

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**



**PAPEL DA MEMBRANA PLASMÁTICA NA  
ADAPTAÇÃO DE *SACCHAROMYCES*  
*CEREVISIE* AO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

**Tese orientada pelas Prof. Doutoradas Luísa Cyrne e Susana Marinho**

**Nuno Miguel Vieira Pedroso**

DOUTORAMENTO EM BIOQUÍMICA

REGULAÇÃO BIOQUÍMICA

2008



# Índice

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURA</b>	<b>XIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 A levedura como modelo biológico</b>	<b>1</b>
1.1.1 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<b>1.2 Formação <i>in vivo</i> de espécies reactivas de oxigénio e stress oxidativo</b>	<b>3</b>
1.2.1 Papel do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em sistemas biológicos	6
<b>1.3 Os mecanismos de defesa antioxidante em <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>8</b>
1.3.1 Mecanismos de defesa antioxidante não enzimáticos em <i>S. cerevisiae</i>	8
1.3.1.1 Pequenas moléculas antioxidantes e proteínas quelantes	9
1.3.2 Mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante em <i>S. cerevisiae</i>	10
1.3.2.1 A resposta adaptativa da levedura <i>S. cerevisiae</i> ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15
1.3.2.2 O estado estacionário de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como modelo fisiológico	22
<b>1.4 A membrana plasmática como barreira à entrada do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na célula</b>	<b>24</b>
1.4.1 Fosfolípidos	31
1.4.1.1 Glicerofosfolípidos	32
1.4.1.2 Esfingolípidos	34
1.4.2 Esteróis	34
1.4.3 Jangadas membranares	37
1.4.4 Proteínas presentes na membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i>	38
1.4.5 Selecção e transporte componentes para a membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i>	39
<b>2 OBJECTIVOS</b>	<b>41</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>43</b>

<b>3.1</b>	<b> Materiais</b>	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b> Métodos experimentais</b>	<b>44</b>
3.2.1	Condições de crescimento da estirpe.	44
3.2.2	Estados estacionários de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	45
3.2.3	Determinação da constante de permeabilidade da membrana plasmática ao longo da adaptação ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	45
3.2.4	Efeito da lovastatina na resistência da <i>S. cerevisiae</i> ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	46
3.2.5	Análise de mRNA por microarrays e por Northern blot	46
3.2.5.1	Recolha de células e isolamento do RNA total	46
3.2.5.2	Análise por <i>microarrays</i>	46
3.2.5.3	Análise por <i>Northern blot</i>	47
3.2.6	Isolamento da membrana plasmática	49
3.2.6.1	Determinação do grau de pureza das membranas plasmáticas	50
3.2.7	Extracção de lípidos	50
3.2.7.1	Análise dos ácidos gordos	51
3.2.7.2	Análise dos esteróis	51
3.2.7.3	Análise por GC-MS	52
3.2.7.4	Análise dos níveis de fósforo	53
3.2.8	Determinação de proteína	53
3.2.9	Análise proteómica da membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i>	53
3.2.9.1	Extracção das proteínas da membrana plasmática	53
3.2.9.2	Electroforese bidimensional das proteínas da membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i>	54
3.2.9.3	Coloração das proteínas por nitrato de prata	56
3.2.9.4	Hidrólise <i>in gel</i> das proteínas e análise por MALDI-TOF	57
3.2.9.5	Análise das proteínas por <i>Western blot</i>	58
3.2.10	Apresentação e tratamento de resultados	58
<b>4</b>	<b> RESULTADOS I: ANÁLISE POR MICROARRAYS DA RESPOSTA CELULAR DURANTE A ADAPTAÇÃO AO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EM S. CEREVISIAE</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b> A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> envolve alterações significativas na expressão génica</b>	<b>59</b>
4.1.1	Análise dos genes cuja expressão está alterada por Gene Ontology	62
4.1.1.1	Análise dos genes cuja expressão está alterada por ontologia estatística	72
4.1.2	Identificação dos factores de transcrição envolvidos na regulação dos genes alterados	80
<b>4.2</b>	<b> Adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo de lípidos</b>	<b>81</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS II: EFEITO DA ADAPTAÇÃO AO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA CELULAR E DA MEMBRANA PLASMÁTICA EM <i>S. CEREVISIAE</i></b>	<b>87</b>
<b>5.1</b>	<b>Análise do enriquecimento da fracção membranar</b>	<b>87</b>
<b>5.2</b>	<b>A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leva a alterações na composição lipídica da membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>88</b>
5.2.1	Análise dos fosfolípidos da membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i>	88
5.2.2	Análise do perfil de ácidos gordos da membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i>	90
<b>5.3</b>	<b>A adaptação de <i>S. cerevisiae</i> ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> altera a composição celular de esteróis mas não altera a composição de esteróis da membrana plasmática</b>	<b>93</b>
5.3.1	Adaptação ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> aumenta os níveis de esqualeno em <i>S. cerevisiae</i>	95
5.3.2	A adaptação da <i>S. cerevisiae</i> ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> leva a uma redistribuição dos domínios ricos em esteróis e a aumento dos domínios ordenados na membrana plasmática	97
<b>6</b>	<b>RESULTADOS III: ANÁLISE PROTEÓMICA DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE <i>S. CEREVISIAE</i> DURANTE A ADAPTAÇÃO AO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>101</b>
<b>6.1</b>	<b>Alterações nas proteínas da membrana plasmática devido à adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>109</b>
6.1.1	Transporte	114
6.1.2	Biossíntese/Degradação	115
6.1.3	Organização celular	117
6.1.4	Stress	117
6.1.5	Metabolismo	120
6.1.6	Parede celular	124
6.1.7	Distribuição e transporte vesicular	124
6.1.8	Sinalização celular	128
6.1.9	Processo biológico desconhecido	131
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>143</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>157</b>



## **Agradecimentos**

Quando me candidatei a um Doutorado a minha motivação principal foi bastante simples – o gosto pela investigação. Agora que me encontro na fase final deste processo penso que esta motivação não saiu gorada, pelo contrário. Ao longo destes anos saiu reforçada a minha convicção da importância da investigação fundamental. Este Doutorado, pela sua exigência, contribuiu acima de tudo para um ganho de capacidade e maturidade tornando-me capaz de desempenhar qualquer tipo de tarefa de um modo profissional.

Pelas suas características, um doutorado é um processo complexo que exige uma dedicação total e exclusiva, e durante o qual se conhecem inúmeras pessoas com as quais desenvolvemos uma relação de proximidade e gratidão, sendo essas as pessoas que se encontram de seguida enumeradas.

Primeiro que tudo as minhas orientadoras Professora Susana Marinho e Professora Luísa Cyrne que, ao longo destes anos, desempenharam realmente o papel de Professores, contribuindo não só para a minha evolução técnica como para a minha evolução pessoal tornando-me uma pessoa mais competente, mais disciplinada e mais aguerrida, e com as quais eu sei que poderei contar sempre. De seguida e praticamente com a mesma importância, o Professor Fernando Antunes, meu pseudo-orientador, não só pelas nossas contínuas discussões científicas (e não só!) como pela sua amizade.

Aos meus colegas de grupo, passados e presentes, em particular à minha “prima” Virgínia Marques e à Ana Matias por serem como são, pelo seu apoio incondicional e, porque não, pela paciência em aturar a minha desarrumação!

Gostaria de agradecer ainda ao Professor Herrero toda a ajuda disponibilizada bem como a sua hospitalidade durante a minha estadia em Lérida, bem como aos elementos do seu grupo em especial ao meu amigo Felip Vilela. Aos Professores Carlos Borges e José Manuel Nogueira pela disponibilidade e ensinamentos ao nível da espectrometria de massa, bem como à Professora Deborah Penque pela ajuda disponibilizada nos estudos de proteómica, e aos elementos do seu grupo em especial à Patrícia Alves. Os meus agradecimentos ainda à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro prestado.

*And last but not least*, à Ana Marília por todo o apoio incondicional demonstrado ao longo destes anos que permitiu levar este Doutorado a bom termo e a quem eu dedico esta tese.





**Parte dos resultados experimentais presentes nesta tese de Doutorado foram publicados nos seguintes artigos científicos:**

Folmer,V., Pedroso,N., Matias,A.C., Lopes,S.C.D.N., 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**, 1141-1147.

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**, 1458-1465.

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**, 289-298

**Parte dos resultados experimentais presentes nesta tese de Doutorado encontram-se também num artigo científico em fase de preparação:**

Pedroso, N., Gomes-Alves, P., Antunes, F., Marinho, H.S., Penque, D., Cyrne, L. *A proteomic study of Saccharomyces cerevisiae plasma membrane during the adaptive response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* (in preparation)



## **Resumo**

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a velocidade de difusão do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) através da membrana plasmática diminui durante a adaptação ao  $H_2O_2$  através de um mecanismo desconhecido. Neste trabalho experimental, observou-se que a adaptação ao  $H_2O_2$  modula rapidamente não só a expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas no metabolismo do ergosterol, lípidos e resposta ao *stress* oxidativo, como também a própria permeabilidade da membrana plasmática. A adaptação ao  $H_2O_2$  também altera a composição lipídica e proteica da membrana plasmática. As principais alterações observadas foram as seguintes: (a) uma diminuição nos níveis de ácido oleico (30%) e da razão entre ácidos gordos de cadeia longa saturados e insaturados; (b) a razão fosfatidilcolina:fosfatidiletanolamina aumentou três vezes; (c) os níveis de esteróis mantiveram-se inalterados mas ocorreu um aumento da heterogeneidade de microdomínios ricos em esteróis e de domínios ordenados; (d) os níveis de esqualeno, um precursor de esteróis, aumentaram duas vezes, correlacionando-se com uma diminuição na expressão do gene *ERG1*; (e) o C26:0 tornou-se o ácido gordo de cadeia muito longa (VLCFA) maioritário devido a uma diminuição de 80% nos níveis do ácido gordo 2-OH-C26:0 e uma diminuição de 50% nos níveis do ácido gordo C20:0 provavelmente relacionada com uma diminuição da expressão de genes envolvidos na elongação de ácidos gordos (*FAS1*, *FEN1*, *SUR4*), e na síntese de ceramidas (*LIP1*, *LAC1*); (f) um aumento nos níveis das proteínas Pil1p, Kes1p e Vsp4p que estão envolvidas na distribuição de lípidos na membrana plasmática e em particular nos seus microdomínios; (g) um aumento da regeneração de NADPH através da alteração da expressão de enzimas chave das vias dos fosfatos de pentose e glicolítica; (h) um aumento nos níveis de S-adenosilmetionina (SAM) através da alteração da expressão de enzimas chave na via biossintética da metionina; (i) um aumento dos níveis da proteína Ahp1p, funcionando provavelmente a mesma como parte de um complexo de eliminação de  $H_2O_2$  na membrana plasmática. Concluindo, a adaptação ao  $H_2O_2$  leva a uma complexa reorganização dos vários componentes da membrana plasmática e em particular dos seus microdomínios, o que pode explicar a menor permeabilidade ao  $H_2O_2$ , sendo que este composto também emerge como um importante regulador do metabolismo lipídico e da composição proteica e lipídica da membrana plasmática em *S. cerevisiae*.

### **Palavras-chave:**

Adaptação ao  $H_2O_2$ ; permeabilidade da membrana plasmática; ácidos gordos de cadeia muito longa; jangadas membranares; proteoma



## **Abstract**

In *Saccharomyces cerevisiae*, the rate of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diffusion through the plasma membrane decreases during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by a still unknown mechanism. Here, adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was observed to modulate rapidly not only the expression of genes coding for enzymes involved in ergosterol, lipid metabolism and oxidative stress response but also the plasma membrane permeability constant. Adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> also alters the lipid and protein composition of the plasma membrane. The main changes observed during adaptation were the following: (a) a decrease of oleic acid (30 %) and of the ratio between unsaturated and saturated long-chain fatty acids; (b) the phosphatidylcholine:phosphatidylethanolamine ratio increased three-fold; (c) sterol levels were unaltered but there was an increased heterogeneity of sterol-rich microdomains and increased ordered domains; (d) the levels of the sterol precursor squalene increased two-fold, in agreement with *ERG1* gene down-regulation; (e) C26:0 became the major very-long-chain fatty acid (VLCFA) due to a 80% decrease of 2-hydroxy-C26:0 levels and a 50 % decrease of C20:0 levels, probably related to the down-regulation of fatty acid elongation (*FAS1*, *FEN1*, *SUR4*), and ceramide synthase (*LIP1*, *LAC1*) genes; (f) an increase in Pil1p, Kes1p and Vsp4p levels which are involved in the distribution of lipids in the plasma membrane and in particular in the plasma membrane microdomains; (g) an increase in NADPH production through changes in the expression of key enzymes in the pentose and glycolytic pathway; (h) an increase in S-adenosylmethionine (SAM) production through changes in the expression of key enzymes in the methionine pathway; (i) an increase in the Ahp1p levels, which probably is part of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimination complex in the plasma membrane. Therefore, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adaptation leads to a complex reorganization of the plasma membrane microdomains, which may explain the lower permeability to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emerges as an important regulator of lipid metabolism and of the plasma membrane lipid and protein composition.

### **Keywords:**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adaptation; plasma membrane permeability; very-long-chain fatty acids; lipid rafts; proteome



## **Lista de abreviaturas e nomenclatura**

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

Gene – *YAP1*

Proteína – Yap1p

Estirpe mutante – yap1

Abs<sub>x</sub> – absorvência a x nm

ATP - trifosfato de adenosina

BSA - albumina de soro bovino

cAMP - monofosfato de adenosina cíclico

CL – cardiolipina

C16:0 – ácido palmítico, ácido hexadecanóico

C16:1 – ácido palmitoleico, ácido *cis*-9-hexadecenóico

C18:0 – ácido esteárico, ácido octadecanóico

C18:1 – ácido oleico, ácido *cis*-9-octadecenóico

C20:0 – ácido eicosanóico

C22:0 – ácido beénico, ácido docosanóico

C24:0 – ácido lignocérico, ácido tetracosanóico

C26:0 – ácido hexacosanóico

2-OH-C26:0 – ácido 2-hidroxi-hexacosanóico

Da - Dalton

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxirribonucleótido

ECL - do inglês ***Enhanced Chemiluminescence***

eIF4G – do inglês, ***eukaryotic translation initiation factor 4G***

ERO - espécies reativas de oxigénio

ESCRT – do inglês, ***Endosomal Sorting Complexes Required For Transport***, complexos de *sorting* endosomais necessários para transporte

g - constante de aceleração gravítica

GSH - glutationo reduzido

GSSG - glutationo oxidado

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

HO• – radical hidroxilo

LCB – do inglês, ***Long Chain Bases***, bases de cadeia longa

MCC – do inglês, ***membrane compartment occupied by Can1p***

MCP – do inglês, ***membrane compartment occupied by Pma1p***

mRNA - RNA mensageiro

MVB – do inglês, **Multivesicular Bodies**, corpos multivesiculares

NADPH - fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida (forma reduzida)

ON - do inglês **Over Night**

ONOO<sup>-</sup> – peroxinitrito

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - radical superóxido

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - dioxigénio singleto

OSH – do inglês, **Oxysterol-Binding Protein Homologue**, homologa da proteína de ligação ao oxiesterol

PA – ácido fosfatídico

PC – fosfatidilcolina

PCR - do inglês **Polymerase Chain Reaction**

Pi - fósforo inorgânico

PE – fosfatidiletanolamina

PI – fosfatidilinositol

PI-4P – 4-fosfato-fosfatidilinositol

PMA1 – H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PS – fosfatidilserina

PSA - persulfato de amónia

RNA - ácido ribonucleico

RNase - ribonuclease

rRNA - RNA ribossomal

RO<sup>•</sup> - radical alcóxido

ROO<sup>•</sup> - radical peróxido

ROOH – hidroperóxidos orgânicos

SAM – S-adenosilo-L-metionina

SC - do inglês **Synthetic Complete**

SDS - dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE - electroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SGD - do inglês, **Saccharomyces Genome Database**

SPF – do inglês, **Supernatant Protein Factor**

SREBPs - do inglês, **Sterol Regulatory Element Binding Proteins**, proteínas de ligação ao elemento regulador de esteróis

STRE - do inglês, **Stress Response Element**, elemento de resposta ao stress

t-Pna – ácido *trans*-parinárico

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



# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 A levedura como modelo biológico**

As leveduras são fungos unicelulares pertencentes ao filo *Ascomycete* e apresentam as mais variadas aplicações industriais (panificação, bebidas alcoólicas, suplementos alimentares, etc.) tendo nos últimos anos vindo a ganhar um forte papel como um sistema modelo de excelência para o estudo de fenómenos biológicos (Sherman, 2002). Embora sendo eucariotas e possuindo uma complexidade genética superior à das bactérias, já que contêm cerca de 3,5 vezes mais DNA do que as células de *E. coli*, estes microrganismos partilham algumas características importantes com os procariotas (Sherman, 2002). Dentro dessas características incluem-se o rápido crescimento (com um tempo de divisão médio de 90 min em meio líquido), a capacidade de crescer em condições muito variáveis, a facilidade de se obterem e isolarem mutantes ou células transformantes, um genoma já totalmente sequenciado e, ainda, o baixo custo associado à manutenção e crescimento destes microrganismos quando comparando com outros modelos biológicos eucariotas (Sherman, 2002; Goffeau *et al.*, 1996).

### **1.1.1 A levedura *Saccharomyces cerevisiae***

Embora existam várias espécies de leveduras a ser utilizadas como modelo biológico (Forsburg, 2005), neste trabalho experimental optou-se pela espécie *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura que se reproduz por gemulação (reprodução assexuada) e por conjugação (reprodução sexuada). A escolha deste microrganismo é consequência não só das características já referidas acima, como também do facto desta espécie de levedura não ser patogénica, não havendo por isso risco acrescido para o experimentador durante a sua manipulação.

Dentro desta espécie eucariota existem várias subespécies ou estirpes, sendo uma das mais relevantes a S288c, a qual corresponde à estirpe cujo genoma foi totalmente sequenciado em 1996 (Goffeau *et al.*, 1996). O genoma de *S. cerevisiae* é relativamente pequeno sendo constituído por aproximadamente 6000 genes em 16 cromossomas (numa célula haplóide). Os genes deste microrganismo apresentam tamanhos variáveis entre os 200 e 2200 kb (Sherman, 2002). A estirpe seleccionada para este trabalho experimental é derivada da estirpe S288c (possuindo, portanto, um fundo genético semelhante) e denomina-se BY4741 (MATa; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*). A estirpe BY4741 pertence à família BY de leveduras que constitui uma subfamília isogénica da estirpe S288c. A estirpe BY4741, em particular, foi uma das seleccionadas como fundo

genético do projecto mundial de deleção de genes de *Saccharomyces cerevisiae* EUROFAN II (Brachmann *et al.*, 1998; Winzeler *et al.*, 1999).

Outra característica interessante da *S. cerevisiae* prende-se com a capacidade que as suas células possuem para se manterem viáveis num estado haplóide ou diplóide, o que permite efectuar, com relativa facilidade, mutações ao nível de genes recessivos bem como obter estirpes mutadas em mais de um gene, o que é extremamente complicado de obter em organismos mais complexos (Sherman, 2002). Uma desvantagem desta facilidade de manipulação é a miríade de estirpes que são usadas como referência nos diversos laboratórios que usam *S. cerevisiae* como modelo animal. Esta grande variedade de estirpes e as diferenças biológicas significativas entre as mesmas, resultam na obtenção de resultados claramente discrepantes para diferentes estirpes na literatura o que, como é óbvio, dificulta a compreensão dos fenómenos biológicos observados e a sua extrapolação para outros organismos (Swiecilo *et al.*, 2000; Kaeberlein *et al.*, 2004).

Existe um extenso historial de investigação experimental com a levedura *S. cerevisiae* nas mais variadas áreas como, por exemplo, a endocitose (Shaw *et al.*, 2001), a acumulação de proteínas tóxicas (Chernoff, 2007), a sensibilidade a compostos químicos (Perego *et al.*, 2000), o transporte de lípidos (Reiner *et al.*, 2005) e o *stress* oxidativo (Jamieson, 1998; Le Moan *et al.*, 2006; Godon *et al.*, 1998). Esta utilização da *S. cerevisiae* como modelo biológico prende-se essencialmente com a observação de que as células deste organismo possuem, na generalidade das situações, as características típicas dos eucariotas superiores, nomeadamente a conservação dos mecanismos metabólicos e celulares que existem nos eucariotas mais complexos, o que potencia a possibilidade de extrapolações válidas (Winzeler *et al.*, 1999; Sherman, 2002). Para além disso, observou-se que cerca de 30% dos genes implicados em doenças humanas têm homólogos na levedura, o que vem reforçar a importância destes microrganismos como modelos biológicos relevantes (Winzeler *et al.*, 1999; Foury, 1997).

Apesar desta conservação em geral do metabolismo eucariota na levedura, existem algumas diferenças entre estes organismos e os eucariotas superiores. Uma das diferenças mais relevantes para o nosso estudo prende-se com a ausência de ácidos gordos polinsaturados devido à inexistência de um enzima com actividade desaturase para além do enzima  $\Delta 9$  desaturase (Bossie e Martin, 1989). Esta ausência leva a que em *S. cerevisiae* só existam ácidos monoinsaturados. Deste modo, a peroxidação dos lípidos das membranas, que é um dano frequente nos eucariotas superiores sujeitos a várias formas de *stress*, incluindo o *stress* oxidativo, é um fenómeno bastante raro em *S. cerevisiae*, ocorrendo somente quando o crescimento da estirpe é feito em meios que se encontram suplementados com ácidos gordos polinsaturados ou quando as estirpes são transformadas de modo a serem capazes de produzir os mesmos (Cipak *et al.*, 2006). Esta situação deve-se a uma maior resistência cinética dos ácidos gordos

monoinsaturados à peroxidação lipídica (Quadro 1) quando comparados com os ácidos polinsaturados em consequência da ausência de hidrogénios bis-aliílicos, os quais permitem a iniciação da peroxidação por serem facilmente abstraídos por radicais (Kunimoto *et al.*, 1981; Antunes *et al.*, 1996).

**Quadro 1 – Constantes de velocidade para a abstracção de átomos de hidrogénio em ácidos gordos insaturados por vários tipos de radicais (Antunes *et al.*, 1996).**

<b>Ácidos Gordos insaturados</b>	<b>Constante de velocidade para a abstracção de átomos de hidrogénio de ácidos gordos (<math>M^{-1}s^{-1}</math>)</b>		
	<b>Radical hidroperoxilo</b>	<b>Radical peroxilo</b>	<b>Radical alcóxilo</b>
<b>18:1</b>	Sem reacção	$1,1 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^6$
<b>18:2</b>	$1,2 \times 10^3$	$1,9 \times 10^1$	$8,8 \times 10^6$
<b>18:3</b>	$1,7 \times 10^3$	$4,1 \times 10^1$	$1,3 \times 10^7$

A levedura *S. cerevisiae*, por todas as características referidas acima, acaba por se apresentar como um organismo híbrido, que apresenta simultaneamente características de bactérias e de eucariotas, sendo que este tipo de organização celular se traduz numa enorme versatilidade experimental comparativamente aos organismos eucariotas mais complexos.

Em última análise a utilização da *S. cerevisiae* como modelo biológico traduz-se claramente num modo mais fácil de se obter informações relativamente a fenómenos biológicos de elevada importância nos eucariotas ditos superiores, como, por exemplo, o *stress* oxidativo, como já foi referido anteriormente.

## **1.2 Formação *in vivo* de espécies reactivas de oxigénio e *stress* oxidativo**

A presença de dioxigénio é um factor essencial à sobrevivência da grande maioria dos organismos existentes no planeta dada a proliferação de formas de vida aeróbias. Contudo, a exposição contínua ao dioxigénio, mesmo a níveis fisiológicos, implica um equilíbrio delicado, já que a vida num ambiente aeróbio tem como consequência a sujeição a vários tipos de moléculas e radicais cuja acumulação pode ter efeitos nocivos e que são denominadas genericamente como **Espécies Reactivas de Oxigénio (ERO)** (Halliwell e Gutteridge, 1984).

Entre as ERO passíveis de serem produzidas num ambiente celular (Quadro 2), incluem-se diversos radicais como o radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), radicais peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ), os radicais alcóxilo ( $RO^{\bullet}$ ), e também moléculas como o dioxigénio singleto ( $^1O_2$ ), o  $H_2O_2$  e outros hidroperóxidos orgânicos ( $ROOH$ ) e ainda o peroxinitrito

(ONOO<sup>-</sup>) (Cadenas, 1998). Dada a toxicidade destas espécies oxidantes, os organismos desenvolveram mecanismos celulares para contrabalançar a sua presença com a existência de antioxidantes. Em geral, considera-se que existe *stress* oxidativo quando existe “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes, levando potencialmente a dano” (Sies, 1997).

**Quadro 2 – Potenciais de oxidação-redução de algumas espécies reactivas de oxigénio (Cadenas, 1998).**

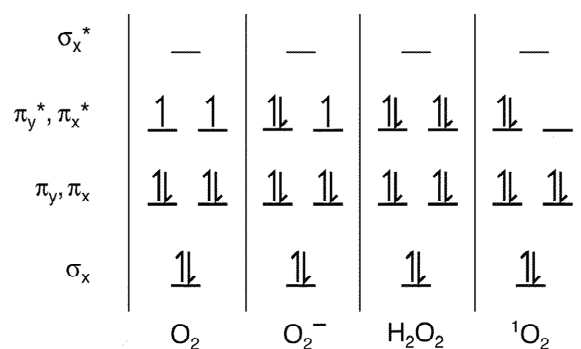
Par redox	E°/Volts
HO <sup>•</sup> ,H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> O	+2,18
RO <sup>•</sup> ,H <sup>+</sup> /ROH	+1,60
ONOO <sup>-</sup> / <sup>•</sup> NO <sub>2</sub>	+1,40
ROO <sup>•</sup> ,H <sup>+</sup> /ROOH	+1,00
NO <sup>•</sup> /NO <sup>-</sup>	+0,39
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> O,HO <sup>•</sup>	+0,32

As espécies reactivas de oxigénio ou ERO, são geradas essencialmente como subprodutos do metabolismo aeróbio, sendo que a sua principal fonte de formação *in vivo* é a cadeia transportadora de electrões situada na membrana mitocondrial interna. A formação das ERO ocorre neste caso, através da redução do O<sub>2</sub> pelo radical ubiquinona e ocorre em dois pontos específicos da cadeia respiratória, o complexo I – NADH:ubiquinona oxidoreductase e o complexo III – ubiquinona:citocromo *c* reductase, levando à formação de radical superóxido (Nelson e Cox, 2004; Raha *et al.*, 2000). As espécies reactivas de oxigénio também podem ser produzidas intracelularmente durante o metabolismo celular normal, como, por exemplo, durante o processo de β-oxidação dos ácidos gordos, e ainda ser geradas directamente a partir da actividade enzimática de oxidases como, por exemplo, o xantina oxidase (Cai, 2005; Zhang e Gutterman, 2007; Toledano *et al.*, 2003). Estas espécies químicas podem ainda ser geradas pela exposição externa a condições ambientais extremas como, por exemplo, aumentos da pressão de oxigénio, exposição a radiação ionizante, choque térmico, metais pesados ou oxidantes químicos (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996; Jamieson, 1998).

Extracelularmente podem-se formar ERO em concentrações elevadas durante processos de resposta imunitária por parte de células especializadas do sistema imunitário como os macrófagos, por exemplo através da acção do enzima NADPH oxidase (Suzuki *et al.*, 1997; Forman, 2007; Barja, 1993).

A exposição a situações de *stress* oxidativo pode levar em última análise à morte celular e já foi associada a várias patologias como, por exemplo, cancro ou doenças degenerativas como a doença de Parkinson (Barja, 1993). No entanto, quando formadas em concentrações fisiológicas, as espécies reactivas de oxigénio parecem ter funções

metabólicas importantes, parecendo cada vez mais importante o papel da regulação *redox* nos organismos, nomeadamente em processos de transdução de sinal (Suzuki *et al.*, 1997; Forman, 2007; Barja, 1993). Destes exemplos é possível concluir que a presença das ERO num organismo nem sempre poderá ser associada a uma conotação negativa ou a uma qualquer falha metabólica, sendo muitas vezes induzida pelo próprio organismo (Barja, 1993).



**Figura 1 – Diagramas das orbitais moleculares do dióxigénio e espécies reactivas derivadas (Imlay, 2003).**

Como já foi referido anteriormente, o oxigénio funciona como precursor das ERO. Esta espécie química, embora apresente um elevado potencial oxidante, é na verdade cineticamente bastante estável. Isto é devido ao facto do oxigénio – ou mais correctamente o dióxigénio – ser um diradical estável paramagnético, uma vez que possui dois electrões desemparelhados em duas orbitais  $\pi$  antiligantes (Imlay, 2003). Esta distribuição electrónica dos electrões pelas respectivas orbitais leva a que, o dióxigénio só reaja rapidamente quando recebe um electrão, o que acontece apenas com metais de transição e com outros radicais. Comparativamente com o dióxigénio estas entidades químicas, apresentam um maior potencial oxidante, sendo o radical hidroxilo o agente oxidante mais forte de todas as ERO reagindo, portanto, com praticamente todo o tipo de biomoléculas (Quadro 2). Aliás, e felizmente para os organismos expostos a esta molécula, a elevada reactividade do  $HO^\bullet$  para praticamente qualquer tipo de molécula biológica implica que esta ERO tenha um tempo de vida muito curto (Quadro 3) e uma difusão na célula extremamente limitada, o que leva a que os danos produzidos por esta entidade sejam essencialmente restringidos à zona de formação da mesma (Willson, 1979).

Dentro das ERO uma tem vindo a sobressair progressivamente – o  $H_2O_2$ , devido à sua presença ubíqua em todas as células aeróbias incluindo microrganismos (Chance *et al.*, 1979). Esta molécula (Quadro 3) apresenta ainda uma maior concentração *in vivo* do que as outras espécies reactivas de oxigénio, bem como uma maior estabilidade, como é

possível observar pelo tempo de semi-vida mais elevado em comparação com outras ERO (Giorgio *et al.*, 2007).

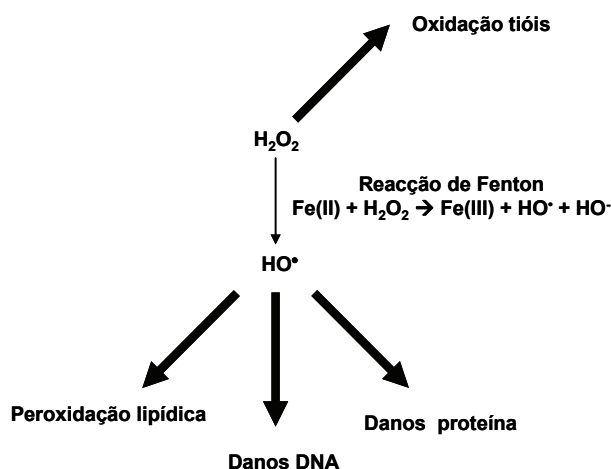
**Quadro 3 – Concentração e tempo de semi-vida de três das espécies reactivas de oxigénio mais abundantes *in vivo* (Giorgio *et al.*, 2007).**

	$O_2^{\bullet-}$	$H_2O_2$	$HO^{\bullet}$
<b>Concentração <i>in vivo</i> (M)</b>	$10^{-10}$	$10^{-7}$	$10^{-15}$
<b>Tempo de semi-vida (s)</b>	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-9}$

### 1.2.1 Papel do $H_2O_2$ em sistemas biológicos

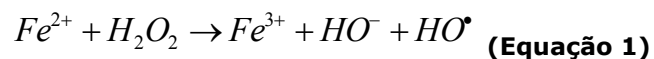
Embora o  $H_2O_2$  seja o intermediário da redução do dioxigénio com maior estabilidade química, esta elevada estabilidade não implica que o mesmo não seja um forte oxidante (Chance *et al.*, 1979). O forte potencial oxidante desta molécula (Quadro 2) é reforçado pela observação de que em estirpes de *E. coli* incapazes de eliminar o  $H_2O_2$ , uma concentração baixa desta molécula ( $1 \mu M$  de  $H_2O_2$ ) é suficiente para provocar uma inibição do crescimento dos referidos organismos (Imlay, 2003). Embora esta concentração seja superior à fisiológica, que se encontra em volta dos  $0,2 \mu M$  (Giorgio *et al.*, 2007) a ideia subjacente a esta observação é a elevada sensibilidade existente a variações na concentração desta molécula, reforçando assim a necessidade dos organismos possuírem mecanismos de eliminação destas espécies químicas (Giorgio *et al.*, 2007).

Como já foi referido acima as espécies reactivas de oxigénio podem ser geradas endogenamente e o  $H_2O_2$  não é excepção, sendo que este oxidante pode ser produzido por várias reacções catalisadas enzimaticamente (Chance *et al.*, 1979). Uma das fontes endógenas de  $H_2O_2$  mais relevantes é a reacção de dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  catalisada pelos superóxido dismutases.



