and nutritional stresses. Understanding if the activity of both activators is affected in *gim* mutants, and if this effect is due to possible relations with Gim subunits, can justify the distinct phenotypes among *gim* mutants when subject to different stresses and contribute to the identification of new functions for the Gim subunits.

Results obtained suggest that transcription activation is different between *gim* mutants and wild type strain and backs up the idea of different importances for each Gim subunit in the cell. Gim2 subunit appears to have a negative effect on Yap1 and Gcn4, as opposing to Gim1 subunit that seems to assume a role in Gcn4 activity. Additionally, all *gim* mutants, except Δ *gim1* mutant, exhibit a 3-aminotriazole resistance phenotype that is not observed for the wild type strain.

Keywords: Gim, Stress, Transcription, Yap1, Gcn4

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
ABREVIATURAS.....	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Os genes <i>GIM</i> e o complexo GimC/Prefoldina.....	1
1.2. Particularidades das subunidades Gim.....	3
1.3. O citosqueleto e a resposta celular a condições de stress.....	4
1.4. Factores de transcrição associados a condições de stress.....	4
1.5. Gcn4.....	6
1.6. Yap1	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Meios e procedimentos gerais	9
2.2. Estirpes e plasmídeos	9
2.3. Integração dos genes <i>Y.HIS3</i> e <i>HIS3</i>	10
2.4. Deleção do gene <i>TRP1</i>	10
2.5. Transformação das estirpes para os ensaios enzimáticos.....	11
2.6. Determinação de sensibilidades por plaqueamento em <i>spots</i>	11
2.7. Ensaio da β -galactosidase.....	12
3. RESULTADOS.....	13
3.1. Potencial de activação da transcrição em mutantes <i>gim</i>	13
3.1.1. Construção de estirpes Δ <i>gim</i> com disrupção do gene <i>TRP1</i>	13
3.1.2. Quantificação da actividade de LexA-Yap1 em mutantes <i>gim</i>	14
3.1.3. Quantificação da actividade de LexA-Gcn4 em mutantes <i>gim</i>	17
3.2. Actividade regulatória do Yap1 e do Gcn4 em mutantes <i>gim</i>	19
3.2.1. Construção de estirpes <i>Y.HIS3/HIS3</i>	19

3.2.2. Avaliação da actividade do Yap1 no gene alvo <i>Y.HIS3</i>	21
3.2.3. Avaliação da actividade do Gcn4 no gene alvo <i>HIS3</i>	22
4. DISCUSSÃO	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ANEXO – Composição de meios de cultura	34

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os genes *GIM* e o complexo GimC/Prefoldina

Em *Saccharomyces cerevisiae* existem 6 genes *GIM* (*genes involved in microtubule biogenesis*) que codificam, individualmente, cada uma das subunidades do complexo heterohexamérico GimC^[1]. Este complexo citoplasmático, com cerca de 90-100kDa, é conservado em eucariotas, designando-se por Prefoldina (Pfd) em mamíferos^[2], e possui homólogos estruturais em arqueobactérias, não tendo sido encontrado em bactérias^[1,3].

GimC/Pfd é constituído por duas classes de subunidades, as de tipo α e as de tipo β (Figura 1.1A). Em levedura/mamífero, as subunidades de tipo α , que formam o núcleo central do complexo GimC/Pfd, são Gim2/Pfd3 e Gim5/Pfd5, sendo as subunidades periféricas, Gim1/Pfd6, Gim3/Pfd4, Gim4/Pfd2 e Gim6/Pfd1, subunidades de tipo β . Em arqueobactérias, o homólogo de GimC/Pfd é também constituído por subunidades de tipo α e β , contendo apenas uma subunidade representativa de cada classe, dispostas num arranjo 2:4 (Figura 1.1B)^[3].

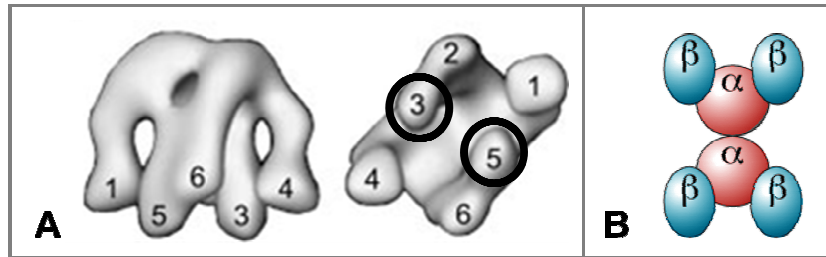


Figura 1.1 – **A.** Arranjo proposto das subunidades Pfd na Prefoldina de células de mamífero. Pfd3 e Pfd5 (circunferências) são subunidades do tipo α , sendo as restantes do tipo β . Adaptado de Simons *et al.*, 2004^[4], **B.** A Prefoldina de arqueobactérias é composta por apenas dois tipos de subunidades que se repetem. Adaptado de Leroux *et al.*, 1999^[3].

O complexo GimC/Pfd interage com péptidos-nascentes, aquando da síntese dos mesmos e quando ainda associados aos ribossomas, transportando-os posteriormente, num estado não-nativo, até à chaperonina TRiC/CCT (com cerca de 600kDa), onde vão adquirir a sua estrutura tridimensional – estado nativo. GimC/Pfd funciona por isso como chaperone molecular uma vez que interage com e estabiliza os péptidos-nascentes, prevenindo a aquisição de uma estrutura tridimensional incorrecta e permitindo ainda que o *folding* por TRiC/CCT ocorra mais rapidamente^[5,6]. O processo desde a síntese dos péptidos até à aquisição da estrutura tridimensional encontra-se esquematizado na Figura 1.2^[6,7].

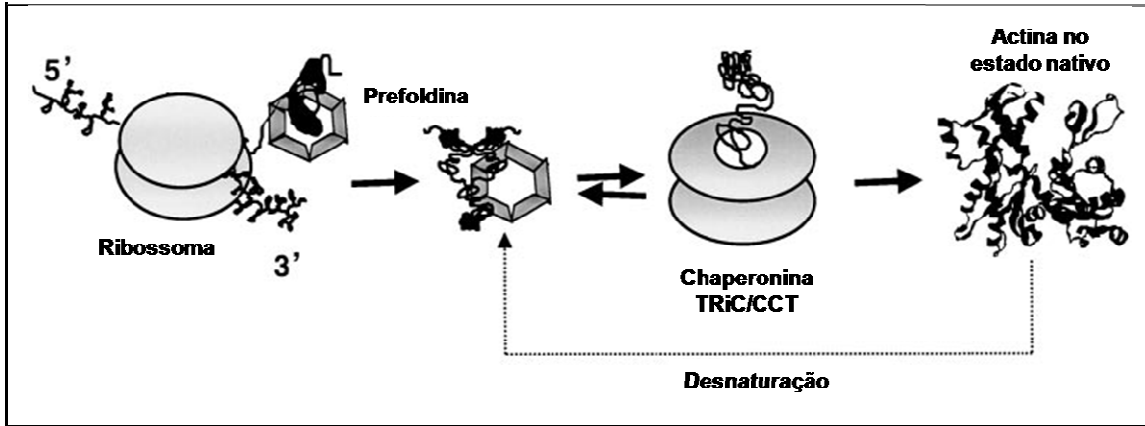


Figura 1.2 – Actina e tubulina interagem com GimC/Pfd e, posteriormente com TRiC/CCT durante o *foldin* *in vivo*. A actina e tubulina, presentes na célula, interagem com este complexo quando ainda associadas ao ribossoma. Assim que são libertadas do ribossoma, e com o auxílio de GimC/Pfd, as proteínas são transferidas para o TRiC/CCT que garante a transição para o estado nativo. É possível que as proteínas que não alcançam o estado nativo após a dissociação da chaperonina, assim como proteínas em estado nativo que são desnaturadas, se liguem a GimC/Pfd que as transporta novamente para TRiC/CCT. Adaptado de Hansen *et al.*, 1999^[5].

A estrutura do complexo GimC/Pfd, semelhante a uma alforreca, permite que os “tentáculos” sejam locais de ligação aos substratos e à chaperonina através de domínios *coiled coil*. Estes domínios possuem duas propriedades que contribuem para a actividade do chaperone: (1) a capacidade de formar estruturas rígidas que actuam como barreiras físicas que impedem interacções não específicas e, (2) a capacidade de expor superfícies com domínios hidrofílicos e hidrofóbicos que contribuem para a ligação com o substrato por meio de interacções específicas^[8].

Até à data, os substratos descritos de GimC/Pfd são a actina e a tubulina, componentes do citosqueleto^[1,2]. A existência de homólogos de GimC/Pfd em arqueobactérias, que não possuem actina ou tubulina, nem os respectivos antecessores funcionais FtsA e FtsZ, remete para a existência de outros substratos do complexo^[3,6]. Com efeito, tanto a chaperonina TRiC/CCT como GimC/Pfd foram recentemente considerados chaperones promíscuos, numa análise à rede de interacções físicas dos 63 chaperones de levedura, uma vez que foram observadas interacções com outros chaperones e com um grande número de proteínas^[9]. No entanto, a divergência de duas (em arqueobactérias) para seis subunidades distintas (em eucariotas), o mecanismo de reconhecimento baseado em interacções hidrofóbicas inespecíficas entre chaperone e substrato que se observa em arqueobactérias mas não em eucariotas, e o facto de GimC/Pfd ter um papel mais protector (os substratos estão protegidos na cavidade de GimC/Pfd), podem significar que a evolução em termos de estrutura e especialização está

associada a alterações de função e de interação com os substratos^[7,10,11]. Esta sugestão é apoiada pela observação de que não existe interação entre a Prefoldina de arqueobactérias e a chaperonina TRiC/CCT^[3].

Em *S. cerevisiae*, a deleção de um gene *GIM* resulta na redução da eficiência do *folding* da actina e tubulina e na redução da proliferação a 30°C^[6]. Adicionalmente, e na ausência de GimC, diversos polipéptidos, ainda por identificar, apresentam uma redução na eficiência de *folding*, sendo referidos como potenciais novos substratos do complexo^[6].

1.2. Particularidades das subunidades Gim

Apesar de ter como principal função descrita a participação no *folding* da actina e tubulina, diversos dados sugerem possíveis novas funções, tanto para GimC/Pfd, como para cada subunidade individualmente.

A subunidade Gim1 foi identificada num *screening* genético de factores que intervêm no estabelecimento do padrão bipolar de gemulação em levedura, juntamente com a proteína Bud27, descrita como sendo uma prefoldina “não-convencional” que, associada à subunidade Rpb5 das três RNA polimerases de levedura, é parte integrante da maquinaria transcricional^[13,14].

A subunidade Gim2 torna-se essencial na ausência da proteína Cin8, envolvida na formação do fuso mitótico e na segregação de cromossomas, em *S. cerevisiae*. Posteriormente, foram observadas deficiências de germinação nos mutantes $\Delta gim2$, bem como a presença de uma única proteína Gim, a subunidade Gim2, em fracções nucleares^[1,14].

A ausência da subunidade Gim5 aumenta a necessidade, para o crescimento celular, de TFIIIS, um factor de transcrição conservado em eucariotas que poderá interagir com o complexo de iniciação da transcrição^[15].

Todos os mutantes *gim*, à excepção do mutante $\Delta gim4$, apresentam crescimento reduzido a 14°C e não proliferam em meio contendo 1,4M de sorbitol (neste último caso, o mutante $\Delta gim3$ apresenta proliferação reduzida e o mutante $\Delta gim6$ não foi testado)^[1]. Para além disto, os mutantes *gim* apresentam sensibilidades distintas aos vários agentes de stress e observam-se padrões de expressão genética diferentes entre os vários mutantes, mais concretamente para os genes *CTT1*, *FLR1* e *TRX2*, em condições de stress^[16].

Todos estes dados sugerem não só possíveis funções alternativas para cada subunidade como também diferentes importâncias das mesmas na célula, nomeadamente em condições de stress.

1.3. O citosqueleto e a resposta celular a condições de stress

A resposta das células eucarióticas a estímulos extracelulares de stress, que impedem ou ameaçam a integridade celular, tem como consequência a activação de diversas cascatas de sinais com especificidades distintas, descritas como essenciais na regulação da transcrição, particularmente a mediada pela RNA polimerase II^[17], na estabilidade de mRNAs^[18] e na tradução^[19].

Em *S. cerevisiae* e células de mamífero expostas a agentes indutores de stress estão descritas alterações estruturais do citosqueleto, dado que componentes como a actina e a tubulina são muitas vezes alvo destes agentes, sugerindo que o citosqueleto funciona como mediador das respostas a estes estímulos^[20,21,22]. A despolimerização do citosqueleto de actina^[23] ou de tubulina^[24] pode servir como um sinal intracelular de indução da resposta às condições de stress.