**Figura 2 – Reactividade directa e indirecta do  $H_2O_2$  para as moléculas biológicas.**

Tal como as outras espécies reactivas de oxigénio, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando em concentrações elevadas, pode provocar vários tipos de danos celulares (Figura 2), como o aumento do nível de oxidação de tióis de proteínas específicas (Le Moan *et al.*, 2006), a carbonilação de proteínas (Costa *et al.*, 2002), peroxidação lipídica e danos no DNA (Jamieson, 1998). Os danos induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorrem tanto de modo directo (por exemplo, oxidação de tióis) como indirecto através da formação de compostos como o radical hidroxilo através da reacção de Fenton na presença de iões de metais de transição (Equação 1) como o Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>+</sup> (Toledano *et al.*, 2003).



Para além dos efeitos tóxicos, já foram atribuídos papéis relevantes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nomeadamente ao nível da sinalização com a observação de uma estimulação dos níveis de Ca<sup>2+</sup> e fosforilação de proteínas, um efeito ao nível do grau de oxidação de tióis em proteínas específicas ou mesmo um papel directo de segundo mensageiro em resposta à presença de citocinas ou factores de crescimento (Forman, 2007; Suzuki *et al.*, 1997; Le Moan *et al.*, 2006).

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também se encontra envolvido na resposta inflamatória, sendo produzido extracelularmente como parte da resposta imunitária inata, através da dismutação do anião superóxido, produzido via a actividade enzimática do enzima NADPH oxidase (Oliveira-Marques *et al.*, 2007).

Em *S. cerevisiae* os estudos envolvendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> têm incidido principalmente sobre os danos provocados, em conjunto com os aspectos relativos aos mecanismos de reparação celular e de eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (enzimáticos e não enzimáticos) presentes neste organismo (Jamieson, 1998; Moradas-Ferreira *et al.*, 1996). Para além deste aspecto, foi já observado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induz uma resposta adaptativa em *S. cerevisiae* (ver capítulo 1.3.2.1) (Collinson e Dawes, 1992). Observou-se ainda que os diferentes padrões de expressão proteica e génica induzidos durante a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae* indicam a presença de uma resposta comum entre fenómenos de *stress*, já que muitas das proteínas cuja expressão está alterada na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> têm igualmente a expressão alterada na presença de outras situações indutoras de *stress* oxidativo (Godon *et al.*, 1998; Moradas-Ferreira *et al.*, 1996).

Dentro da resposta celular ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incluem-se uma série de respostas de sinalização celular com conseqüente activação de vários factores de transcrição e mecanismos de sinalização celular. Dentro destas respostas estão envolvidos vários factores de transcrição como o Yap1p, o Msn2p/Msn4p (Msn2/4) e o Skn7p (Toledano *et al.*, 2003; Hasan *et al.*, 2002), que são responsáveis pela regulação da expressão de genes que codificam várias proteínas cujos níveis são alterados pelo *stress* oxidativo induzido por

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Toledano *et al.*, 2003). Na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as células de *S. cerevisiae* apresentam alterações no ciclo celular com a indução de uma paragem na fase G2 do ciclo celular sendo esta paragem dependente do *checkpoint* associado ao gene *RAD9*, normalmente relacionado com resposta aos danos no DNA (Flattery-O'Brien e Dawes, 1998).

### **1.3 Os mecanismos de defesa antioxidante em *S. cerevisiae***

Como referido anteriormente, embora as ERO tenham vários papéis importantes na vida celular ao nível das vias de sinalização e como parte integrante dos sistemas imunitários mais complexos, as suas concentrações são mantidas sobre um controlo estrito, graças a uma série de mecanismos celulares altamente reguláveis (Barja, 1993; Jamieson, 1998). Para evitar a ocorrência de *stress* oxidativo e todos os danos celulares associados a este fenómeno biológico, as células evoluíram no sentido de desenvolver mecanismos celulares para manutenção destas espécies reactivas a concentrações baixas *in vivo*, já que a exposição a estas espécies é um fenómeno que ocorre continuamente. Estes mecanismos protectores incluem defesas enzimáticas e não enzimáticas que têm como função efectuar a eliminação das ERO e em caso de dano proceder à reparação e/ou eliminação das moléculas afectadas.

Desde o trabalho pioneiro de McCord e Fridovich que levou à identificação do enzima superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos de bovino (McCord e Fridovich, 1969), que tem sido relatada em trabalhos experimentais um número cada vez maior número de entidades com propriedades antioxidantes. Considera-se como um antioxidante "qualquer substância que, quando presente em concentrações mais baixas em relação a um substrato oxidável, atrasa significativamente ou previne a oxidação desse mesmo substrato" (Halliwell, 2007).

Os mecanismos de defesa contra a presença de oxidantes são variados, podendo ser enzimáticos ou não, observando-se relativamente à levedura *S. cerevisiae*, uma clara equivalência entre as suas defesas antioxidantes e as presentes em eucariotas superiores (Jamieson, 1998).

#### **1.3.1 Mecanismos de defesa antioxidante não enzimáticos em *S. cerevisiae***

Os mecanismos de defesa não enzimáticos contra a presença de espécies reactivas de oxigénio em *S. cerevisiae* são constituídos por pequenas moléculas antioxidantes e, ainda, por proteínas com papéis biológicos variados (Jamieson, 1998; Moradas-Ferreira *et al.*, 1996).



### 1.3.1.1 Pequenas moléculas antioxidantes e proteínas quelantes

Relativamente aos antioxidantes não enzimáticos o mais conhecido é o glutathione (GSH), o tripéptido  $\gamma$ -L-glutamilo-L-cisteinilglicina. Esta molécula reage com compostos oxidantes como o  $H_2O_2$  graças ao seu grupo sulfidrilo formando-se um persulfureto, glutathione oxidado (GSSG). A importância desta molécula na resposta celular à presença de oxidantes é reforçada pela sua elevada concentração celular, sendo que em levedura a mesma se situa em cerca de 10 mM (Jamieson, 1998; Perrone *et al.*, 2005). Foi ainda observado que em estirpes de *S. cerevisiae* deficientes em glutathione ocorre uma hipersensibilidade à exposição ao  $H_2O_2$  (Jamieson, 1998).

Embora ainda não tenham sido identificadas em *S. cerevisiae*, existem em outras espécies de leveduras (*S. pombe*) moléculas denominadas fitoquelatinas [( $\gamma$ -glutamilcisteina)n-glicina], que desempenham um papel análogo ao GSH (Jamieson, 1998).

Outras moléculas envolvidas, na defesa contra as ERO, são as poliaminas como a espermidina e a espermina, que são essenciais para o crescimento aeróbio de *S. cerevisiae*, já que estirpes deficientes nestas moléculas são hipersensíveis ao oxigénio (Jamieson, 1998); também se observou um envolvimento destes compostos na protecção dos lípidos contra a oxidação (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996).

Embora o ácido ascórbico seja uma molécula antioxidante clássica em eucariotas superiores, a presença desta molécula em levedura ainda não foi totalmente esclarecida, tendo sido apontada como provável a sua inexistência em *S. cerevisiae* (Huh *et al.*, 1998). Contudo foi já identificada a presença de uma molécula com propriedades semelhantes – o ácido eritroascórbico – para a qual se observou um papel na resistência ao *stress* oxidativo (Huh *et al.*, 1998).

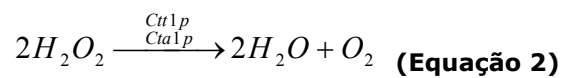
Tem sido apontado um papel antioxidante para o dióxido trealose, devido tratar-se de uma molécula importante na tolerância ao *stress* oxidativo. Contudo este papel foi posto em causa noutros estudos em que não foi estabelecida uma correlação entre os níveis de trealose e a resistência ao  $H_2O_2$ , embora se tenha observado uma influência da concentração deste dióxido na sensibilidade ao etanol e *stress* térmico (Jamieson, 1998; Pereira *et al.*, 2001).

Um grupo de proteínas que têm vindo a ganhar importância em termos de um papel como antioxidante têm sido as proteínas envolvidas no controlo das concentrações de iões metálicos livres. Esta importância ganha sentido se se considerar o papel dos metais nos fenómenos de *stress* oxidativo, nomeadamente como catalisadores da redução do  $H_2O_2$  a radical hidroxilo (reacção de Fenton) como referido no capítulo 1.2.1 (Jamieson, 1998; Chance *et al.*, 1979). Dentro deste grupo as proteínas mais importantes são as metalotioneínas, e as flavo-hemoglobinas, bem como todas as proteínas envolvidas na regulação da homeostase de iões metálicos (Jamieson, 1998).

### 1.3.2 Mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante em *S. cerevisiae*

Relativamente às defesas enzimáticas específicas estas consistem em enzimas que apresentam a capacidade de catalisar a eliminação das espécies reactivas de oxigénio, assim como enzimas envolvidos na reparação dos danos provocados pelas ERO.

A eliminação de peróxidos é efectuada por diversos peroxidases (Quadro 4). Na levedura *S. cerevisiae* existem dois catalases (codificados pelos genes *CTT1* e *CTA1*) que apresentam localizações celulares diferentes (Quadro 4) sendo que ambos os enzimas funcionam como catalisadores da dismutação directa do  $H_2O_2$  em água e oxigénio (Equação 2).



Recentemente, foi atribuída também ao catalase A, que se pensava estar somente presente nos peroxisomas onde tem como função eliminar o  $H_2O_2$  formado durante o processo de  $\beta$ -oxidação, uma localização mitocondrial. Esta localização constitui uma surpresa já que este enzima não possui uma sequência de importação mitocondrial clássica (Petrova *et al.*, 2004).

Já foi anteriormente demonstrado através do uso de estirpes mutantes nos genes que codificam para os catalases que ambos os enzimas não são necessários para a sobrevivência da estirpe mutada em condições não oxidantes ou quando expostas a  $H_2O_2$  em fase de crescimento exponencial. No entanto, são essenciais durante a exposição de células em fase de crescimento estacionária ao  $H_2O_2$  bem como no processo de resposta adaptativa a este agente oxidante (Izawa *et al.*, 1996), cuja importância será abordada no capítulo 1.3.2.1. Os catalases são igualmente importantes na protecção contra a modificação oxidativa de proteínas, nomeadamente na protecção contra a formação de grupos carbonilo, uma vez que foi observada uma correlação entre os níveis da sua actividade enzimática e os níveis de grupos carbonilo proteicos (Lushchak e Gospodaryov, 2005).

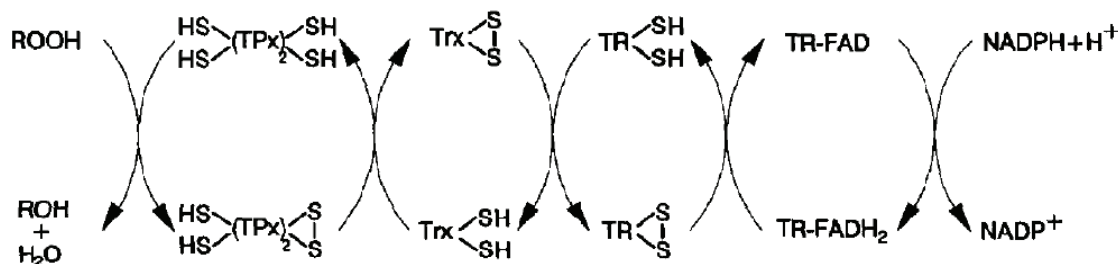
**Quadro 4 – Peroxidases expressos na levedura *S. cerevisiae***

Gene(s)	Actividade enzimática	Localização intracelular
<i>CTT1</i>	Catalase	Citoplasma
<i>CTA1</i>		Peroxisomas / Mitocôndrios
<i>CCP1</i>	Citocromo c peroxidase	Espaço intermembranar mitocondrial
<i>AHP1, TSA1</i>	Tiorredoxina peroxidase	Citoplasma
<i>DOT5, TSA2</i>		Núcleo
<i>PRX1</i>		Mitocôndrios
<i>GPX1</i>	Hidroperóxido de	Desconhecida
<i>GPX2</i>	fosfolípido GSH	Citoplasma/núcleo
<i>GPX3</i>	peroxidase	Intracelular

Juntamente com os catalases Ctt1p e Cta1p, o outro peroxidase com maior importância na eliminação directa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é o citocromo c peroxidase, codificado pelo gene *CCP1* e que se encontra localizado no espaço intermembranar dos mitocôndrios (Minard e McAlister-Henn, 2001).

Este enzima, embora não sendo essencial para a viabilidade e respiração, apresenta um aumento dos níveis de expressão do seu mRNA durante o processo de respiração aeróbia e também durante a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kwon *et al.*, 2003). Foi ainda observado um aumento da expressão do *CCP1* aquando a exposição das células a peroxinitrito, levantando a hipótese deste enzima também poder desempenhar um papel ao nível da eliminação deste composto oxidante (Kwon *et al.*, 2003).

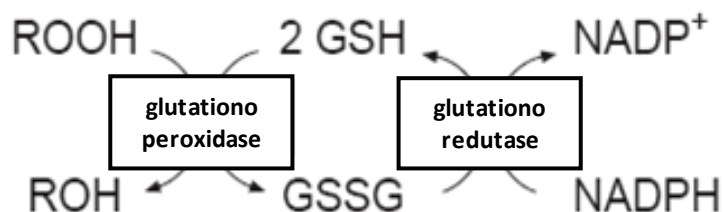
Para além destes três enzimas existem ainda uma série de enzimas que possuem actividade de peroxidase. Neste grupo incluem-se enzimas que possuem no seu centro catalítico resíduos de cisteína e que são denominados tiorredoxina peroxidases. Até este momento já foram identificados cinco destes enzimas (codificados pelos genes *TSA1*, *TSA2*, *AHP1*, *PRX1* e *DOT5*) em *S. cerevisiae* tendo sido atribuído a cada um uma localização celular própria (Park *et al.*, 2000) (Quadro 4). Os tiorredoxina peroxidases (TPx) têm como função principal reduzir o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os hidroperóxidos de alquilo (ROOH), utilizando como dador de equivalentes redutores o sistema constituído pela tiorredoxina (TRx), o tiorredoxina redutase (TR) e o NADPH (Carmel-Harel e Storz, 2000) (Figura 3).



**Figura 3 – Sequência de funcionamento da redução de hidroperóxidos por parte das tiorredoxinas peroxidases (TPx) (Chae *et al.*, 1994).**

TPx – Tiorredoxina Peroxidase. TRx – Tiorredoxina. TR – Tiorredoxina Redutase.

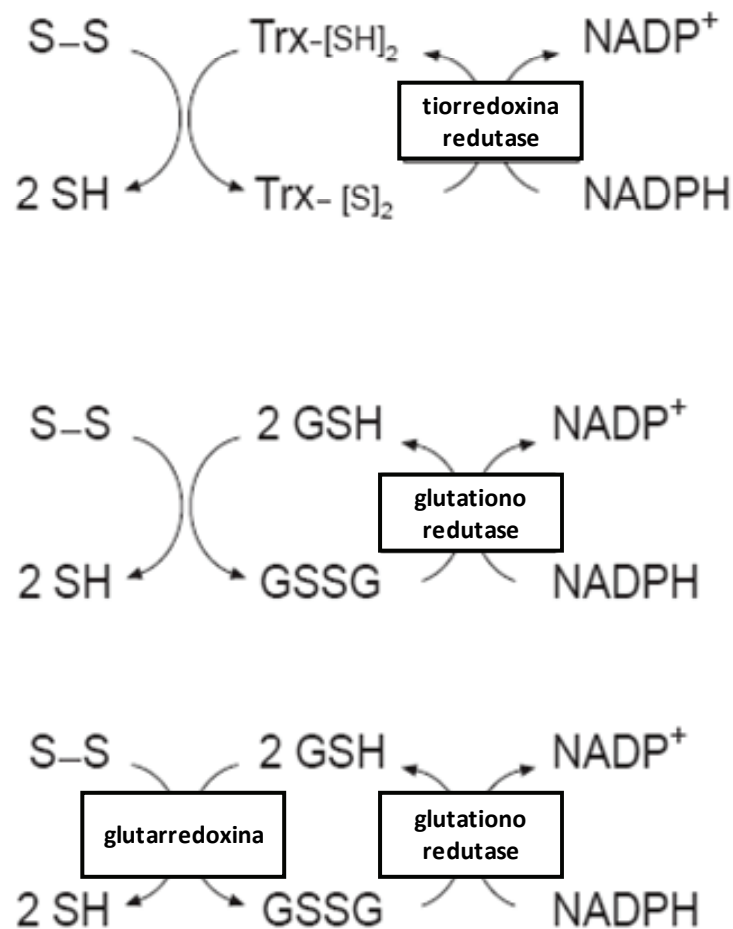
Os outros peroxidases ditos não maioritários, recorrem ao glutatióno como fonte de electrões, sendo por essa mesma razão denominados genericamente como glutatióno peroxidases ou GPx. Até agora identificando-se a presença de três destes enzimas em *S. cerevisiae* (*GPX1*, *GPX2* e *GPX3*). Relativamente à localização celular destes enzimas, observou-se que o Gpx2p está presente no citoplasma e no núcleo não existindo uma localização clara dos outros glutatióno peroxidases. Quanto ao Gpx3p, embora denominado glutatióno peroxidase observou-se que não desempenha uma actividade de peroxidase clássica, como mais adiante se verá.



**Figura 4 – Sequência de funcionamento da redução de hidroperóxidos por parte dos enzimas glutatióno peroxidases (GPx). Adaptado de (Carmel-Harel e Storz, 2000).**

Tal como os tiorredoxina peroxidases (TPx), os glutatióno peroxidases (GPx) têm como função principal reduzir o  $H_2O_2$  (Figura 4) e os hidroperóxidos de alquilo (ROOH), utilizando neste caso como equivalentes redutores o sistema constituído pelo glutatióno, o glutatióno redutase e NADPH (Carmel-Harel e Storz, 2000). Recorrendo a estirpes mutadas nestes glutatióno peroxidases, observou-se que apenas ocorria hipersensibilidade à exposição ao  $H_2O_2$  no mutante *gpx3Δ*, enquanto que nos outros dois mutantes (*gpx1Δ* e *gpx2Δ*) não foram detectadas diferenças significativas. Esta maior sensibilidade do mutante *gpx3Δ*, está relacionada com o papel que este enzima desempenha como sensor da presença de  $H_2O_2$ , funcionando como um elemento importante na transdução de sinal entre o  $H_2O_2$  e o factor de transcrição Yap1p ao

mediar a oxidação de resíduos específicos e não apresentando actividade de glutatióno peroxidase como referido acima (Delaunay *et al.*, 2002).



**Figura 5 - A redução de persulfuretos formados por oxidação de tióis, pode ser feita através dos sistemas enzimáticos tiorredoxina/tiorredoxina redutase, glutatióno/glutatióno redutase e glutarredoxina/glutatióno redutase. Adaptado de (Le Moan *et al.*, 2006).**

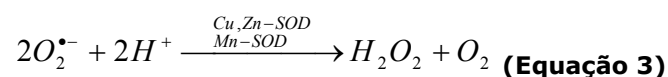
Outro aspecto relevante na resposta ao *stress* oxidativo encontra-se dentro dos mecanismos de defesa enzimáticos que não estão especificamente dirigidos para a eliminação das espécies reactivas de oxigénio, mas que têm um papel relevante na reparação de alguns dos danos oxidativos causados pelas ERO, nomeadamente a reparação de tióis através da redução de grupos persulfureto.

Tanto o sistema que envolve a tiorredoxina e o enzima tiorredoxina redutase, como o sistema envolvendo glutatióno e glutatióno redutase e o sistema da glutarredoxina apresentam esta importante capacidade biológica (Carmel-Harel e Storz, 2000; Jamieson, 1998; Collinson *et al.*, 2002) tal como se encontra exemplificado na Figura 5.

Para além deste aspecto, já foi atribuído a um destes enzimas (Grx1) um papel directo na eliminação de hidroperóxidos com um funcionamento equivalente ao dos glutathione peroxidases (Jamieson, 1998; Collinson *et al.*, 2002).

Neste momento já estão identificadas 5 proteínas pertencentes a esta família (Grx1-5), sendo as glutarredoxinas Grx1 e Grx2 enzimas com dois grupos sulfidrilo e as glutarredoxinas Grx3-5 enzimas com um grupo sulfidrilo no centro activo. Este aspecto é particularmente importante já que o número de grupos sulfidrilo influencia o tipo de actividade enzimática desempenhada. Assim, os enzimas com dois grupos sulfidrilo têm provavelmente um papel mais relevante na redução de ligações persulfureto em proteínas e os glutarredoxinas, que têm apenas um grupo sulfidrilo, estão provavelmente envolvidos na redução de proteínas S-tioladas (Toledano *et al.*, 2003).

Relativamente aos enzimas responsáveis pela eliminação de outros oxidantes que não o  $H_2O_2$ , a estirpe *S. cerevisiae* possui, tal como outros seres eucariotas, dois superóxido dismutases (SOD). A levedura possui um enzima citoplasmático, contendo Cu/Zn no seu centro activo, denominando-se por essa razão Cu,Zn-SOD e sendo codificado pelo gene *SOD1*. O segundo SOD apresenta uma localização mitocondrial e contem Mn no seu centro activo denominando-se logicamente Mn-SOD e sendo codificado pelo gene *SOD2*. Estes enzimas catalisam ambos a dismutação da espécie reactiva radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) dando origem a  $H_2O_2$  e dióxigénio (Equação 3), sendo provavelmente o papel da Mn-SOD mais relevante na eliminação de oxidantes associados ao processo respiratório como já foi abordado anteriormente (Jamieson, 1998), enquanto que a Cu,Zn-SOD assume uma relevância maior na dismutação de fontes externas de anião superóxido (Cyrne *et al.*, 2003; Jamieson, 1998).



O NADPH, essencial para a manutenção do glutathione e tioredoxina no seu estado reduzido, é gerado principalmente pela via dos fosfatos de pentose. A importância desta fonte de equivalentes redutores é reforçada pelas observações de hipersensibilidade ao  $H_2O_2$  em estirpes mutadas nos genes que codificam para os enzimas glucose-6-fosfato desidrogenase (codificado pelo gene *ZWF1*), ribulose-5-fosfato epimerase (codificado pelo gene *RPE1*) e o enzima transcetolase (codificado pelo gene *TKL1*) (Jamieson, 1998; Minard e McAlister-Henn, 2001), todos enzimas com papéis relevantes na via dos fosfatos de pentose. Estas observações levam a concluir que a manutenção de fluxo de NADPH é essencial para o correcto funcionamento dos mecanismos de eliminação dos peróxidos em enzimas que utilizem equivalentes redutores do NADPH para a sua actividade enzimática como, por exemplo, os catalases (Minard e McAlister-Henn, 2001).

### 1.3.2.1 A resposta adaptativa da levedura *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Todas as células, quando expostas a um aumento não controlado de um oxidante e que, portanto, se encontram numa situação de *stress* oxidativo, iniciam uma complexa série de processos biológicos que, em última análise, servem um objectivo comum – diminuir os níveis do oxidante e reparar os danos celulares. Esta série de processos biológicos tem sido estudada em todo o tipo de organismos e a levedura *S. cerevisiae* não é excepção, sendo um dos modelos biológicos mais utilizados no estudo das respostas ao *stress* oxidativo sob as mais variadas formas (You *et al.*, 2003; Causton *et al.*, 2001; Chatterjee *et al.*, 2000; Higgins *et al.*, 2002; Causton *et al.*, 2001).

Um dos efeitos mais interessantes na resposta ao *stress* oxidativo por parte dos organismos denomina-se “resposta adaptativa” e consiste num aumento da capacidade de sobrevivência à exposição a uma dose letal quando se expõe previamente um organismo a uma dose sub-letal. Este fenómeno pode ser observado quando se efectua o tratamento de células de levedura com doses sub-letais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (como, por exemplo, 0,2 mM), e em seguida se aplica uma dose letal (como, por exemplo, 1 mM), a estas mesmas células, assim como a um grupo de células controlo, (não tratadas com a dose sub-letal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Collinson e Dawes, 1992). As células tratadas com a dose sub-letal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exibem uma taxa de sobrevivência maior do que as células controlo, podendo-se concluir que a pré-exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leva a que as células iniciem uma série de funções de resposta que resultam posteriormente numa maior viabilidade aquando a exposição a uma dose potencialmente letal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Devido ao óbvio interesse biológico da adaptação ao *stress* oxidativo esta situação tem sido amplamente estudada em *S. cerevisiae*. Os estudos de adaptação não têm incidido somente sobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como também sobre outras fontes de *stress* oxidativo (Giannattasio *et al.*, 2005). Têm sido feitos alguns trabalhos experimentais que procuram identificar respostas adaptativas comuns, tentando induzir a adaptação a uma situação de *stress* por exposição a outro tipo de *stress* (Palhano *et al.*, 2004).

Os estudos, relativos à exposição e adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*, têm incidido principalmente sobre dois aspectos:

1. A indução de mecanismos de eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
2. A indução de mecanismos de reparação celular

Relativamente aos dois aspectos acima referidos, os estudos têm incidido principalmente sobre as proteínas e os mRNA induzidos durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em relação às proteínas observou-se a existência de uma dependência da síntese *de novo* de proteínas já que a adição de cicloheximida, um inibidor da síntese proteica, afecta a adaptação da levedura ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Collinson e Dawes, 1992; Davies *et al.*, 1995). O trabalho de Godon *et al.* (Godon *et al.*, 1998) estabeleceu que existe uma resposta proteica global após exposição a uma dose adaptativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quadro 5), tendo sido observado que as

alterações ocorrem nos mais variados tipos de proteínas, incluindo proteínas de eliminação de ERO e de reparação, e proteínas envolvidas no metabolismo e na degradação proteica, entre outras. Além deste aspecto, foi também observada uma diminuição da velocidade do processo de biossíntese proteica em simultâneo com um aumento da actividade dos processos de degradação proteica e um aumento dos níveis de proteínas envolvidas na regeneração do NADPH (Godon *et al.*, 1998).

**Quadro 5 – Proteínas cujos níveis se alteram com a exposição a uma dose adaptativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Os índices de repressão foram obtidos a partir de uma exposição a 0,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min, enquanto que os índices de indução foram obtidos a partir de doses entre 0,2 e 0,8 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min. As proteínas são identificadas pelo nome do respectivo gene (Godon *et al.*, 1998).

<b>Gene</b>	<b>Repressão</b>	<b>Indução</b>	<b>Função da Proteína</b>
<b>Proteínas com propriedades antioxidantes</b>			
CCP1		+	Citocromo c peroxidase
CTT1		+	Catalase T
GLR1		+	Glutathione Redutase
SOD1		+	SOD Cu/Zn
SOD2		+	SOD Mn
TRR1		+	Tiorredoxina Redutase
TRX (1/2)		+	Tiorredoxina 1 ou 2
TSA1		+	Tiorredoxina peroxidase
GRX1		+	Glutarredoxina 1
TSA2		+	Tiorredoxina peroxidase
AHP1		+	Tiorredoxina peroxidase
GRE2		+	Metilglioxal redutase dependente de NADPH
<b>Proteínas de choque térmico e chaperones</b>			
CPR3		+	Ciclofilina
DDR48		+	Resposta ao dano no DNA
HSC82	-		Proteína de choque térmico 82 kDa
HSP104		+	Proteína de choque térmico 104 kDa
HSP12		+	Proteína de choque térmico 12 kDa
HSP26		+	Proteína de choque térmico 26 kDa
HSP42		+	Proteína de choque térmico 42 kDa
HSP82		+	Proteína de choque térmico 82 kDa
PDI1		+	Proteína persulfureto isomerase
SSA1		+	Proteína de choque térmico
SSA2	-		Proteína de choque térmico
SSA3		+	Proteína de choque térmico
<b>Proteases</b>			
CIM5		+	Subunidade do Proteossoma
PRE1		+	Subunidade do Proteossoma
PRE3		+	Subunidade do Proteossoma



<i>PRE5</i>	+	Subunidade do Proteossoma
<i>PRE8</i>	+	Subunidade do Proteossoma
<i>PRE9</i>	+	Subunidade do Proteossoma
<i>PUP2</i>	+	Subunidade do Proteossoma
<i>SCL1</i>	+	Subunidade do Proteossoma
<i>UBA1</i>	+	Enzima activador ubiquitina
<i>UB14</i>	+	Ubiquitina
<i>HSP78</i>	+	Protease mitocondrial
<i>PEP4</i>	+	Protease vacuolar A
<b><i>Proteínas envolvidas na tradução proteica</i></b>		
<i>EFB1</i>	-	Factor de elongação EF-1
<i>EFT1</i>	-	Factor de elongação EF-2
<i>YEF3</i>	-	Factor de elongação EF-3
<i>IF4B</i>	+	Factor de iniciação eIF4B
<i>TIF1</i>	-	Factor de iniciação eIF4A
<i>TIF51A</i>	-	Factor de iniciação eIF5A
<i>RPS5</i>	-	Proteína ribossomal RPS5
<i>YST2</i>	+	Proteína ribossomal
<i>RPA2</i>	-	Proteína ribossomal ácida L44
<i>RPA0</i>	-	Proteína ribossomal ácida A0
<i>RPL45</i>	-	Proteína ribossomal ácida L45
<i>SSB1</i>	-	Família das proteínas de choque térmico
<i>SSB2</i>	-	Família das proteínas de choque térmico
<b><i>Proteínas não classificadas</i></b>		
<i>ATP2</i>	-	ATP sintase
<i>BGL2</i>	+	Glucanase
<i>CDC48</i>	+	Família das ATPase
<i>DNM1</i>	+	Proteína semelhante a dinamina
<i>OYE3</i>	+	NADPH desidrogenase
<i>RNR4</i>	+	Subunidade pequena da ribonucleótido redutase
<i>OLA1</i>	+	ATPase semelhante à proteína Humana OLA1
<i>TMA19</i>	-	Proteína semelhante à TCTP
<i>TFS1</i>	+	Supressor da mutação da cdc25
<i>YLR179C</i>	-	Proteína de função desconhecida
<b><i>Enzimas do metabolismo dos glúcidos</i></b>		
<b><i>Via dos fosfatos de pentose</i></b>		
<i>TAL1</i>	+	Transaldolase
<i>TKL1</i>	-	Transcetolase
<i>TKL2</i>	+	Transcetolase
<i>ZWF1</i>	+	Glucose 6-fosfato desidrogenase

<b>Glicólise</b>		
<i>ADH1</i>	-	Álcool desidrogenase
<i>ALD5</i>	+	Aldeído desidrogenase
<i>ALD6</i>	-	Álcool desidrogenase
<i>ENO1</i>	+	Enolase
<i>ENO2</i>	-	Enolase
<i>GLK1</i>	+	Glucocinase
<i>PDC1</i>	-	Piruvato descarboxilase
<i>SEC 53</i>	-	Fosfomanomutase
<i>TDH 2</i>	-	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<i>TDH 3</i>	-	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<b>TCA</b>		
<i>LPD1</i>	-	Di-hidrolipoamida desidrogenase
<i>MDH1</i>	-	Malato desidrogenase
<i>PDB1</i>	-	Piruvato desidrogenase
<b>Metabolismo glicerol</b>		
<i>DAK1</i>	+	Di-hidroxiacetona cinase
<i>GPD1</i>	+	Fosfato glicerol desidrogenase
<i>GPP1</i>	-	Fosfato glicerol fosfatase
<i>GPP2</i>	+	Fosfato glicerol fosfatase
<i>YBR149W</i>	+	Glicerol desidrogenase
<b>Síntese trealose</b>		
<i>PGM2</i>	+	Fosfoglucomutase
<i>TPS1</i>	+	6-fosfato de trealose sintase
<i>UGP1</i>	+	UDP-Glucose pirofosforilase
<b>Enzimas do metabolismo de aminoácido, enxofre e purinas</b>		
<b>Metabolismo Enxofre</b>		
<i>CYS3</i>	+	Cistationina liase
<i>MET6</i>	-	Metionina sintase
<i>SAM1</i>	-	S-adenosilmetionina sintetase 1
<i>SAM2</i>	-	S-adenosilmetionina sintetase 2
<b>Via das poliaminas</b>		
<i>SPE2B</i>	-	S-adenosilmetionina descarboxilase
<i>SPE3</i>	-	Espermidina sintase
<b>Metabolismo aminoácidos</b>		
<i>ARG1</i>	+	Arginosuccinato sintase
<i>ARO4</i>	+	DAHP sintase
<i>CPA2</i>	+	Fosfato de carbamilo sintase
<i>GDH1</i>	-	Glutamato desidrogenase
<i>HIS4</i>	+	AMP ciclohidrolase
<i>ILV2</i>	-	Acetolactato sintase
<i>ILV2</i>	+	Acetolactato sintase

<i>ILV3</i>	-		Di-hidroxiácido desidratase
<i>ILV5</i>	-		Aceto-hidroxiácido redutoisomerase
<i>LYS20</i>		+	Homocitrato sintase
<i>LYS9</i>	-		Sacaropina desidrogenase
<i>SHMT2</i>	-		Serina hidroximetiltransferase
<b>Síntese purinas e pirimidinas</b>			
<i>GUA1</i>	-		GMP sintetase
<i>ADE3</i>	-		C1- tetra-hidrofolato sintase
<i>ADE6</i>	-		5'-fosforibosilformilglicinamidina sintase
<i>ADE57</i>	-		Fosforibosilamina-glicina ligase
<i>URA1</i>	-		Di-hidrourotato desidrogenase
<b>Proteínas regulatórias</b>			
<i>CDC37</i>		+	Regulador de cinases
<i>MPR1</i>		+	Metaloprotease
<b>Função desconhecida</b>			
<i>PST2</i>		+	Proteína dependente do Yap1p
<i>PNC1</i>		+	Nicotinamidase
<i>SBA1</i>		+	Proteína Co-chaperone
<i>REH1</i>		+	Proteína com domínio dedo de zinco
<i>YNL134C</i>		+	Função desconhecida
<i>GOR1</i>		+	Glioxalato Redutase

No estudo das alterações ao nível do mRNA, que foi grandemente facilitado com o advento dos *microarrays* e da genómica em larga escala, tem-se observado que a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> envolve a alteração da expressão de um número muito significativo de genes (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001). A resposta à adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> envolve cerca de um terço do genoma, incluindo um conjunto de genes (cerca de 500 genes) que estão envolvidos na resposta comum a vários tipos de *stress* como, por exemplo, o *stress* térmico e ácido (Causton *et al.*, 2001). Entre os genes envolvidos nesta resposta ao *stress* observou-se a repressão sobretudo de genes associados à tradução e síntese proteica e a indução de genes envolvidos no metabolismo dos glúcidos, resposta ao *stress* e produção de energia (Causton *et al.*, 2001). Observou-se ainda que a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é, em termos de expressão génica, semelhante à resposta adaptativa observada com a menadiona que forma *in vivo* radicais superóxido, sendo que os genes onde se observa maior grau de indução são regulados pelo factor de transcrição Yap1p (Gasch *et al.*, 2000).

Os principais factores de transcrição envolvidos na resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são o Yap1p, o Skn7p e o Msn2/4p (Quadro 6), sendo o primeiro o mais estudado em termos de importância na resposta adaptativa. Observou-se que em termos de regulação da

transcrição o fenómeno de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é dependente do factor de transcrição Yap1p, enquanto a mutação dos factores de transcrição Msn2p e Msn4p não tem influência sobre a adaptação celular (Hasan *et al.*, 2002). Contudo, deve ser referido que, mesmo sem a existência do factor de transcrição Yap1p, observa-se uma resposta adaptativa residual o que indica que a resposta adaptativa tem uma dependência, pelo menos parcial, de outros factores de transcrição (Jamieson, 1998; Hasan *et al.*, 2002).

**Quadro 6 – Compilação de alguns dos genes induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a sua regulação pelos factores de transcrição Yap1p, Skn7p e Msn2/4p (Toledano *et al.*, 2003).**

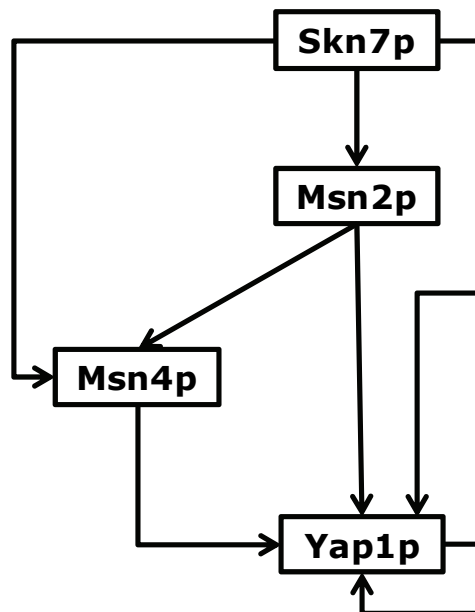
<i>Gene</i>	<i>Função da Proteína</i>	<i>Factores de transcrição envolvidos na regulação</i>	<i>Referências</i>
<i>GSH1</i>	$\gamma$ -glutamilcisteína sintetase	Yap1p	1, 2
<i>GSH2</i>	Glutathione sintetase	Yap1p	2, 3
<i>GLR1</i>	Glutathione Redutase	Yap1p	2, 4, 5, 6
<i>GPX2</i>	Glutathione peroxidase 2	Yap1p	2, 7
<i>GRX1</i>	Glutarredoxina 1	Msn2/4p	2
<i>TRX2</i>	Tiorredoxina 2	Yap1p/Skn7p	2, 5, 6, 8, 9
<i>TRR1</i>	Tiorredoxina redutase	Yap1p/Skn7p	2, 5, 9, 10
<i>TSA1</i>	Tiorredoxina peroxidase	Yap1p/Skn7p	2, 5, 10
<i>AHP1</i>	Tiorredoxina peroxidase	Yap1p/Skn7p	5, 6
<i>CCP1</i>	Citocromo c peroxidase	Yap1p/Skn7p	2, 5, 6, 10
<i>CTA1</i>	Catalase A	Yap1p	2
<i>CTT1</i>	Catalase T	Yap1p/Skn7p/Msn2/4p	2, 5, 6, 11
<i>SOD1</i>	Superóxido dismutase	Yap1p/Skn7p	2, 5, 6
<i>SOD2</i>	Superóxido dismutase	Yap1p/Skn7p	5, 6
<i>SSA1</i>	Proteína de choque térmico	Yap1p/Skn7p	5, 6, 10, 12
<i>HSP12</i>	Proteína de choque térmico 16 kDa	Skn7p/Msn2/4p	2, 12
<i>HSP26</i>	Proteína de choque térmico 26 kDa	Skn7p/Msn2p	11, 12
<i>HSP82</i>	Proteína de choque térmico 82 kDa	Yap1p/Skn7p	5, 6, 10
<i>HSP104</i>	Proteína de choque térmico 104 kDa	Skn7p	12
<i>FLR1</i>	Transportador da membrana plasmática	Yap1p	2, 13
<i>ATR1</i>	Transportador da membrana plasmática	Yap1p	2
<i>ZWF1</i>	6-fosfato de glucose desidrogenase	Yap1p	2, 5, 6
<i>TSL1</i>	6-fosfato de trealose sintase	Msn2/4p	2
<i>TPS1</i>	6-fosfato de trealose sintase	Yap1p	5, 6
<i>UGA2</i>	Succinato semialdeído desidrogenase	Msn2/4p	2
<i>ALD3</i>	Aldeído desidrogenase	Msn2/4p	2
<i>GRE2</i>	Metilglioxal redutase dependente de NADPH	Yap1p	5,6

<i>GRE3</i>	Aldose redutase	Msn2/4p	2
<i>PDI1</i>	Proteína persulfureto isomerase	Yap1p	5, 6

<sup>1</sup>(Stephen *et al.*, 1995); <sup>2</sup>(Gasch *et al.*, 2000); <sup>3</sup>(Sugiyama *et al.*, 2000); <sup>4</sup>(Grant *et al.*, 1996); <sup>5</sup>(Godon *et al.*, 1998); <sup>6</sup>(Lee *et al.*, 1999a); <sup>7</sup>(Inoue *et al.*, 1999); <sup>8</sup>(Kuge e Jones, 1994); <sup>9</sup>(Morgan *et al.*, 1997); <sup>10</sup>(Lee *et al.*, 1999b); <sup>11</sup>(Amoros e Estruch, 2001); <sup>12</sup>(Raitt *et al.*, 2000); <sup>13</sup>(Nguyen *et al.*, 2001)

Esta regulação pelo factor de transcrição Yap1p revela-se bastante complexa já que se observou que alguns dos genes são regulados directamente pelo mesmo, enquanto que outros genes envolvidos na resposta adaptativa são regulados indirectamente por este factor de transcrição. Com efeito, o Yap1 influencia a expressão de vários genes sem actuar directamente como factor de transcrição sobre os mesmos (Jamieson, 1998). Na ausência de *stress* oxidativo, o Yap1p mantém-se maioritariamente no citoplasma devido à acção de um mecanismo de exportação nuclear, sendo que, quando sob a acção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o mesmo se acumula no núcleo devido a uma oxidação de resíduos específicos que impedem a sua deslocação para o citoplasma, induzindo deste modo a transcrição dos genes alvo. Nesta oxidação estão envolvidos dois domínios ricos em resíduos de cisteína (C-terminal e N-terminal), mas demonstrou-se que apenas dois resíduos de cisteína são essenciais para a activação do Yap1p (Delaunay *et al.*, 2000). Nesta regulação do estado de oxidação/redução do factor de transcrição Yap1p encontram-se envolvidos o sistema associado à tiorredoxina e o enzima Gpx3p, o que vem mais uma vez reforçar a importância dos sistemas de reparação de tióis proteicos, não só na reparação de danos celulares como na regulação de fenómenos de sinalização (Delaunay *et al.*, 2002).

O mutante *skn7Δ* é também hipersensível ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e julga-se que o factor de transcrição Skn7p funciona numa via semelhante à do factor de transcrição Yap1p, regulando assim sobre uma série de genes comuns. É provável que o Skn7p esteja envolvido numa via a funcionar de um modo paralelo e/ou cooperativo relativamente ao factor de transcrição Yap1p. Observa-se então que o Skn7p deverá ter maioritariamente um papel regulador sobre os vários factores de transcrição envolvidos na resposta ao *stress* oxidativo (Figura 6) e ainda outros factores de transcrição envolvidos na regulação de vias metabólicas, já que ainda não foram identificadas proteínas reguladas em exclusivo pelo factor de transcrição Skn7p (Toledano *et al.*, 2003).



**Figura 6 – Efeito regulador do factor de transcrição Skn7p sobre os factores de transcrição Yap1p, e Msn2/4p.**

As interações documentadas entre os factores de transcrição Skn7p, Yap1p e Msn2/4p foram obtidas com o programa Yeabstract (Teixeira *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2008).

Os factores de transcrição Msn2/4p são responsáveis pela activação de vários genes em situação de *stress* oxidativo ligando-se à sequência de resposta ao *stress* STRE (do inglês, *stress response element*) CCCCT, sendo os mutantes *msn2Δmsn4Δ* hipersensíveis ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hasan *et al.*, 2002).

Embora sendo todos estes elementos relevantes para a resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observou-se que existem diferenças entre os efeitos do factor de transcrição Yap1p e os factores de transcrição Msn2/4p. Com efeito, observou-se que mutantes *yap1Δ* apresentam uma resposta adaptativa residual enquanto que os mutantes *msn2/4Δ* mantêm essa mesma capacidade, sendo que a sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das estirpes mutantes é diferenciada conforme o ensaio experimental é executado em meio líquido ou sólido (Hasan *et al.*, 2002).

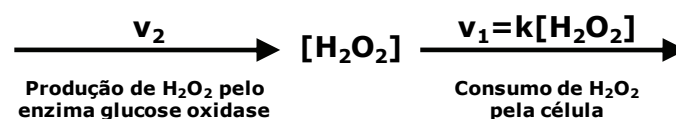
#### 1.3.2.2 O estado estacionário de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como modelo fisiológico

A utilização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estudos de *stress* oxidativo prende-se com vários factores (Giorgio *et al.*, 2007; Chance *et al.*, 1979):

1. existe fisiologicamente nas células
2. é muito estável em comparação com outras espécies reactivas de oxigénio
3. das espécies reactivas de oxigénio, é aquela que existe em maior quantidade nas células

Os estudos utilizando  $H_2O_2$  como indutor de *stress* oxidativo ou de adaptação em sistemas biológicos são maioritariamente feitos através da adição de uma dose única de  $H_2O_2$ , denominada dose *bolus*. Esta aproximação experimental levanta vários problemas. Com efeito, a adição em *bolus* de  $H_2O_2$  exige o uso de doses de  $H_2O_2$  muito mais elevadas do que as concentrações de  $H_2O_2$  existentes *in vivo*. Portanto, as adições de  $H_2O_2$  em *bolus* constituem um choque para a célula levando à desregulação da homeostase celular com a ocorrência de modificações estruturais irreversíveis nas mais variadas estruturas celulares (Antunes e Cadenas, 2001). O uso destas doses mais elevadas prende-se com a necessidade de obter efeitos observáveis nas células, uma vez que na ausência de uma fonte contínua de  $H_2O_2$ , há uma rápida diminuição da concentração de  $H_2O_2$  ao longo do tempo devido ao consumo endógeno de  $H_2O_2$  catalisado pelos peroxidases. Na verdade, o que acontece *in vivo* é uma produção contínua de  $H_2O_2$  nas células e simultaneamente a sua degradação catalisada pelos peroxidases, havendo um estado estacionário de  $H_2O_2$  com concentrações intracelulares da ordem dos submicromolar. Assim, quem pretender estudar situações de adaptação ao  $H_2O_2$  próximas da situação fisiológica não deverá usar adição em *bolus*, as quais usam concentrações de  $H_2O_2$  na ordem dos mM, muito superiores às encontradas na célula.

A alternativa à adição *bolus* consiste na sujeição das células a um estado estacionário de  $H_2O_2$ , ou seja, a um fluxo contínuo e controlado de  $H_2O_2$  que contrapõe o consumo de  $H_2O_2$  via peroxidases e que simula a situação *in vivo* (Figura 7). Este fluxo pode ser conseguido adicionando ao meio o enzima glucose oxidase (EC 1.1.3.4) que catalisa a oxidação da D-glucose resultando na produção de  $H_2O_2$  e D-gluconolactona. O glucose oxidase é um enzima ideal para este efeito, uma vez que usa como substrato a glucose em excesso presente no meio de cultura (Antunes e Cadenas, 2001).



**Figura 7 – Esquema correspondente à variação da concentração de  $H_2O_2$  ao longo do tempo num sistema em estado estacionário onde a concentração de  $H_2O_2$  se mantém constante.**

A concentração de  $H_2O_2$  é mantida constante devido à existência de um equilíbrio entre a produção de  $H_2O_2$  pelo enzima glucose oxidase (EC 1.1.3.4) e a velocidade de consumo endógeno de  $H_2O_2$  por parte da célula.

Este modelo apresenta numerosas vantagens já que permite a utilização de concentrações baixas de  $H_2O_2$  sob a forma de um fluxo contínuo constituindo uma aproximação aos valores fisiológicos e evitando-se assim os danos celulares provocados pela adição *bolus*. Por outro lado, sendo o estado estacionário de  $H_2O_2$  regulado pela

quantidade de enzima adicionado, esta aproximação experimental oferece a possibilidade de regular a concentração utilizada e permite conhecer as concentrações de  $H_2O_2$  a partir das quais ocorrem determinados fenómenos biológicos, ou seja, permite efectuar uma titulação das respostas biológicas induzidas pelo  $H_2O_2$ .

A importância desta titulação é reforçada com as observações efectuadas na levedura *S. pombe* e nas linhas celulares Hela e MCF-7, em que doses diferentes de  $H_2O_2$  resultam em respostas celulares distintas ao nível dos mecanismos de sinalização (Vivancos *et al.*, 2006a; Oliveira-Marques *et al.*, 2007). Esta diferença ainda não foi observada em *S. cerevisiae* já que aparentemente, os elementos envolvidos na resposta celular ao  $H_2O_2$  não são diferentes de acordo com a concentração de  $H_2O_2$  aplicada.

#### **1.4 A membrana plasmática como barreira à entrada do $H_2O_2$ na célula**

Nos estudos que incidem sobre a resposta celular à presença do  $H_2O_2$  tem sido considerado sempre que este composto se difunde rapidamente através das barreiras celulares (parede celular e/ou membrana celular), pressupondo-se que não existe uma barreira de permeabilidade. Deste modo, as concentrações intracelulares e extracelulares de  $H_2O_2$  deverão ser iguais (Chance *et al.*, 1979). No entanto, este paradigma da difusão livre do  $H_2O_2$  através das membranas celulares tem vindo a ser refutado nos últimos anos. Foram observadas diferenças muito significativas entre a concentração extracelular de  $H_2O_2$  com valores até 100  $\mu M$  (Halliwell *et al.*, 2000) e a concentração intracelular com valores entre 0,01 e 0,1  $\mu M$  (Chance *et al.*, 1979), o que implica a existência de uma barreira que proporcione esta elevada diferença de concentrações, resultando daí um gradiente entre a concentração extracelular e intracelular de  $H_2O_2$ . A existência deste gradiente de  $H_2O_2$  através de membranas foi identificado inicialmente numa linha celular humana (células Jurkat T) através do recurso ao conceito de latência enzimática, segundo o qual a actividade de um enzima dentro de um compartimento é mais baixa do que quando o mesmo se encontra livre devido à barreira de permeabilidade exercida pelo compartimento (Antunes e Cadenas, 2000).

Mais tarde, também foi confirmada a existência de um gradiente em *E. coli*, tendo-se observado ainda que a inexistência desse mesmo gradiente de concentração leva a maior sensibilidade ao  $H_2O_2$  (Seaver e Imlay, 2001). Esta observação leva a concluir que, neste organismo, as actividades enzimáticas dos enzimas que catalisam a redução do  $H_2O_2$  não são suficientes para proteger células individuais, se o  $H_2O_2$  entrar livremente nessas mesmas células (Seaver e Imlay, 2001). Para além de ter sido observado em várias linhas celulares de mamífero e em *E. coli*, a existência de um gradiente celular para o  $H_2O_2$  também já foi observada em *S. cerevisiae*, o que indica que este fenómeno deverá



ser ubíquo em todos os organismos (Antunes e Cadenas, 2000; Branco *et al.*, 2004; Sousa-Lopes *et al.*, 2004; Seaver e Imlay, 2001; Oliveira-Marques *et al.*, 2007).

A importância da existência de um gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através das biomembranas nos organismos é grande, já que antecipa a protecção pelas membranas contra a grande maioria das situações de *stress* oxidativo, ao fornecer uma limitação física à passagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o interior das células e levando a um efeito protector através da existência de uma diferença entre a concentração extracelular e intracelular (Branco *et al.*, 2004), bem como a existência de uma diferença entre as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dos vários organelos celulares (Antunes e Cadenas, 2000).

Relativamente à levedura *S. cerevisiae*, e dado estarmos perante um fungo, que possui para além de membrana plasmática uma parede celular, a existência de um gradiente levantava a questão da barreira de permeabilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser devida à membrana plasmática ou à parede celular. Neste organismo foi efectuada uma análise experimental, da função biológica destas duas estruturas celulares, na adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em duas fases metabólicas distintas – fase de crescimento exponencial e fase de crescimento estacionário. Na fase de crescimento exponencial foi atribuído o papel de barreira de permeabilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à membrana plasmática dado que a permeabilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não se alterou quando se removeu enzimaticamente a parede celular (Branco *et al.*, 2004). Quanto às células de *S. cerevisiae* na fase de crescimento estacionário observou-se mais uma vez a influência da membrana plasmática no gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> embora não se tenha podido descartar uma possível influência da parede celular nesta fase metabólica ao nível da permeabilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sousa-Lopes *et al.*, 2004). Nestes trabalhos foi possível efectuar a determinação quantitativa das constantes de permeabilidade e dos respectivos gradientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004; Sousa-Lopes *et al.*, 2004) (Quadro 7). Para além da determinação de uma constante de permeabilidade para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quadro 7) observou-se surpreendentemente que esta constante variava com a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004). Assim, as células de levedura adaptam-se não só através do aumento das actividades enzimáticas dos enzimas que catalisam a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como também diminuindo a permeabilidade da membrana plasmática ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004). Esta maior dificuldade na entrada do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na célula tem como consequência o aumento do gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da membrana plasmática (Branco *et al.*, 2004)

Também se observou que as células na fase de crescimento estacionário apresentavam uma constante de permeabilidade bastante baixa o que explica em parte as observações anteriores duma resistência mais elevada das células de *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nesta fase metabólica comparativamente às células em fase de crescimento exponencial (Sousa-Lopes *et al.*, 2004).

**Quadro 7 – Constantes de permeabilidade e gradientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae* em diferentes condições experimentais (Branco *et al.*, 2004; Sousa-Lopes *et al.*, 2004).**

<b>Células</b>	<b>Gradiente [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>intr</sub>/[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>extrac</sub></b>	<b>Constante de permeabilidade (min<sup>-1</sup> A<sub>600</sub><sup>-1</sup>)</b>
<b>Controlo (fase de crescimento exponencial)</b>	0,64 ± 0,09	0,083 ± 0,028
<b>Controlo (fase de crescimento estacionário)</b>	0,056 ± 0,020	0,017 ± 0,004
<b>Adaptadas (fase de crescimento exponencial)</b>	0,34 ± 0,06	0,049 ± 0,012

O papel da membrana plasmática de *S. cerevisiae* em resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> já tinha sido sugerido anteriormente, em trabalhos experimentais onde se observou que, em estirpes mutantes nos genes *ERG3* e *ERG6*, que codificam enzimas da via de síntese do ergosterol, e que apresentavam alterações nas composições de esteróis, existia uma maior sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004). Para além destes resultados já tinha sido observada uma elevada indução do nível de mRNA de um enzima chave do metabolismo do ergosterol – o HMG-CoA redutase (Causton *et al.*, 2001). Também foi relatada uma influência da composição lipídica em levedura na activação do elemento geral de resposta ao *stress* quando exposto a *stress* térmico ou na presença de excesso de sais (Chatterjee *et al.*, 2000).

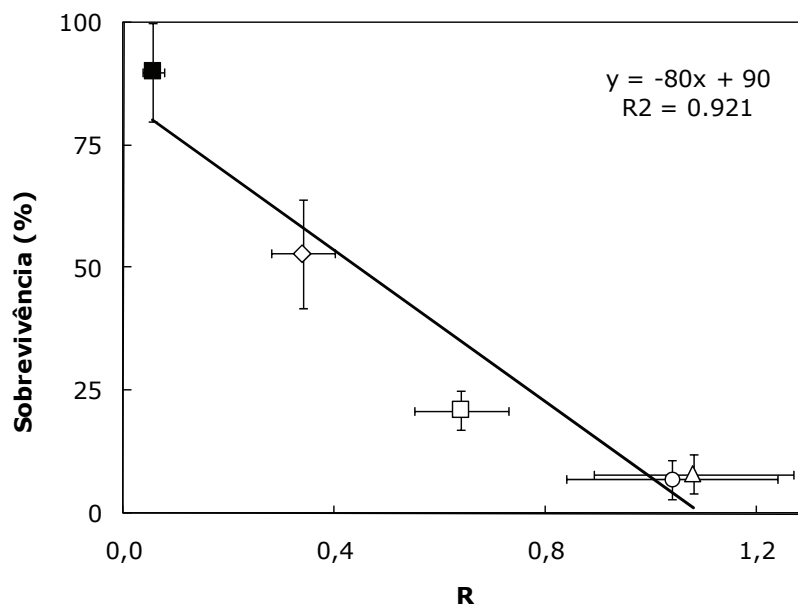
**Quadro 8 – Comparação entre gradiente e constante de permeabilidade de células controlo e estirpes mutantes na via do ergosterol (Branco *et al.*, 2004).**

N.D. – constante de permeabilidade não determinada.

<b>Células</b>	<b>Gradiente [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>intr</sub>/[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>extrac</sub></b>	<b>Constante de permeabilidade (min<sup>-1</sup> A<sub>600</sub><sup>-1</sup>)</b>
<b><i>wt</i> (fase de crescimento exponencial)</b>	0,64 ± 0,09	0,083 ± 0,028
<b><i>erg3Δ</i> (fase de crescimento exponencial)</b>	1,08 ± 0,19	N.D.
<b><i>erg6Δ</i> (fase de crescimento exponencial)</b>	1,04 ± 0,20	N.D.

Para além da observação de uma maior sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas estirpes *erg3Δ* e *erg6Δ*, observou-se ainda, nestas condições experimentais a ausência de um gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quadro 8) devido à inexistência de uma barreira à passagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004). Estas observações, quando analisadas em conjunto (Figura 8) vêm

demonstrar claramente a importância da presença de um gradiente de  $H_2O_2$  na sobrevivência das células de *S. cerevisiae* quando expostas ao  $H_2O_2$ . Analisando a Figura 8, observamos que existe uma clara correlação entre a intensidade do gradiente apresentado pelas células de *S. cerevisiae* e a sua taxa de sobrevivência quando expostas ao  $H_2O_2$ .

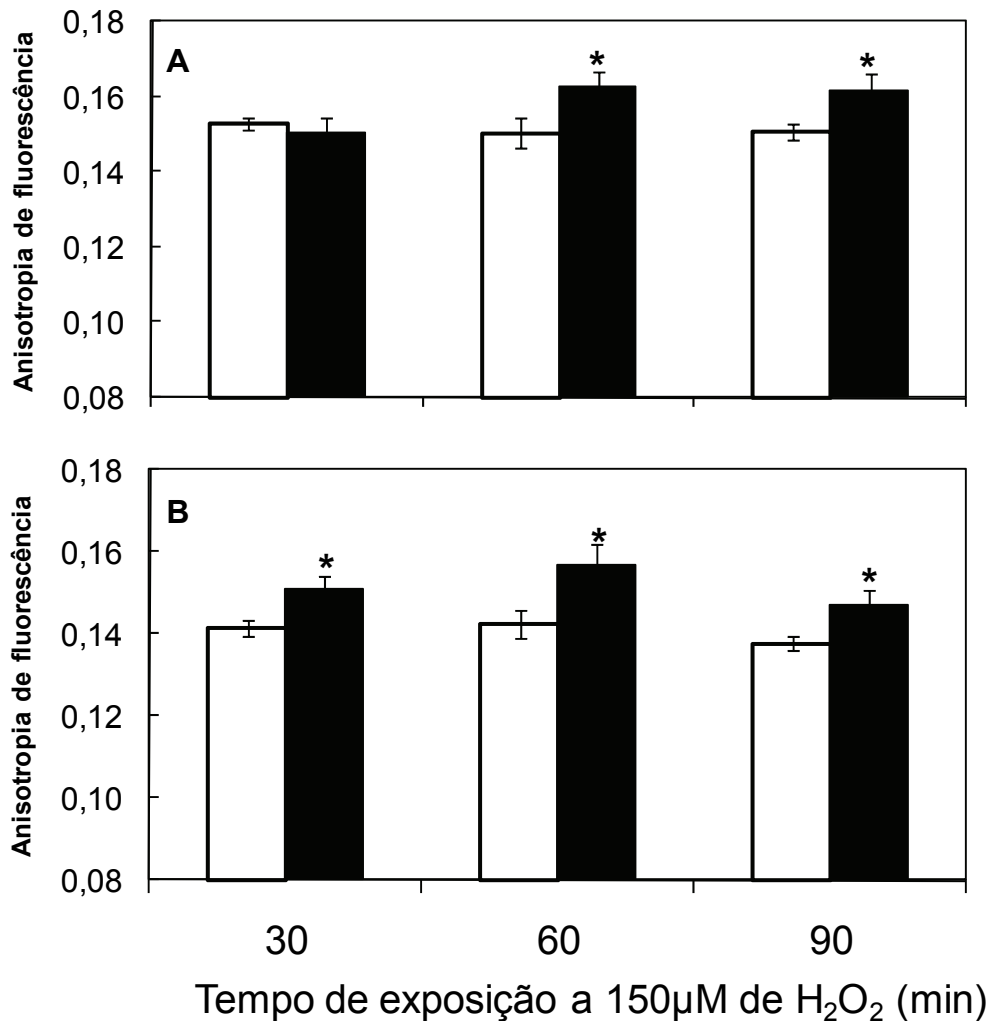


**Figura 8 – Efeito do gradiente de  $H_2O_2$  sobre a sobrevivência celular aquando a exposição ao  $H_2O_2$  em *S. cerevisiae*. Adaptado de (Sousa-Lopes *et al.*, 2004)**

Representação gráfica da correlação existente entre o gradiente de  $H_2O_2$  e a taxa de sobrevivência a uma exposição ao  $H_2O_2$ . (■) células em fase de crescimento estacionário, (◊) células em fase de crescimento exponencial adaptadas, (○) células *erg6Δ* em fase de crescimento exponencial, (Δ) células *erg3Δ* em fase de crescimento exponencial, (□) células em fase de crescimento exponencial.

Em conjunto com as determinações das constantes de permeabilidade e os gradientes de  $H_2O_2$ , foi também analisada, por parte deste grupo, a existência uma correlação entre as alterações de permeabilidade e um parâmetro biofísico denominado anisotropia de fluorescência, que permite identificar alterações de fluidez na membrana plasmática (Folmer *et al.*, 2008). Observou-se, recorrendo a duas sondas de anisotropia de fluorescência distintas (DPH – difenilhexatrieno e 2-AS – ácido 2-(9-antroiloxi) esteárico), que aos 30 e 60 min de adaptação ao  $H_2O_2$  respectivamente, ocorrem já aumentos de anisotropia correspondentes a uma diminuição de fluidez na membrana plasmática, o que veio demonstrar que a adaptação a  $150 \mu M$  de  $H_2O_2$  em estado estacionário induz muito rapidamente alterações de fluidez na membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae* (Figura 9). O facto de estas alterações terem sido observadas com duas sondas distintas, também revela que as alterações de fluidez ocorrem globalmente ao longo da membrana

plasmática, já que a sonda DPH é incorporada na zona mais hidrófoba da membrana, enquanto que a sonda 2-AS se encontra mais localizada à superfície da mesma.

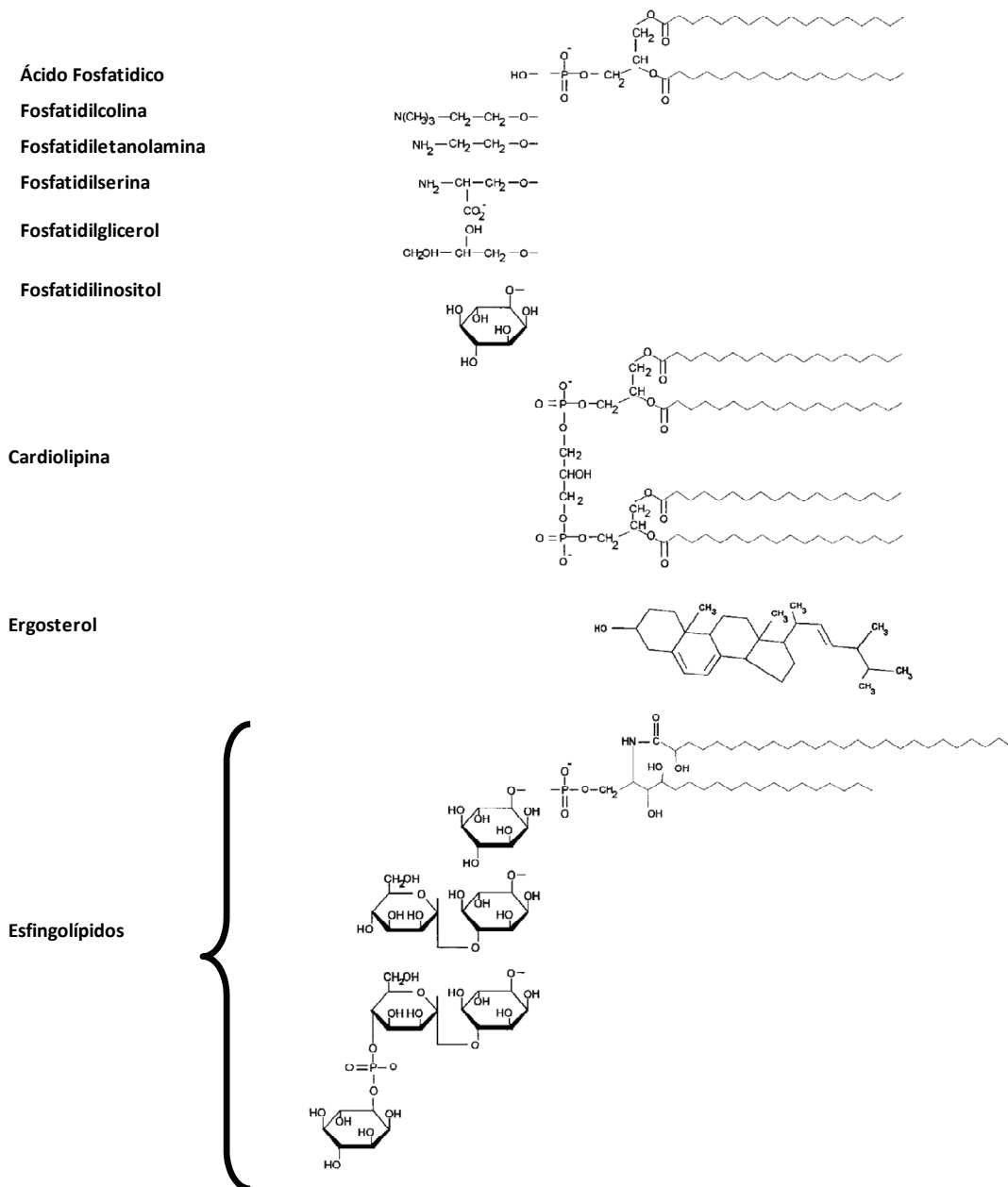


**Figura 9 – A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induz um aumento da anisotropia correspondente com uma diminuição na fluidez da membrana plasmática de *S. cerevisiae*. Adaptado de (Folmer *et al.*, 2008)**

As alterações da fluidez da membrana plasmática de *S. cerevisiae* em células controlo (barras brancas) e células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao longo de 90 min (barras pretas) foram analisadas através da determinação da anisotropia de fluorescência com recurso a duas sondas distintas (A – sonda DPH e B – sonda 2-AS), \*P<0,01 *versus* controlo.