Adicionalmente, alguns estudos propõem uma associação entre a actina e complexos nucleares tanto em mamífero como em levedura^[25,26] e um possível papel da actina na regulação da transcrição uma vez que, em levedura, a actina é responsável pela localização celular quer de mRNAs^[27] quer de activadores transcricionais^[28].

1.4. Factores de transcrição associados a condições de stress

Todos os organismos desenvolveram, um grande número de respostas celulares que lhes permitem sobreviver em condições de stress provocadas por um grande número de agentes. Estas respostas, invariavelmente, envolvem um aumento da expressão de diversos genes cujos produtos anulam parte dos efeitos negativos causados por condições de stress^[29]. Uma das respostas mais estudadas é a resposta ao choque térmico (universal entre os seres-vivos), que envolve a indução de um pequeno grupo de proteínas e é conseguida através de um aumento da quantidade e actividade do Factor de Choque Térmico (HSF – *Heat Shock Factor*)^[30].

Em eucariotas, as condições de stress induzem não só a expressão dos genes de resposta ao choque térmico, mas também a de genes envolvidos na glicólise, função da membrana citoplasmática, defesa anti-oxidante, homeostase de metais^[31]. Em *S. cerevisiae*, a expressão de todos os genes envolvidos nos processos supra-mencionados é, adicionalmente, induzida quando a célula entra em fase estacionária, podendo ser considerada como uma resposta à ausência de nutrientes (stress nutricional)^[32].

Por estes motivos, torna-se evidente que a tolerância ao stress requer a actividade coordenada de um grande número de proteínas envolvidas nas mais diversas funções celulares^[29]. Os factores de transcrição que regulam os genes necessários na tolerância ao stress podem intervir em respostas mais gerais (a vários tipos de stress) ou em respostas a condições de stress específicas, podendo ocorrer ainda sobreposições funcionais, parciais ou totais, dependendo dos factores de transcrição em questão^[33] (Figura 1.3).

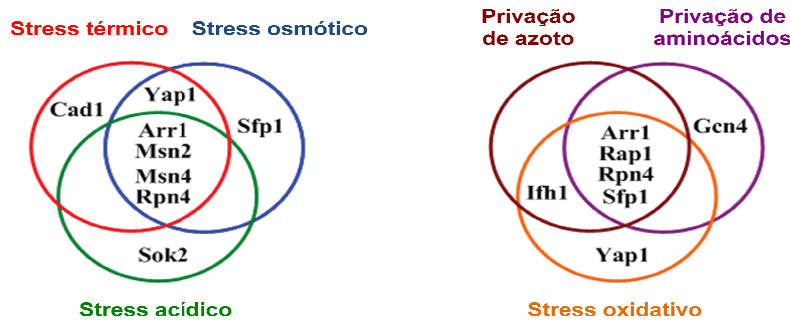


Figura 1.3 – Representação da regulação das respostas a várias condições de stress, em *S. cerevisiae*. Os factores de transcrição encontram-se no interior de cada circunferência consoante a resposta que regulam. Aqueles que são observados em duas ou mais circunferências intervêm em mais do que uma resposta celular ao estímulo indicado. Adaptado de Wu *et al.*, 2008^[33]

Todos os factores de transcrição mencionados na Figura 1.3 têm a capacidade de regular respostas celulares a stresses, pois possuem um domínio de ligação a sequências específicas de DNA que podem ser encontradas nos promotores dos vários genes intervenientes nestas respostas^[33].

Se os mutantes *gim* apresentam sensibilidades distintas a diferentes agentes de stress e padrões de expressão dos genes *TRX2* e *FLR1* distintos^[16], se foi observada a presença da subunidade Gim2 em fracções nucleares, se existe a sugestão de que a actina pode intervir na regulação da transcrição e sendo a actina substrato do complexo GimC/Pfd, então torna-se pertinente perceber se existe algum tipo de relação entre as proteínas Gim e factores de transcrição. Dado que o gene *TRX2* é regulado pelo factor de transcrição Yap1 e devido à importância que este activador transcricional possui na resposta celular a condições de stress, neste trabalho deu-se especial ênfase ao Yap1^[34]. Para perceber se potenciais relações são específicas para cada subunidade ou se são comuns a mais do que um factor de transcrição, foi estudado outro activador transcricional, que também intervém na resposta ao stress, o Gcn4^[35]. Tanto o Yap1 como o Gcn4 possuem um motivo estrutural bZIP, domínio com feixe de resíduos de leucinas que permite a dimerização e se encontra adjacente a uma região cuja

presença de resíduos de aminoácidos básicos é responsável pela interacção directa com as bases azotadas do DNA^[36,37]. Estes diferem entre si na especificidade da ligação ao DNA, bem como no papel regulatório que assumem em levedura^[38,39,40].

1.5. Gcn4

A proteína Gcn4 (General Control Nonderepressible Protein 4) de *S. cerevisiae* pertence à família AP-1 e, na forma homodimérica, liga-se a sequências palindrómicas ATGA(C/G)TCAT (Figura 1.4), também designadas GCRE (Gcn4 Responsive Elements), existentes nos promotores de genes associados à biossíntese de aminoácidos, induzindo a transcrição destes mesmos genes^[39,41,42,43]. Verificou-se que mutações nas bases CG centrais reduzem fortemente a ligação do Gcn4 ao DNA^[44] e que a existência de uma única sequência de ligação ao Gcn4 não é suficiente para a regulação da transcrição por este activador^[45].

Hope e Struhl (1986)^[46] demonstraram que 60 resíduos de aminoácidos situados na região C-terminal do Gcn4 são suficientes para a ligação específica ao DNA e que uma região acídica composta por 19 resíduos de aminoácidos é crucial para a activação da transcrição.

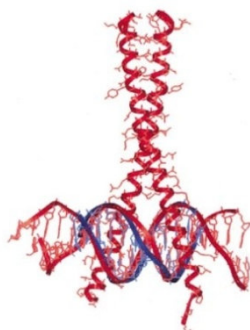


Figura 1.4 – Modelo estrutural da interacção do homodímero de Gcn4 com o DNA-alvo. Adaptado de Khandelwal *et al.*, 2001^[47].

Este activador estimula a transcrição de mais de 30 genes intervenientes na biossíntese de aminoácidos e ainda de genes que codificam várias aminoacil-tRNA sintetases^[48,49]. Adicionalmente, o Gcn4 activa a transcrição de genes envolvidos nas vias biossintéticas de purinas^[50]. Demonstrou-se que a actividade do Gcn4 é também induzida por radiação UV mediando uma resposta protectora muito semelhante à observada nos factores AP-1 em mamífero^[51]. Recentemente, sugeriu-se ainda que a indução da actividade de Gcn4, em *S. cerevisiae*, ocorra na presença de peróxido de hidrogénio (H₂O₂)^[52].

A indução da expressão de *GCN4* ao nível da tradução ocorre rapidamente em condições de redução severa de aminoácidos sem que ocorra uma alteração detectável na abundância do

respectivo RNA mensageiro^[53]. Este último contém quatro ORFs (*Open Reading Frames*), ORFs 1 a 4, a montante da região codificante, constituídas por 2 a 3 codões, que inibem a tradução da região codificante para o *GCN4*, razão pela qual a deleção das quatro aumenta de forma considerável a tradução de *GCN4*^[54,55,56].

Foi observada uma homologia parcial, ao nível da sequência de ligação ao DNA, entre o Gcn4 e as oncoproteínas Fos e Jun^[35,57,58].

1.6. Yap1

O gene *YAP1* (*Yeast AP-1*) em *S. cerevisiae* codifica uma proteína que se liga, na forma homodimérica, a sequências TTA^{CTTAA}^[59] existente nos promotores de genes intervenientes na resposta anti-oxidante^[60], sendo a estrutura do homodímero muito semelhante à observada para o Gcn4 (Figura 1.4). Esta proteína pertence à família Yap de factores de transcrição constituída por oito membros que formam uma sub-família de proteínas bZIP uma vez que possuem quatro resíduos na região básica (Q234, Q239, A241 e F/Y242) que raramente, ou nunca, são observados nas outras proteínas bZIP, razão pela qual o seu local de reconhecimento é distinto do observado para os outros factores AP-1^[59]. O Yap1 é o activador mais forte, não podendo ser substituído por nenhum dos membros Yap: Yap2, Yap3, Yap4 e Yap5^[59].

Este gene não é essencial, uma vez que mutantes com disrupção do gene *YAP1* possuem um crescimento idêntico ao observado para estirpes *YAP1*, em condições óptimas de crescimento^[34]. No entanto, o Yap1 é responsável pela activação da transcrição de vários genes envolvidos na resposta a diversas condições ambientais adversas, particularmente, na resposta ao stress oxidativo, provocado por agentes como o H₂O₂. Os genes sujeitos à regulação por Yap1 incluem o *TRX2*, que codifica a tioredoxina 1 (citoplasmática)^[60], o *YCF1*^[61] e o *FLR1*^[62] cujos produtos constituem bombas de efluxo (de famílias distintas), o *GSH1*^[63] e o *GLR1*^[64], ambos codificando enzimas envolvidas na biossíntese e regulação da glutatona.

Gounalaki e Thireos (1994)^[29] verificaram que a sobre-expressão de Yap1 suporta o crescimento de células deletadas para o *GCN4* em condições de stress nutricional, o que se deve, não a uma substituição funcional, uma vez que estes activadores não reconhecem a mesma sequência, mas sim ao resultado da multi-resistência que esta sobre-expressão despoleta^[29,65,66]. Este fenómeno de multi-resistência inclui tolerância ao cádmio e zinco^[66,67] bem como a diversos agentes oxidativos^[68].

A actividade do Yap1 é regulada ao nível da localização nuclear. Esta localização nuclear é controlada pela região C-terminal da proteína, que contem três repetições CysSerGlu^[69]. O Yap1 é activado pelo H₂O₂ por oxidação dos resíduos de cisteína que desta forma previnem o reconhecimento pelo exportador nuclear Crm1/Xpo1^[70,71], (a exposição ao H₂O₂ induz a formação de duas ligações persulfureto entre os domínios ricos em cisteínas das regiões N- e C-terminal do Yap1 impedindo a interacção Yap1-Crm1) e desactivado por redução enzimática mediada pelo sistema da tioredoxina^[72]. Para além disto, e na presença de H₂O₂, o Yap1 é fosforilado, modificação que ocorre fora do domínio C-terminal e que é necessária para a activação da transcrição de genes regulados por este factor de transcrição^[72,73].

Sugeriou-se um papel para o Yap1 na resposta ao stress nutricional provocado pela ausência de carbono na célula ou resultado da mudança de células crescidas em glucose para uma fonte de carbono alternativa, uma vez que se verificou a sua acumulação no núcleo nestas condições^[69].

O Yap1 possui um homólogo funcional em bactérias, o regulador transcricional OxyR que é activado directamente pelo H₂O₂ e, de forma semelhante ao Yap1, possui um sistema de auto-regulação uma vez que ambos são desactivados pelos seus genes-alvo^[72]. Da mesma forma, existem homólogos de Yap1 em várias células eucariotas como a proteína Pap1 em *Schizosaccharomyces pombe*^[74], Kap1 em *Kluyveromyces lactis*^[75], Cap1 em *Candida albicans*^[62] ou AP-1 em mamífero^[34,76].

A existência de homólogos de Yap1 em várias células eucariotas e em bactérias e a importância que esta proteína tem ao nível da regulação de respostas celulares a estímulos a que a célula está frequentemente sujeita, justificam a escolha deste activador para o estudo da activação transcricional, neste caso específico, em mutantes *gim*.

Yap1 e Gcn4 são portanto activadores transcricionais que assumem papéis centrais nas respostas que regulam, respectivamente, em condições de stress oxidativo e nutricional, podendo existir uma sobreposição parcial de funções no caso específico de genes que intervenham em ambas as respostas^[29,53,69]. Perceber de que forma é que a actividade de ambos os activadores é afectada em mutantes *gim* contribui para esclarecer o motivo pelo qual estes mutantes apresentam fenótipos distintos quando sujeitos a diferentes stresses^[16] e, eventualmente, para a identificação de novas funções das Gims.