Embora já tenha sido observado, em *S. pombe*, que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reprimia a biossíntese de ergosterol através de uma proteína denominada Pof14p, traduzindo-se numa diminuição dos níveis globais de ergosterol (*S. pombe*) (Tafforeau *et al.*, 2006), em *S. cerevisiae* ainda não existem observações relativamente a este aspecto. Apesar de todos os dados experimentais já obtidos e de ter sido atribuído claramente um papel à membrana plasmática durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004; Folmer *et al.*, 2008), ainda não existem dados experimentais claros relativamente ao papel individual dos

componentes da membrana plasmática no fenómeno adaptativo ou mesmo um papel em conjunto dos vários componentes da membrana plasmática de *S. cerevisiae*, ou seja, lípidos esteróis e proteínas, nas alterações de permeabilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Noutros organismos (mamíferos e plantas), foi possível observar que proteínas transportadoras denominadas aquaporinas, que tradicionalmente têm um papel na regulação dos níveis de água e outros solutos neutros no interior da célula, desempenham um papel no transporte do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bienert *et al.*, 2006). Em *S. cerevisiae* ainda não foi observado este tipo de papel por parte de nenhuma das aquaporinas presentes neste organismo, embora se tenha observado uma maior sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células *S. cerevisiae* transformadas com aquaporinas de mamífero e plantas (Dynowski *et al.*, 2008; Bienert *et al.*, 2007). Poderá existir alguma aquaporina com um papel relevante neste aspecto, embora em *S. cerevisiae* ainda não tenha sido feita a identificação de tal proteína nem atribuído esse papel a nenhuma das várias aquaporinas já identificadas nesta levedura. A membrana plasmática é constituída por uma bicamada lipídica heterogénea (van der Rest *et al.*, 1995; Blagovic *et al.*, 2005) e assimétrica com cerca de 7,5 nm de espessura. Nesta estrutura para além dos lípidos (Figura 10), encontram-se incorporadas diversas proteínas, integrais ou não, que desempenham uma variedade de funções importantes na membrana plasmática (van der Rest *et al.*, 1995; Blagovic *et al.*, 2005).



**Figura 10** – Componentes lipídicos da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de (van der Rest *et al.*, 1995).

Em termos de composição de lípidos a membrana plasmática apresenta uma composição bastante heterogênea como é possível observar na Figura 10. Para além da heterogeneidade em termos de componentes lipídicos, também se observou que os níveis dos diferentes componentes são variáveis em termos de condição metabólica (Quadro 9) o que vem reforçar a adaptabilidade da membrana plasmática a vários tipos de situações (Tuller *et al.*, 1999).

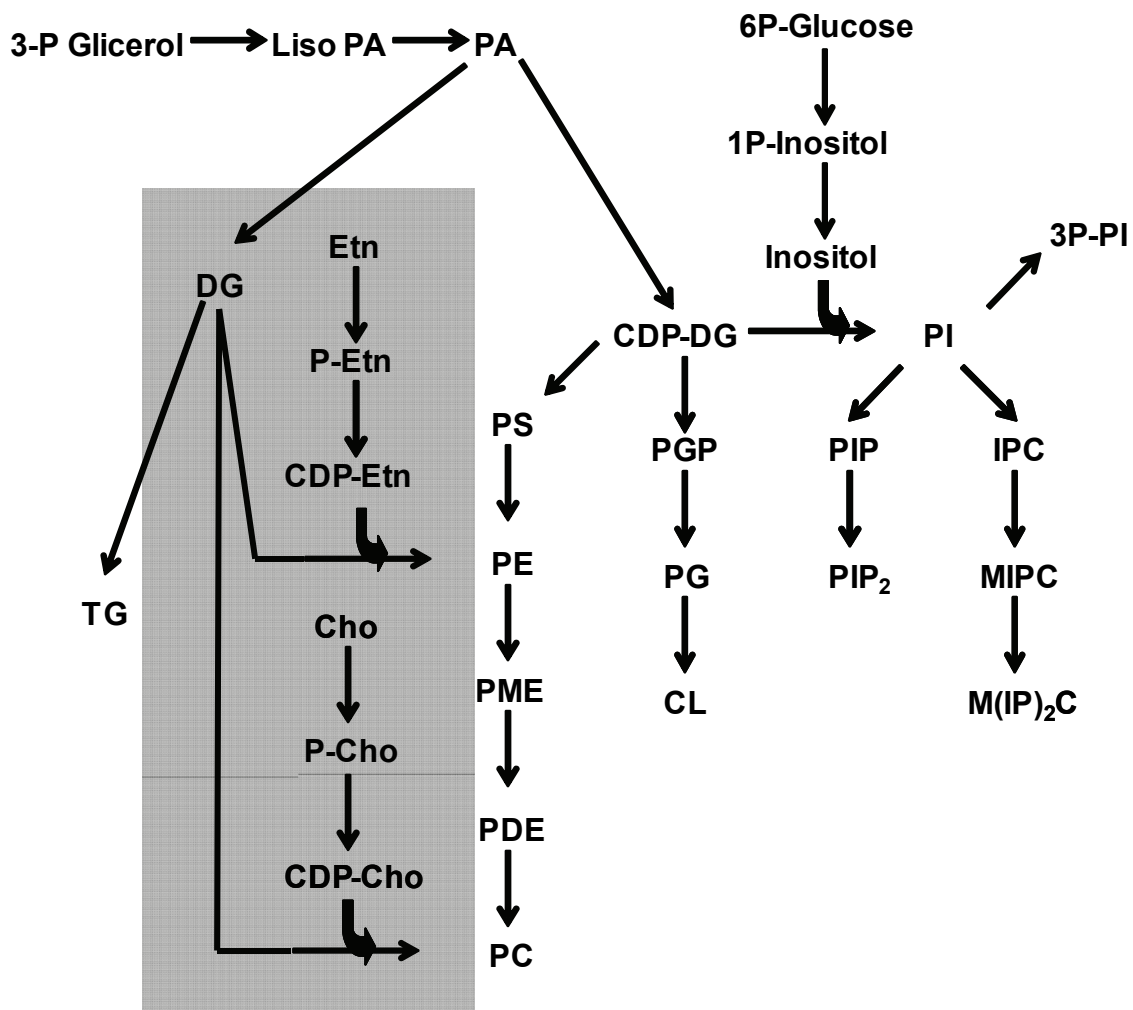
**Quadro 9 – Composição percentual de fosfolípidos da membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae*.**

PC	PE	PI	PS	CI	PA	Esfingolípidos	Outros Componentes	Fonte de carbono	Referência
16,8	20,3	17,7	33,6	0,2	3,9		6,9	Glucose	1
11,3	24,6	27,2	32,2	nd	3,3		1,4	Glucose	2
17,0	14,0	27,7	3,8	4,2	2,5	30,7		Glucose	3
10,0	41,8	7,9	20,3		3,5		16,5	Glucose	4
21,0	18,3	13,3	23,1	4,9	7,5		11,9	Lactato	2
19,3	14,3	15,8	25,7	4,0	8,8		12,1	Etanol	2

<sup>1</sup>(Zinser *et al.*, 1991); <sup>2</sup>(Tuller *et al.*, 1999); <sup>3</sup>(Patton e Lester, 1991); <sup>4</sup>(van den Hazel *et al.*, 1999)

#### **1.4.1 Fosfolípidos**

Dentro dos componentes mais importantes das biomembranas encontram-se os fosfolípidos, que podem ser divididos estruturalmente em dois grandes grupos com igual importância na membrana plasmática: glicerofosfolípidos e esfingolípidos. Embora sejam estruturalmente distintos, as vias metabólicas destes dois grupos de fosfolípidos encontram-se associadas, como é possível observar na Figura 11. O ácido fosfatídico (PA) assume um papel fulcral na biossíntese de fosfolípidos, não só por este ser um intermediário principal, como também por desempenhar um papel ao nível da sinalização celular desta via (Loewen *et al.*, 2004). Observou-se ainda que estas vias apresentam a particularidade de a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina poderem ser sintetizadas por duas vias distintas: através de CDP – DG como todos os outros fosfolípidos ou através da via metabólica de Kennedy (Carman e Zeimet, 1996). No Quadro 9 é possível ver a composição percentual dos diferentes fosfolípidos da membrana plasmática de *S. cerevisiae*.



**Figura 11 – Vias biossintéticas de produção de fosfolípidos em *S. cerevisiae*.**

Cho - Colina, Etn - Etanolamina; PS - Fosfatidilserina; PE - Fosfatidiletanolamina; PI - Fosfatidilinositol; IPC - Inositol fosfoceramida; MIPC - Manosilinositol fosfoceramida; M(IP)<sub>2</sub>C - Manosildi-inositol fosfoceramida; PG - Fosfatidilglicerol; PME - Fosfatidilmonometiletanolamina; PDE - Fosfatidildimetiletanolamina; CL - Cardiolipina; DG - Diacilglicerol; TG - Triacilglicerol; PA - Ácido fosfatídico; PIP - 4-fosfato fosfatidilinositol; PIP<sub>2</sub> - 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol. A cinzento encontra-se assinalada a via metabólica de Kennedy. Adaptado de (Carman e Zeimetz, 1996).

#### 1.4.1.1 Glicerofosfolípidos

Os glicerofosfolípidos encontram-se sob as mais variadas formas na membrana plasmática (Figura 10). A sua distribuição na membrana plasmática é predominantemente assimétrica, havendo uma maior percentagem de fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilserina (PS) na face interna da membrana plasmática e uma maior percentagem de fosfatidilcolina (PC) na face externa desta estrutura celular e existindo ainda, como componentes minoritários, o ácido fosfatídico (PA) e a cardiolipina (CL) (van der Rest *et al.*, 1995).



Os glicerofosfolípidos apresentam uma estrutura característica com a presença de uma zona polar hidrófila, ligada covalentemente a uma molécula de glicerol, e uma zona apolar com elevada hidrofobicidade constituída por duas moléculas de ácidos gordos.

Os ácidos gordos de *S. cerevisiae* apresentam a particularidade de não existirem sob a forma de cadeias polinsaturadas (excepto em meios suplementados), encontrando-se apenas ácidos gordos saturados e monoinsaturados, tal como referido na secção 1.1.1. Os ácidos gordos de cadeia longa maioritários na membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Quadro 10) são o ácido palmítico (16:0), o ácido palmitoleico (16:1) e o ácido oleico (18:1), embora existam valores discrepantes na literatura consultada, provavelmente devido à utilização de diferentes estirpes de *S. cerevisiae* (van der Rest *et al.*, 1995; Tuller *et al.*, 1999).

Relativamente à composição de ácidos gordos em *S. cerevisiae*, observou-se que estes influenciam a resposta a vários tipos de *stress* (Chatterjee *et al.*, 1997; Chatterjee *et al.*, 2000). No caso do *stress* induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observou-se que numa estirpe de levedura capaz de produzir ácidos gordos polinsaturados (transformada com o gene de um enzima  $\Delta 12$  desaturase) existe uma maior sensibilidade a este agente oxidante, sem existir ainda nenhuma informação clara relativamente às alterações que ocorrem na composição em ácidos gordos da membrana plasmática em estirpes não transformadas (Cipak *et al.*, 2006).

Os grupos polares dos fosfolípidos determinam o estado físico da membrana, através da indução de uma maior ou menor flexibilidade em função do seu tamanho, enquanto que os ácidos gordos possuem um papel relevante na regulação da fluidez da membrana de acordo com o aumento da cadeia de carbonos e o grau de insaturação. Em geral, a fluidez de uma membrana diminui com o aumento do tamanho da cadeia de carbonos dos ácidos gordos e com a diminuição do seu grau de insaturação (van der Rest *et al.*, 1995).

**Quadro 10 – Ácidos gordos presentes na membrana plasmática de *S. cerevisiae*.**

<i>Ácidos Gordos (%)</i>						
10:0-14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	20:0-24:0	Referência
7,0	12,8	32,3	8,0	28,0	8,0	(van der Rest <i>et al.</i> , 1995)
1,2	37,7	21,5	3,3	36,4		(Tuller <i>et al.</i> , 1999)

#### 1.4.1.2 Esfingolípidos

O outro grupo de fosfolípidos, os esfingolípidos, apresenta várias diferenças estruturais em relação aos outros fosfolípidos. Os esfingolípidos na levedura *S. cerevisiae* são estruturalmente constituídos por uma base de cadeia longa ou LCB (do inglês, **Long Chain Base**), um ácido gordo, e um grupo polar. Neste organismo existem 3 tipos de esfingolípidos complexos, de acordo com a constituição do seu grupo polar: inositol fosfoceramida (IPC), manosilinositol fosfoceramida (MIPC) e manosildi-inositol fosfoceramida (M(IP)<sub>2</sub>C) (Carman e Zeimetz, 1996).

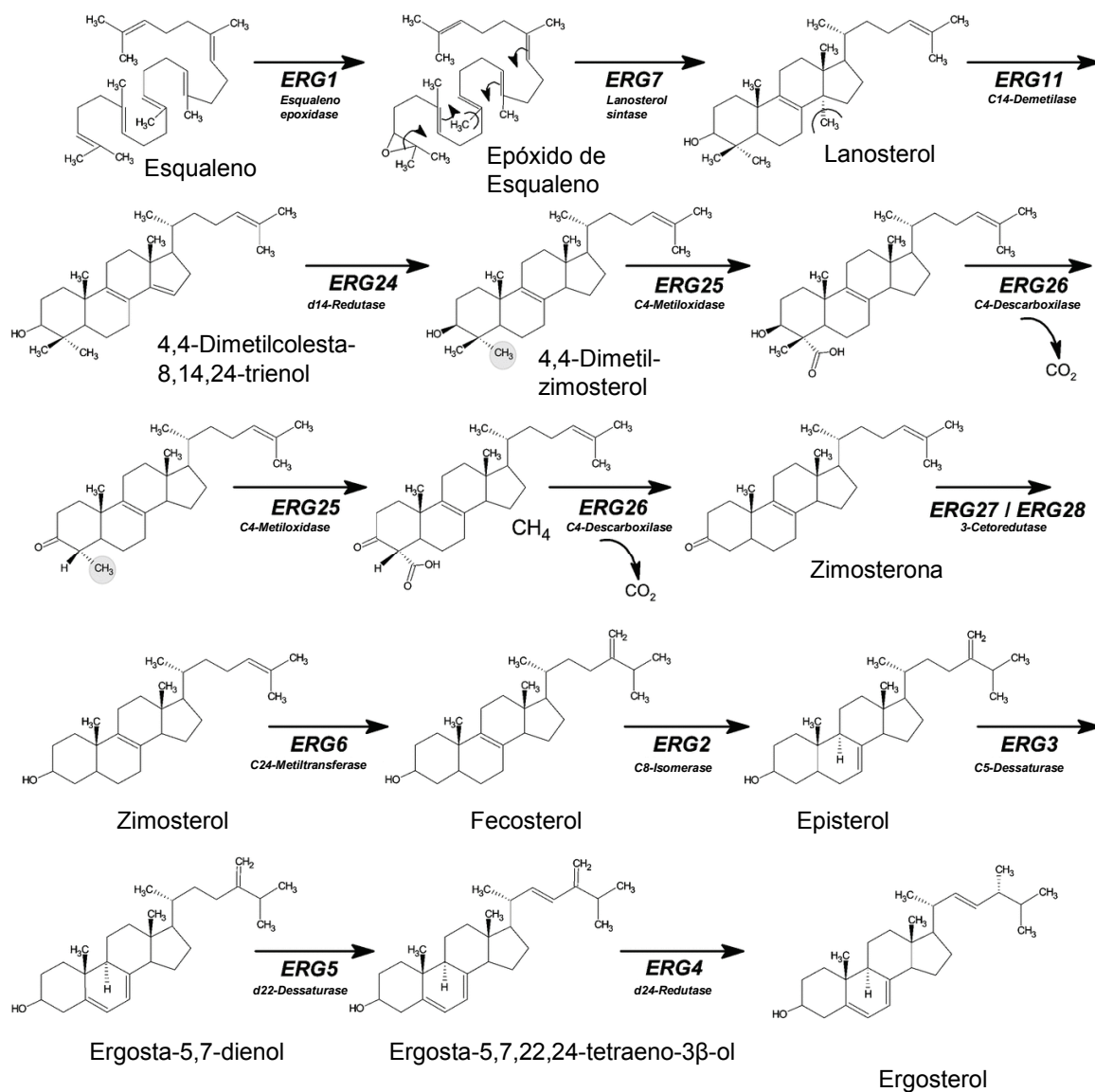
Relativamente às bases de cadeia longa, os dois tipos de LCB presentes em levedura são a di-hidroesfingosina e a fitoesfingosina, sendo que o comprimento da cadeia de carbonos destas bases de cadeia longa pode variar entre 18 e 20 carbonos (Dickson *et al.*, 2006; Guan e Wenk, 2006a). Quanto aos ácidos gordos eles variam no tamanho da cadeia de carbonos e hidroxilação, sendo que em *S. cerevisiae* o ácido gordo mais comum nos esfingolípidos apresenta 26 carbonos, é saturado e pode conter um ou dois grupos hidroxilo (Dickson *et al.*, 2006). Os esfingolípidos de levedura diferenciam-se dos de mamífero estruturalmente devido à presença de resíduos de manose e inositol no grupo polar bem como pelo tipo de ceramidas (van der Rest *et al.*, 1995). Os esfingolípidos encontram-se maioritariamente distribuídos na membrana plasmática (cerca de 90%) relativamente a outros locais celulares e constituem cerca de 30% dos fosfolípidos da membrana plasmática (Patton e Lester, 1991; van der Rest *et al.*, 1995).

Os esfingolípidos parecem estar envolvidos na resposta ao *stress* térmico, uma situação em que as LCB desempenham um papel de moléculas sinalizadoras (Dickson *et al.*, 2006). Os esfingolípidos também desempenham um papel na endocitose, no citosqueleto, na integridade da parede celular e na longevidade celular (Dickson *et al.*, 2006). Para além do importante papel em vários mecanismos de sinalização celular, os esfingolípidos desempenham ainda um importante papel na organização da membrana plasmática em conjunto com o ergosterol através da distribuição e organização de microdomínios denominados jangadas membranares (*membrane rafts*) (Dickson *et al.*, 2006).

#### 1.4.2 Esteróis

As leveduras apresentam como parte integrante dos seus lípidos um esteroide maioritário com uma função equivalente ao colesterol, embora com uma estrutura diferente – o ergosterol. Este composto, cuja via metabólica se sobrepõe em muito com a do colesterol, desempenha um papel relevante nas alterações de rigidez da membrana plasmática que se traduzem em alterações do movimento lateral e actividade das proteínas membranares (van der Rest *et al.*, 1995).

A via metabólica do ergosterol é bastante complexa (Figura 12) e tem sido alvo de vários estudos experimentais, nomeadamente com recurso a estirpes mutantes nos genes que codificam os enzimas da via e que permitiram identificar os efeitos da acumulação de metabolitos que não o ergosterol (Parks *et al.*, 1995; Gaber *et al.*, 1989; Parks *et al.*, 1995). O ergosterol é sintetizado nas células a partir de acetil-CoA, sendo necessárias mais de vinte reacções enzimáticas para a sua síntese.



**Figura 12 – Via biossintética do ergosterol pós-esqualeno. Adaptado de (Veen e Lang, 2004).**

Devido às suas diferenças estruturais relativamente ao colesterol, o ergosterol e a sua via biossintética são também particularmente estudados como alvos específicos para o tratamento de patologias de origem fúngica.

Para além da sua função estrutural na membrana, o ergosterol também tem, a concentrações muito baixas, uma função designada por *sparkling function* sendo essencial para o início da proliferação celular. Esta função, determinada em estirpes mutantes, indica que o ergosterol necessita de estar sempre presente nas células, em concentrações vestigiais, para que se dê início à proliferação celular (dai o nome *sparkling function*) (Gaber *et al.*, 1989).

Além do efeito observado em relação à resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com uma maior sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas estirpes mutantes *erg3Δ* e *erg6Δ* (Branco *et al.*, 2004), esta via metabólica parece estar igualmente envolvida na resistência a compostos tóxicos (Molzahn e Woods, 1972; Walker-Caprioglio *et al.*, 1990), em alterações de permeabilidade relativamente a determinados compostos (Welihinda *et al.*, 1994), em efeitos sobre a própria organização da membrana plasmática e até sobre a distribuição de proteínas na mesma (van der Rest *et al.*, 1995).

Relativamente à quantidade de ergosterol, o esterol maioritário presente na membrana plasmática, os valores que aparecem na literatura são muito diversos; as razões molares esteróis/fosfolípidos determinadas vão desde 0,30 a 3,31 (van der Rest *et al.*, 1995; Blagovic *et al.*, 2005). Embora exista esta elevada disparidade nos níveis de esteróis determinados na membrana, o valor da razão esteróis/fosfolípidos deverá ser inferior a 1, já que para razões superiores a 1 não é possível a formação de biomembranas estáveis (van der Rest *et al.*, 1995). O ergosterol, em conjunto com os esfingolípidos, assume um papel muito relevante na manutenção das jangadas membranares como veremos mais adiante no capítulo 1.4.3 (van der Rest *et al.*, 1995).

Foi ainda observado que a via do ergosterol apresenta interações com várias vias biossintéticas (Veen e Lang, 2004) não sendo a sua biossíntese regulada em exclusivo pelos seus próprios níveis celulares (Smith *et al.*, 1996). Relativamente às interações com a via biossintética do ergosterol, observou-se que alterações na via do ergosterol também se traduzem em alterações em outras vias como por exemplo a via dos esfingolípidos, ou seja, observou-se a existência de uma coordenação ao nível da regulação metabólica entre o metabolismo do ergosterol e o metabolismo dos esfingolípidos (Veen e Lang, 2004). Também se observou uma influência de alterações na via do ergosterol no metabolismo de ácidos gordos e glicerofosfolípidos (Veen e Lang, 2005).

Grande parte dos genes que codificam os enzimas da via do ergosterol são regulados globalmente por dois factores de transcrição principais: Ucp2p e Ecm22p. Estes dois factores de transcrição homólogos têm um papel regulador de toda a via biossintética sendo denominados SREBPs (do inglês, **s**terol **r**egulatory **e**lement **b**inding **p**roteins) (Vik e Rine, 2001b). Para além da regulação transcricional via Ucp2p e Ecm22p, existem outras possibilidades de regulação transcricional da via. Um dos pontos sujeitos a maior

regulação na via do ergosterol é o gene *ERG9* que codifica o enzima esqualeno sintase. Este gene é um dos pontos de regulação da via e é regulado por outros factores de transcrição como, por exemplo, Yap1p, Ino2/4p, Hap1p e Hap2/3/4p, o que reforça não só o papel que a síntese de esqualeno tem no metabolismo do ergosterol como a elevada sensibilidade desta via às mais diversas situações como por exemplo o *stress* (Kennedy *et al.*, 1999).

Por último, para além do importante papel estrutural que o ergosterol desempenha, deve também ser referida a importância de dois dos intermediários da sua via metabólica – o farnesil e o geranil, que desempenham um importante papel na modificação pós-traducional proteica, ao funcionarem como substrato para a prenilação (via prenil transferases) de várias proteínas como as proteínas Ras e as laminas nucleares (Casey e Seabra, 1996), importantes na sinalização celular.

### **1.4.3 Jangadas membranares**

A membrana plasmática não tem uma estrutura homogénea, apresentando zonas /microdomínios membranares, com funções específicas e uma localização espacial distinta, sendo genericamente denominados jangadas membranares. Estes microdomínios, constituídos por ergosterol, esfingolípidos e proteínas específicas, têm um importante papel na sinalização, polaridade, organização da membrana plasmática e na manutenção da actividade de proteínas (Wachtler e Balasubramanian, 2006). Para além do ergosterol e dos esfingolípidos, observou-se também que a fosfatidiletanolamina tem um papel importante na estabilidade destes microdomínios estruturais (Opekarova *et al.*, 2005)

As jangadas membranares apresentam algumas características estruturais particulares, nomeadamente a presença de glicerofosfolípidos com uma maior percentagem de ácidos gordos saturados (relativamente aos glicerofosfolípidos não associados às jangadas membranares), esfingolípidos e esteróis, que se traduz numa menor fluidez relativamente ao espaço membranar em volta deste domínio (Pike, 2003; Bagnat *et al.*, 2000). É provavelmente esta característica estrutural que é responsável por uma das características observadas experimentalmente no isolamento destes microdomínios – a insolubilidade em detergentes não iónicos (Pike, 2003). Observou-se ainda que esta mesma extracção com detergentes permitiu uma extracção diferencial de proteínas, revelando a existência de vários tipos de microdomínios e consequentemente vários tipos de jangadas membranares (Opekarova *et al.*, 2005). Mais concretamente, observa-se que na levedura *S. cerevisiae*, existem duas organizações completamente distintas de jangadas membranares (domínios MCP e MCC), que se pensa serem equivalentes aos microdomínios dos eucariotas superiores, e às quais se encontram associadas proteínas distintas (Grossmann *et al.*, 2007; Malinska *et al.*, 2003a; Malinska *et al.*, 2004).

Observou-se ainda que estes domínios não só são distintos no seu aspecto morfológico como também ao nível da constituição lipídica, já que foi observado que num dos domínios existe uma maior predominância de esteróis (MCC), (Grossmann *et al.*, 2007) enquanto que no outro domínio existe uma maior predominância de esfingolípidos (MCP) (Lee *et al.*, 2002; Gaigg *et al.*, 2005).

As jangadas membranares, para além do papel importante na organização membranar, desempenham um papel importante no transporte dessas mesmas proteínas para a membrana plasmática, tendo essa importância sido comprovada com a observação de que a depleção de ergosterol ou esfingolípidos afecta a associação das jangadas membranares a proteínas (Bagnat *et al.*, 2000; Pike, 2003).

Relativamente ao papel das jangadas membranares na resposta ao *stress* oxidativo observou-se que em linfócitos T, as espécies reactivas de oxigénio promovem a formação de jangadas membranares e também uma partição importante de tioredoxina nessas jangadas membranares em *S. cerevisiae* (Lu *et al.*, 2007; Chougnet e Hildeman, 2007; Takeuchi *et al.*, 2007). Foi ainda observado em células endoteliais que as jangadas membranares e o colesterol influenciam a resposta de sobrevivência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yang *et al.*, 2006) e a existência de uma associação entre aquaporinas e jangadas membranares em células de mamífero (Kobayashi *et al.*, 2006), o que é particularmente relevante dada a importância destas proteínas na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em alguns organismos tal como referido no capítulo 1.4.

#### **1.4.4 Proteínas presentes na membrana plasmática de *S. cerevisiae***

O número de proteínas membranares (integradas na membrana) em *S. cerevisiae* é estimado em cerca de 1000, embora se assuma que nem todas são expressas ao mesmo tempo tendo sido estimado um valor de 150 proteínas diferentes presentes em simultâneo na membrana plasmática (van der Rest *et al.*, 1995). Cerca de metade das proteínas presentes na membrana plasmática de *S. cerevisiae* apresentam uma função de transporte (desde o transporte de aminoácidos ao transporte de iões), sendo que existem outros grupos de proteínas ligadas à síntese da parede celular, transdução de sinal ou que fazem parte do citosqueleto (van der Rest *et al.*, 1995).

Com o avanço das técnicas de análise proteómica tem sido possível determinar com uma maior exactidão o conteúdo proteico de vários organelos, embora experimentalmente a análise proteómica da membrana plasmática de *S. cerevisiae* se revele bastante complexa dada a elevada hidrofobia das proteínas integrais de membrana, a qual dificulta o seu correcto isolamento (Wu e Yates, III, 2003; Navarre *et al.*, 2002). Na literatura, o número de proteínas identificadas na membrana plasmática de *S. cerevisiae* varia aproximadamente entre a meia centena e a centena de proteínas (Delom *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2002), Destas, só um pequeno número revela a existência de

domínios transmembranares, o que vem reforçar as dificuldades existentes no isolamento de proteínas membranares, tal como referido acima.

A aplicação das técnicas de análise proteómica permitiu já explorar as alterações de proteínas na membrana plasmática de *S. cerevisiae* em resposta ao agente antifúngico calcoflúor, tendo-se identificado proteínas com localização celular atípica as quais se pensava inicialmente não estarem associadas à membrana plasmática, sendo que esta situação se tem vindo a repetir noutros trabalhos experimentais (Delom *et al.*, 2006; Lopez-Villar *et al.*, 2006). Estas observações podem estar relacionadas com a existência de um elevado número de proteínas que estruturalmente não são proteínas de membrana, mas que devido a modificações pós-traducionais ou simplesmente por associação indirecta, se encontram ligadas à membrana plasmática.

De referir ainda que a própria distribuição de proteínas é dependente da distribuição assimétrica dos lípidos, já que muitas proteínas só se revelam funcionais quando associadas às jangadas membranares, encontrando-se distribuídas em exclusivo nestes microdomínios (Malinska *et al.*, 2003b). No conjunto das proteínas que se sabe estarem associadas às jangadas membranares incluem-se várias proteínas transportadoras, como, por exemplo, as proteínas Pma1p e Can1p, que ocupam microdomínios não sobreponíveis demonstrando assim a heterogeneidade dos microdomínios (Malinska *et al.*, 2003c). Outro exemplo de proteínas associadas às jangadas membranares é a RVS161p que desempenha um papel ao nível da polarização do citosqueleto de actina (Sivadon *et al.*, 1995).

#### **1.4.5 Seleção e transporte componentes para a membrana plasmática de *S. cerevisiae***

Outro dos aspectos mais importantes na manutenção da estrutura da membrana plasmática prende-se com a selecção e transporte (*sorting*) de lípidos e proteínas das restantes estruturas celulares para a membrana plasmática. Este aspecto é particularmente relevante, já que a membrana plasmática não possui capacidades biossintéticas *per se*, pelo que a sua composição é dependente quer de um complexo sistema de transporte celular, quer da troca espontânea de elementos constituintes da membrana

Relativamente aos lípidos já foram identificados vários tipos de transportadores, sendo que estes podem ser vesiculares ou não, ocorrendo neste último caso com o auxílio de proteínas transportadoras. Mesmo o próprio transporte vesicular necessita da presença de algumas proteínas específicas, que facilitam a transferência de lípidos entre as bicamadas. Dentro deste grupo, uma das proteínas mais estudadas é a proteína Sec14p que funciona como um transportador específico de fosfatidilinositol e fosfatidilcolina do complexo de Golgi para a membrana plasmática.

Interessantemente observou-se também que duas proteínas associadas à resistência a fármacos, a Pdr16p e a Pdr17p, induzem aparentemente alterações na composição lipídica de vários compartimentos celulares, quando estão ausentes (van den Hazel *et al.*, 1999). Esta observação pode indicar uma associação entre as proteínas envolvidas na resposta à presença de compostos tóxicos e a própria composição lipídica da célula funcionando talvez estas mesmas alterações como uma resposta *per se* aos compostos tóxicos (van den Hazel *et al.*, 1999).

Outro exemplo claro, desta diversidade de meios de transporte celular, é o transporte de ergosterol para a membrana plasmática de *S. cerevisiae*. Neste caso, os esteróis podem ser transportados por um complexo sistema vesicular, ou, alternativamente, via proteínas transportadoras específicas denominadas genericamente como proteínas da família OSH (do inglês **O**xysterol-binding **P**rotein **H**omologue) (Schulz e Prinz, 2007).

Relativamente às proteínas, o seu transporte para a membrana plasmática é realizado maioritariamente através de vesículas. Embora este sistema contemple a hipótese de que ocorra um *sorting* simultâneo de lípidos e proteínas, dado o transporte ser vesicular, esta não é a situação mais habitual (van der Rest *et al.*, 1995). O transporte de proteínas ocorre ao longo da via secretória. Os péptidos são sintetizados nos ribossomas associados ao retículo endoplasmático rugoso, daí os polipéptidos são transportados do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi sendo posteriormente transportados para a membrana plasmática através da via secretória (van den Hazel *et al.*, 1999). Como já foi referido acima (secção 1.4.3), também as jangadas desempenham um papel importante no transporte de proteínas para a membrana plasmática, o que vem reforçar a interacção entre lípidos e proteínas durante o transporte dos mesmos (Bagnat *et al.*, 2000).



## 2 Objectivos

A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na levedura *S. cerevisiae* é um importante fenómeno biológico devido às potenciais aplicações biomédicas que a elucidação deste mecanismo celular pode ter na compreensão das respostas biológicas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos eucariotas, nomeadamente em situações de inflamação. Estudos prévios (Branco *et al.*, 2004) revelaram que o processo adaptativo ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*, na presença de uma dose de 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário, está intrinsecamente relacionado com uma diminuição da permeabilidade da membrana plasmática ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta alteração da membrana foi ainda associada a uma diminuição da sua fluidez (Folmer *et al.*, 2008). É ainda conhecido de estudos prévios que estirpes de levedura com deleções em genes do metabolismo dos esteróis (*erg3Δ* e *erg6Δ*) são mais sensíveis ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004). Dada a reconhecida importância da membrana plasmática na adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, torna-se essencial a compreensão dos mecanismos subjacentes às alterações da permeabilidade da membrana observadas durante a resposta adaptativa.

O principal objectivo deste trabalho experimental foi tentar perceber quais os acontecimentos biológicos que levam a que haja uma diminuição da permeabilidade da membrana plasmática durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*. Considerando a elevada heterogeneidade da composição da membrana, devido à presença de vários tipos de lípidos e proteínas, bem como a necessária dependência de eventuais alterações da composição da membrana durante a resposta adaptativa de alterações da expressão génica, esta tarefa revelava-se complexa. Assim, considerou-se que uma primeira abordagem para atingir este objectivo deveria contemplar a análise das eventuais alterações da expressão génica e da composição da membrana plasmática. Deste modo durante este trabalho fez-se a análise por *microarrays* das alterações de expressão génica, assim como uma análise exaustiva da constituição lipídica e do proteoma da membrana plasmática durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os resultados obtidos foram separados pelos capítulos IV, V e VI desta tese. No capítulo IV são analisadas as alterações de expressão génica ao longo de 90 minutos de adaptação a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário. Foi feita uma análise global das funções e processos biológicos dos genes alterados, bem como a análise das variações ocorridas em genes especificamente associados ao metabolismo dos lípidos. No capítulo V são analisadas as alterações na composição lipídica da membrana plasmática em células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas mesmas condições que no capítulo IV, bem como a heterogeneidade da mesma. São analisadas as alterações lipídicas em termos de composição celular total e feita uma análise comparativa entre a composição membranar e a composição lipídica total. No capítulo VI são analisadas as alterações no proteoma da membrana plasmática em células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas condições definidas no capítulo

IV, tendo em conta não só as proteínas directamente incorporadas na membrana como também as proteínas associadas (covalentemente ou não) à mesma.

No capítulo VII encontra-se uma discussão final com a integração dos resultados obtidos.

### 3 **Materiais e métodos**

#### 3.1 **Materiais**

A estirpe “selvagem” de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada ao longo do trabalho experimental foi a BY4741 (MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0), e foi adquirida na EUROSCARF (Brachmann *et al.*, 1998). As restantes estirpes mutantes (com excepção da estirpe *fas1Δ*) utilizadas ao longo do trabalho experimental são derivadas desta mesma estirpe encontrando-se descritas no quadro abaixo, tendo também sido adquiridas na EUROSCARF. A estirpe mutante *fas1Δ* foi obtida a partir da estirpe “selvagem” diplóide BY4743.

**Quadro 11 – Estirpes mutantes utilizadas ao longo do trabalho experimental.**

<i>Estirpe</i>	<i>ORF</i>	<i>Genótipo</i>
<i>ecm22Δ</i>	YLR228c	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1;leu2Δ0; met15Δ0;ura3Δ0;</i> <i>YLR228c::kanMX4</i>
<i>upc2Δ</i>	YDR213w	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1;leu2Δ0; met15Δ0;ura3Δ0;</i> <i>YDR213w::kanMX4</i>
<i>Y03153Δ</i>	YBR016w	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1;leu2Δ0; met15Δ0;ura3Δ0;</i> <i>YBR016w::kanMX4</i>
<i>Y06532Δ</i>	YML131w	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1;leu2Δ0; met15Δ0;ura3Δ0;</i> <i>YML131w::kanMX4</i>
<i>tfs1Δ</i>	YLR178c	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1;leu2Δ0; met15Δ0;ura3Δ0;</i> <i>YLR178c::kanMX4</i>
<i>hsp12Δ</i>	YFL014w	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1;leu2Δ0; met15Δ0;ura3Δ0;</i> <i>YFL014w::kanMX4</i>
<i>fit2Δ</i>	YOR382w	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1;leu2Δ0; met15Δ0;ura3Δ0;</i> <i>YOR382w::kanMX4</i>
<i>fas1Δ</i>	YKL182w	BY4743; MAT a/MATa; <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ</i> <i>0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0;</i> <i>YKL182w::kanMX4/YKL182w</i>
<i>srt1Δ</i>	YMR101c	BY4741; MAT a; <i>his3Δ1;leu2Δ0; met15Δ0;ura3Δ0;</i> <i>YMR101c::kanMX4</i>

Os marcadores de massa molecular para SDS-PAGE, o *kit* ECL, o *CyScribe Post-labelling kit* e o material para a electroforese bidimensional foram obtidos da GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK). As esferas de vidro (425-600 μm), o anticorpo anti-actina (A-5060), o catalase, o glucose oxidase, a digitonina, os aminoácidos do meio de crescimento, os padrões de ácidos gordos metilados, os padrões de esteróis e o *kit* de

silanização dos mesmos foram obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA). O extracto de levedura, a peptona, o YNB e agar foram obtidos da Difco (Detroit, MI, EUA). A membrana de nitrocelulose 0,45 mm foi obtida da Schleider and Schnell (Dassel, DE). Os anticorpos secundários (anti-rabbit, [SC 2004] e anti-mouse, [SC 2005]) e o anticorpo anti-Pma1p (SC-57978) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Delaware, CA, EUA). O anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina (MCA78S) foi obtido da Serotec (Munich, DE) e o anticorpo secundário anti-rat foi obtido da Jackson (Suffolk, UK). O kit de extracção de RNA *RiboPure-yeast* foi obtido da Ambion (Austin, TX, EUA) e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi obtido da Merck (Darmstadt, DE). A análise dos ácidos gordos e esteróis foi efectuada num cromatografo a gás Agilent 6890 equipado com um autosampler Agilent 7683, ligado a um espectrómetro de massa Agilent 5973 N da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA). Todas as análises foram efectuadas numa coluna capilar TRB-5MS da Teknokroma (Barcelona, ES) (30 m × 0,25 mm × 0,30  $\mu$ m espessura do filme). O gás de arrasto utilizado foi hélio a uma pressão de 5,28 psi. Todas as amostras foram injectadas em modo *splitless* e em alíquotas de 2  $\mu$ l.

## 3.2 Métodos experimentais

### 3.2.1 Condições de crescimento da estirpe.

Os ensaios foram realizados em meio sintético completo – meio SC (do inglês **Synthetic Complete**), excepto onde referido em contrário. O meio SC é constituído por YNB 6.8% (m/v), glucose 2% (m/v) e aminoácidos – 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), ácido glutâmico 0,01% (m/v), valina 0,015% (m/v), ácido aspártico 0,01% (m/v), adenina 0,0025% (m/v), serina 0,04% (m/v), leucina 0,01% (m/v), triptofano 0,005% (m/v), histidina 0,01% (m/v), treonina 0,02% (m/v) e uracilo 0,0025% (m/v).

Para o armazenamento das estirpes foi ainda usado meio YPD sólido (extracto de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v) e glucose 2% (m/v)), suplementado com agar 2% (m/v).

As estirpes foram armazenadas em placas de meio YPD sólido, a 4 °C (com um máximo de duas passagens para uma nova placa a cada 20 dias), ou em suspensão numa solução de glicerol a 20% (v/v), a -80 °C.

Uma vez inoculadas em meio líquido SC, o crescimento das células deu-se a 30 °C, num agitador orbital a 160 rpm. Todos os estudos foram realizados em fase de crescimento exponencial, partindo de culturas a 0,5 OD<sub>600</sub> ou ON (do inglês **Over Night**), após a ocorrência de pelo menos dois ciclos de duplicação.

### **3.2.2 Estados estacionários de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

A adaptação de *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi induzida através da exposição de células em fase de crescimento exponencial (0,15 OD<sub>600</sub>) (1 OD<sub>600</sub>= 2-3 x 10<sup>7</sup> células) a uma dose sub-letal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM) em estado estacionário até um período máximo de 90 min tal como referido anteriormente (Branco *et al.*, 2004).

O estado estacionário de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi criado através da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à concentração requerida em conjunto com o enzima glucose oxidase de modo a obter uma actividade de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte do enzima equivalente ao consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte das células. Deste modo, consegue-se a manutenção da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a um nível constante ao longo dos ensaios experimentais.

De modo a confirmar que o estado estacionário gerado era o da concentração pretendida, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente na cultura foi quantificado ao longo do tempo de adaptação. Todas as medições da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram efectuadas num eléctrodo de Clark (*Hansatech Instruments*). A medição foi feita retirando uma alíquota de 500 µl da cultura, adicionando 500 µl de água e adicionando de seguida cerca de 10 µl de uma solução de catalase 8 mg/ml (equivalente a aproximadamente 80 U), medindo assim o oxigénio libertado pela dismutação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tal como descrito anteriormente (Branco *et al.*, 2004).

O sinal obtido no eléctrodo de Clark foi comparado com o obtido com uma curva de calibração usando soluções padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, feitas a partir de uma solução *stock* (aproximadamente 9 M), cuja concentração foi determinada pelo valor de absorvência a 240 nm ( $\epsilon = 43,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A curva de calibração foi efectuada diariamente de modo a obter uma quantificação exacta da quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no dia da experiência.

### **3.2.3 Determinação da constante de permeabilidade da membrana plasmática ao longo da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

A análise das alterações das constantes de permeabilidade da membrana plasmática ao longo da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi feita como descrito em trabalhos anteriores do grupo (Branco *et al.*, 2004; Sousa-Lopes *et al.*, 2004). Para isso foram efectuados ensaios para a medição do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células intactas e permeabilizadas com digitonina considerando a aproximação de que o consumo medido corresponde à actividade enzimática do catalase, sendo esta a maior fonte de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*. Com base nestas duas velocidades de consumo e no conceito de latência enzimática foi efectuada a determinação do gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bem como da constante de permeabilidade da membrana plasmática para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

O gradiente foi então calculado com base na fórmula 1/R, onde R corresponde à razão entre o consumo medido para as células intactas e o consumo medido para as células

permeabilizadas. A constante de permeabilidade  $k_{perm}$  foi calculada com base na equação  $k_{perm} = [R/(1 - R) \times k_{catabolismo}]$  onde o termo  $k_{catabolismo}$  corresponde à velocidade de consumo intracelular de  $H_2O_2$ .

### **3.2.4 Efeito da lovastatina na resistência da *S. cerevisiae* ao $H_2O_2$**

As células foram inoculadas a 0,05 OD<sub>600</sub> em meio SC durante 18 h a 28 °C, com agitação a 160 rpm. A estas culturas foram adicionadas diferentes concentrações de lovastatina (10, 40 e 100 µg/ml) a partir de uma solução *stock* de 20 mg/ml em NaOH etanólico [etanol 15% (v/v), NaOH 0,25% (m/v)] (Lorenz e Parks, 1990). As células foram recolhidas por centrifugação a 1000 g durante 2 min, lavadas com água bidestilada estéril, ressuspendidas a densidades celulares iguais, e diluídas em série em água bidestilada estéril (diluições de 1/10). As células diluídas foram aplicadas em alíquotas de 3 µl em caixas de YPD contendo diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . Após dois dias de crescimento procedeu-se à análise visual das caixas. As caixas contendo  $H_2O_2$  foram sempre preparadas no mesmo dia da experiência de modo a evitar a degradação do mesmo e foi sempre feito um controlo com placas sem  $H_2O_2$ .

### **3.2.5 Análise de mRNA por microarrays e por Northern blot**

#### 3.2.5.1 Recolha de células e isolamento do RNA total

Com vista à obtenção de RNA total, procedeu-se à recolha de amostras de culturas (75 ml) de células expostas ao  $H_2O_2$  em fase de crescimento exponencial e respectivo controlo ao longo dos vários tempos de adaptação a uma dose de sub-letal (150 µM) tendo o estado estacionário sido sempre iniciado com as células a uma densidade óptica de 0,150 OD<sub>600</sub>.

As células foram então recolhidas por centrifugação a 1000 g durante 2 min, tendo sido o sedimento resultante ressuspendido em água destilada estéril e colocado em tubos *ependorf*. O sobrenadante foi descartado através de um *short spin*, tendo-se procedido de seguida ao armazenamento das células em azoto líquido. Para a extracção do RNA total recorreu-se ao *kit* Ribo Pure-yeast (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante, para se obter RNA sem contaminações (sem DNA e RNase).

#### 3.2.5.2 Análise por *microarrays*

Para a análise dos *microarrays* foram usados 30 µg de RNA total (o equivalente a aproximadamente 0,5 µg de mRNA). A síntese e marcação do cDNA de *S. cerevisiae* com os fluorocromos Cy3-dUTP e Cy5-dUTP foi feita recorrendo ao *kit* *CyScribe Post-labelling*

*kit* da Amersham Biosciences e de acordo com as instruções do fabricante. O efeito específico de cada fluorocromo sobre a quantificação causado pela diferente emissão de fluorescência entre o Cy5 e o Cy3 foi eliminado com recurso à troca de fluorocromos em duas experiências independentes.

Os cDNAs diferentemente marcados das células controlo e adaptadas foram combinados tendo-se procedido à hibridação desta mistura com a matriz dos *microarrays*. Os processos de pré-hibridação, hibridação e lavagem dos *chips* foram efectuados de acordo com protocolos experimentais presentes na literatura (Viladevall *et al.*, 2004).

Os *microarrays* (fornecidos pelo laboratório do Professor Enrique Herrero da Universidade de Lérida) foram analisados num *scanner* Genepix 4100 (*Molecular Devices*) e os dados analisados com recurso ao software Genepix 6.0 (*Molecular Devices*). A indução ou repressão dos níveis de mRNA só foi considerada significativa, para este estudo, quando as razões entre os sinais dos fluorocromos eram superiores a 2,0 (no caso da indução) ou alternativamente inferiores a 0,5 (no caso da repressão) em duas experiências independentes.

#### 3.2.5.3 Análise por *Northern blot*

Os ensaios de *Northern blot*, electroforese de RNA, sondas marcadas com fósforo  $^{32}\text{P}$ , hibridação e respectiva detecção do sinal foram efectuados de acordo com protocolos definidos anteriormente pelo grupo (Cyrne *et al.*, 2003).

As sondas para os mRNA foram sintetizadas recorrendo a PCR (do inglês ***Polymerase Chain Reaction***) usando DNA genómico de levedura e oligonucleótidos cuja sequência levou à amplificação específica da região codificante dos genes em estudo. Os oligómeros iniciadores utilizados na preparação das sondas por PCR foram os representados no Quadro 12.

**Quadro 12 – Sequências dos vários oligómeros iniciadores usados na amplificação da sequência dos genes por PCR**

<i>Genes</i>	<i>Oligómeros iniciadores</i>
<i>ERG1</i>	5'- GAAAAACATATCGAGAAAAGGG -3' 5'- CGGTATAACCGGTAACAGG -3'
<i>ERG3</i>	5'- GAAAAATATTCGTCTAGATTTGAG -3' 5'- CAAGATGCTGGAACGAGGC -3'
<i>ERG6</i>	5'- GTAGGCAGCATAAGATGAGTG -3' 5'- CTGAAATGGAAAGAGGAACC -3'
<i>U2</i>	5'-GATCAAGTGTAGTATCTGTTC-3' 5'-GAACGACTCCACAAGTGCG-3'

A mistura reaccional, usada durante a amplificação consistiu em: 200 ng de DNA genómico de *S. cerevisiae*; 5 µl de cada um dos oligómeros a uma concentração de 10 pmol/µl; 3,8 µl de dNTP 2mM; 5 µl de tampão Mix completo 10x concentrado [para uma concentração final de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16 mM, Tris HCl 67 mM pH 8,8, Tween-20 0,01% (v/v), MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM] ; 1 µl de Taq polimerase a 5 U/µl (Bioron), tendo sido adicionada água estéril até um volume final de 50 µl.

Os mRNAs foram amplificados por PCR de acordo com os programas descritos no Quadro 13.

**Quadro 13 – Programa de amplificação via PCR dos fragmentos dos genes analisados por Northern blot.**

<i>Genes</i>	<i>Programa de amplificação</i>
<i>Erg1, Erg3, Erg6</i>	95° - 4 min; (95° -1 min; 50° - 1 min; 72°- 1,5 min) x 30 ciclos; 72° - 10 min
<i>U2</i>	95°- 4 min; (95° -1 min; 50° - 1 min; 72°- 3 min) x 30 ciclos; 72° - 10 min

Como controlo interno da quantidade de RNA aplicado no gel foi usada uma sonda para o snRNA U2 tal como referido anteriormente (Matias *et al.*, 2007). A quantificação dos níveis de mRNA foi feita a partir da digitalização dos resultados obtidos nos autoradiogramas utilizando o *software ImageJ* (Rasband, 1997), tendo os valores sido normalizados a partir dos níveis do snRNA U2.



### **3.2.6 Isolamento da membrana plasmática**

O isolamento da membrana plasmática de *S. cerevisiae* foi efectuado de acordo com (Panaretou e Piper, 2006) com umas pequenas modificações. Partindo de um litro de cultura em fase de crescimento exponencial, a aproximadamente 0,3 OD<sub>600</sub>, procedeu-se à recolha das células por centrifugação a 5000 g durante 5 min, sendo que a partir deste momento todo o isolamento foi feito a 4º C. Após a centrifugação as células foram lavadas 1 vez com uma solução de sacarose 0,4M em solução tampão imidazole-HCl, 25 mM a pH 7,0. Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em 1,5 ml da mesma solução tampão, suplementada com um *cocktail* de inibidores de proteases (PMSF 100 mM, leupeptina 1 mg/ml, benzamidina 0,15 mg/ml e pepstatina 0,1 mg/ml – concentrações finais). A esta mistura foram adicionadas esferas de vidro (2 ml) e procedeu-se à lise celular agitando esta mistura no *vortex* 3 vezes durante 2 min, alternando sempre com 2 min em gelo de modo a manter a mistura a uma temperatura baixa.

Com vista à separação do extracto celular contendo membranas plasmáticas das esferas de vidro e células não lisadas, efectuou-se uma centrifugação a baixa velocidade do homogenato (530 g durante 20 min) e recolheu-se o sobrenadante. Este sobrenadante foi de seguida centrifugado a 22000 g durante 30 min, de modo a obter-se um sedimento contendo as membranas plasmáticas ainda impuras isoladas da fracção microsomal. Este sedimento foi ressuspendido em 2 ml de solução tampão de imidazole-HCl 25 mM a pH 7,0 ao qual foi adicionado o *cocktail* de inibidores nas concentrações finais já referidas anteriormente. Esta suspensão foi aplicada num gradiente descontínuo de sacarose, constituído por 3 camadas de 12 ml de soluções de sacarose (2,25 M, 1,65M e 1,1M) em tampão de imidazole-HCl 25mM a pH 7,0, com vista à obtenção de uma fracção constituída na sua totalidade por membranas plasmáticas de *S. cerevisiae*. Este gradiente foi centrifugado a 80000 g durante 18 h num rotor SW 28 (Beckman Coulter, Inc.). As membranas plasmáticas, na sua forma mais pura, foram recolhidas a partir do interface entre as camadas de sacarose 2,25M e 1,65 M. O extracto puro foi ressuspendido em solução tampão imidazole-HCl 25mM a pH 7,0, de modo a reduzir a contaminação por sacarose e, de seguida centrifugado a 30000 g durante 40 min. O sedimento final foi ressuspendido muito cuidadosamente em solução tampão imidazole-HCl 25mM a pH 7,0 para posterior análise. Caso se pretendesse armazenar as membranas plasmáticas, este mesmo sedimento era ressuspendido em solução constituída pela solução tampão imidazole-HCl 25mM, a pH 7,0 e glicerol (1:1 v/v) sendo posteriormente guardado a -80ºC.

### 3.2.6.1 Determinação do grau de pureza das membranas plasmáticas

A pureza da membrana plasmática foi determinada através da actividade do H<sup>+</sup> ATPase membranar (Koland e Hammes, 1986). Esta actividade é um bom indicador do grau de pureza das membranas obtidas já que a actividade deste enzima é facilmente diferenciada dos restantes ATPases devido à sua inibição específica pelo vanadato (Koland e Hammes, 1986).

A 900 µl de uma mistura reaccional em solução tampão Mes/Na 0,1M, pH 6,0 (de acordo com (Koland e Hammes, 1986), Quadro 14), contendo entre 40 a 90 µl de amostra, e incubada previamente a 30°C durante 5 min, adicionaram-se 100 µl de ATP 20 mM de modo a iniciar a reacção durante um tempo pré-definido. A mesma foi terminada com a adição de 2 ml uma solução de ácido sulfúrico 2% (v/v), molibdato de amónio 5 g/l e SDS 5 g/l, seguindo-se um período de incubação de 5 min a 30°C. À mistura anterior adicionaram-se por último 20 µl de uma solução de ascorbato a 10% (m/v) e após um período de incubação de 5 min a 30°C foi medida a absorvência a 750 nm. Os valores obtidos (normalizados à quantidade de proteína) permitiram determinar o ganho de actividade enzimática específica das membranas plasmáticas puras relativamente a um extracto celular em bruto (homogenato obtido após a lise das células com esferas de vidro).

**Quadro 14 – Composição da mistura reaccional para análise da actividade do enzima ATPase da membrana plasmática de *S. cerevisiae*.**

<i>Concentrações stock</i>	<i>Mistura reaccional c/ vanadato</i>	<i>Mistura reaccional s/ vanadato</i>
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	100 µl	100 µl
NaN <sub>3</sub> 50 mM	100 µl	100 µl
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 mM	100 µl	-
Fracção membranas/homogenato	40 a 90 µl	

### 3.2.7 Extracção de lípidos

Os lípidos totais celulares foram extraídos de células de *S. cerevisiae* em fase de crescimento exponencial ao longo da sua adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que nunca foi superior a 90 min. Foram recolhidas 15 OD<sub>600</sub> de células por centrifugação a 5000 g durante 5 min, sendo que a partir deste momento todo o isolamento foi feito a 4°C, de modo a reduzir o metabolismo e degradação celular a um mínimo. Após a centrifugação, as células foram lavadas uma vez com água bidestilada estéril. Após a lavagem procedeu-se à ressuspensão das células em 1 ml de solução tampão de fosfato de potássio 0,1M a pH 7,4, seguida da lise das mesmas através de agitação no vortex com esferas de vidro (1 ml) durante 2 min seguidos de 2 min em gelo durante 3 vezes. Após a lise das células, os

lípidos foram extraídos do homogenato resultante recorrendo ao método de Folch (Folch *et al.*, 1957). Para isso, os lípidos foram extraídos com a adição de 20 volumes de uma mistura clorofórmio/metanol (2:1, v/v) e o extracto lavado de seguida com a adição de uma solução aquosa de KCl 0,88 % (m/v), tendo-se formado duas fases - uma orgânica e uma aquosa. Após remoção da fase aquosa (fase superior) a fase orgânica foi seca sob atmosfera de azoto e dissolvida no solvente adequado. Os lípidos da membrana plasmática foram extraídos exactamente do mesmo modo - método de Folch.

#### 3.2.7.1 Análise dos ácidos gordos

Os ácidos gordos foram obtidos a partir de extractos lipídicos e metilados em simultâneo com a sua extracção para posterior análise por GC-MS. Os extractos lipídicos secos obtidos de acordo com 3.2.7, ficaram durante 24 h a 50 °C dissolvidos em 3 ml de uma mistura de metanol/HCl 5:1 (v/v) (Christie, 1989) em tubos de vidro rolhados. Após arrefecimento da solução anterior, foram adicionados 5 ml de uma solução aquosa de NaCl a 5 % (m/v) e os ácidos gordos extraídos desta solução com 5 ml de n-hexano (2 vezes). O extracto de hexano foi lavado com 4 ml de uma solução de bicarbonato de potássio a 2% (m/v) e a fase orgânica resultante seca sob atmosfera de azoto.

A garantia de uma metilação total dos ácidos gordos extraídos pelo método referido acima foi assegurada com a utilização de uma mistura de trifluoreto de boro em metanol (Morrison e Smith, 1964). Assim, ao extracto de ácidos gordos seco sob atmosfera de azoto foi adicionado 1 ml de uma solução de trifluoreto de boro em metanol 14% (m/v), e os tubos colocados em banho de areia a 100°C durante 15 min. Os ácidos gordos metilados foram, após arrefecimento da mistura, extraídos com 1 volume de água (1 ml) e 2 volumes de n-pentano (2 ml) com o auxílio de forte agitação usando um *vortex*. Após a formação das duas fases, procedeu-se à recolha da fase orgânica e posterior secagem sobre atmosfera de azoto, tendo os extractos sido dissolvidos em 200 µl de n-hexano, para posterior análise por GC-MS.

#### 3.2.7.2 Análise dos esteróis

Os extractos lipídicos obtidos tal como descrito em 3.2.7, foram também usados para a análise do conteúdo em esteróis, como descrito anteriormente (Swain *et al.*, 2002). Os extractos lipídicos secos foram sujeitos a saponificação, sendo dissolvidos em 1,5 ml de metanol, 1 ml de pirogalol a 0,5% (m/v), 1 ml de KOH a 60% (m/v) e aquecidos sob refluxo durante 2 h a 85°C. Após arrefecimento, os esteróis foram extraídos 2 vezes com 3 ml de uma mistura de éter de petróleo/n-hexano (1:1, v/v) e a fase orgânica obtida foi seca sob atmosfera de azoto (Swain *et al.*, 2002).

Este extracto seco contendo os esteróis, foi posteriormente dissolvido numa mistura de diclorometano/ciclohexano (1:1, v/v) e analisado por GC-MS. Relativamente aos esteróis obtidos a partir de extractos totais, os mesmos foram submetidos após o processo de saponificação a uma reacção de trimetilsilanização com 200 µl de uma mistura 1:1 (v/v) de piridina e BSTFA:TMCS 99:1 (Phillips *et al.*, 1999), tendo os esteróis silanizados sido analisados posteriormente por GC-MS.

### 3.2.7.3 Análise por GC-MS

A análise dos ácidos gordos e esteróis por GC-MS foi efectuada com alíquotas de 2 µl. O procedimento de separação dos componentes dos vários extractos foi diferente de acordo com a complexidade e o tipo de misturas de lípidos, como se pode observar no Quadro 15.

**Quadro 15 – Condições de separação dos vários componentes lipídicos por GC-MS.**

	<i>Esteróis da membrana plasmática</i>	<i>Esteróis totais</i>	<i>Ácidos gordos da membrana plasmática</i>
Temperatura do Forno	150°C (1min.) 150°C a 300°C (10º/min) 300°C (15 min.)	150°C (1min.) 150°C a 250°C (10º/min) 250°C a 300°C (5º/min) 300°C (15 min)	100°C (1min.) 150°C a 300°C (10º/min) 300°C (10 min.)

A identificação qualitativa dos compostos foi feita utilizando padrões e/ou pela comparação dos espectros de massa obtidos com os existentes em bibliotecas comerciais.

A análise quantitativa do ergosterol e esqualeno foi feita usando o colesterol como padrão interno e usando curvas de calibração com ergosterol e esqualeno de origem comercial. Quanto à determinação das quantidades relativas de cada espécie de esterol, esta foi feita recorrendo à integração de um ião comum cujo sinal foi corrigido para possíveis variações não lineares com a concentração – 363 m/z para esteróis silanizados e 69 m/z para os esteróis não silanizados.

A análise quantitativa dos ácidos gordos foi efectuada com recurso aos factores de resposta dos ésteres metílicos dos mesmos, usando ésteres metílicos comerciais. Como padrão interno foi utilizado o éster metílico de um ácido gordo, inexistente em levedura (C17:0). A excepção a este procedimento experimental, foi a análise dos níveis do ácido gordo metilado metil-2-hidroxi hexacosanoato, já que não foi encontrado um padrão comercial deste ácido gordo metilado. A quantificação deste ácido gordo foi efectuada recorrendo ao um factor de resposta calculado em função do ião 367 m/z (um dos iões mais abundantes nos ácidos gordos C26:0 e 2-OH-C26:0). A elevada abundância deste

ião tanto na espécie hidroxilada como na espécie não hidroxilada, bem como a forte semelhança estrutural entre os compostos levou a que se considerasse esta aproximação experimental como a mais correcta, dada a ausência de um padrão comercial.

#### 3.2.7.4 Análise dos níveis de fósforo

Os níveis totais de fósforo dos lípidos da membrana plasmática foram determinados usando um ensaio de Bartlett (Dittmer e Wells, 1969). Aos extractos lipídicos secos obtidos de acordo com o capítulo 3.2.7, adicionaram-se 0,4 ml de ácido perclórico. Esta mistura foi aquecida em banho de areia numa posição oblíqua de modo a manter o refluxo até que a solução, inicialmente castanha, passasse a apresentar uma cor clara e límpida. Após arrefecimento das amostras, foram adicionados 2,4 ml de molibdato de amónio 0,44% (m/v) e 2,4 ml de reagente redutor (reagente de Fiske-Subbarow). Os tubos foram agitados no *vortex* e aquecidos de seguida em água em ebulição durante 10 min sendo lida a absorvência das amostras a 750 nm após o arrefecimento das mesmas. A curva de calibração utilizada nos ensaios foi feita usando como padrão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  no intervalo de concentrações entre 5 e 130 nanomoles de fósforo e os valores finais foram normalizados para quantidade de proteína total das amostras.

#### **3.2.8 Determinação de proteína**

Os níveis de proteína foram determinados, usando o método de Lowry modificado (Peterson, 1977) e albumina de soro bovino (BSA) como padrão (entre 10 e 50  $\mu\text{g}$  de BSA). A 1 ml de reagente de cobre e tartarato [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] adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de amostra de proteína diluída numa proporção variável em água destilada até um volume final de 2 ml. Após agitação e 10 min de reacção à temperatura ambiente, foram adicionados 0,5 ml de uma solução de reagente de Folin diluído 1/7 seguido de agitação imediata, tendo-se procedido à medição da Absorvência a 750nm após 60 min de reacção.

#### **3.2.9 Análise proteómica da membrana plasmática de *S. cerevisiae***

##### 3.2.9.1 Extracção das proteínas da membrana plasmática

Após centrifugação da banda correspondente à membrana plasmática a 30000 g durante 40 min tal como descrito no capítulo 3.2.6, procedeu-se à eliminação cuidadosa do sobrenadante. O sedimento correspondente à membrana plasmática pura (Capitulo 3.2.6) foi ressuspendido cuidadosamente num volume mínimo de água *Millipore* estéril

(tipicamente 1 ml). Após quantificação das proteínas, foi colocado num tubo *ependorf* uma quantidade de suspensão de membranas equivalente a 100 µg de proteína. De modo a extrair parcialmente as membranas dos seus lípidos, adicionou-se 2 volumes de éter etílico, e agitou-se os tubos no *vortex*. Os tubos foram deixados em repouso de modo a formar duas fases, sendo a fase orgânica (contendo lípidos) recolhida e descartada e deixando secar possíveis resíduos da mesma ao ar. À fase aquosa, contendo as proteínas das membranas, adicionou-se 1 volume de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (m/v) e DTT 40 mM em acetona, para precipitar as proteínas. Após mistura da suspensão com auxílio do *vortex*, colocou-se a -20°C durante 45 min para precipitar as proteínas.

Os tubos foram centrifugados durante 15 min a 10000 RPM (4°C) numa centrífuga refrigerada *ependorf* de modo a obter um sedimento de proteínas precipitadas. Após lavagem do sedimento com uma solução de acetona fria com DTT (20 mM) 2 vezes, deixou-se secar os tubos ao ar para eliminar os restos de acetona.

### 3.2.9.2 Electroforese bidimensional das proteínas da membrana plasmática de *S. cerevisiae*

O sedimento proteico obtido em 3.2.9.1 foi dissolvido com 250 µl de uma solução constituída por ureia 8M, CHAPS 0,5% (m/v), DTT 0,2% (m/v), solução IPG 0,5% (v/v) e azul de bromofenol 0,002% (m/v). Após a dissolução completa das proteínas, colocou-se a amostra no sarcófago e colocou-se a tira da 1ª dimensão sobre a amostra com o cuidado de não deixar bolhas, cobrindo no final o sistema com óleo. As tiras de 1ª dimensão (*GE Healthcare*) eram de 13 cm de comprimento e com um intervalo de pI entre 4-7 e 3-10. Após 12 h de hidratação passiva as tiras foram sujeitas ao processo de focagem isoeléctrica num aparelho Ettan-IPGphor (*GE Healthcare*) a 20 °C, nas condições referidas no Quadro 16.

**Quadro 16 – Condições experimentais usadas no processo de focagem isoeléctrica**

<i>Voltagem (V)</i>	<i>Tempo (min)</i>
150	60 min
300	60 min
600	60 min
600-4000	90 min (gradiente)
4000	240 min

Após a focagem isoeléctrica as tiras foram colocadas consecutivamente em 10 ml de duas soluções de equilíbrio constituídas por SDS 2% (m/v), Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, ureia 6M, glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (m/v), durante 15 min cada;

para a solução de redução a solução de equilíbrio foi suplementada com 1% (m/v) de DTT e para a solução de alquilação foi suplementada com 2,5% (m/v) de iodoacetamida. Após o equilíbrio com as soluções anteriores, as tiras foram colocadas sobre um gel de acrilamida previamente polimerizado e cobertas com uma solução de Tris/Glicina/SDS [Trizma base 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% (m/v)] com agarose 0,5% (m/v) sendo de seguida sujeitos a electroforese (Laemmli, 1970).

Os géis desnaturantes de acrilamida utilizados foram géis de gradiente com uma percentagem de acrilamida, a variar entre os 7,5% (m/v) e os 20% (m/v), com 16 x 14 x 0,15 cm de dimensão. Para este tamanho de gel o volume de cada uma das soluções era de 17,5 ml, encontrando-se a composição das mesmas (para um volume de 60 ml) descritas abaixo (Quadro 17).