Mais concretamente, neste trabalho experimental procedeu-se ao estudo da actividade de factores de transcrição nos vários mutantes *gim*, especificamente através da avaliação do potencial de activação do Yap1 e do Gcn4 e do uso de genes “repórter” por eles regulados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Meios e procedimentos gerais

A propagação (em meio líquido ou sólido) das estirpes de *S. cerevisiae* foi feita em meio SC ou meio YPD (Anexo). Para as estirpes transformadas utilizou-se meio CAA sólido e meio FOA (Anexo). Em todos os casos, a incubação foi feita a 28°C e o crescimento em meio líquido foi feito com agitação. A transformação das estirpes de *S. cerevisiae* foi realizada pelo método do acetato de lítio^[77]. A preparação de plasmídeos foi realizada pelo método da lise alcalina descrito por Birnboim e Doly (1979)^[78], utilizando estirpes de *Escherichia coli* transformadas pelo método clássico descrito por Chung *et al.*, (1989)^[79] e crescidas a 37°C em meio 2xTY líquido (Anexo) com agitação. As reacções para amplificação de fragmentos de DNA *in vitro* (PCR) foram realizadas com Taq DNA polimerase da Fermentas[®], num termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc).

2.2. Estirpes e plasmídeos

As estirpes e os plasmídeos utilizados no trabalho experimental encontram-se listados nas Tabelas 2.1 e 2.2, respectivamente.

Tabela 2.1 – Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho

Estirpes	Genótipo relevante	Origem
Y00000	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
Y04149	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δgim1</i>	Euroscarf
Y04708	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δgim2</i>	Euroscarf
Y02059	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δgim3</i>	Euroscarf
Y00243	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δgim4</i>	Euroscarf
Y06491	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δgim5</i>	Euroscarf
Y01246	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δgim6</i>	Euroscarf
yJC2	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δgim2; Δyap1</i>	João Coelho, Lisete Fernandes*
yJC3	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δgim3 Δyap1</i>	João Coelho, Lisete Fernandes*
yJC4	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δgim4 Δyap1</i>	João Coelho, Lisete Fernandes*
yJC7	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δyap1</i>	João Coelho, Lisete Fernandes*

*Não publicado

Tabela 2.2 – Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeos	Características relevantes	Referência
pY.HIS3	<i>HIS3</i> dependente de Yap1; <i>URA3</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 1997 ^[60]
YRp14- <i>trp1Δ63</i>	<i>trp1Δ63</i> ; <i>URA3</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995 ^[80]
64F2.LexΔI	Vector com promotor do <i>ADH1</i> ; região codificante de LexA, HA, NLS; <i>TRP1</i> ; <i>CEN</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 1997 ^[60]
pLF45	64F2.LexΔI com região codificante de <i>YAP1</i> em <i>frame</i> com NLS	Fernandes <i>et al.</i> , 1997 ^[60]
63F1.GCN4	64F2.LexΔI com região codificante de <i>GCN4</i>	Lisete Fernandes*
JK103	<i>lacZ</i> dependente de LexA; <i>URA3</i> , 2μm	Kamens <i>et al.</i> , 1990 ^[81]

*Não publicado

2.3. Integração dos genes *Y.HIS3* e *HIS3*

Os mutantes *gim* e estirpe selvagem isogénica (Tabela 2.1) foram transformados com o plasmídeo pY.HIS3 (Tabela 2.2). Pelo método da selecção negativa por 5-FOA^[82], a recombinação entre o alelo *Y.HIS3* presente no plasmídeo supra-mencionado e o alelo *his3Δ1*, presente nas estirpes transformadas e que possui uma deleção parcial da ORF do *HIS3* selvagem^[83], gerou o alelo *Y.HIS3* ou a reconstrução do alelo selvagem, *HIS3*, cujo promotor possui um local de ligação para o Gcn4^[60]. A integração de ambos os alelos foi confirmada por *PCR* com os oligonucleótidos descritos na Tabela 2.3. Os oligonucleótidos 836sv e STR1029 permitiram a amplificação de todo o gene para os três alelos *his3Δ1*, *Y.HIS3* e *HIS3*, e o 836B, foi utilizado juntamente com o 836sv, nos casos em que o tamanho dos fragmentos amplificados suscitou algumas dúvidas.

Tabela 2.3 – Oligonucleótidos utilizados na confirmação da integração dos alelos *Y.HIS3* e *HIS3*

Oligonucleótidos	Sequência de nucleótidos
836sv	5' - GTCCTTATTCTGGAAGTGGATTTATG - 3'
STR1029	5' - GAATACCACTTGCCACCTATCACC - 3'
836B	5' - GTGTGATGGTCGTCTATGTGTAAG - 3'

2.4. Deleção do gene *TRP1*

O gene *TRP1* foi deletado em todas as estirpes descritas na Tabela 2.1, através da transformação das mesmas com o plasmídeo YRp14-*trp1Δ63* (Tabela 2.2) e pelo método da selecção negativa por 5-FOA^[82]. A disrupção do gene foi conseguida por inserção de um alelo mutado, *trp1Δ63*, que possui uma deleção parcial da ORF do gene *TRP1*. A disrupção do alelo

selvagem foi confirmada por plaqueamento em *spots*, como descrito no ponto 2.6 mas utilizando meio SC sem triptofano (meio SC como controlo positivo).

2.5. Transformação das estirpes para os ensaios enzimáticos

Para a realização dos ensaios enzimáticos (descritos no ponto 2.7), todas as estirpes obtidas neste trabalho por deleção do gene *TRP1* (Tabela 3.1 - Resultados) foram transformadas em simultâneo com as seguintes combinações de plasmídeos (Tabela 2.2): pLF45 e JK103; 64F2.LexΔI e JK103. A combinação 64F3.GCN4 e JK103 foi utilizada na transformação das estirpes obtidas por deleção do gene *TRP1*, originadas a partir das estirpes adquiridas à Euroscarf (Tabela 2.1), isto é, utilizaram-se as estirpes *ΔgimΔtrpYAP1*.

Utilizou-se meio CAA sem uracilo nem triptofano (marcadores auxotróficos, nestes casos) para seleccionar as colónias transformantes a serem testadas no ensaio enzimático.

2.6. Determinação de sensibilidades por plaqueamento em *spots*

Para a realização destes ensaios fenotípicos, foram utilizadas culturas líquidas em fase estacionária (D.O._{600nm} superior a 3 em meio SC) de onde foram recolhidas células por centrifugação à temperatura ambiente, durante 3 minutos à velocidade de 13200rpm numa centrífuga *Eppendorf* 5415. Estas células foram ressuspensas em solução de desagregação (composta por 10mM Tris-HCl pH8 e 5mM EDTA pH8 e previamente esterilizada por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos) e a sua concentração foi ajustada para uma D.O._{600nm}=3 de forma a preparar cinco diluições decimais sucessivas. Foram aplicados 3μl de cada uma das diluições, da mais concentrada para a menos concentrada, na superfície do meio SC sólido, ou meio SC sem histidina e contendo 3-amino-1,2,4-triazol (aminotriazol - AT) ou H₂O₂. A preparação das placas contendo os referidos meios ocorreu sempre no dia da sua utilização e os agentes de stress (preparados também no dia e a partir de soluções a 1M) foram incorporados no meio quando este se encontrava a uma temperatura não superior a 55°C. As placas foram incubadas durante 3 dias. Todas as soluções a 1M foram preparadas imediatamente antes da sua utilização: 1M H₂O₂ (Sigma®) e 1M de 3-aminotriazol (Sigma®) preparadas em água bi-destilada esterilizada.

2.7. Ensaio da β -galactosidase

Foram utilizadas culturas líquidas com uma D.O._{600nm} entre 0.5 e 0.9 de onde foram recolhidas células por centrifugação à temperatura ambiente durante 5 minutos à velocidade de 13200rpm numa centrífuga *Eppendorf* 5415. Estas células foram ressuspendidas em solução LacZ (composta por 100mM de PO₄⁻³, 10mM de KCl, 1mM de MgSO₄ e previamente esterilizada por filtração) com β -mercaptoetanol, SDS a 0,1% e clorofórmio a 100%. Foi adicionada a solução de ONPG (*ortho-Nitrophenyl- β -galactoside*), substrato da β -galactosidase, a 4mg/mL, e após misturar por inversão, todas as amostras foram colocadas num bloco térmico a 30°C. A β -galactosidase hidrolisa o ONPG, reacção que dá origem a orto-nitrofenol que, em meio básico, se encontra na forma de ião orto-nitrofenolato, de cor amarela. Por este motivo, a hidrólise do ONPG foi cronometrada, tendo sido interrompida quando a mistura atingiu a cor amarelo-clara ou após terem decorrido 30 minutos desde a adição do ONPG. A reacção foi interrompida através da adição de uma solução de Na₂CO₃ a 1M e o tempo decorrido foi registado. Os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente durante 5 minutos à velocidade de 13200rpm para remover detritos celulares, o sobrenadante foi retirado para um novo tubo e foi medida a Abs_{420nm}. A medição da absorvância permite determinar de forma quantitativa a abundância de ião orto-nitrofenolato presente e, conseqüentemente, a de β -galactosidase. A actividade enzimática é dada pela seguinte fórmula:

$$U = \frac{\text{Abs}_{420\text{nm}} \times 1000}{\text{D.O.}_{600\text{nm}} \times V \times t}$$

onde V = Volume da reacção em ml

t = tempo de reacção em minutos

D.O.₆₀₀ = Densidade óptica da cultura no início do ensaio medida a 600nm

Abs₄₂₀ = Absorvância a 420nm do tubo de reacção, medida após a paragem da reacção

3. RESULTADOS

3.1. Potencial de activação da transcrição em mutantes *gim*

3.1.1. Construção de estirpes Δgim com disrupção do gene *TRP1*

Com o intuito de avaliar o potencial de activação dos activadores Yap1 e Gcn4 nos vários mutantes *gim*, começou-se pela deleção, nestes mutantes, do gene *TRP1*, cujo produto participa no terceiro passo da biossíntese de triptofano^[84]. O objectivo desta deleção foi utilizar o triptofano como marcador auxotrófico devido ao facto dos plasmídeos que expressam as quimeras LexA-activador (já construídos) conterem o gene *TRP1* (Tabela 2.2).

Os candidatos que apresentaram ausência de crescimento em meio sem triptofano, portanto com *TRP1* deletado, e crescimento idêntico ao observado para a estirpe ancestral isogénica em meio com triptofano (resultados não mostrados) foram seleccionados correspondendo aos candidatos independentes obtidos e indicados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Estirpes $\Delta gim \Delta trp$ construídas por disrupção do gene *TRP1*

Estirpes	Genótipo	Nº candidatos independentes obtidos
<i>yMC10</i>	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; Δtrp	2
<i>yMC11</i>	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim1$; Δtrp	3
<i>yMC12</i>	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim2$; Δtrp	4
<i>yMC13</i>	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim3$; Δtrp	3
<i>yMC14</i>	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim4$; Δtrp	6
<i>yMC15</i>	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim5$; Δtrp	2
<i>yMC22</i>	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim2$; $\Delta yap1$; Δtrp	22
<i>yMC23</i>	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim3$; $\Delta yap1$; Δtrp	18
<i>yMC24</i>	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim4$; $\Delta yap1$; Δtrp	6
<i>yMC20</i>	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta yap1$; Δtrp	2

Para obtenção dos candidatos listados na Tabela 3.1 foram testados cerca de 200 transformantes para os mutantes $\Delta gim1$, $\Delta gim2$, $\Delta gim3$, $\Delta gim4$ e $\Delta gim5$ (*yMC11*, *yMC12*, *yMC13*, *yMC14*, *yMC15*, respectivamente), entre 300 e 550 transformantes para a estirpe selvagem (*yMC10*) e para os mutantes $\Delta yap1$ (*yMC20*, *yMC22*, *yMC23*, *yMC24*) e cerca de 800 transformantes para o mutante $\Delta gim6$ (*yMC16*), resultantes de 1 a 3 transformações independentes. Uma vez que não foi possível a construção de mutantes $\Delta gim6 \Delta trp$, o potencial de activação do Yap1 e Gcn4 em estirpes com ausência de Gim6 não foi avaliado.

A quantificação da actividade das proteínas quiméricas foi realizada utilizando oito candidatos independentes (clones) para *yMC22* e dois clones por estirpe para as restantes. Contudo, para as estirpes *yMC11* e *yMC13* foram testados três clones, apesar de se ter considerado um representativo devido a problemas técnicos mencionados seguidamente (Tabela 3.1).