**Quadro 17 – Composição das soluções de acrilamida utilizadas na segunda dimensão de electroforese a duas dimensões**

	<i>Solução de acrilamida 7,5% (m/v) (para 60 ml)</i>	<i>Solução de acrilamida 20% (m/v) (para 60 ml)</i>
Tris 1,5 M pH 8,9	15 ml	15 ml
SDS 10% (m/v)	0,6 ml	0,6 ml
H <sub>2</sub> O destilada	23,7 ml	1,8 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%/0,1% (m/v)	15 ml	39,9 ml
Bis-acrilamida 1,5% (m/v)	6 ml	-
Glicerol	-	3 ml
<i>Volumes de TEMED e PSA adicionados para 17,5 ml de cada uma das misturas de acrilamida</i>		
TEMED	10 µl	6,4 µl
PSA 10% (m/v)	100 µl	64 µl

A electroforese decorreu durante cerca de 16h-18h, até a linha da frente do gel chegar ao fim do mesmo, utilizando uma solução contendo Trizma base 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1% (m/v).

### 3.2.9.3 Coloração das proteínas por nitrato de prata

As proteínas obtidas nos géis anteriores foram coradas com nitrato de prata de acordo com o descrito em (Yan *et al.*, 2000), tendo todos os passos de tratamento dos géis sido feitos com agitação orbital. No Quadro 18, encontram-se discriminados os vários passos necessários à coloração dos géis, com os volumes das soluções utilizadas para um gel de 16 x 14 x 0,15 cm.

**Quadro 18 – Protocolo de coloração com nitrato de prata de géis de acrilamida (Yan *et al.*, 2000).**

<i>Passo</i>	<i>Solução</i>	<b>Tempo (min)</b>
Fixação	12,5 ml de ácido acético, 50 ml de metanol, 62,5 ml de água bidestilada	15
Fixação	12,5 ml de ácido acético, 50 ml de metanol, 62,5 ml de água bidestilada	15
Sensibilização	37,5 ml de metanol, 5 ml de tiosulfato de sódio 5% (m/v), 8,5 g de acetato de sódio e 82,5 ml de água bidestilada	30
Lavagem	250 ml de água bidestilada	5
Lavagem	250 ml de água bidestilada	5
Lavagem	250 ml de água bidestilada	5
Marcação com Prata	0,625 g de nitrato de prata, 250 ml de água destilada	20
Lavagem	250 ml de água bidestilada	1
Lavagem	250 ml de água bidestilada	1
Revelação	6,25 g de carbonato de sódio, 100 µL de formaldeído, 250 ml de água bidestilada	
Paragem	3,65 g de EDTA, 250 de água bidestilada	
Lavagem	250 ml de água bidestilada	5
Lavagem	250 ml de água bidestilada	5
Lavagem	250 ml de água bidestilada	5

A revelação do gel foi feita com uma solução de carbonato de sódio e formaldeído, tendo o cuidado de substituir esta solução durante a revelação, assim que fosse visível algum depósito, de modo a diminuir o fundo do gel por marcação inespecífica.

A análise dos níveis das várias proteínas detectadas foi feita recorrendo ao *software SameSpots*. A partir dos resultados obtidos, pelo software, procedeu-se à excisão das proteínas de interesse e analisou-se por MALDI-TOF.



#### 3.2.9.4 Hidrólise *in gel* das proteínas e análise por MALDI-TOF

A análise das proteínas por MALDI-TOF foi feita de acordo com (Bensalem *et al.*, 2007), com pequenas adaptações. Aos *spots* de gel com as proteínas, excisados e colocados em tubos *ependorf*, foram adicionados 30 µl de água *Millipore* e deixados em agitação à temperatura ambiente durante 20 min, sendo de seguida removido e descartado o sobrenadante. Para remover a marcação de nitrato de prata, adicionam-se 200µl de uma solução 1:1 (v/v) ferricianeto de potássio 30mM e tiosulfato de sódio 100mM, sendo o tubo incubado no escuro durante 20 min à temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 200µl de água *Millipore*, ficando os tubos com agitação durante 20 min à temperatura ambiente; este processo é repetido até o gel perder a cor. De seguida, adicionam-se 30 µl de acetonitrilo (ACN) e incubam-se durante 5 min à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante removido. Após este passo foram de novo adicionados 30 µl de acetonitrilo sendo desta vez incubados durante 30 min com agitação e à temperatura ambiente. Após a retirada do sobrenadante, o gel é seco sobre vácuo, e transferido para tubos *ependorf* novos.

As partículas de gel desidratadas foram hidratadas com uma solução de tripsina 6,7 ng/µl em NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM durante 30 min a 4 °C, sendo acrescentada mais solução com tripsina quando a solução foi toda absorvida antes do termo dos 30 min de incubação a 4 °C. O sobrenadante restante, que não foi absorvido, foi eliminado, e os fragmentos de gel cobertos com uma solução de NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM (aproximadamente 25µl). De seguida procedeu-se à hidrólise *in gel* das proteínas incubando os tubos a 37 °C por um período entre 12 a 16 h. Ao fim deste tempo, recolheu-se o sobrenadante para um tubo *ependorf* 0,5 ml e guardou-se. Adicionaram-se de seguida 40 µl de uma solução contendo ácido trifluoroacético (TFA) 1% (v/v) em ACN 50% (v/v) aos pedaços de gel sendo os tubos sujeitos a banho de ultra-sons durante 10 min. Após este tempo o sobrenadante foi recolhido e adicionado ao sobrenadante guardado anteriormente. Este processo foi repetido mais uma vez, e o sobrenadante recolhido e adicionado aos anteriores, sendo esta mistura seca sobre vácuo. Para a análise por MS o sedimento foi ressuspenso em 5 µl de TFA 0,1% (v/v) em ACN 50% (v/v) e sujeito a um banho de ultra-sons durante 15 min.

Desta solução foram retirados 0,5 µl de amostra para uma placa de MALDI, sendo de seguida adicionados mais 0,5 µl de matriz CHCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinamico) 10 mg/ml em ACN 70% (v/v) e TFA 0,1% (v/v) sobre essa mesma amostra. Após secagem as amostras foram analisadas num espectrómetro de massa Voyager-DE STR MALDI-TOF (*Applied Biosystems*), tendo a identificação dos péptidos sido feita com o auxílio do *software* MASCOT (*Matrix Science*).

### 3.2.9.5 Análise das proteínas por *Western blot*

As proteínas da membrana plasmática (60 µg) foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) de acordo com o descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), para posterior análise por *Western blot*.

Após separação por electroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose num sistema semi-seco durante 1 h, utilizando como solução de transferência uma solução tampão contendo glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,0375% (m/v) e metanol 20% (v/v) (Bjerrum e Schafer-Nielsen, 1986). As membranas foram bloqueadas durante 1 h, à temperatura ambiente, numa solução de leite magro desnatado 5% (m/v) em PBS (4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, e 2,0 mM KCl, pH 7,4) antes da incubação com os anticorpos primários, nas condições referidas no Quadro 19. Após a incubação com os anticorpos primários durante 2 h, as membranas foram lavadas duas vezes durante 15 min e três vezes durante 5 min com uma solução de Tween-20 0,1% (v/v) em PBS. A incubação com os anticorpos secundários foi feita de acordo com o quadro 19, durante 1 h. As membranas foram lavadas duas vezes durante 15 min e três vezes durante 5 min com uma solução de PBS e as proteínas detectadas com um *kit* de ECL (do inglês *enhanced chemiluminescence*), de acordo com as instruções do fornecedor.

**Quadro 19 – Condições experimentais para a realização dos *Western blot*.**

<i>Proteína</i>	<i>Diluição do anticorpo primário</i>	<i>Percentagem de acrilamida no gel de resolução</i>	<i>Diluição do anticorpo secundário</i>
Tubulina	1/10	10%	<i>anti-rat</i> 1/3000
Actina	1/50	10%	<i>anti-rabbit</i> 1/5000
Pma1p	1/25	7,5%	<i>anti-mouse</i> 1/2000

### 3.2.10 Apresentação e tratamento de resultados

Onde não é especificado, os resultados estão apresentados como a média ± desvio padrão de *n* experiências independentes. Para comparar médias de dois grupos diferentes, foram realizados testes *t* de *Student*, de duas caudas. Para comparar simultaneamente médias de 3 ou mais grupos diferentes, foram realizadas ANOVAs seguidas por um pós-teste de Tukey-Kramer.

## **4 Resultados I: Análise por *microarrays* da resposta celular durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae***

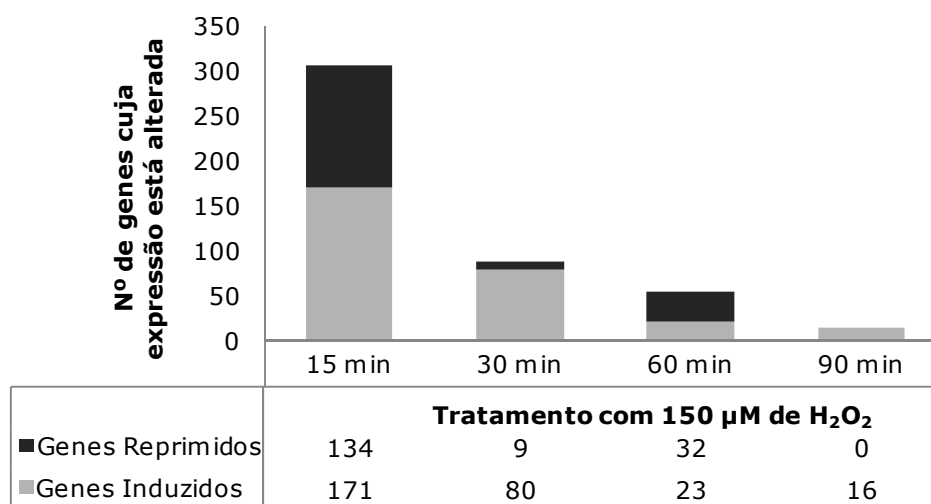
### **4.1 A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> envolve alterações significativas na expressão génica**

Tomando em consideração não só a complexidade da composição da membrana plasmática como também das vias metabólicas dos seus componentes como, por exemplo, a via de biossíntese do ergosterol, assim como as possíveis vias de sinalização envolvidas nas alterações da membrana plasmática durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tornou-se importante obter informação de um modo o mais abrangente possível sobre os efeitos celulares do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a expressão génica de *S. cerevisiae* nas condições experimentais a usar neste trabalho. Para tal, optou-se por uma análise em larga escala recorrendo à tecnologia dos *microarrays*, cuja totalidade dos resultados se encontra em anexo.

A análise por *microarrays* permitiu detectar alterações significativas (ver capítulo 3.2.5.2) na expressão de 385 genes distintos ao longo dos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que corresponde a aproximadamente 6% do total dos genes presentes no genoma da levedura *S. cerevisiae*. Esta baixa percentagem está relacionada não só com a especificidade da resposta celular ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Stone e Yang, 2006; Georgiou, 2002), como também com a baixa dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM em estado estacionário) utilizada. Num ensaio que envolvesse a utilização de uma dose *bolus* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o número de genes seria muito mais elevado, tal como já foi observado anteriormente com uma dose *bolus* de 0,4 mM a qual induziu alterações em cerca de um terço do genoma da *S. cerevisiae* (Causton *et al.*, 2001). A elevada alteração do estado *redox* da célula pela exposição a uma dose *bolus* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> torna os resultados obtidos mais inespecíficos devido aos mesmos resultarem da conjugação da resposta ao *stress* oxidativo e da resposta resultante de uma elevada perda da homeostase celular.

A análise dos dados relativos aos *microarrays* permitiu inferir vários aspectos acerca da resposta da levedura *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em condições que induzem adaptação celular. Em primeiro lugar, foi possível observar uma clara reacção rápida e transitória à presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 13). A presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levou à alteração dos níveis de mRNA (indução ou repressão) de mais de 300 genes aos 15 min de adaptação, seguindo-se uma diminuição progressiva do número de genes cuja expressão estava alterada ao longo do tempo de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> culminando num valor surpreendentemente baixo de apenas 16 genes cujos níveis de expressão se encontravam alterados aos 90 min. Esta observação está em concordância com trabalhos anteriores (Gasch *et al.*, 2000), nos quais foi observada uma resposta transitória no início da exposição (cerca de 750

genes com expressão alterada ao fim de 10 min de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,32 mM em estado estacionário) que rapidamente diminuiu de intensidade ao longo do tempo de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 14).



**Figura 13 – Número de genes que apresentam alterações da expressão de mRNA ao longo do tempo durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*.**

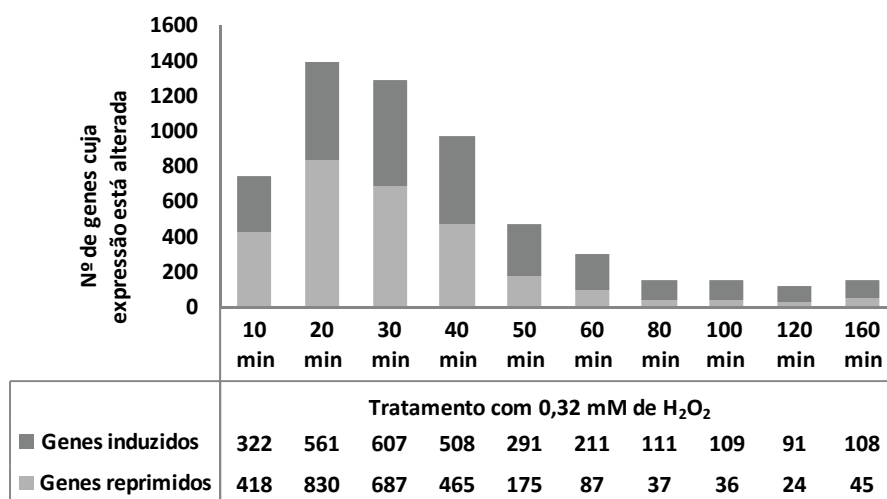
Os dados apresentados resultam de duas experiências independentes em que células de *S. cerevisiae* foram adaptadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 15, 30, 60 e 90 min.

A existência de uma resposta transitória ao nível da expressão génica está provavelmente relacionada com os mecanismos de *feedback* negativo existentes entre a expressão de um gene alvo e o seu produto final (proteína), ou seja, quando o aumento de expressão de um determinado gene, após um estímulo externo inicial, se traduz finalmente num aumento do seu produto final, é de seguida activado um mecanismo que leva a uma diminuição da expressão do gene alvo de modo a restituir os níveis de expressão ao seu nível basal, evitando-se deste modo uma acumulação excessiva de proteína.

Foi ainda possível observar uma aparente resposta bifásica por parte das células de *S. cerevisiae* adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já que em termos de genes reprimidos se observou que existiam dois pontos de forte repressão génica (aos 15 e 60 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Figura 13) o que parece indicar um comportamento não uniforme ao longo do tempo. Para estes dois tempos de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a razão entre genes reprimidos e induzidos aproxima-se claramente de 1, sendo que no estudo de Gasch *et al* (Gasch *et al.*, 2000) não foi observada esta resposta bifásica. Com efeito, quando se efectua uma comparação directa dos dados obtidos com os dados da literatura (Figura 13 vs Figura 14), observa-

se que somente o padrão de resposta transitória é similar apresentando forte resposta inicial seguida de um rápido amortecimento da mesma ao longo do tempo, como já foi referido acima. Contudo, no estudo de Gasch *et al* (Gasch *et al.*, 2000) observou-se uma rápida subida do número de genes afectados até aos 20 min de exposição, sendo que depois esse valor rapidamente diminui ao longo do tempo. Esta diferença, bem como o maior número de genes alterados, poderá ter a ver com a diferença de dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada, já que no estudo de Gasch *et al* (Gasch *et al.*, 2000), a dose foi de 0,32 mM (em estado estacionário) enquanto que nas condições deste estudo a dose foi de 0,15 mM em estado estacionário. Esta diferença de concentração poderá igualmente explicar a resposta bifásica referida acima, já que a utilização de uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais baixa permite, em teoria, observar fenómenos de controlo de expressão mais complexos. Ou seja, a utilização de uma dose mais baixa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, poderá permitir identificar alterações relacionadas predominantemente com o processo adaptativo enquanto que, nos ensaios de adaptação com doses mais elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estas alterações são mascaradas devido à ocorrência em simultâneo de alterações decorrentes do dano celular e da correspondente disrupção da homeostase celular.

Outra vantagem da utilização de uma concentração mais baixa prende-se com a probabilidade de existirem sensibilidades diferenciadas de acordo com a dosagem utilizada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tal como já foi observado em *S. pombe* (Vivancos *et al.*, 2006b). Esta sensibilidade diferenciada está provavelmente relacionada com os diferentes graus de oxidação que determinadas proteínas necessitam de modo activar fenómenos de sinalização.



**Figura 14 - Alterações da expressão de genes devidas à exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*.**

Dados obtidos para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,32 mM em estado estacionário (Gasch *et al.*, 2000).

Dada a quantidade de dados experimentais obtidos por estes métodos experimentais, torna-se essencial adoptar uma abordagem abrangente antes de se começar a estudar genes em particular. Com vista a esse objectivo, optou-se pelas seguintes abordagens:

- Recorrer à ontologia de genes de modo a atribuir uma função biológica e um processo biológico geral comum a vários genes.
- Identificação dos factores de transcrição envolvidos na regulação dos genes alterados tendo por base a literatura e os processos biológicos em que estes genes estão envolvidos considerados relevantes.

#### **4.1.1 Análise dos genes cuja expressão está alterada por Gene Ontology**

O projecto *Gene Ontology* foi criado com vista à obtenção de uma linguagem comum na análise biológica que facilitasse as análises inter espécies e uniformização de critérios (Ashburner *et al.*, 2000). Esta linguagem de classificação incide essencialmente sobre três aspectos biológicos dos produtos dos genes: função molecular, processo biológico e componente celular (Ashburner *et al.*, 2000). Neste trabalho optou-se por usar a classificação *Gene Ontology* atribuída pela base de dados SGD (do inglês, *Saccharomyces Genome Database*<sup>1</sup>), dado que a mesma tem em consideração algumas especificidades de classificação da levedura (Dwight *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2008).

A análise usada neste trabalho usando as ferramentas de *Gene Ontology* recorre a duas aproximações:

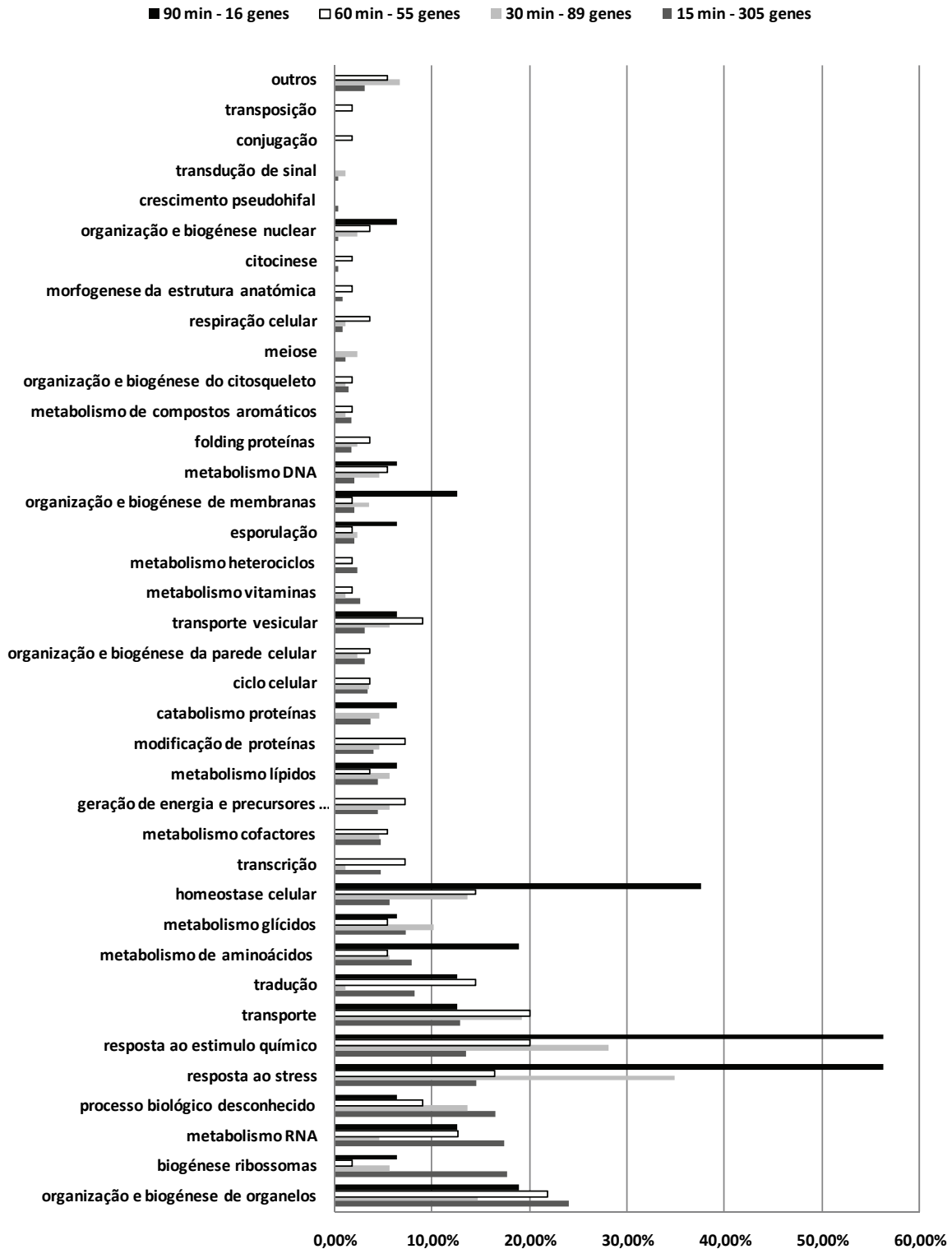
- A primeira consiste na identificação dos termos relativos à classificação *Gene Ontology* de cada gene (deve ser referido que a cada gene podem ser atribuídas várias classificações) através da ferramenta *GO slim mapper* que permite uma análise mais abrangente do tipo de ontologia apresentada pelos genes (Dwight *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2008). Para este efeito foram analisados dois dos três aspectos biológicos dos critérios da *Gene Ontology*: **função biológica** e **processo biológico**, encontrando-se os resultados disponibilizados nas figuras abaixo (Figura 15 e Figura 16).
- A segunda consiste numa análise estatística dos genes identificados e a atribuição de critérios de ontologia relativos ao processo biológico, com base na análise probabilística dos grupos de genes formados, estabelecendo como critério de qualidade um valor de P menor que 0,05 (Boyle *et al.*, 2004).

A análise de ontologia por processo biológico (Figura 15) permitiu observar que existe claramente uma alteração nos níveis de expressão em genes representativos de processos biológicos importantes, ao longo do tempo. Observa-se que aos 15 min de

---

<sup>1</sup> URL: <http://www.yeastgenome.org/>

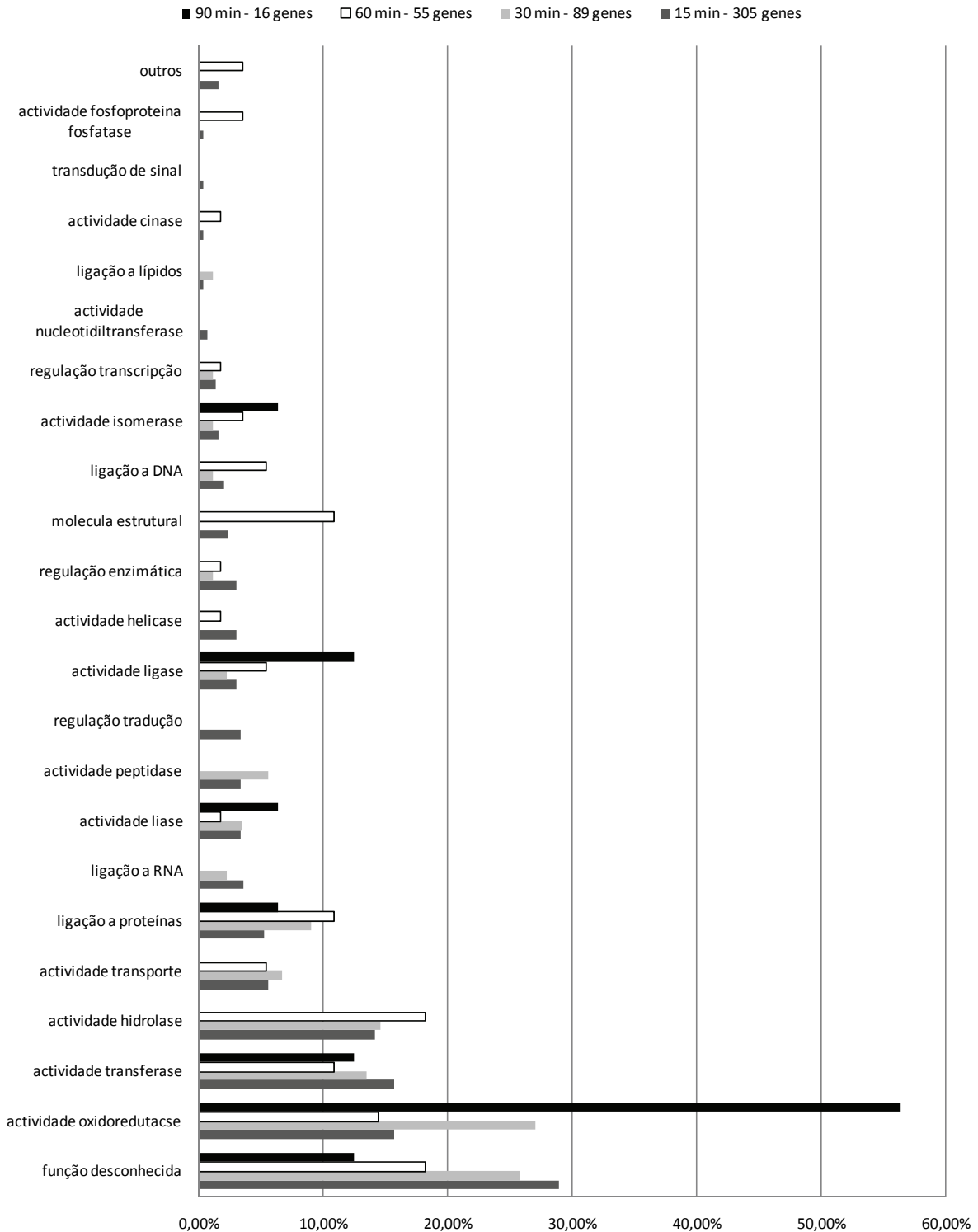
adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> os genes se distribuem por diferentes processos biológicos sendo que aquele que apresenta maior número de genes alterados é o processo referente à organização e biogénese de organelos. Aos 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> os processos maioritários passam a ser a resposta a estímulos químicos e a resposta ao *stress* os quais contabilizam uma percentagem superior a 50%. Aos 60 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, interessante, o processo referente à organização e biogénese de organelos volta a ser o maioritário em termos do número de genes cuja expressão está alterada. Aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a maioria dos genes volta a ser associado aos processos de resposta ao *stress* e a estímulos químicos. Esta análise deverá ser encarada com precaução já que cada um dos genes pode ser associado a mais que um processo de ontologia (Figura 15).



**Figura 15 – Extracção dos termos de ontologia relativos ao processo biológico nos genes cuja expressão foi alterada durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*.**

Representação gráfica resultante da atribuição de termos de ontologia aos genes cuja expressão variou em células de *S. cerevisiae* expostas a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário até um máximo de 90 min. Para cada gene analisado foi possível atribuir mais que uma ontologia. A listagem de genes obtidos resulta de 2 experiências independentes.





**Figura 16 – Extracção dos termos de ontologia relativos à função biológica nos genes cuja expressão foi alterada durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*.**

Representação gráfica resultante da atribuição de termos de ontologia aos genes cuja expressão variou em células de *S. cerevisiae* expostas a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário até um máximo de 90 min. Para cada gene analisado foi possível atribuir mais que uma ontologia. A listagem de genes obtidos resulta de 2 experiências independentes.

As anotações de ontologia relativas à função biológica distribuem-se essencialmente entre várias actividades enzimáticas como oxidoredutases, transferases e hidrolases. Tal como no caso do estudo dos processos biológicos também é possível observar uma forte manutenção de uma resposta associada ao *stress*, nomeadamente através de uma elevada percentagem de genes associados à função biológica de oxidoredutase (entre 14,5% a 56,3%) que constitui *per se* a actividade enzimática por detrás dos muitos enzimas envolvidos na resposta ao *stress* oxidativo.

De referir ainda a presença de uma elevada frequência de genes cuja expressão variou com a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aos quais é atribuída uma função ou processo desconhecidos (Quadro 20 e Quadro 21). A inexistência de uma correlação entre o número de genes com processo biológico desconhecido e o número de genes com função biológica desconhecida, deve-se ao facto do produto de determinado gene poder apresentar uma função biológica completamente definida (ter, por exemplo, a sua actividade enzimática descrita) e o seu processo biológico ser completamente desconhecido (não ser conhecida a sua intervenção em qualquer processo biológico), podendo também ocorrer a situação inversa. Esta observação revela que ainda existem muitos genes que respondem à presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sem que esteja esclarecido qual o papel exacto dos mesmos (função ou processo) na resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Quadro 20 – Frequência de genes cuja expressão variou durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para os quais o processo biológico em que estão envolvidos é desconhecido.**

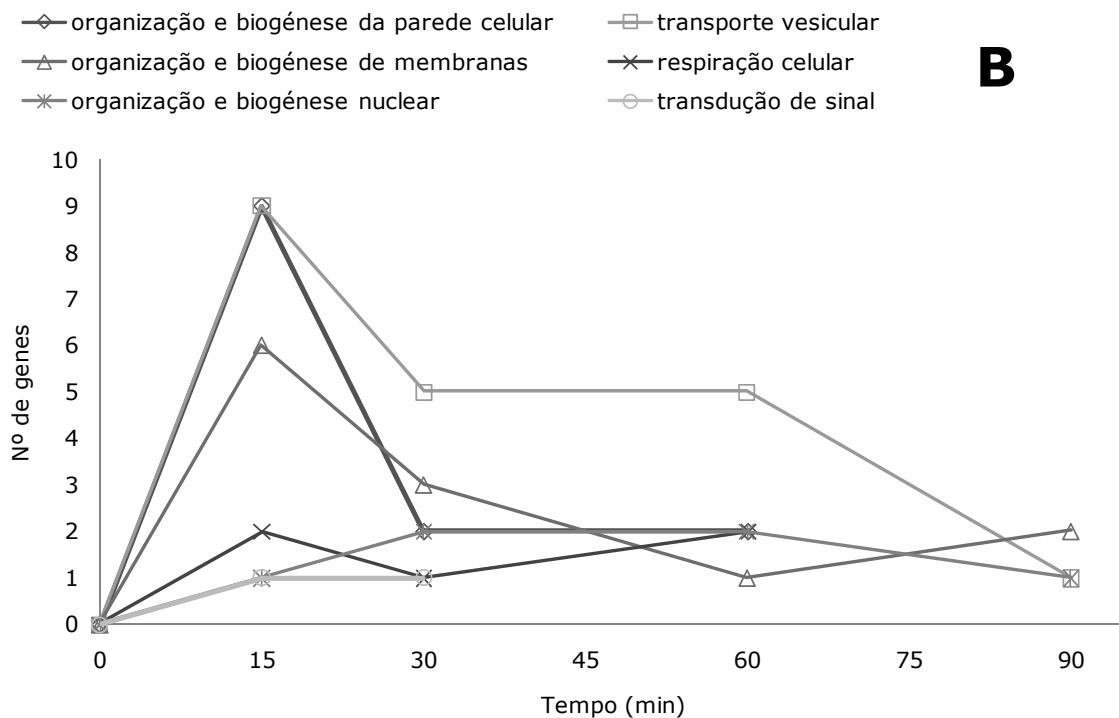
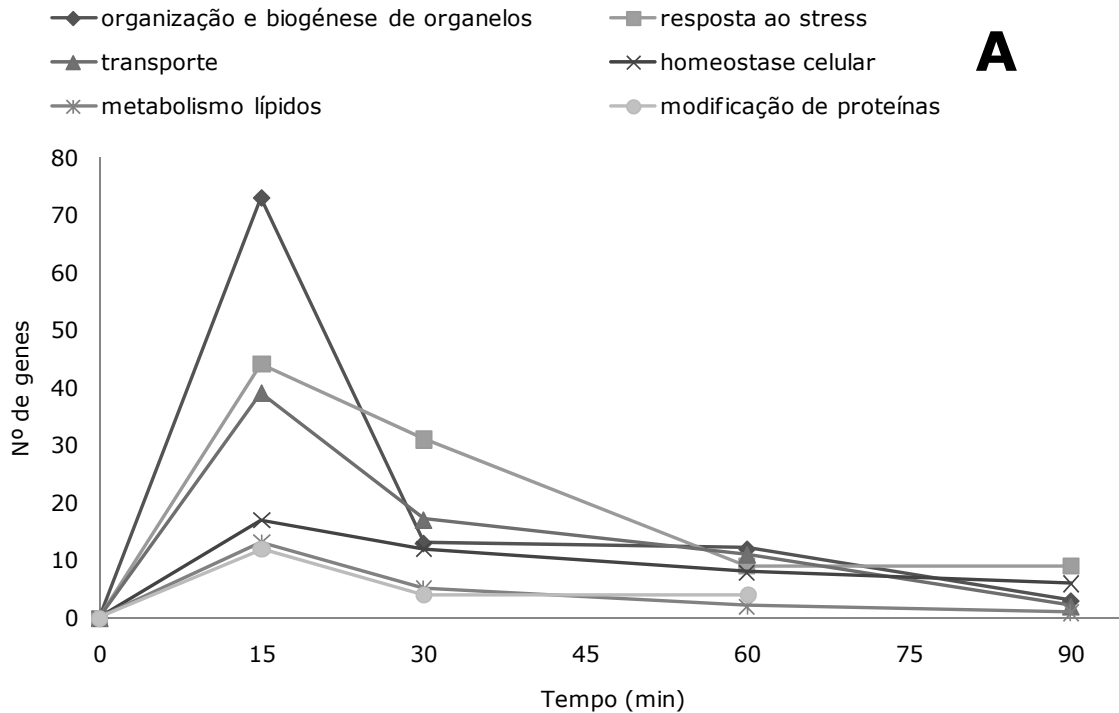
<i>Adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	<i>Genes com processo biológico desconhecido cuja expressão variou (Frequência)</i>
15 min	50 de 305 genes, 16,4%
30 min	12 de 89 genes, 13,5%
60 min	5 de 55 genes, 9,1%
90 min	1 de 16 genes, 6,3%

**Quadro 21 – Frequência de genes cuja expressão variou durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuja função biológica é desconhecida.**

<i>Adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	<i>Genes com função biológica desconhecido cuja expressão variou (Frequência)</i>
15 min	88 de 305 genes, 28,9%
30 min	23 de 89 genes, 25,8%
60 min	10 de 55 genes, 18,2%
90 min	2 de 16 genes, 12,5%

A partir dos genes cuja expressão estava alterada nas nossas condições experimentais, e aos quais foi atribuído um processo biológico por ontologia, foram seleccionados os grupos que, de acordo com a nossa análise qualitativa inicial, mais interesse tinham para o estudo da resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por razões óbvias seleccionaram-se genes que codificam proteínas às quais foram atribuídas os processos biológicos de resposta ao

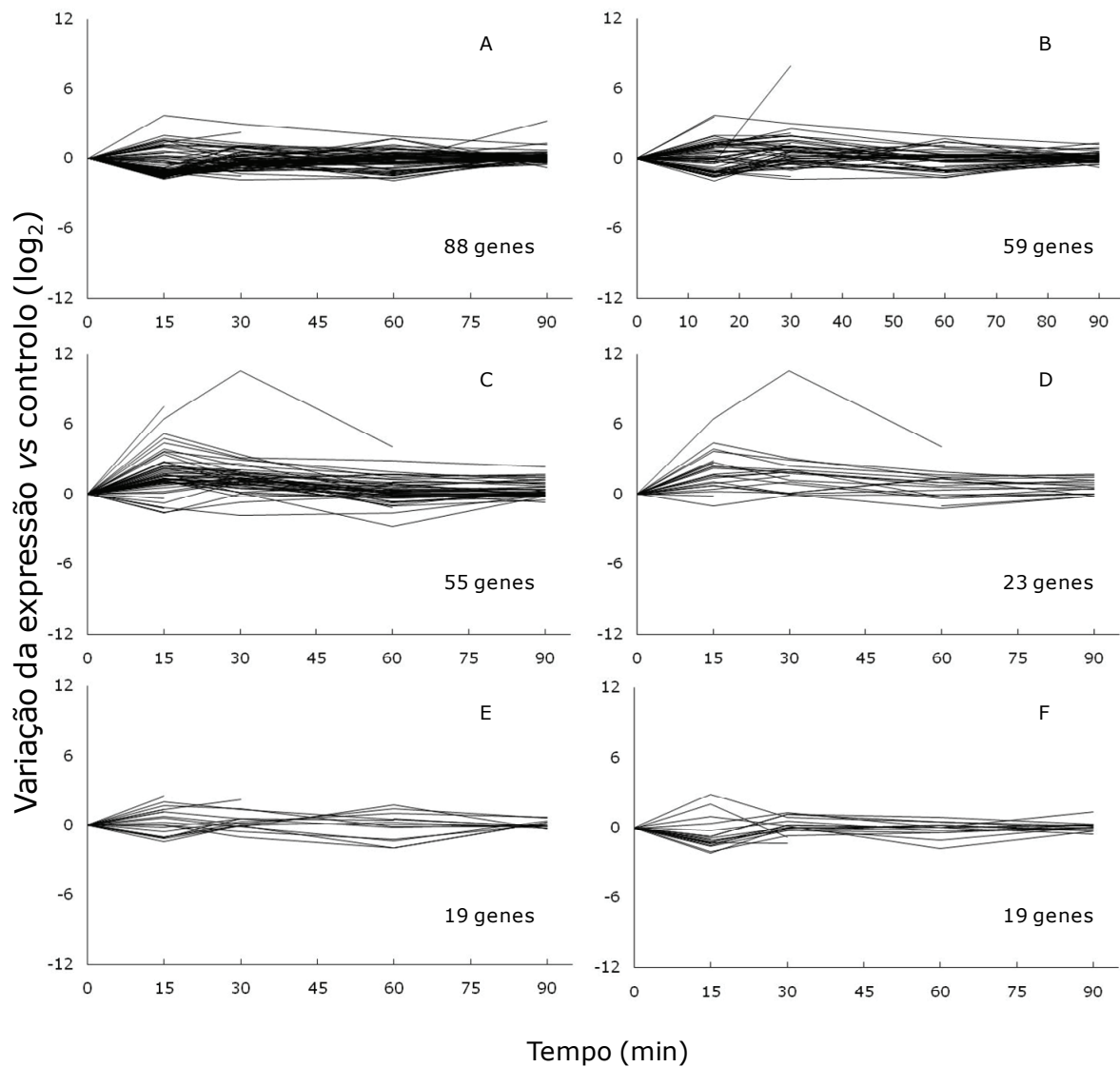
*stress*, homeostase celular, transdução de sinal e respiração celular devido à importância dos mesmos na resposta ao *stress* oxidativo. Foram também seleccionados genes que codificam proteínas com função de transporte vesicular e não vesicular, já que as possíveis alterações da membrana plasmática poderão ser dependentes de alterações ao nível de mecanismos de transporte (Bagnat *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002), os genes que codificam proteínas cujo processo biológico está relacionado com o metabolismo de lípidos e modificação de proteínas devido aos efeitos que estas alterações podem ter sobre a composição da membrana plasmática (van der Rest *et al.*, 1995). Por último, seleccionaram-se os genes que codificam proteínas envolvidas em processos relacionados com a organização e biogénese de organelos, em particular da parede celular, devido ao potencial papel que estes processos podem ter nas alterações da constituição da membrana plasmática (Delom *et al.*, 2006).



**Figura 17 - Análise do número de genes envolvidos em processos biológicos seleccionados cuja expressão se alterou ao longo do tempo de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** As células de *S. cerevisiae* foram adaptadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário até um máximo de 90 min. Para cada gene analisado foi possível atribuir mais que uma ontologia. Os genes obtidos resultam de 2 experiências independentes encontrando-se os processos biológicos seleccionados divididos em dois gráficos distintos para melhor visualização.

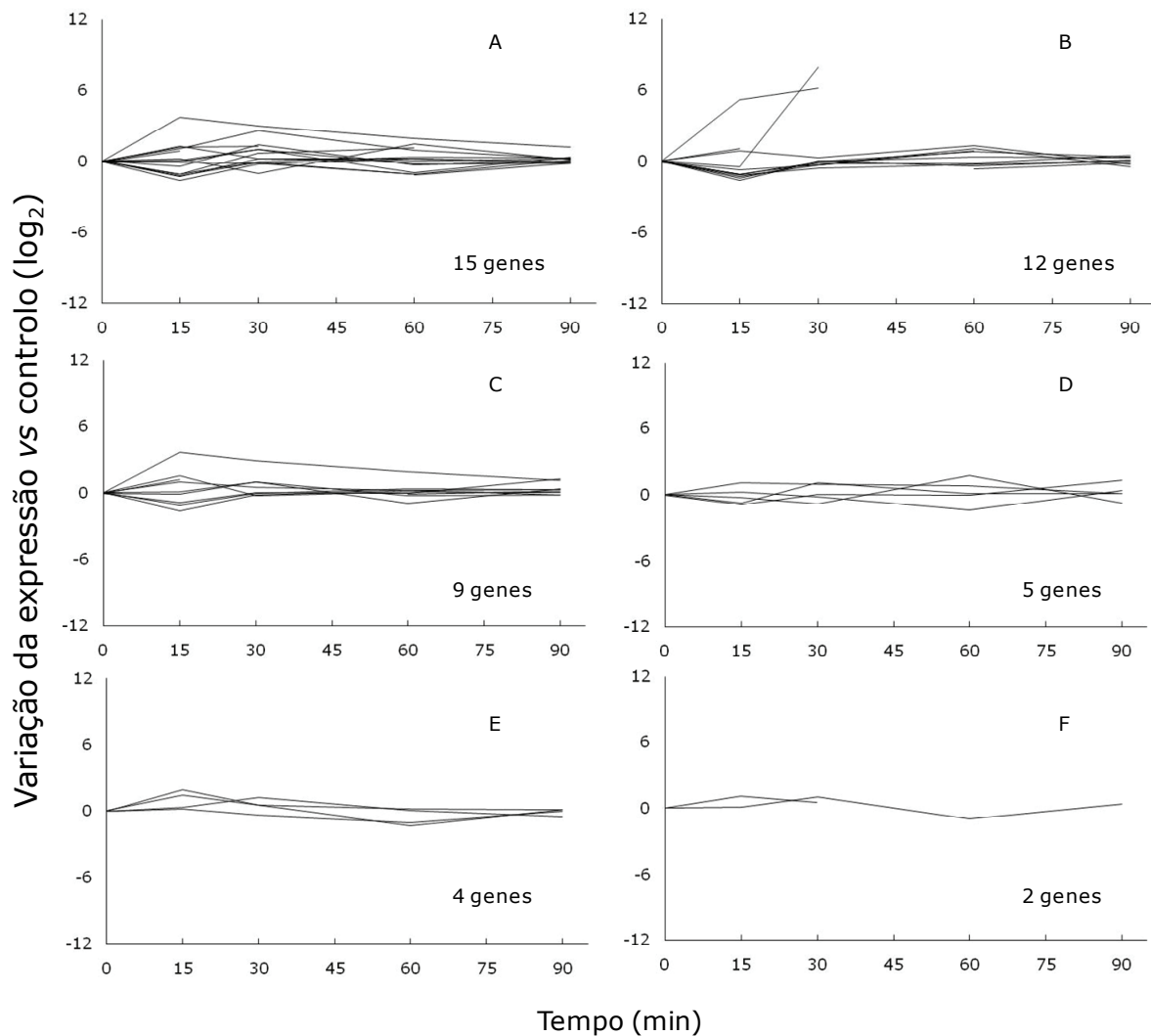
Na Figura 17 é possível observar de um modo mais sistemático a variação ao longo do tempo do número de genes envolvidos nos processos biológicos seleccionados. Esta selecção permite discriminar mais claramente as alterações decorrentes ao longo do tempo de adaptação ao  $H_2O_2$ , nos processos referidos acima, nomeadamente o número de genes que são alterados ao longo do tempo, permitindo assim aferir a importância relativa de cada um dos processos biológicos seleccionados.

Com vista a uma melhor compreensão do comportamento temporal das variações de expressão de determinados genes que codificam para proteínas envolvidas nos processos biológicos que se seleccionaram como sendo de interesse para a resposta adaptativa ao  $H_2O_2$ , definidos acima (Figura 17), efectuou-se uma análise de ontologia do conjunto de genes pertencentes a cada um destes processos cuja expressão estava alterada durante a adaptação ao longo do tempo de adaptação ao  $H_2O_2$  (Figura 18 e Figura 19).



**Figura 18 – Análise da variação dos níveis de expressão de genes pertencentes a grupos de processos biológicos seleccionados ao longo do tempo de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

As células de *S. cerevisiae* foram adaptadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário até um máximo de 90 min. Para cada gene analisado foi possível atribuir mais que uma ontologia. De modo a obter-se uma maior informação relativamente ao comportamento temporal da expressão dos genes foram considerados todos os valores obtidos resultando de 1 a 2 experiências independentes (mesmos os valores considerados não significativos foram utilizados para este efeito). A – organização e biogénese de organelos; B – transporte; C – resposta ao *stress*; D – homeostase celular; E – modificação de proteínas; F – metabolismo de lípidos.



**Figura 19 – Análise da variação dos níveis de expressão de genes pertencentes a processos biológicos selecionados ao longo do tempo de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

As células de *S. cerevisiae* foram adaptadas com 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário até um máximo de 90 min. Para cada gene analisado foi possível atribuir mais que uma ontologia. De modo a obter-se uma maior informação relativamente ao comportamento temporal da expressão dos genes foram considerados todos os valores obtidos resultando de 1 a 2 experiências independentes (mesmos os valores considerados não significativos foram utilizados para este efeito). A – transporte vesicular; B – organização e biogénese da parede celular; C – organização e biogénese das membranas; D – organização e biogénese nuclear; E – respiração celular; F – transdução de sinal.

Desta análise temporal (Figura 18 e Figura 19) ressaltam algumas observações relevantes, nomeadamente a existência uma correlação entre o comportamento temporal do processo biológico de resposta ao *stress* e o comportamento temporal do processo biológico de homeostase celular. Nestes dois processos biológicos sobressai ainda o elevado aumento da expressão do gene *TSA2*, envolvido na resposta ao *stress* oxidativo, bem como o rápido aumento de expressão observado no gene *SRX1*, que codifica para o enzima sulfiredoxina, uma proteína que catalisa a redução de resíduos de cisteína que se oxidaram a ácidos sulfínicos em proteínas como a Tsa1p (tioredoxina peroxidase) e a

Ahp1p, (hidroperóxido de alquilo peroxidase) (Biteau *et al.*, 2003). Outra observação interessante prende-se com a evolução temporal do processo biológico do metabolismo de lípidos onde se observa uma repressão inicial na expressão de vários genes que codificam para proteínas envolvidas no metabolismo de lípidos. Observa-se também que, relativamente à evolução temporal dos genes cujas proteínas estão organização e biogénese da parede celular, ocorre uma repressão geral da expressão génica ao início do processo adaptativo, com excepção de dois genes que apresentam uma forte indução dos seus níveis (genes *ECM4* e *FLC1*). O gene *FLC1* (que também está associado ao processo biológico de transporte) codifica para uma proteína transportadora responsável pela importação de FAD para o retículo endoplasmático e que está envolvida na manutenção da parede celular (Protchenko *et al.*, 2006), enquanto que o gene *ECM4* codifica para um glutathione transferase (Garcera *et al.*, 2006). Relativamente a genes envolvidos no processo biológico de transdução de sinal, observou-se a presença de alterações *EDE1* que codifica para uma proteína envolvida no processo endocítico (Gagny *et al.*, 2000) e no gene *PKA1*, que codifica para uma proteína envolvida na regulação da resposta ao *stress* (Smith *et al.*, 1998).

#### 4.1.1.1 Análise dos genes cuja expressão está alterada por ontologia estatística

Paralelamente à análise por ontologia efectuada acima, optou-se por efectuar uma análise de ontologia mais específica denominada ontologia estatística. A atribuição de termos de ontologia por análise estatística dos genes identificados com base em (Boyle *et al.*, 2004), permitiu definir mais claramente quais os processos biológicos afectados pela adaptação a um estado estacionário de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao longo de 90 min (Quadro 22, Quadro23, Quadro 24 e Quadro 25). Este processo de análise estatística permitiu confirmar na generalidade os resultados obtidos pelo processo anterior e, simultaneamente, permitiu uma maior especificação de alguns dos processos biológicos envolvidos, nomeadamente ao nível metabólico, através da atribuição de algumas funções metabólicas mais específicas.



**Quadro 22 – Análise estatística do processo biológico em que estão envolvidos os genes cuja expressão está alterada aos 15 min durante a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A atribuição estatística de um processo biológico por ontologia de genes foi efectuada como descrito anteriormente (Boyle *et al.*, 2004). Só foram considerados significativos os valores com  $P < 0,05$ .

<i>Processo Biológico</i>	<i>Frequência</i>
Metabolismo	190 de 305 genes, 62,3%
Metabolismo celular	189 de 305 genes, 62,0%
Biogénese e montagem dos complexos de ribonucleoproteínas	58 de 305 genes, 19,0%
Biogénese ribossomas	54 de 305 genes, 17,7%
Resposta ao <i>stress</i>	44 de 305 genes, 14,4%
Resposta a estímulo químico	41 de 305 genes, 13,4%
Processamento de ncRNA	33 de 305 genes, 10,8%
Processamento de rRNA	30 de 305 genes, 9,8%
Metabolismo rRNA	30 de 305 genes, 9,8%
Resposta ao <i>stress</i> oxidativo	26 de 305 genes, 8,5%
Metabolismo aminoácidos	24 de 305 genes, 7,9%
Metabolismo de aminoácidos e derivados	24 de 305 genes, 7,9%
Metabolismo aminas	24 de 305 genes, 7,9%
Metabolismo álcool	23 de 305 genes, 7,5%
Metabolismo de oses	15 de 305 genes, 4,9%
Biogénese subunidade grande ribossomal	14 de 305 genes, 4,6%
Catabolismo de glícidos	13 de 305 genes, 4,3%
Catabolismo celular de glícidos	13 de 305 genes, 4,3%
Catabolismo oses	12 de 305 genes, 3,9%
Catabolismo de álcool	12 de 305 genes, 3,9%
Regulação da homeostase redox	9 de 305 genes, 3,0%
Regulação de processos homeostáticos	9 de 305 genes, 3,0%
Homeostase redox	9 de 305 genes, 3,0%
Catabolismo hexose	9 de 305 genes, 3,0%
Metabolismo pentose	8 de 305 genes, 2,6%

**Quadro 23 – Análise estatística do processo biológico em que estão envolvidos os genes cuja expressão está alterada aos 30 min durante a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A atribuição estatística de um processo biológico por ontologia de genes foi efectuada como descrito anteriormente (Boyle *et al.*, 2004). Só foram considerados significativos os valores com P < 0,05.

<i>Processo Biológico</i>	<i>Frequência</i>
Resposta a estímulos	35 de 89 genes, 39,3%
Resposta ao <i>stress</i>	31 de 89 genes, 34,8%
Resposta a estímulo químico	25 de 89 genes, 28,1%
Resposta ao <i>stress</i> oxidativo	18 de 89 genes, 20,2%
Homeostase celular	12 de 89 genes, 13,5%
Homeostase	12 de 89 genes, 13,5%
Regulação da homeostase redox	7 de 89 genes, 7,9%
Regulação de processos homeostáticos	7 de 89 genes, 7,9%
Homeostase redox	7 de 89 genes, 7,9%
Catabolismo de álcool	7 de 89 genes, 7,9%
Catabolismo oses	6 de 89 genes, 6,7%

**Quadro 24 – Análise estatística do processo biológico em que estão envolvidos os genes cuja expressão está alterada aos 60 min durante a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A atribuição estatística de um processo biológico por ontologia de genes foi efectuada como descrito anteriormente (Boyle *et al.*, 2004). Só foram considerados significativos os valores com P < 0,05.

<i>Processo Biológico</i>	<i>Frequência</i>
Homeostase	9 de 55 genes, 16,4%
Homeostase celular	8 de 55 genes, 14,5%
Resposta ao <i>stress</i> oxidativo	8 de 55 genes, 14,5%
Regulação da homeostase redox	4 de 55 genes, 7,3%
Regulação de processos homeostáticos	4 de 55 genes, 7,3%
Homeostase redox	4 de 55 genes, 7,3%

**Quadro 25 – Análise estatística do processo biológico em que estão envolvidos os genes cuja expressão está alterada aos 90 min durante a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A atribuição estatística de um processo biológico por ontologia de genes foi efectuada como descrito anteriormente (Boyle *et al.*, 2004). Só foram considerados significativos os valores com P < 0,05.

<i>Processo Biológico</i>	<i>Frequência</i>
Resposta ao <i>stress</i> oxidativo	9 de 16 genes, 56,2%
Resposta a estímulos	9 de 16 genes, 56,2%
Resposta a estímulo químico	9 de 16 genes, 56,2%
Resposta ao <i>stress</i>	9 de 16 genes, 56,2%
Homeostase celular	6 de 16 genes, 37,5%
Homeostase	6 de 16 genes, 37,5%
Regulação da qualidade biológica	6 de 16 genes, 37,5%
Regulação da homeostase redox	5 de 16 genes, 31,2%
Regulação de processos homeostáticos	5 de 16 genes, 31,2%
Homeostase redox	5 de 16 genes, 31,2%

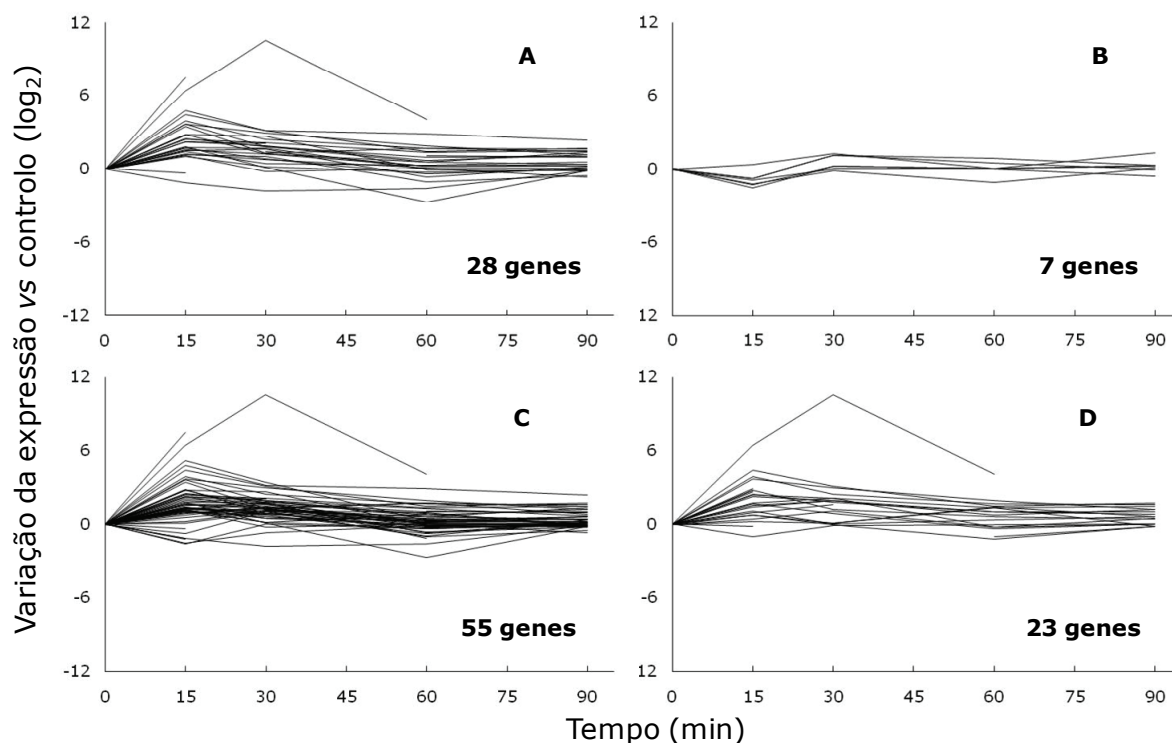
Resposta a ERO dependente da idade celular durante o envelhecimento	2 de 16 genes, 12,5%
Resposta a ERO dependente da idade celular	2 de 16 genes, 12,5%
Resposta a <i>stress</i> oxidativo dependente da idade celular	2 de 16 genes, 12,5%
Declínio metabólico dependente da idade celular durante o envelhecimento	2 de 16 genes, 12,5%
Resposta a <i>stress</i> oxidativo dependente da idade celular durante o envelhecimento	2 de 16 genes, 12,5%
Declínio metabólico geral dependente da idade celular	2 de 16 genes, 12,5%
Metabolismo de oxigénio e espécies reactivas de oxigénio	2 de 16 genes, 12,5%

---

Analisando os quadros acima (Quadro 22, Quadro 23, Quadro 24 e Quadro 25) podemos concluir que se mantêm as observações anteriores relativas a quais os processos biológicos mais relevantes durante a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ou seja, temos uma fase inicial em que a resposta celular é, em termos de processo biológico, muito ampla, com as alterações de expressão génica a serem distribuídas por vários processos biológicos de índole maioritariamente metabólica, tal como observado na atribuição não estatística de ontologia; de seguida, mais uma vez repetindo os resultados já anteriormente observados, ocorre um claro deslocamento da maioria dos genes cuja expressão está alterada para processos biológicos relacionados com a resposta ao *stress* e a manutenção da homeostase celular.

Com vista a uma maior compreensão do comportamento temporal das variações de expressão de determinados genes que codificam para proteínas envolvidas em processos biológicos com interesse para a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, à semelhança dos critérios aplicados anteriormente (Figura 17, Figura 18 e Figura 19), efectuou-se uma análise de ontologia dos genes alterados durante a adaptação como um todo, tendo sido seleccionados grupos particulares de processos biológicos determinados pela análise estatística da ontologia de processo biológico dos genes:

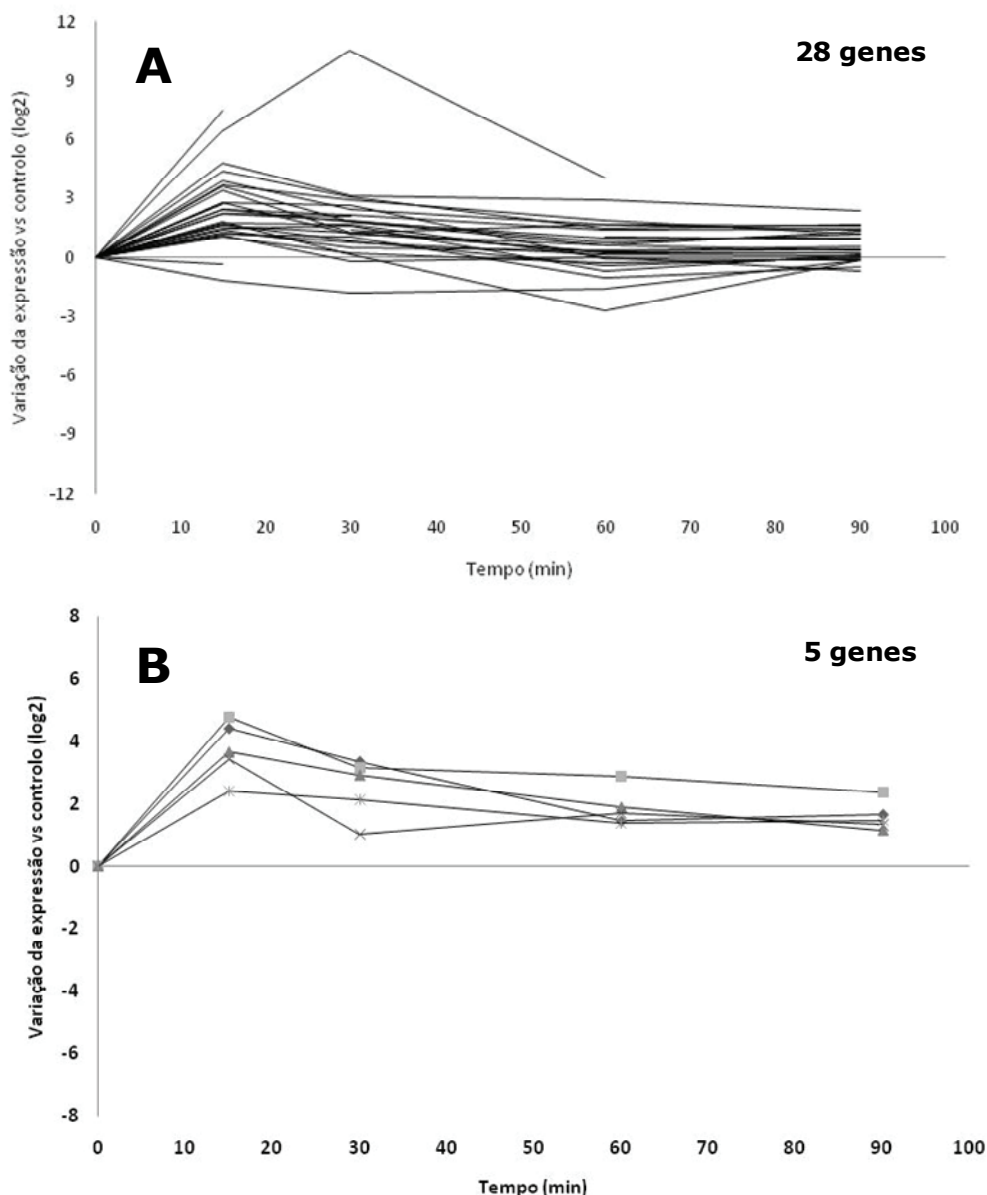
- Resposta ao *stress* oxidativo
- Resposta ao *stress*
- Homeostase celular
- Biossíntese de ácidos Gordos



**Figura 20 – Análise da variação dos níveis de expressão de genes envolvidos em processos biológicos seleccionados por ontologia estatística ao longo do tempo de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

As células de *S. cerevisiae* foram adaptadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário até um máximo de 90 min. Para cada gene analisado foi possível atribuir mais que uma ontologia. De modo a obter-se uma maior informação relativamente ao comportamento temporal da expressão dos genes foram considerados todos os valores obtidos resultando de 1 a 2 experiências independentes. A – resposta ao *stress* oxidativo; B – biossíntese de ácidos gordos; C – resposta ao *stress*; D – homeostase celular.

Ao longo dos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observa-se uma diminuição inicial nos níveis de expressão nos genes que codificam para proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos gordos à semelhança do que já foi observado para o metabolismo de lípidos (Figura 18 e Figura 19). Observou-se ainda alterações dos níveis de expressão num grupo de 28 genes que codificam para proteínas associadas à resposta ao *stress* oxidativo, embora deste grupo só em 5 genes se mantêm as alterações significativas de expressão ao longo dos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este grupo é constituído pelos genes *PRX1* (tiorredoxina peroxidase), *GPX2* (glutatio peroxidase), *TRX2* (tiorredoxina), *CCP1* (citocromo c peroxidase) e *TSA1* (tiorredoxina peroxidase) e todos eles desempenham um papel importante na resposta ao *stress* oxidativo (Jamieson, 1998), quer na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quer na reparação de danos oxidativos em proteínas. Analisando a Figura 21 observa-se que para todos estes genes há uma maior indução da expressão para tempos mais curtos, sendo que o grau de indução dos genes diminui rapidamente ao longo do tempo de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



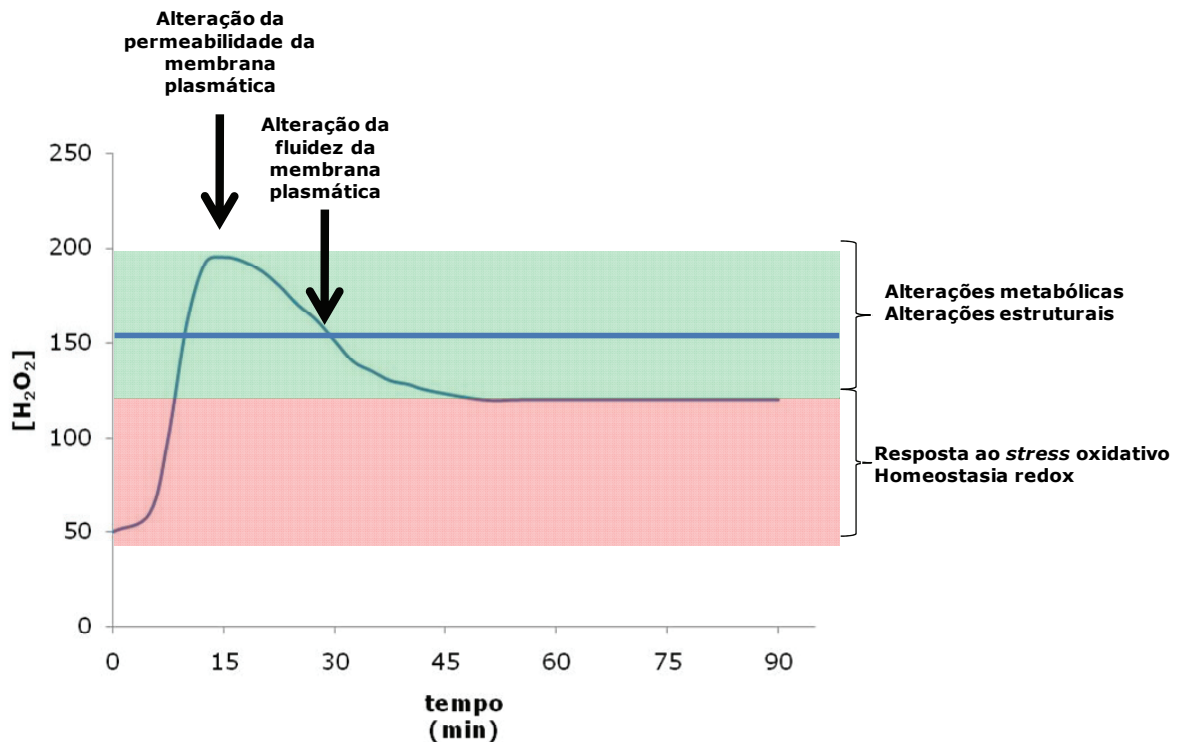
**Figura 21 – Alguns dos genes envolvidos na resposta ao stress oxidativo em *S. cerevisiae* mantêm-se induzidos ao longo da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

A análise da totalidade dos dados obtidos (A) permitiu isolar um grupo de genes (B) que se manteve alterado ao longo do tempo de adaptação a 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 15, 30, 60 e 90 min. (\* ) *TSA1*, (x) *CCP1*, (■) *GPX2*, (◆) *PRX1* e (▲) *TRX2*.