3.1.2. Quantificação da actividade de LexA-Yap1 em mutantes *gim*

De modo a perceber se a ausência de cada uma das proteínas Gim tem influência na capacidade de activação da transcrição do Yap1, os mutantes *gim* foram transformados, simultaneamente, com o plasmídeo JK103 (Tabela 2.2) que possui o gene repórter *lacZ* dependente de LexA e com o plasmídeo pLF45 (Tabela 2.2) que expressa a quimera LexA-Yap1. Uma vez ligada ao DNA através do domínio LexA, o Yap1 da proteína quimérica LexA-Yap1 vai activar a transcrição do gene *lacZ*. Isto significa que a avaliação do potencial de activação do Yap1 em cada mutante *gim* é traduzida pela quantificação da actividade da β -galactosidase, enzima codificada pelo gene *lacZ* que não está sujeito a outros níveis de regulação por ser um gene heterólogo. Os valores obtidos para a actividade do LexA-Yap1 estão expressos na Figura 3.1.

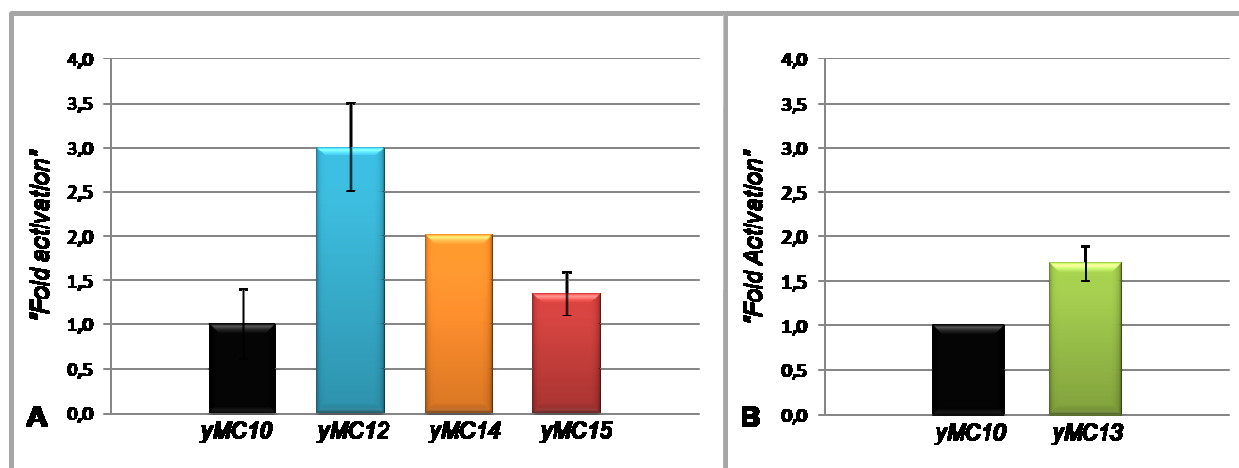


Figura 3.1 - Activação da transcrição do gene *lacZ* pela quimera LexA-Yap1 em (A) mutantes $\Delta gim2$, $\Delta gim4$ e $\Delta gim5$ (*yMC12*, *yMC14* e *yMC15*, respectivamente) e estirpe selvagem isogénica (*yMC10*); e (B) mutantes $\Delta gim3$ (*yMC13*) e estirpe selvagem isogénica (*yMC10*). As barras correspondem à razão entre o valor médio de activação normalizado de cada mutantes *gim* e o da estirpe selvagem isogénica ("Fold activation"). A normalização corresponde à razão entre unidades de activação por LexA-Yap1 e unidades de activação por LexA Δ I. Os valores médios foram obtidos a partir da avaliação de 10 colónias independentes (culturas) por estirpe, tendo sido testada, simultaneamente, uma réplica por colónia. Os resultados apresentados em ambos os gráficos representam médias, com respectivos desvios padrão, obtidas a partir de experiências independentes com dois clones diferentes por estirpe (A) ou duas experiências independentes com o mesmo clone (B).

Verificou-se que a ausência de Gim2 ou Gim4 na célula provoca uma triplicação ou duplicação, respectivamente, da activação por LexA-Yap1 em relação ao observado para a estirpe selvagem. A razão entre os valores de activação por LexA-Yap1 obtidos para o mutante $\Delta gim4$ (*yMC14*) e estirpe selvagem isogénica manteve-se nas duas experiências independentes, razão pela qual o desvio padrão, neste mutante, não está representado na Figura 3.1A. O mutante $\Delta gim5$ (*yMC15*), por sua vez, apresenta um aumento de cerca de 30% em relação à estirpe selvagem. Contudo, este é o valor médio do que se observou nas duas experiências independentes, sendo que, numa delas, o resultado obtido para a activação da transcrição por LexA-Yap1 foi muito semelhante ao observado na estirpe selvagem. Por terem sido realizadas duas experiências independentes que não foram repetidas e não estão em concordância, não foi possível esclarecer qual o clone correcto nem perceber se este mutante tem um comportamento muito semelhante ou se a activação por LexA-Yap1 sofre um aumento comparativamente ao observado para a estirpe selvagem isogénica (Figura 3.1A).

A Figura 3.1B apresenta a média de duas experiências independentes para a estirpe *yMC13*. O facto de estas experiências terem sido realizadas independentemente das relativas à Figura 3.1A justifica o motivo pelo qual este resultado se encontra separado dos restantes. Para além disto, e nas duas experiências independentes, foi considerado apenas um dos três clones obtidos na construção da estirpe $\Delta gim3\Delta trp$ (Tabela 3.1), assumindo-se neste trabalho que este clone é representativo da estirpe. Os restantes clones não foram considerados por apresentarem um crescimento mais lento do que a estirpe selvagem isogénica e os clones dos restantes mutantes *gim* (excepto mutante $\Delta gim1$) e devido às culturas não terem atingido a D.O._{600nm} desejada (entre 0,4 e 0,9). O clone que se considerou representativo da estirpe exibe um aumento de cerca de 70% na activação por LexA-Yap1 comparativamente ao observado para a estirpe selvagem isogénica. Devido às razões técnicas supra-mencionadas, este valor poderá não traduzir o que realmente ocorre num mutante $\Delta gim3$.

Relativamente ao mutante $\Delta gim1$ (*yMC11*), foram testados os três clones obtidos da construção da estirpe (Tabela 3.1), mas não pode ser realizada uma comparação válida entre estes valores e a estirpe selvagem isogénica, uma vez que as culturas da última apresentaram valores de D.O._{600nm} fora dos limites pretendidos, não podendo, portanto, ser utilizados como referência. Adicionalmente, mais nenhum mutante *gim* foi testado neste dia. Contudo, os valores normalizados de activação por LexA-Yap1 são muito semelhantes para os três clones (dados não mostrados).

Pensou-se que seria pertinente saber se estes resultados seriam semelhantes em estirpes $\Delta yap1$ uma vez que a presença de Yap1 endógeno poderia estar a interferir com a actividade da proteína quimérica LexA-Yap1.

A limitação da construção das estirpes $\Delta gim\Delta trp\Delta yap1$ fez com que só fosse possível testar a activação por LexA-Yap1 nos mutantes $\Delta gim2$, $\Delta gim3$ e $\Delta gim4$ e na estirpe selvagem isogénica. À semelhança do que foi previamente referido, a activação da transcrição por LexA-Yap1, em estirpes $\Delta yap1$, foi determinada pela quantificação da actividade de β -galactosidase nos três mutantes *gim* supra-listados e estirpe selvagem isogénica. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.2.

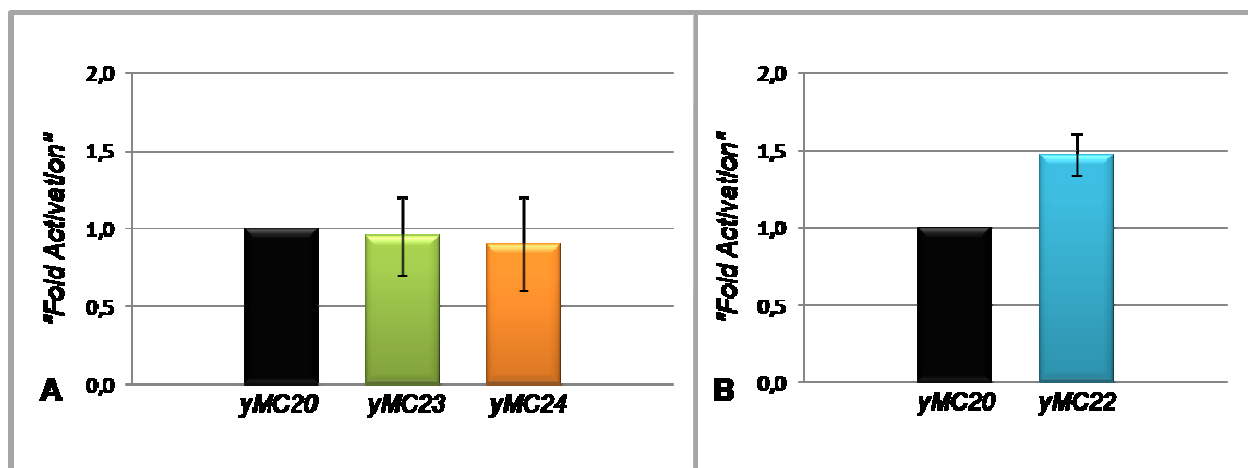


Figura 3.2 – Activação da transcrição do gene *lacZ* pela quimera LexA-Yap1 em (A) mutantes $\Delta gim3\Delta yap1$ (yMC23) e $\Delta gim4\Delta yap1$ (yMC24) e estirpe selvagem isogénica (yMC20); e (B) mutantes $\Delta gim2\Delta yap1$ (yMC22) e estirpe selvagem isogénica (yMC20). As barras correspondem à razão entre o valor médio de activação normalizado de cada mutantes *gim* e o da estirpe selvagem isogénica (“Fold activation”). A normalização corresponde à razão entre unidades de activação por LexA-Yap1 e unidades de activação por LexA Δ I. Os valores médios foram obtidos a partir da avaliação de 10 colónias independentes (culturas) por estirpe, tendo sido testada, simultaneamente, uma réplica por colónia. Os resultados apresentados em ambos os gráficos representam médias, com respectivos desvios padrão, obtidas a partir de experiências independentes com dois clones diferentes por estirpe em (A) e com seis clones em (B).

A separação destes resultados em dois gráficos distintos deveu-se à variação de algumas condições entre as experiências, nomeadamente o número de experiências independentes e o facto de terem sido realizadas em dias distintos, sendo os resultados comparáveis pela repetição dos ensaios para a estirpe selvagem isogénica.

Na Figura 3.2A é possível observar que os mutantes $\Delta gim3$ e $\Delta gim4$ (yMC23 e yMC24, respectivamente) não exibem valores de activação por LexA-Yap1 muito distintos dos observados para a estirpe selvagem isogénica. No entanto, esta semelhança de resultados não

é observada para o mutante $\Delta gim2$ (*yMC22*), cuja activação por LexA-Yap1 sofre um aumento de 50% quando comparada com a estirpe selvagem isogénica (Figura 3.2B).

Estes resultados sugerem que a capacidade de activação por Yap1 não é afectada pela ausência de Gim3 ou Gim4, mas que a ausência de Gim2 resulta num aumento desta mesma capacidade. No entanto, estes resultados não estão de acordo com os previamente observados para os mesmos mutantes num fundo genético diferente, ou seja, com Yap1 endógeno (Figura 3.1).

3.1.3. Quantificação da actividade de LexA-Gcn4 em mutantes *gim*

O estudo do efeito da ausência das proteínas Gim na capacidade de activação da transcrição por Gcn4 foi iniciado com a transformação dos mutantes *gim* e estirpe selvagem isogénica (estirpes *yMC10-15* da Tabela 3.1) com o plasmídeo JK103 (Tabela 2.2) e o plasmídeo 64F3.Gcn4 (Tabela 2.2) que expressa a quimera LexA-Gcn4. De modo idêntico ao descrito para o Yap1, a avaliação do potencial de activação do Gcn4 em cada mutante *gim* é traduzida pela quantificação da actividade da β -galactosidase. Os valores obtidos para a activação da transcrição por LexA-Gcn4 estão expressos na Figura 3.3.

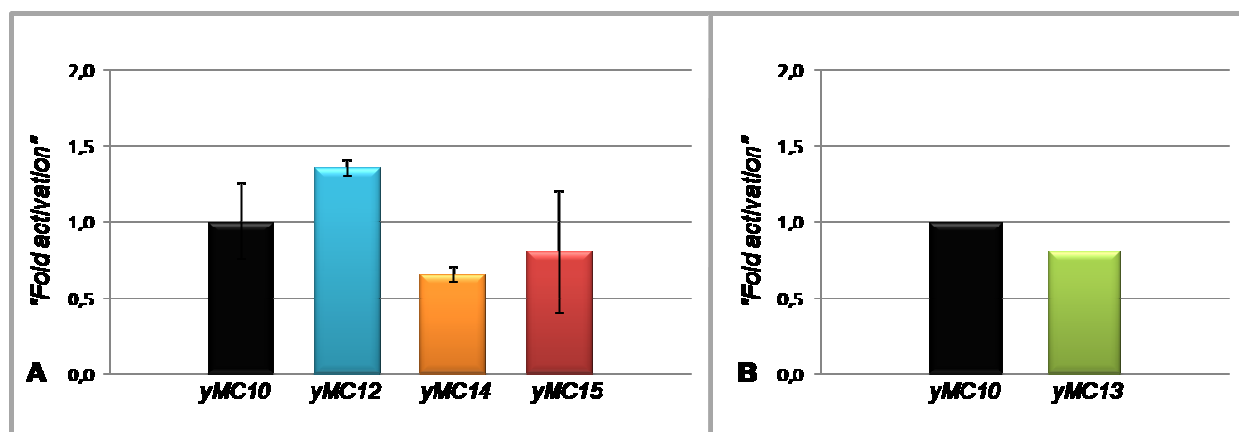


Figura 3.3 – Activação da transcrição do gene *lacZ* pela quimera LexA-Gcn4 em (A) mutantes $\Delta gim2$, $\Delta gim4$ e $\Delta gim5$ (*yMC12*, *yMC14* e *yMC15*, respectivamente) e estirpe selvagem isogénica (*yMC10*); e (B) mutantes $\Delta gim3$ (*yMC13*) e estirpe selvagem isogénica (*yMC10*). As barras correspondem à razão entre o valor médio de activação normalizado de cada mutantes *gim* e o da estirpe selvagem isogénica (“Fold activation”). A normalização destes valores corresponde à razão entre unidades de activação por LexA-Gcn4 e unidades de activação por Lex Δ I. Os valores médios foram obtidos a partir da avaliação de 10 colónias independentes (culturas) por estirpe, tendo sido testada, simultaneamente, uma réplica por colónia. Os resultados apresentados em ambos os gráficos representam médias, com respectivos desvios padrão, obtidas a partir de experiências independentes com dois clones por estirpe em (A) e uma única experiência independente com um clone em (B).

Na Figura 3.3A é possível observar que os mutantes $\Delta gim4$ e $\Delta gim5$ (*yMC14* e *yMC15*, respectivamente) apresentam uma redução da activação por LexA-Gcn4 de cerca de 20-30%, respectivamente, comparativamente à estirpe selvagem isogénica. Em contrapartida, os resultados observados para o mutante $\Delta gim2$ (*yMC22*), demonstram um aumento na activação por LexA-Gcn4 de cerca de 40% em comparação com a estirpe selvagem isogénica.

Estes resultados sugerem que a capacidade de activação por Gcn4 é afectada de forma distinta pela ausência de Gim2, Gim4 ou Gim5. Enquanto a ausência de Gim4 e Gim5 resulta num decréscimo, a ausência de Gim2 conduz a um aumento da activação por LexA-Gcn4.

A Figura 3.3B apresenta o resultado representativo obtido de uma única experiência independente para o mutante $\Delta gim3$ (*yMC13*). O facto de esta experiência ter sido realizada independentemente das relativas à Figura 3.3A justifica o facto de este resultado se encontrar separado dos restantes. Para além disto, foi considerado apenas um dos três clones obtidos da construção da estirpe (Tabela 3.1), assumindo-se neste trabalho que este clone é representativo da estirpe (o mesmo que foi considerado representativo para a quantificação da proteína quimérica LexA-Yap1). Os restantes clones não foram considerados por apresentarem um crescimento mais lento do que a estirpe selvagem isogénica e os clones dos restantes mutantes *gim* (excepto mutante $\Delta gim1$) e devido às culturas não terem atingido a D.O._{600nm} desejada. O clone que se considerou representativo apresentou um decréscimo de 20% na activação por LexA-Gcn4 em comparação com o que é observado para a estirpe selvagem isogénica. Apesar de ser resultado de uma única experiência independente, é notório que o resultado obtido para o mutante $\Delta gim3$ é muito semelhante ao observado para os mutantes $\Delta gim4$ e $\Delta gim5$.

Relativamente ao mutante $\Delta gim1$ (*yMC11*), foram testados os três clones obtidos da construção da estirpe (Tabela 3.1), mas não pode ser realizada uma comparação válida entre estes valores e a estirpe selvagem isogénica, uma vez que as culturas da última apresentaram valores de D.O._{600nm} fora dos limites pretendidos, não podendo, portanto, ser utilizados como referência. Adicionalmente, mais nenhum mutante *gim* foi testado neste dia. Contudo, os valores normalizados de activação por LexA-Gcn4 apresentaram diferenças entre os três clones (dados não mostrados).

Contrariamente ao que foi feito para o Yap1, a avaliação da activação da transcrição por LexA-Gcn4 não foi realizada em estirpes $\Delta gcn4$ dado que trabalhos anteriores^[85] mostram que não há interferência do Gcn4 endógeno com a actividade da proteína quimérica LexA-Gcn4.

A avaliação do potencial de activação do Yap1 e Gcn4 permitiu apenas saber de que forma é que a ausência de cada uma das subunidades Gim afecta a capacidade de activação da transcrição mediada por estes activadores, uma vez ligados ao DNA através do domínio LexA. Por este motivo, foi realizada uma avaliação da actividade destes factores de transcrição para perceber, juntamente com o que foi observado na avaliação do potencial de activação, de que forma é que cada proteína Gim interfere com a actividade regulatória do Yap1 e do Gcn4 sobre genes alvo.

3.2. Actividade regulatória do Yap1 e do Gcn4 em mutantes *gim*

3.2.1. Construção de estirpes *Y.HIS3/HIS3*

De modo a deduzir a actividade dos trans-activadores Yap1 e Gcn4 ao nível da ligação ao DNA nos vários mutantes *gim* começou-se pela construção de estirpes contendo um gene alvo para cada activador. Para o primeiro activador, o alelo *his3Δ1* (existente nas estirpes originais) foi substituído pelo gene repórter *Y.HIS3*, com local de ligação para o Yap1, permitindo que a biossíntese de histidina esteja exclusivamente dependente da actividade do Yap1. Estirpes que possuam o alelo *Y.HIS3* são distinguíveis das originais e das estirpes com o alelo *HIS3* (que serão mencionadas de seguida) não só pelo tamanho do produto amplificado por *PCR* a partir do locus *HIS3* (Figura 3.4) como pelo facto de só crescerem em meio sem histidina e na presença de H₂O₂ (agente oxidante que induz a actividade do Yap1). Para o Gcn4, por sua vez, a recombinação entre o gene repórter e o alelo *his3Δ1* permitiu a reconstrução do alelo selvagem cujo promotor possui um local de reconhecimento para o Gcn4. Desta forma, e nestas estirpes, a biossíntese de histidina vai estar dependente da actividade do Gcn4, distinguindo-se das acima mencionadas não só pelo tamanho do produto amplificado por *PCR* (Figura 3.4) como pelo facto de crescerem exclusivamente em meio sem histidina (ausência de aminoácidos induz a actividade do Gcn4).

Para obtenção dos candidatos listados na Tabela 3.2 foram testados, para cada mutante *gim*, cerca de 50 transformantes resultantes de uma transformação. Não foi possível obter transformantes com os alelos pretendidos para todos os mutantes *gim*, mas as construções obtidas com sucesso foram utilizadas na avaliação da actividade de ambos os factores de transcrição.

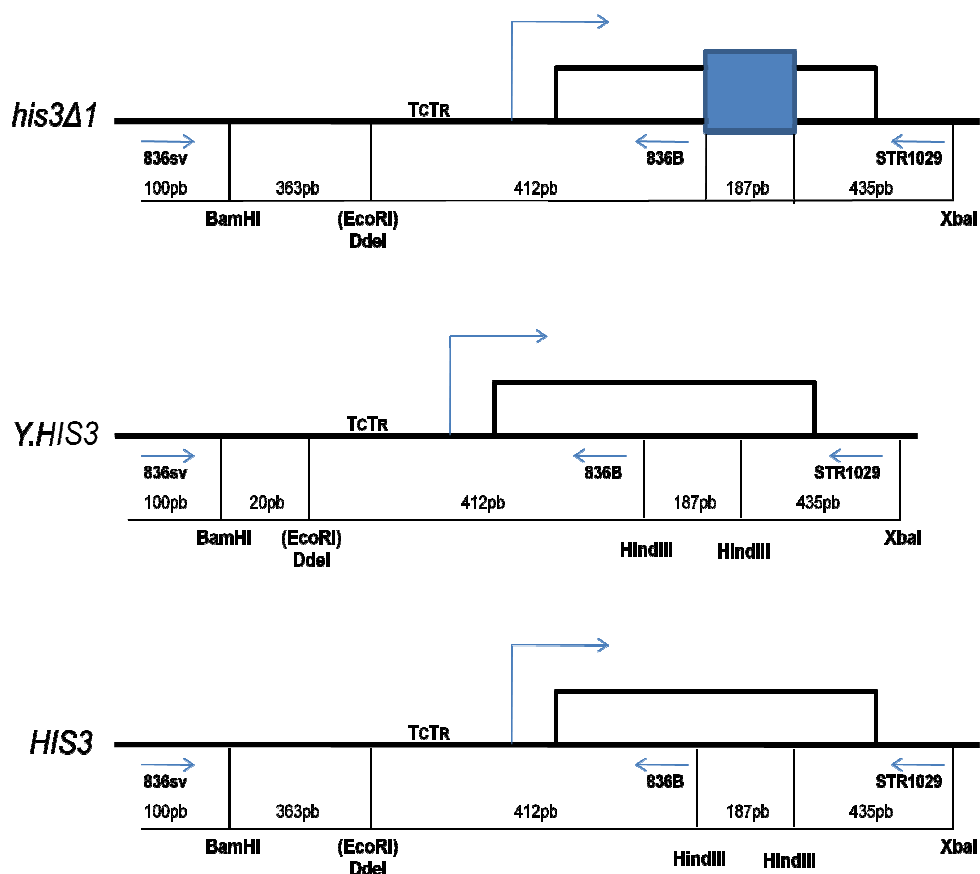


Figura 3.4 – Representação dos alelos *his3Δ1*, *Y.HIS3* e *HIS3*, locais de emparelhamento dos oligonucleotídeos e de reconhecimento de algumas enzimas de restrição. O primeiro alelo, presente nas estirpes originais, possui uma deleção parcial da ORF do gene *HIS3* (caixa cinzenta). As caixas abertas representam a ORF do gene *HIS3*. T_C representa o elemento TATA constitutivo e T_R o elemento TATA regulatório.

Tabela 3.2. – Estirpes Δgim construídas por recombinação com o plasmídeo pY.HIS3

Estirpes	Genótipo	Nº candidatos independentes obtidos
<i>yMC7</i>	BY4741; MAT a; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>HIS3</i>	1
<i>yMC1</i>	BY4741; MAT a; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim1$; <i>HIS3</i>	1
<i>yMC2</i>	BY4741; MAT a; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim2$; <i>HIS3</i>	3
<i>yMC3</i>	BY4741; MAT a; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim3$; <i>HIS3</i>	2
<i>yMC4</i>	BY4741; MAT a; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim4$; <i>HIS3</i>	2
<i>yMC5</i>	BY4741; MAT a; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim5$; <i>HIS3</i>	1
<i>yMC6</i>	BY4741; MAT a; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim6$; <i>HIS3</i>	4
<i>yMC17</i>	BY4741; MAT a; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>Y.HIS3</i> + <i>his3Δ1</i>	3
<i>yMC8</i>	BY4741; MAT a; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim5$; <i>Y.HIS3</i> + <i>his3Δ1</i>	1
<i>yMC9</i>	BY4741; MAT a; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; $\Delta gim6$; <i>Y.HIS3</i> + <i>his3Δ1</i>	5

3.2.2. Avaliação da actividade do Yap1 no gene alvo *Y.HIS3*

Para estudar o efeito da ausência das várias proteínas Gim na actividade do Yap1, a indução desta actividade foi feita através da utilização do H₂O₂ como agente gerador de stress oxidativo. Tendo em conta que o H₂O₂ induz tanto a localização nuclear como a activação da transcrição por Yap1^[86], a determinação das sensibilidades em meio SC sem histidina com H₂O₂ vai traduzir a actividade do Yap1 sobre o gene alvo *Y.HIS3*.

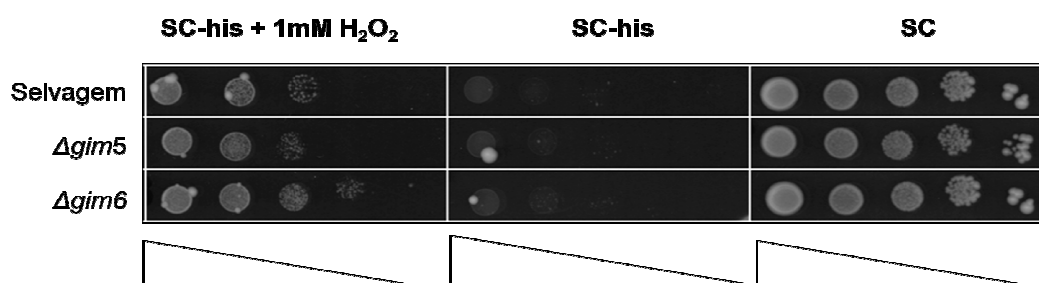


Figura 3.5 - Efeitos da ausência de cada uma das proteínas Gim (*Δgim*) na actividade do Yap1 na presença de 1mM de H₂O₂, agente indutor de stress oxidativo. O meio utilizado foi SC sem histidina. Em cada painel o primeiro spot (a partir da esquerda) corresponde a cerca de 9x10⁵ células, seguindo-se diluições seriadas. Selvagem designa a estirpe selvagem isogénica, i. e., sem deleção dos genes *GIM*. Foram testados todos os candidatos independentes obtidos para os mutantes *Δgim5* e *Δgim6* e estirpe selvagem isogénica (*yMC8*, *yMC9* e *yMC17*, respectivamente) listados na Tabela 3.2.

Tabela 3.3 - Resumo do crescimento dos mutantes *gim* observados no plaqueamento em *spot*. (+) corresponde ao crescimento num *spot*; (-) corresponde à ausência de crescimento. Selvagem designa a estirpe selvagem isogénica.

Estirpes	SC-his+H ₂ O ₂ 1mM	SC-his	SC
<i>Selvagem</i>	++	-	+++++
<i>Δgim5</i>	++	-	+++++
<i>Δgim6</i>	+++	-	+++++

Como se pode visualizar na Figura 3.5 e na Tabela 3.3, o mutante *Δgim5* tem um comportamento muito semelhante ao observado para a estirpe selvagem, sendo ambos mais sensíveis ao H₂O₂ do que o mutante *Δgim6*. Este último apresenta maior resistência ao agente oxidante o que significa que a actividade do Yap1 neste mutante é superior. A actividade do Yap1 não parece ser afectada pela ausência de Gim5.

Em meio SC sem histidina verifica-se uma ausência de crescimento em todas as estirpes. Este resultado era esperado dado que, sem adição de H₂O₂, não ocorre indução da actividade do Yap1, e conseqüentemente, este factor de transcrição não activa a transcrição do gene repórter *Y.HIS3*.

3.2.3. Avaliação da actividade do Gcn4 no gene alvo *HIS3*

O estudo do efeito da ausência das várias proteínas Gim na actividade do Gcn4 foi realizado nos transformantes contendo o alelo *HIS3* selvagem, cujo promotor tem um local de reconhecimento para o Gcn4. Como já foi referido anteriormente, a activação da transcrição por Gcn4 ocorre em condições de ausência de aminoácidos (stress nutricional). Por este motivo, neste ensaio, utilizou-se o 3-aminotriazol (AT) como agente gerador de stress. Este composto é um inibidor competitivo do produto do gene *HIS3*, uma enzima que cataliza o sexto passo na biossíntese da histidina. A concentrações acima de 10mM, o 3-aminotriazol provoca stress nutricional, mais concretamente, falta de histidina, razão pela qual ocorre uma indução da actividade do Gcn4^[87].

A determinação das sensibilidades em meio SC sem histidina com 3-aminotriazol vai traduzir a actividade do Gcn4 sobre o gene alvo *HIS3* (Figura 3.6 e Tabela 3.4).

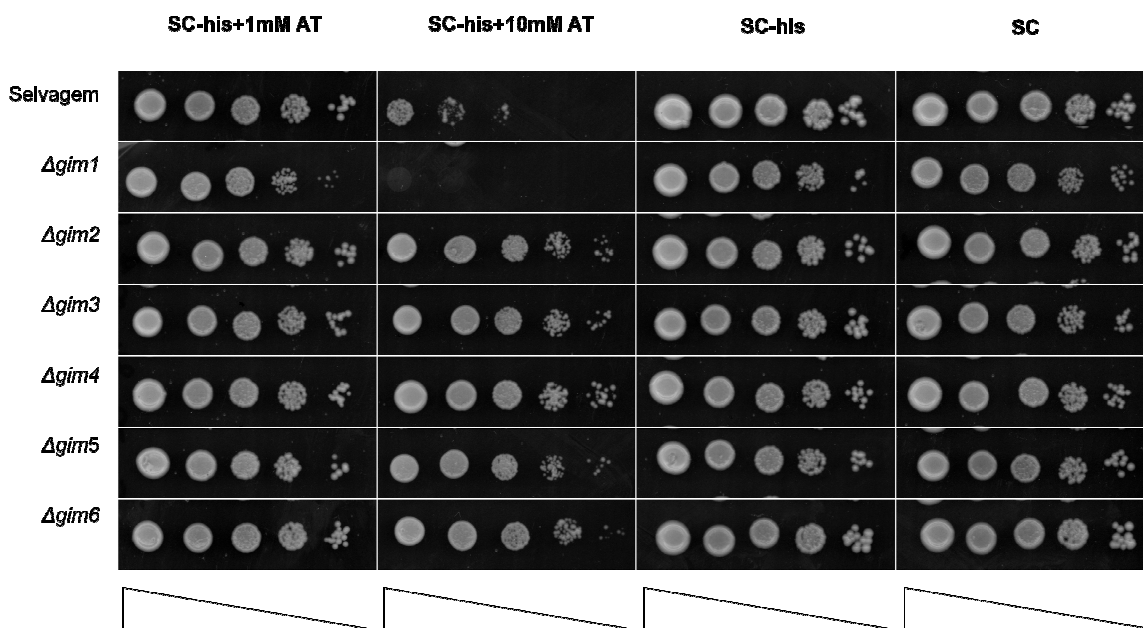


Figura 3.6 - Efeitos da ausência de cada uma das proteínas Gim (Δgim) na actividade do Gcn4 na presença de 3-aminotriazol. O meio utilizado foi SC sem histidina. Em cada painel o primeiro spot (a partir da esquerda) corresponde a cerca de 9×10^5 células, seguindo-se diluições seriadas. Selvagem designa a estirpe selvagem isogénica, i. e., sem deleção dos genes *GIM*. Foram testados todos os candidatos independentes obtidos para todos os mutantes *gim* e estirpe selvagem isogénica (*yMC1-7*) listados na Tabela 3.2.

Tabela 3.4 - Resumo do crescimento dos mutantes *gim* observados no plaqueamento em *spots*. (+) corresponde ao crescimento num *spot*; (-) corresponde à ausência de crescimento. Selvagem designa a estirpe selvagem.

Estirpes	SC-his+AT		SC-his	SC
	1mM	10mM		
Selvagem	+++++	+++	+++++	+++++
<i>Δgim1</i>	++++	-	+++++	+++++
<i>Δgim2</i>	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>Δgim3</i>	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>Δgim4</i>	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>Δgim5</i>	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>Δgim6</i>	+++++	+++++	+++++	+++++

Como se pode visualizar na Figura 3.6 e na Tabela 3.4, o mutante *Δgim1* apresenta uma sensibilidade acentuada à concentração de 10mM de 3-aminotriazol, o que não se verifica para a estirpe selvagem nem para os restantes mutantes *gim* que, por sua vez, são resistentes ao 3-aminotriazol. A resistência pode ser traduzida por um aumento da actividade do Gcn4 que não ocorre no mutante *Δgim1*. Juntamente com os resultados obtidos para a avaliação do potencial de activação de LexA-Gcn4, é possível sugerir que, para o mutante *Δgim2*, o fenómeno de resistência ao 3-aminotriazol poderá ser devido a um aumento na activação da transcrição por Gcn4, mas não para os mutantes *Δgim3*, *Δgim4* e *Δgim5* cujo fenómeno de resistência não se deverá a um aumento da activação da transcrição por Gcn4 mas sim a um aumento da ligação do Gcn4 ao DNA ou da quantidade de activador presente nestas células.

Em meio SC sem histidina verifica-se um crescimento idêntico ao observado em meio SC para todas as estirpes. Este resultado era esperado dado que, mesmo sem adição de 3-aminotriazol, a ausência de histidina no meio serve de estímulo para a actividade do Gcn4.

4. DISCUSSÃO

Trabalhos prévios^[1] sugerem que a subunidade Gim2 possa assumir algum papel na regulação da transcrição, mais concretamente, como parte integrante da maquinaria transcricional. A subunidade Gim5 poderá intervir na iniciação da transcrição devido à observação da necessidade acrescida de TFIS, interveniente na iniciação da transcrição, na ausência de Gim5^[15]. Esperar-se-ia, por estes motivos, que a ausência destas subunidades afectasse, simultaneamente, a actividade do Yap1 e do Gcn4, na activação da transcrição e/ou na capacidade de ligação ao DNA de ambos os activadores. Com efeito, o mutante *Δgim2* apresenta um aumento na activação da transcrição tanto por Yap1 como por Gcn4, comparativamente à estirpe selvagem. Este facto pode significar que a subunidade Gim2 possui um papel regulatório na transcrição, tendo um efeito negativo na activação da mesma. Contudo, a subunidade Gim5 não parece ter qualquer efeito na actividade do Yap1 o que não se observa para o Gcn4, como sugerem os resultados obtidos neste trabalho para o mutante *Δgim5*.

Os resultados obtidos da avaliação do potencial de activação do Yap1 para os dois fundos genéticos *Δyap1* e *YAP1*, revelaram alguma coerência se for considerada a hipótese da interferência do Yap1 endógeno na actividade da proteína quimérica LexA-Yap1. A observação da semelhança de resultados entre estirpe selvagem e mutantes *Δgim3* e *Δgim4* num fundo genético *Δyap1* e de um aumento idêntico na activação por LexA-Yap1 em ambos os mutantes e comparativamente à estirpe selvagem num fundo genético *YAP1*, pode significar que Gim3 e Gim4 não afectam a activação da transcrição por Yap1 mas sim a sua abundância na célula que desta forma se encontra em menor quantidade nestes mutantes. Tendo em conta que o Yap1 dimeriza, monómeros de Yap1 endógeno podem interagir com moléculas quiméricas LexA-Yap1, formando heterodímeros. Como descrito por Brent e Ptashne (1985)^[88], monómeros de LexA formam ligações instáveis com o DNA, podendo impedir a activação da transcrição nestes casos. Assim, a maior abundância de Yap1 endógeno na estirpe selvagem do que nos mutantes *Δgim3* e *Δgim4* conduz a uma menor interferência na actividade de LexA-Yap1 nestes mutantes o que justifica o aumento da activação da transcrição observado num fundo genético *YAP1*. Os resultados obtidos para o mutante *Δgim2*, no qual a activação por LexA-Yap1 é sempre muito superior à observada para a estirpe selvagem, independentemente do fundo genético, não podem ser explicados, por este motivo, apenas por uma variação na quantidade de Yap1 endógeno.

Dados anteriores^[16] revelam que o mutante *Δgim6* é mais sensível ao H₂O₂ do que a estirpe selvagem e o mutante *Δgim5*, que apresentam um padrão fenotípico muito semelhante entre eles. Tendo em conta que a actividade do Yap1 é induzida em presença de H₂O₂ e que são

conhecidos os fenótipos de sensibilidade a este agente nestes mutantes, pode ser feito um paralelo directo entre o crescimento que se observa na Figura 3.5 em meio sem histidina com adição de H₂O₂ e a actividade do Yap1 sobre o gene alvo *Y.HIS3*. O mutante $\Delta gim6$ apresenta maior resistência ao agente oxidante o que significa que a actividade do Yap1 neste mutante é superior. Esta maior resistência, comparativamente ao que se observa para a estirpe selvagem e ao mutante $\Delta gim5$, do mutante $\Delta gim6$ ao H₂O₂ não entra em contradição com os resultados de sensibilidade previamente observados uma vez que o que se observa não é uma diminuição da sensibilidade ao H₂O₂ mas sim um aumento da actividade do Yap1 sobre o gene alvo *Y.HIS3* em meio sem histidina utilizando o H₂O₂ como agente indutor desta actividade.

No caso específico do mutante $\Delta gim1$, não foi possível determinar de que forma é que a actividade do Yap1 é afectada na ausência de Gim1.

Estudos preliminares no laboratório (dados não publicados) indicam que a abundância de Yap1 em cada mutante *gim* varia, tendo-se verificado uma diminuição da quantidade de Yap1 nos mutantes $\Delta gim3$, $\Delta gim4$ e $\Delta gim6$, e uma quantidade de Yap1 idêntica à da estirpe selvagem nos mutantes $\Delta gim1$, $\Delta gim5$ e $\Delta gim2$, apesar do último apresentar um resultado mais evidente. Estes resultados preliminares apoiam o que foi sugerido para cada mutante.

Relativamente aos resultados obtidos para o Gcn4, e comparativamente à estirpe selvagem, verificou-se que existe um aumento na activação por LexA-Gcn4 na ausência de Gim2 e um decréscimo idêntico para os mutantes $\Delta gim4$, $\Delta gim5$ e, simultaneamente para o que se considerou ser representativo para o mutante $\Delta gim3$. A coerência dos resultados observados para os mutantes $\Delta gim3$, $\Delta gim4$ e $\Delta gim5$ mantém-se, dado que todos apresentam o mesmo fenótipo em presença de 3-aminotriazol (Figura 3.6). Assim, é possível concluir que a ausência das subunidades Gim3, Gim4 ou Gim5 afecta de igual forma a actividade do Gcn4. O decréscimo dos valores de activação por LexA-Gcn4 observado nos três mutantes pode ser explicado, de forma semelhante ao previamente sugerido para o Yap1, i.e., através da formação de heterodímeros de LexA-Gcn4 e Gcn4 endógeno que interferem com a actividade da proteína quimérica LexA-Gcn4. No entanto, esta hipótese não está de acordo com o previamente sugerido sobre a não interferência do Gcn4 endógeno devido à localização distante do motivo bZIP (responsável pela dimerização) do domínio LexA neste activador^[85].

O ensaio da actividade regulatória do Gcn4 demonstrou que, à excepção do mutante $\Delta gim1$, todos os mutantes *gim* exibem um fenótipo de resistência ao 3-aminotriazol superior ao observado para a estirpe selvagem, o que significa que o Gcn4 está funcional nas estirpes Δgim

e que pode sofrer uma indução da sua actividade muito superior ou que existe em maior quantidade nestes mutantes, comparativamente à estirpe selvagem.

O mutante $\Delta gim1$, por sua vez, apresenta um fenótipo de sensibilidade extrema a concentrações elevadas de 3-aminotriazol que não é verificado nem para a estirpe selvagem nem para os restantes mutantes *gim*. Este fenótipo pode ser explicado por um efeito positivo que a subunidade Gim1 possa assumir na actividade do Gcn4. Este efeito pode ser devido a interacções directas entre Gim1 e Gcn4 ou indirectas entre Gim1 e, por exemplo, a proteína Bud27, ou Uri. A Uri está descrita como sendo parte da maquinaria transcricional, necessária na iniciação da tradução em levedura, tendo ainda uma função repressora da tradução de *GCN4* e foi identificada juntamente com a subunidade Gim1, num *screening* genético de factores que intervêm no estabelecimento do padrão bipolar de gemulação em levedura^[13,14,89]. A subunidade Gim1, interagindo com a proteína Uri, pode interferir com a sua actividade ao nível da activação da transcrição, da capacidade de ligação do Gcn4 ao DNA ou pode ser necessária na regulação da quantidade de Gcn4 na célula funcionando como regulador da repressão da tradução de *GCN4* pela Uri. No entanto, Gim1 não parece ser essencial uma vez que em meio sem histidina e a concentrações mais baixas de 3-aminotriazol existe crescimento, indicando que o gene *HIS3* está a ser transcrito, logo que a actividade do Gcn4 não está totalmente comprometida em mutantes $\Delta gim1$.

Outra explicação possível para o resultado obtido para o mutante $\Delta gim1$ é dada por Coleman *et al.*, (1997)^[90] que demonstraram que o Yap1 e o Gcn4 são necessários para a expressão do gene *ATR1* e que se ligam ao mesmo local no promotor deste gene. O *ATR1* codifica para um transportador membranar que se torna essencial na resistência ao 3-aminotriazol uma vez que mutações neste gene ou mesmo a sua deleção provocam uma hipersensibilidade a este agente de stress^[87]. Se a subunidade Gim1 for necessária para a activação da transcrição pelo Gcn4, e se a ausência das restantes proteínas Gim, por sua vez, provocar uma indução da actividade do Gcn4, este dado pode justificar o fenótipo de resistência ao 3-aminotriazol que é observado para os restantes mutantes, não entrando em contradição com a hipótese de que pode existir uma maior abundância de Gcn4 em todos os mutantes *gim*, à excepção do mutante $\Delta gim1$.

A maior quantidade de Gcn4 nos mutantes $\Delta gim3$, $\Delta gim4$ e $\Delta gim5$ do que na estirpe selvagem que é sugerida neste trabalho poderá justificar o fenómeno de resistência observado e apoia a ideia de que a abundância deste activador nestes mutantes será idêntica. Dado que o mutante $\Delta gim6$ exhibe o mesmo fenótipo de resistência ao 3-aminotriazol do que os três mutantes supra-mencionados, seria interessante saber se a quantificação da actividade de LexA-Gcn4 seria idêntica à observada para os mutantes $\Delta gim3$, $\Delta gim4$ e $\Delta gim5$. A semelhança dos resultados

observados na ausência das subunidades Gim3, Gim4, Gim5 e possivelmente, Gim6, associados à sugestão da variação da quantidade de Gcn4 nestes mutantes comparativamente à estirpe selvagem, sugerem um papel repressor para o complexo GimC na actividade do Gcn4 ou na indução da tradução do *GCN4*. Os resultados obtidos para o mutante $\Delta gim2$ só não excluíam esta hipótese se a subunidade Gim2 assumisse um papel adicional na activação da transcrição. Os resultados obtidos na quantificação da actividade de LexA-Gcn4 sugerem que a subunidade Gim2 interfere de forma repressora na activação da transcrição por Gcn4 ou que este se encontre em menor quantidade no mutante $\Delta gim2$, sendo a sua actividade maior.

Por outro lado, e tendo em conta que o fenótipo de resistência ao 3-aminotriazol é observado para todos os mutantes, à excepção do mutante $\Delta gim1$, o complexo GimC poderá ter algum papel na entrada/saída do 3-aminotriazol na célula.

Uma quantificação do Gcn4 em cada mutante deverá ser uma prioridade em trabalhos futuros, bem como a quantificação da actividade de LexA-Gcn4 em estirpes $\Delta gcn4$ com o intuito de compreender se a activação da transcrição por Gcn4 é realmente afectada em cada mutante, ou se o que se observa é resultado de variações na abundância de Gcn4 em cada mutante *gim*.

A sugestão da existência de interacções entre Gims e activadores da transcrição é merecedora de um estudo mais profundo devido ao impacto que esta descoberta pode ter ao nível da compreensão da regulação das respostas celulares que conferem resistências a drogas num contexto em que o citosqueleto está comprometido, como é o caso envolvendo o uso de anti-mitóticos nas terapias cancerígenas ou de anti-fúngicos como o benomil na agricultura. Um exemplo disto é a regulação do gene *FLR1* por Yap1. O produto deste gene é um transportador membranar que confere resistência a vários anti-fúngicos como o mancozeb^[91], o fluconazol^[62], o benomil^[92,93] e outros compostos tóxicos^[94,95]. Kanazawa *et al.*, (1988)^[87] sugerem que o transportador membranar Atr1 assumia um papel importante na excreção de compostos tóxicos que possam entrar em contacto com a célula.

Por outro lado, foram observados fenótipos de letalidade em ratinhos associados a knock-outs da tioredoxina I^[96] e da γ -glutamyl sintetase^[97]. Os homólogos destas proteínas em levedura são produtos dos genes *TRX2*^[60] e *GSH1*^[63] cuja transcrição é regulada pelo Yap1. Assim, e utilizando o sistema tiol redox em levedura como modelo de estudo, é possível tentar compreender do sistema tiol redox em eucariotas superiores, mais concretamente, a sua importância e funcionamento nestes organismos^[98].

Em suma, o conjunto dos resultados obtidos neste trabalho sugere que a activação da transcrição apresenta diferenças entre mutantes *gim* e estirpe selvagem. A subunidade Gim2

parece exercer um efeito negativo na activação da transcrição por Yap1 e Gcn4, ao contrário da subunidade Gim1 que parece desempenhar um papel de indução da actividade do Gcn4. Adicionalmente, todos os mutantes *gim*, à excepção do mutante $\Delta gim1$, exibem fenótipos de resistência ao 3-aminotriazol que não se verificam para a estirpe selvagem.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Geissler, S., Siergers, K., Schiebel, E. (1998) *EMBO Journal* **17**(4):952-966
2. Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L., Cowan, N. J. (1998) *Cell* **93**:863-873
3. Leroux, M. R., Fandrich, M., Klunker, D., Siergers, K., Lupas, A. N., Brown, J. R., Schiebel, E., Dobson, C. M., Hartl., F. U. (1999) *EMBO Journal* **18**(23):6730-6743
4. Simons, C. T., Staes, A., Rommelaere, H., Ampe, C., Lewis, S. A., Cowan, N. J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**(6):4196-4203
5. Siegert, R., Leroux, M. R., Scheufler, C., Hartl., F. U., Moarefi, I., (2000) *Cell* **103**:621-632
6. Siegers, K., Waldmann, T., Leroux, M. R., Grein, K., Shevchenko, A., Schiebel, E., Hartl, F. U. (1999) *EMBO Journal* **18**(1):75-83
7. Hansen, W. J., Cowan, N. J., Welch, W. J. (1999) *Journal of Cell Biology* **145**(2):265-277
8. Martin j., Gruber, M., Lupas A. N. (2004) *TRENDS in Biochemical Sciences* **29**(9):455-458
9. Gong, Y., Kakahara, Y., Krogan, N., Greenblatt, J., Emili, A., Zhang, Z., Houry, W. A. (2009) *Molecular Systems Biology* **5**(275):1-14
10. Martín-Benito, J., Boskovic, J., Gómez-Puertas, P., Carrascosa, J. L., Simons, C. T., Lewis, S. A., Bartolini, F., Cowan, N. J., Valpuesta, J. M. (2002) *EMBO Journal* **21**(23):6377-6386
11. Martín-Benito, J., Gómez-Reino, J., Stirling, P. C., Lundin, V. F., Gómez-Puertas, P., Boskovic, J., Chacón, P., Fernández, J. J., Berenguer, J., Leroux, M. R., Valpuesta, J. M. (2007) *Structure* **15**:101-110
12. Ni, L., Snyder, M. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**:2147-2170
13. Gstaiger, M., Luke, B., Hess, D., Oakeley, E. J., Wirbelauer, C., Blondel, M., Vigneron, M., Peter, M., Krek, W. (2003) *Science* **302**:1208-1212
14. Geiser, J. R., Schott, E. J., Kingsbury, T. J., Cole, N. B., Totis, L. J., Bhattacharyya, g., He, L., Hoyt, M. A. (1997) *Mol. Biol. Cell* **8**:1035-1050
15. Malagon, F., Tong, A. H., Shafer, B. K., Strathern, J. N. (2004) *Genetics* **166**:1215-1227
16. Coelho, J., Broa, S., Faria, J., Fernandes, L. (submetido para publicação)
17. Toone, W., Jones, N. (1998) *Genes to Cells* **3**(8):485-498
18. Jona, G., Choder, M., Gileadi, O. (2000) *Biochem. Biophys. Acta.* **1491**:37-48
19. Shenton, D., Smirnova, J. B., Selley, J. N., Carroll, K., Hubbard, S. J., Pavitt, G. D., Ashe, M. P., Grant, C. M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**(39):29011-29021
20. Gourlay, C. W., Ayscough, K. R. (2005) *FEMS Yeast Res.* **5**:1193-1198

21. Zhu, D., Tan, K. S., Zhang, X., Sun, A. Y., Sun, G. Y., Lee, J. C. (2005) *J. Cell. Sci.* **118**:3695-3703
22. Dalle-done, I., Rossi, R., Milzani, A., Simplicio, P. D., Colombo, R. (2001) *Free Radic. Bio. Med.* **31**(12):1624-1632
23. Haarer, B. K., Amberg, D. C. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**:4522-4531
24. Santa-Maria, I., Smith, M. A., Perry, G., Hernandez, F., Avila, J. Moreno, F. J. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1740**:472-480
25. Zhao, K., Wang, W., Rando, O., Xue, Y., Swiderek, K., Kuo, A., Crabtree, G. (1998) *Cell* **95**(5):625-636
26. Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., Wu, C. (2000) *Nature* **406**:541-544
27. Takizawa, P. A., Sil, A., Swedlow, J. R., Herskowitz, I., Vale, R. D. (1997) *Nature* **389**:90-93
28. Cox, K. H., Tate, J. J., Cooper, T. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**(18):19294-19301
29. Gounalaky, N., Thireos, G. (1994) *EMBO Journal* **13**(17):4036-4041
30. Gross, D. S., English, K. E., Collins, K. W., Lee, S. (1990) *J. Mol. Biol.* **216**:611-631
31. Mager, W. H., Moradas Ferreira, P. (1993) *Biochem. J.* **290**:1-13
32. Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., Singer, R. A. (1993) *Microbiol. Rev.* **57**:383-401
33. Wu, W., Li, W., Chen, B. (2008) *Gene Regulation And Systems Biology* **2**:53-62
34. Moye-Rowley, W. S., Harshman, K. D., Parker, S. C. (1989) *Genes Dev.* **3**:283-292
35. Struhl, K. (1987) *Cell* **50**:841-848
36. Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., III, Curran, T., (1990) *Science* **249**:1157-1161
37. Angel, P., Karin, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1072**:129-157
38. Ellenberg, T. E., Brandl, C. J., Struhl, K., Harrison, S. C. (1992) *Cell* **71**:1223-1237
39. Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L. (1988) *Science* **240**:1759-1764
40. O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S., Alber, T. (1991) *Science* **254**:539-544
41. Hope, I. A., and Struhl, K. (1985) *Cell* **43**:177-188
42. Hope, I. A., and Struhl, K. (1987) *The EMBO Journal* **6**(9):2781-2784
43. Hill, D. E., Hope, I. A., Macke, J. P., Struhl, K. (1986) *Science* **234**:451-457
44. Sellers, J. W., Vincent, A. C., Struhl, K. (1990) *Mol. Cell Biol.* **10**:5077-5086
45. Schmidheini, T., Mosch, H. U., Graf, R., Braus, G. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **224**:57-64
46. Hope, I. A. and Struhl, K. (1986) *Cell* **46**:885-894
47. Khandelwal, P., Panchal, S. C., Radha, P. K., Hosur, R. V. (2001) *Nucleic Acids Research* **29**(2):499-505

48. Hinnebusch, A. G. (1992) In Jones, E. W., Pringle, J. R., Broach, J. R. (eds), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, pp. 319-414
49. Mirande, M., Waller, J.-P. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**:18443-18451
50. Mosch, H. U., Scheier, B., Lahti, R., Mantsala, P., Braus, G. H. (1991) *J. Biol. Chem.* **273**:32870-32877
51. Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K., Karin, M. (1994) *Cell* **77**:381-390
52. Mascarenhas, C., Edwards-Ingram, L. C., Zeef, L., Shenton, D., Ashe, M. P., Grant, C. M. (2008) *Mol. Cell Biol.* **19**:2995-3007
53. Hinnebusch, A. G. (2005) *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:407-450
54. Hinnebusch, A. G. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6442-6446
55. Mueller, P. P., Hinnebusch, A. G. (1986) *Cell* **45**:201-207
56. Thireos, G., Driscoll-Penn, M., Greer, H. (1984) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **81**:5096-5100
57. Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K., Tjian, R. (1987) *Science* **238**:1386-1392
58. Distel, R., Ro, H. S., Rosen, B. S., Groves, D., Spiegelman, B. M. (1987) *Cell* **49**:835-844
59. Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C., Struhl, K. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**:6982-6993
60. Kuge, S., Jones, N. (1994) *EMBO Journal* **13**:655-664
61. Wemmie, J. A., Szczyпка, M. S., Thiele, D. J., Moye-Rowley, W. S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**(6):32592-32597
62. Alarco, A. M., Balan, I., Talibi, D., Mainville, N., Raymond, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**:19304-19313
63. Wu, A. L., Moye-Rowley, W. S. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14**:5832-5839
64. Grant, C. M., Collinson, L. P., Roe, J. H., Dawes, I. W. (1996) *Mol. Microbiol.* **21**:171-179
65. Leppert, G., McDevitt, R., Falco, S. C., Van Dyk, T. K., Ficke, M. B., Golin, J. (1990) *Genetics* **125**:13-20
66. Wu, A., Wemmie, J. A., Edginton, N. P., Goelb, M., Guevaras, J. L., Moye-Rowley, W. S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**:18850-18858
67. Lesuisse, E., Labbe, P. (1995) *Microbiology* **141**:2937-2943
68. Schnell, N., Entian, K. D. (1991) *Eur. J. Biochem.* **200**:487-493
69. Wiatrowski, H. A., Carlson, M. (2003) *Eukaryotic Cell* **2**(1):19-26
70. Kuge, S., Toda, T., Iizuka, N., Nomoto, A. (1998) *Genes Cells* **3**:521-532
71. Yan, C. L., Lee, H., Davis, L. I. (1998) *EMBO Journal* **17**:7416-7429
72. Delaunay, A., Isnard, A., Toledano, M. B. (2000) *EMBO Journal* **19**(19):5157-5166

73. Coleman, S. T., Epping, E. A., Steggerda, S. M., Moye-Rowley, W. S. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**:8302-8313
74. Toda, T., Shimanuki, M., Yanagida, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4328-4332
75. Billard, P., Dumond, H., Bolotin-Fukuhara, M. (1997) *Mol. Gen. Genet.* **257**:62-70
76. Harshman, K. D., Moye-Rowley, W. S., Parker, S. C. (1988) *Cell* **53**:321-330
77. Faria, J. P., Fernandes, L. (2006) *Free Rad. Biol. Med.* **41**:1684-1693
78. Birnboim, H.C., & Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523
79. Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H. (1989) *Biochemistry* **86**: 2172-2175
80. Winston, F., Dollard, C., Ricupero-Hovasse, S. L. (1995) *Yeast* **11**:53-55
81. Kamens, J., Richardson, P., Mosialos, G., Brent, R., Gilmore, T. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**(6):2840-2847
82. Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., Fink, G. R. (1987) *Methods Enzymol.* **154**:164–175
83. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J. D. (1998) *Yeast* **14**:115-132
84. Niederberger, P., Aebi, M., Furter, R., Prantl, F., and Hiitter, R. (1984) *Mol. Gen. Genet.* **195**:481-486
85. Fernandes, Lisete Celestina Perpétua, (1998) Studies on the Yap Family of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
86. Gulshan, K., Sherry, A. R., Coleman, S. T., Moye-Rowley, W. S. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**(49):40524-40533
87. Kanazawa, S., Driscoll, M., Struhl, K. (1988) *Mol. Cel. Biol.* **8**(2):664-673
88. Brent, R., Ptashne, M. (1985) *Cell* **43**:729-736
89. Deplazes, A., Mockli, N., Luke, B., Auerbach, D., Peter, M. (2009) *The EMBO Journal* **28**:1429-1441
90. Coleman, S. T., Tseng, E., Moye-Rowley, W. S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**:23224-23230
91. Cacho Teixeira, M., Dias, P. J., Simões, T., Sá-Correia, I. (2007) *Biochem. and Biophys. Research Communications* **367**:249-255
92. Brôco, N., Tenreiro, S., Viegas, C. A., Sá-correia, I. (1999) *Yeast* **15**:1595-1608
93. Tenreiro, S., Fernandes, A. R., Sá-Correia, I. (2001) *Bioch. and Bioph. Research. Communications* **280**:216-222
94. Oskouian, B., Saba, J. D. (1999) *Mol. Gen. Genet.* **261**:346-353

95. Jungwirth, H., Wendler, F., Plantzer, B., Bergler, H., Hogenauer, G. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**:4809-4816
96. Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., Taketo, M. M. (1996) *Dev. Biol.* **178**:179-185
97. Dalton, T. P., Dieter, M. Z., Yang, Y., Shertzer, H. G., Nebert, D. W. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**:324-329
98. Toledano, M. B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D., Tacnet, F. (2007) *FEBS Letters* **581**:3598-3607

ANEXO – Composição de meios de cultura

Meio SC

Para 1L de meio SC (Sintético Completo) líquido: 50mL de Glucose 40%, 100mL de YNB 10x, 40mL de SC mix 25x, 10mL de Adenina 100x, 10mL de L- α -Tryptofano 100x, 10mL de L- α -Leucina 100x, 10mL de Uracilo 100x, 10mL de L- α -Serina 100x, 10mL de L- α -Histidina 100x, 10mL de L- α -Treonina 100x e 740mL de água estéril.

Para 1L de meio sólido: Preparar 20g de Bacto Agar (BD[®]) e autoclavar a 121°C, 20 minutos. Adicionar os restantes reagentes aquando da utilização, nas mesmas quantidades descritas para o meio líquido.

Quando se pretende preparar meio selectivo, isto é, com deficiência em alguma base ou aminoácido, o volume correspondente ao aminoácido que é retirado é substituído por água estéril.

Meio YPD

Para 1L de meio YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose) sólido: 20g de Peptona (BD[®]), 10g de Extracto de levedura (BD[®]), 20g de Bacto Agar (BD[®]) e 950mL de água. Autoclavar a 121°C, 20 minutos. Adicionar 50mL de Glucose 40%, previamente esterilizada, aquando da utilização.

Para 1L de meio líquido: (receita supramencionada sem adição de Bacto Agar).

Meio 2xTY

Para 1L de meio 2xTY (Tryptone, Yeast extract) líquido: 16g Triptona (BD[®]), 10g Extracto de levedura (BD[®]), 5g NaCl (BD[®]) e perfazer o volume final com água. Autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

Meio FOA

Para 1L de meio FOA (5-Fluorogrotic Acid) sólido: adicionar a 500mL de água 6g de CAA e 15g de Agar e autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Quando esta mistura se encontrar a uma temperatura não superior a 50°C, adicionar 8mL de Uracilo 100x (BD[®]), 1g de FOA, 50mL Glucose 40%, 100mL de YNB 10x, 10mL de Uracilo 100x, 10mL de Adenina 100x, 10mL de L- α -Tryptofano 100x e perfazer o volume de 500mL com água estéril.

Meio CAA

Para 1L de meio CAA (*Casaminoacids*) sólido: 50mL de Glucose 40%, 100mL de YNB 10x, 100mL de CAA 10x, 10mL de Adenina 100x, 10mL de L- α -Tryptofano 100x, 10mL de Uracilo 100x e 20g de Bacto Agar (BD[®]) e 720mL de água previamente esterilizados a 121°C, 20 minutos.

Quando se pretende preparar meio selectivo, isto é, com deficiência em alguma base ou aminoácido, o volume correspondente ao aminoácido que é retirado é substituído por água estéril.

Soluções stock

Glucose 40% (Merck[®]);

YNB (*Yeast Nitrogen Base without amino acids*) 10x (68,5%) (BD[®]);

Adenina 100x (Sigma[®]);

L- α -Tryptofano 100x (Sigma[®]);

L- α -Leucina 100x (Sigma[®]);

Uracilo 100x (Sigma[®]);

L- α -Serina 100x (Sigma[®]);

L- α -Histidina 100x (Sigma[®]);

L- α -Treonina 100x (Sigma[®]);

SC (*Synthetic Complete*) mix 25x: L- α -Arginina 0,050% (Sigma[®]); L- α -Metionina 0,050% (Sigma[®]); L- α -Tirosina 0,075% (Sigma[®]); L- α -Isoleucina 0,075% (Sigma[®]); L- α -Lisina 0,075% (Sigma[®]); L- α -Fenilalanina 0,125% (Sigma[®]); L- α -Valina 0,375% (Sigma[®]); L- α -Ácido Aspártico 0,250% (Sigma[®]); L- α -Ácido Glutâmico 0,250% (Sigma[®]);

CAA (*Casamino acids*) 10x (60%) (BD[®]).

Autoclavar as soluções de aminoácidos e bases a 110°C, 20 minutos; Glucose 40%, YNB 10x e SC mix 25x a 121°C, 20 minutos. A esterilização não é sempre feita por autoclavagem a 121°C pois alguns componentes das soluções preparadas precipitam ou oxidam mais rapidamente quando sujeitos a essa temperatura. Como alternativa, nestes casos, a autoclavagem é feita a 110°C.