Interessantemente não foi observado um efeito na expressão do gene relativo à catalase citosólica (*CTT1*), embora já tenha sido observado um aumento da actividade do enzima catalase citosólico nas nossas condições experimentais (Branco *et al.*, 2004). Este aumento de actividade enzimática devia em princípio estar relacionado com um aumento da quantidade deste enzima, sendo que a ausência de dados relativos aos níveis de expressão do catalase citosólico podem estar relacionados com problemas ao nível do sinal dos *microarrays*, já que, embora não tenha sido reprodutível, observou-se para um

dos tempos de uma das experiências independentes um aumento dos níveis de expressão do gene *CTT1* (dados não apresentados).

Estas observações relativas à análise das ontologias permitem-nos obter um retrato generalista da resposta celular adaptativa ao  $H_2O_2$  em *Saccharomyces cerevisiae*:



**Figura 22 – A resposta celular da levedura *S. cerevisiae* a um estado estacionário de 150  $\mu M$  de  $H_2O_2$  leva a alterações na expressão génica e na fluidez da membrana plasmática.**

Modelo interpretativo das alterações da expressão génica durante a resposta adaptativa ao  $H_2O_2$  e sua correlação com observações da fluidez da membrana plasmática. Este modelo pretende simular a relação entre a expressão génica e o aparecimento de alterações na membrana plasmática ao nível da constante de permeabilidade e fluidez, onde a curva apresentada simula a intensidade da resposta celular e a linha azul simula o estado estacionário de  $H_2O_2$ .

Neste retrato generalista da resposta celular adaptativa da levedura *S. cerevisiae* ao  $H_2O_2$  (Figura 22) pode-se observar que a resposta celular deste microrganismo ocorre de um modo muito rápido e muito intenso nas fases iniciais (15 min), onde as alterações praticamente afectam a totalidade do metabolismo celular; após algum tempo ocorre uma diminuição do número de genes alterados, sendo apenas maioritariamente constantes nesta fase (a partir dos 30 min), as alterações ao nível da resposta adaptativa clássica ao *stress oxidativo*.

De referir ainda que, esta rápida alteração da expressão está claramente de acordo com as também rápidas alterações observadas ao nível da fluidez da membrana, medidas por anisotropia, realizadas por outro membro deste grupo (Folmer *et al.*, 2008) que foram

referidas anteriormente (capítulo 1.4) Assim, parece existir claramente uma correlação entre a resposta transcricional rápida e a alteração das características biofísicas da membrana. Contudo não era ainda possível associar a esta rápida alteração de fluidez uma alteração da constante de permeabilidade para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na membrana plasmática de *S. cerevisiae*, já que os dados experimentais disponíveis à data só se referiam a medições de permeabilidade após 90 min de adaptação a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004).

De modo a comprovar a existência ou não de uma correlação entre as rápidas alterações de fluidez da membrana plasmática e as alterações da constante de permeabilidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram efectuadas medições da mesma aos 15 e 30 min de adaptação a 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário (Quadro 26).

**Quadro 26 - Constantes de permeabilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da membrana plasmática, gradientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e consumos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células de *S. cerevisiae* intactas e permeabilizadas para tempos curtos de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

As células foram adaptadas através de tratamento com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 15 e 30 min. Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. \*P<0,001, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,05 *versus* controlo.

Células	Consumo intactas (min <sup>-1</sup> A <sub>600</sub> <sup>-1</sup> )	Consumo permeabilizadas (min <sup>-1</sup> A <sub>600</sub> <sup>-1</sup> )	Gradiente [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sub>intr</sub> /[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sub>extrac</sub>	Constante de permeabilidade (min <sup>-1</sup> A <sub>600</sub> <sup>-1</sup> )
Controlo	0,023 ± 0,002	0,031 ± 0,004	0,71 ± 0,030	0,088 ± 0,009
Adaptadas 15 min	0,028 ± 0,003***	0,051 ± 0,001*	0,51 ± 0,049*	0,052 ± 0,01*
Adaptadas 30 min	0,033 ± 0,002**	0,090 ± 0,008*	0,36 ± 0,030*	0,055 ± 0,002*

Os dados relativos a estes tempos mais curtos de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, permitiram comprovar que as células de *S. cerevisiae* rapidamente alteram a constante de permeabilidade da membrana plasmática para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 22). Contudo, observa-se também que apesar da constante de permeabilidade ser alterada rapidamente, as alterações ao nível do gradiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da membrana plasmática são mais lentas, o que é justificável se considerarmos que este aspecto também depende de um aumento da actividade do enzima catalase responsável por parte dos processos de eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e que é utilizado na determinação dos gradientes tal como descrito anteriormente (Branco *et al.*, 2004).

Durante a adaptação observa-se também uma disparidade entre os tempos a que ocorrem as alterações da constante de permeabilidade (15 min), e as alterações de fluidez (30 min) medidas através da anisotropia (Branco *et al.*, 2004; Folmer *et al.*, 2008). No entanto, deve ser referido que, embora os resultados de anisotropia sejam de uma grande fiabilidade, existe sempre a possibilidade deste método apresentar uma limitação técnica ao nível da sensibilidade que leva à não detecção de alterações de fluidez aos 15 min. Contudo, esta diferença entre a alteração da constante de

permeabilidade (aos 15 min) e a da diminuição de fluidez (aos 30 min) poderá ser também indicativa de que as alterações de permeabilidade da membrana podem depender de vários elementos, que não somente aqueles que afectam a fluidez da membrana, restando-nos então determinar claramente quais os elementos responsáveis por estas alterações. Outro aspecto relevante prende-se com o tempo exacto a que ocorre a alteração inicial da constante de permeabilidade, já que o tempo de adaptação mais curto utilizado neste estudo foi 15 min, sendo que já foram observadas alterações de expressão logo aos 10 minutos de exposição a 0,32 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário (Gasch *et al.*, 2000), que poderão implicar a existência de uma alteração da constante de permeabilidade antes dos 15 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, embora a dose utilizada na literatura seja superior.

#### **4.1.2 Identificação dos factores de transcrição envolvidos na regulação dos genes alterados**

Os dados de *microarrays* foram igualmente estudados de modo a se obter uma relação dos factores de transcrição associados à expressão dos genes alterados durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quadro 27).

#### **Quadro 27 – Agrupamento dos genes com níveis de expressão alterada durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por factor de transcrição, através de análise *in silico*.**

Os genes cujos níveis de expressão foram alterados ao longo do tempo de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram agrupados *in silico* em função dos factores de transcrição responsáveis pela regulação dos mesmos (Teixeira *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2008). Abaixo encontram-se os cinco factores de transcrição com maior percentagem de genes atribuídos, por tempo de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, encontrando-se a restante listagem disponibilizada em anexo.

<b>15 min (305 genes)</b>		<b>30 min (89 genes)</b>		<b>60 min (55 genes)</b>		<b>90 min (16 genes)</b>	
<b>Factor de transcrição</b>	<b>Frequência</b>	<b>Factor de transcrição</b>	<b>Frequência</b>	<b>Factor de transcrição</b>	<b>Frequência</b>	<b>Factor de transcrição</b>	<b>Frequência</b>
Sok2p	17,0 %	Yap4p	21,3 %	Skn7p	20,0 %	Msn4p	43,8 %
Ino4p	15,1 %	Fhl1p	20,2 %	Fhl1p	18,2 %	Yap1p	43,8 %
Yap4p	14,1 %	Yap2p	20,2 %	Msn4p	16,4 %	Msn2p	43,8 %
Yap2p	13,1 %	Sok2p	19,1 %	Msn2p	16,4 %	Skn7p	37,5 %
Fhl1p	12,8 %	Msn4p	18,0 %	Rap1p	14,5 %	Fhl1p	31,2 %

Assim, através do estudo *in silico* dos factores de transcrição associados aos genes alterados (Monteiro *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2006) foi possível observar que nos tempos mais longos de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> os genes alterados se encontram possivelmente associados na sua maioria a factores de transcrição clássicos de resposta



ao *stress* como o Yap1p e também os factores de transcrição Skn7p e Msn24p (Jamieson, 1998; Toledano *et al.*, 2003), sendo que o mesmo não acontece para tempos mais curtos de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Com efeito, para 15 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> os dois principais factores de transcrição identificados *in silico* (em percentagem teórica de genes) foram o Sok2p e o Ino4p. O Sok2p é um factor de transcrição que, aparentemente, desempenha um papel regulador da via de sinalização cinase A dependente do AMP cíclico, sendo homólogo a vários factores de transcrição (Ward *et al.*, 1995). Foi observado que o Sok2p interage com o factor de transcrição Msn2p (Shenhar e Kassir, 2001), um factor de transcrição importante na resposta ao *stress* oxidativo. Quanto ao factor de transcrição Ino4p, este, em conjunto com o factor de transcrição Ino2p, forma um complexo proteico que responde a variações nos níveis de colina e inositol, dois intermediários do metabolismo lipídico, regulando deste modo a biossíntese de fosfolípidos (Schwank *et al.*, 1995; Santiago e Mamoun, 2003). Foi ainda observado que estes dois factores de transcrição interagem com uma proteína denominada Apl2p, que está envolvida na formação de vesículas endocíticas de clatrina, formando um complexo ternário (Nikawa *et al.*, 2006). Esta associação é particularmente interessante porque reflecte uma clara interacção entre o processo endocítico e a regulação da expressão génica. Mais ainda, observou-se que os mutantes para cada um destes genes individuais são mais resistentes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que no caso de mutantes duplos observa-se a situação inversa com um aumento da sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nikawa *et al.*, 2006). Relativamente à identificação do factor de transcrição Yap1 *in silico* observou-se que os níveis de expressão do próprio (em Anexo) são alterados durante o processo de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a ocorrência de uma rápida subida de expressão aos 15 e 30 min (1,2 e 1,1 respectivamente), seguida de uma diminuição da mesma aos 60 minutos (-1,0).

#### **4.2 Adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo de lípidos**

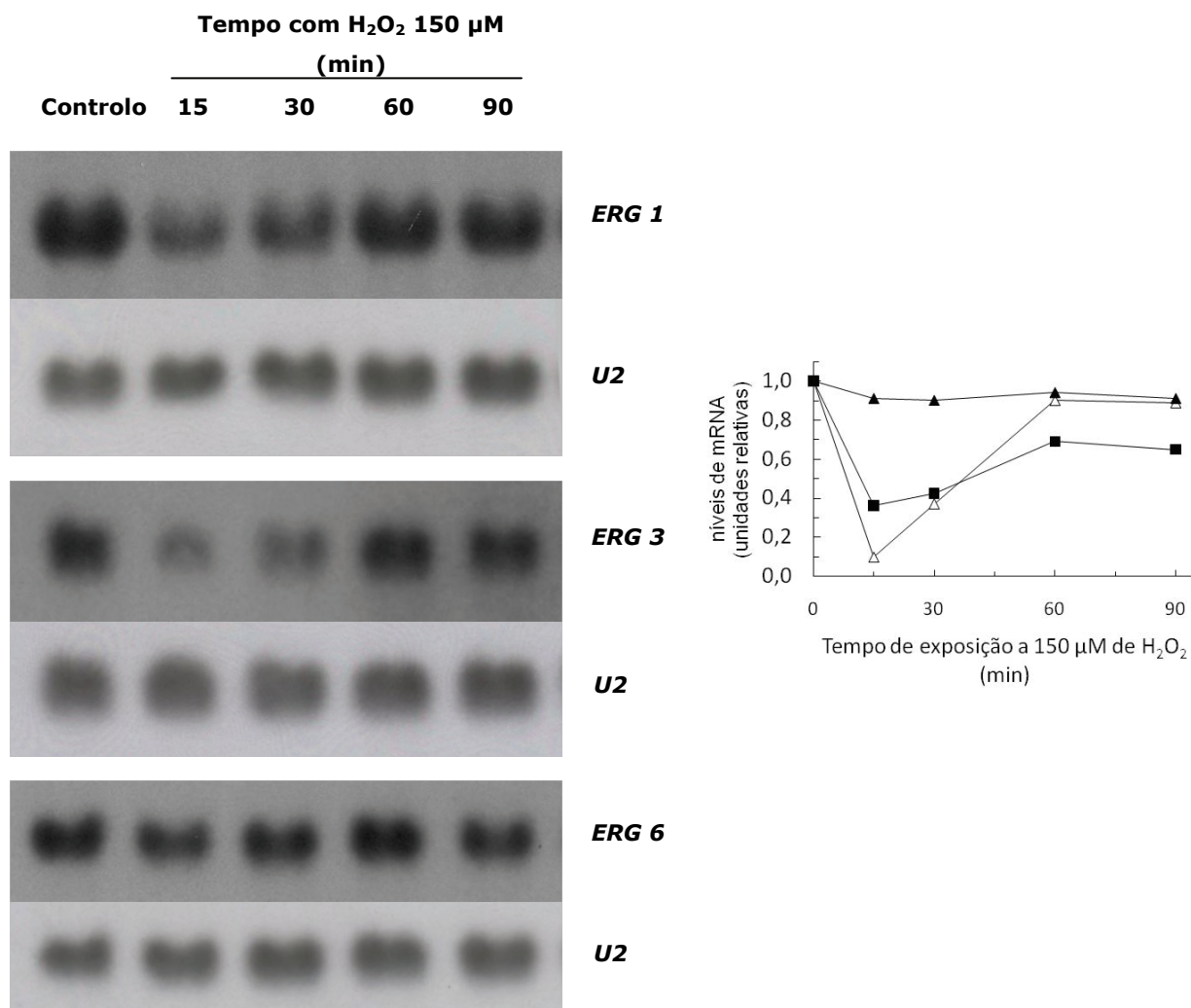
Como já foi referido, já foi observado um papel da membrana plasmática na adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Considerando a possível relevância da sua composição lipídica nesta observação, analisou-se os dados dos *microarrays* com vista à identificação de possíveis variações nos níveis de expressão de genes associados ao metabolismo de lípidos. Relativamente aos genes especificamente associados ao metabolismo de esteróis e de lípidos, observaram-se várias alterações significativas dos níveis de expressão (Quadro 28)

**Quadro 28 – Os níveis de expressão de vários genes associados ao metabolismo de esteróis e lípidos são alterados durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*.**

Os dados dos *microarrays* apresentados relativamente à indução ou repressão de genes estão representados sobre a forma da média do log<sub>2</sub> (da razão das medianas) de duas experiências independentes. As razões foram consideradas significativas quando log<sub>2</sub> era igual ou superior a 1,0 ou -1,0.

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

Foi possível observar a partir dos dados de *microarrays*, que as alterações de expressão não se restringiam somente ao metabolismo do ergosterol, onde se observou uma rápida repressão de genes que codificam para enzimas envolvidos na biossíntese do ergosterol, com a diminuição dos níveis de mRNA dos genes *ERG1*, *ERG3*, *ERG7* e *ERG25*, mas ocorrendo também em várias áreas do metabolismo de lípidos como, por exemplo, genes cujo produto está envolvido na síntese de ceramidas (através dos genes *LAC1* e *LIP1*) e na síntese (através dos genes *FAS1* e *FAS3*), alongação (através dos genes *ELO1*, *ELO2* e *ELO3*) e desaturação (*OLE1*) de ácidos gordos e a biossíntese de fosfolípidos (*GPT2*).



**Figura 23 – A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae* altera os níveis de expressão dos genes *ERG1* e *ERG3* mas não do *ERG6*.**

Amostras de mRNA total de células expostas a um estado estacionário de 150 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante os tempos indicados foram analisadas por *Northern blot*. O mRNA respeitante ao gene U2 foi utilizado como controlo interno. A análise quantitativa do sinal foi efectuada normalizando a intensidade de sinal obtido ao sinal do controlo interno, sendo os resultados expressos sobre a forma de unidades arbitrárias relativas ao controlo. (■) *ERG1*; (△) *ERG3*; (▲) *ERG6*. As autorradiografias apresentadas são representativas de duas experiências independentes.

De modo a ter uma confirmação do grau de significância destes valores e efectuar também um controlo de qualidade dos dados obtidos por *microarrays*, foi feita uma determinação dos níveis de mRNA de um conjunto seleccionado de genes por *Northern blot*. Como se pode observar na Figura 23, a variação dos níveis de expressão dos genes *ERG1*, *ERG3* e *ERG6* está de acordo com os dados dos *microarrays*. Portanto, a expressão de genes envolvidos no metabolismo dos esteróis e lípidos é alterada

confirmando assim dados anteriores do grupo que já antecipavam esta observação (Branco *et al.*, 2004; Folmer *et al.*, 2008; Sousa-Lopes *et al.*, 2004).

Dado o elevado número de genes alterados em resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi efectuada uma selecção de genes potencialmente relevantes (Quadro 29) na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dentro desse grupo de genes foram seleccionados genes com uma forte alteração e cuja função fosse próxima do metabolismo lipídico ou da membrana plasmática.

**Quadro 29 – Conjunto de genes seleccionados para análise da sensibilidade de estirpes mutadas nestes genes ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Os dados dos *microarrays* apresentados relativamente à indução ou repressão de genes são representados sobre a forma da média do log<sub>2</sub> (da razão das medianas) de duas experiências independentes. As razões foram consideradas significativas quando log<sub>2</sub> era igual ou superior a 1,0 ou -1,0. As células de *S. cerevisiae* foram adaptadas com um estado estacionário de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 µM durante os tempos indicados.

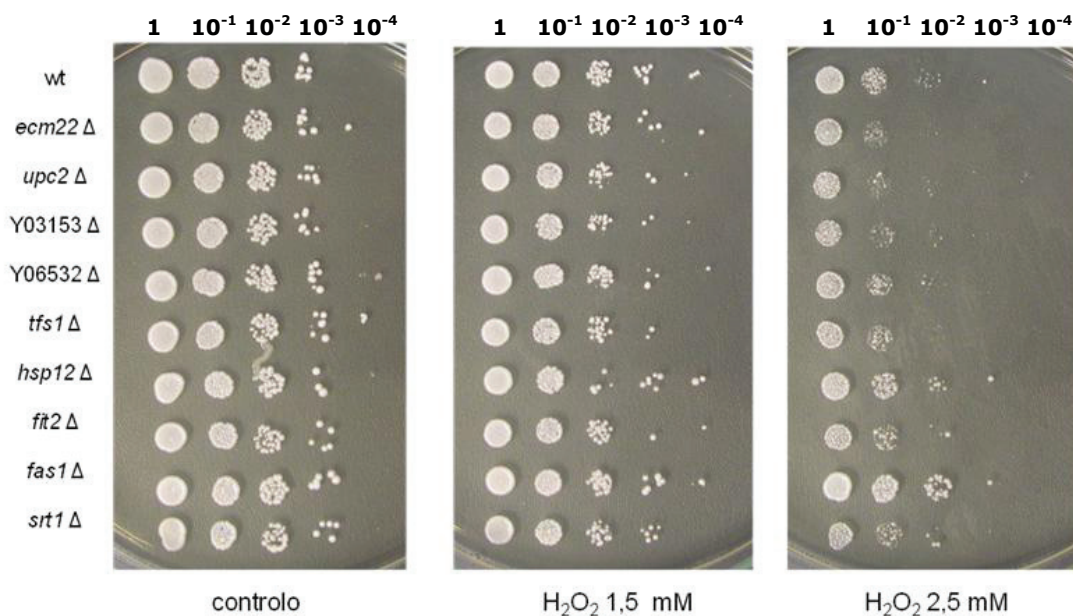
Gene	ORF	Descrição	Variação dos níveis de expressão de mRNA durante a adaptação ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
			15 min	30 min
YBR016W	YBR016W	Proteína de função desconhecida	1,1	
YML131W	YML131W	Proteína de função desconhecida	5,2	3,0
TFS1	YLR178C	Inibidor carboxipeptidase Y	3,0	2,3
HSP12	YFL014W	Proteína de choque térmico	2,8	2,7
FIT2	YOR382W	Manoproteína	1,2	1,6
FAS1	YKL182W	Subunidade β do ácido gordo sintase	-1.6	

Para além destes genes (Quadro 29), seleccionados em função dos seus níveis de expressão terem sofrido alterações durante a adaptação a uma dose adaptativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram também seleccionados três genes (*ECM22*, *UPC2* e *SRT1*) que desempenham funções potencialmente importantes para a composição da membrana plasmática.

Foram então seleccionados os seguintes genes:

- Dois dos factores de transcrição envolvidos na biossíntese do ergosterol cujos genes são o *ECM22* e o *UPC2* (Vik e Rine, 2001a).
- Duas proteínas com função desconhecida, a primeira correspondente a uma proteína da membrana plasmática de função desconhecida que se pensa ser modificada por palmitoilação codificada pela ORF YBR016w (Ren *et al.*, 2008) e a segunda uma proteína que responde a uma variedade de fontes de *stress* ambientais codificada pela ORF YML131W (Jelinsky e Samson, 1999; Rep *et al.*, 2001).
- O gene *TFS1* responsável pela codificação da proteína Tfs1p, que corresponde a um inibidor da carboxipeptidase Y, que apresenta a capacidade de se ligar a lípidos, nomeadamente a fosfatidiletanolamina (Bruun *et al.*, 1998).

- O gene *HSP12*, correspondente a uma proteína da membrana plasmática que funciona como proteína de choque térmico, com consequente resposta a uma grande variedade de formas de *stress* biológico (Praekelt e Meacock, 1990; Sales *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 1990).
- O gene *FIT2*, que codifica para uma manoproteína de função desconhecida que é incorporada na parede celular via uma âncora GPI e está envolvida no metabolismo de ferro (Philpott *et al.*, 2002).
- O gene *FAS1*, que codifica para a subunidade beta do enzima ácido gordo sintase que catalisa a síntese de ácidos gordos monoinsaturados de cadeia longa (Schweizer *et al.*, 1986).
- O gene *SRT1* que codifica para um enzima cis-preniltransferase envolvido na síntese de dolícois, os quais funcionam como precursores de âncoras de GPI que são posteriormente ligadas covalentemente a proteínas e servem para incorporar proteínas em membranas (Sato *et al.*, 2001).



**Figura 24 - Estirpes mutantes associadas com proteínas da membrana plasmática ou com o metabolismo de lípidos apresentam alterações na sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

As células de *S. cerevisiae* foram aplicadas em meio sólido YPD com concentrações variadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 48 h foi tirada uma fotografia a cada placa encontrando-se nesta figura uma experiência representativa dos resultados obtidos.

As estirpes mutantes para os genes referidos acima foram colocadas a crescer em meio sólido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de modo a determinar a sensibilidade das estirpes a este oxidante (Figura 24). Na Figura 24 observa-se que, de todas as estirpes mutadas estudadas as que apresentaram resultados mais interessantes foram a estirpe *hsp12Δ* que não possui

a proteína Hsp12p, uma proteína de choque térmico da membrana plasmática, e que apresentou uma resistência ligeiramente superior ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relativamente ao controlo e a estirpe *fas1Δ* que não possui o gene que codifica para uma das subunidades do ácido gordo sintase e que apresentou um forte aumento da resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta maior resistência foi estudada mais a fundo por outro elemento do grupo de investigação tendo dado origem a uma nova linha de investigação que culminou na produção de um artigo onde se estudaram as razões do aumento de resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nesta estirpe *fas1Δ* (Matias *et al.*, 2007).

Apesar da selecção deste grupo muito restrito de genes, os dados dos *microarrays* ainda apresentam muito potencial experimental. Um dos aspectos mais interessantes prende-se com a aproximação experimental utilizada que, ao recorrer a uma concentração menor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, levou a que houvesse um menor número de genes alterados. Longe de ser uma desvantagem, tendo em conta o menor número de genes, este aspecto é na verdade uma grande vantagem já que, como referido anteriormente, uma baixa dose de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permite distinguir claramente as respostas mais iniciais ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que no caso de doses mais elevadas são claramente absorvidas pelo elevado número de genes alterados resultantes do somatório resultante da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da perturbação da homeostase, o que pode levar à não consideração de fenómenos regulatórios sensíveis a baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que podem ser essenciais para a resposta adaptativa em *S. cerevisiae*. Em conclusão, e face à literatura de referência onde se recorreu a um estado estacionário de concentração mais elevada (Gasch *et al.*, 2000) nas nossas condições experimentais, efectuámos uma aproximação mais fiável à resposta celular à presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sem que ocorra morte celular, através de um fluxo baixo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de concentração estacionária e regulável, tornando-se assim possível observar fenómenos regulatórios sensíveis a baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e estudar os vários aspectos da resposta celular ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **5 Resultados II: Efeito da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na composição lipídica celular e da membrana plasmática em *S. cerevisiae***

A diminuição da permeabilidade da membrana plasmática relativamente a espécies químicas que atravessam biomembranas por difusão simples, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é causada por uma diminuição na fluidez da membrana (Branco *et al.*, 2004; Folmer *et al.*, 2008). Estas modificações das propriedades da membrana plasmática podem ser atribuídas a alterações na sua composição lipídica, nomeadamente a um aumento da compactação da mesma devido a um aumento das cadeias de carbonos dos grupos acilo e/ou a uma diminuição da insaturação resultando numa estrutura mais ordenada e compacta (van der Rest *et al.*, 1995). Além destas situações pode ainda ocorrer diminuição da fluidez da membrana devido às perturbações que resultam na diminuição da área de um lípido ou a um aumento dos níveis de esteróis relativamente aos níveis de fosfolípidos (Hechtberger *et al.*, 1994).

Dado o possível papel relevante dos lípidos nas alterações de permeabilidade e de fluidez da membrana plasmática, não só pela análise da literatura como também pelos resultados já descritos acima (capítulo 4), onde se observou a existência de alterações em genes relacionados com o metabolismo lipídico, tornou-se essencial analisar a composição lipídica da levedura *S. cerevisiae* durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A análise dos lípidos de *S. cerevisiae* em resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que nos propusemos a efectuar, incidiu essencialmente sobre dois aspectos:

- as alterações qualitativas e quantitativas ao nível da composição total de lípidos nas células em estudo
- as alterações quantitativas e qualitativas ao nível dos lípidos da membrana plasmática,

Com estas duas aproximações procurou-se inferir acerca da existência ou não de uma concordância entre alterações globais (lípidos totais) e alterações localizadas (membrana plasmática).

### **5.1 Análise do enriquecimento da fracção membranar**

Com vista à compreensão do fenómeno de alteração da permeabilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> procedeu-se, tal como referido acima, ao isolamento da membrana plasmática de *S. cerevisiae* com vista à análise da constituição lipídica da mesma. Dada a importância da qualidade, em termos de pureza, da fracção da membrana plasmática isolada, foi efectuada previamente uma determinação do grau de enriquecimento da fracção membranar. Embora existam outras aproximações para medir o grau de enriquecimento

da fracção membrana em *S. cerevisiae*, optou-se pela análise da actividade do H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática (a proteína Pma1p codificada pelo gene YGL008C), dada elevada especificidade deste enzima.

A partir dos resultados obtidos (Quadro 30) pode-se concluir que o grau de enriquecimento da fracção de membranas é elevado estando em concordância com os dados da literatura (Patton e Lester, 1991).

**Quadro 30 – Avaliação do grau de pureza da membrana plasmática isolada recorrendo à determinação da actividade enzima H<sup>+</sup>-ATPase.**

A actividade do enzima da membrana plasmática sensível ao vanadato H<sup>+</sup>-ATPase foi determinada para a fracção da membrana plasmática de células controlo e células adaptadas (150 µM) ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. O grau de enriquecimento das fracções membranares foi determinado em relação à actividade específica do homogenato inicial. Os resultados são média±desvio padrão de 3 a 6 experiências independentes. \*P<0,05 versus homogenato.

	<b>Actividade da ATPase sensível ao vanadato (µmol Pi min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>)</b>		
	<b>Homogenato</b>	<b>Membrana plasmática purificada</b>	<b>Enriquecimento da fracção</b>
Células controlo	0,025 ± 0,009	0,509 ± 0,215*	20
Células adaptadas ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,030 ± 0,007	0,490 ± 0,182*	17

**5.2 A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leva a alterações na composição lipídica da membrana plasmática de *S. cerevisiae***

**5.2.1 Análise dos fosfolípidos da membrana plasmática de *S. cerevisiae***

Uma primeira análise global aos lípidos extraídos das membranas plasmáticas das fracções membranares puras de células controlo e células adaptadas a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não permitiu a observação de quaisquer diferenças entre os níveis de fosfolípidos totais, níveis esses que foram aferidos através da determinação dos níveis de fósforo total (Quadro 31).



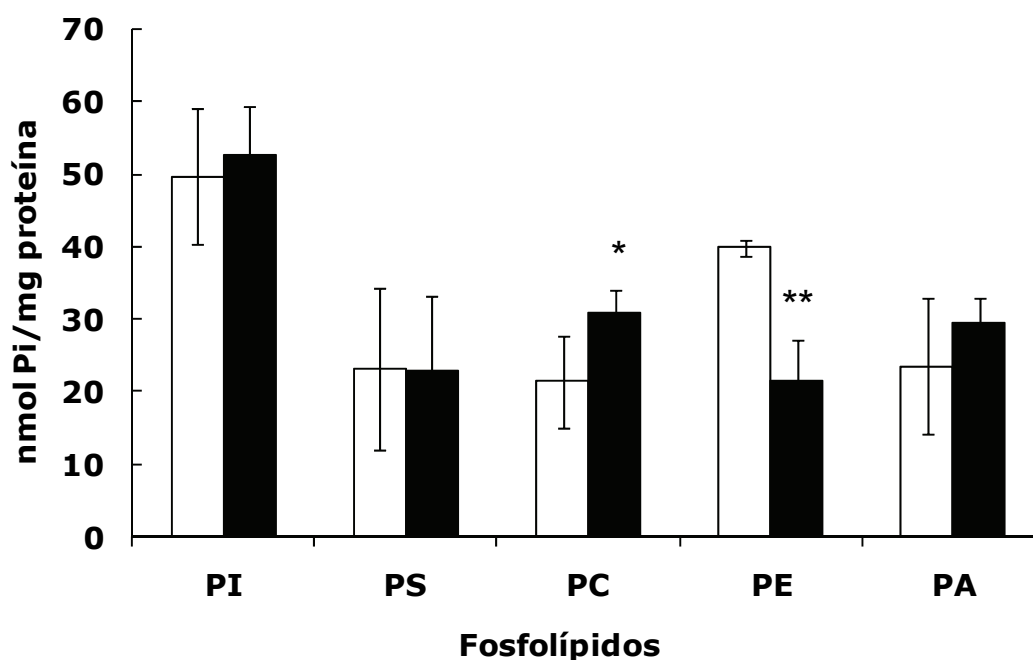
**Quadro 31 – Os níveis totais de fosfolípidos são equivalentes em células controlo e adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

As células adaptadas foram tratadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em estado estacionário, durante 90 minutos. Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes.

<b>[Fósforo inorgânico]</b>	
<b>(µmol Pi/min.mg proteína)</b>	
<b>Células controlo</b>	0,315 ± 0,033
<b>Células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	0,306 ± 0,029

Dado que os níveis de fosfolípidos totais não apresentavam variações significativas, o passo seguinte consistiu na determinação experimental dos níveis dos diversos e glicerofosfolípidos presentes na membrana plasmática com o objectivo de perceber se existiriam alterações nos níveis relativos dos diversos glicerofosfolípidos devido à adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O perfil de glicerofosfolípidos<sup>2</sup> determinado nas nossas condições experimentais, tal como se mostra na Figura 25, encontra-se de acordo com os valores referidos na literatura (van der Rest *et al.*, 1995; Tuller *et al.*, 1999). A análise dos componentes individuais permitiu identificar várias alterações relevantes, nomeadamente um aumento de 44% nos níveis de fosfatidilcolina na membrana plasmática de células adaptadas e uma diminuição de 46 % no conteúdo de fosfatidiletanolamina na membrana plasmática de células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta observação teve como consequência uma alteração da razão fosfatidilcolina: fosfatidiletanolamina de 0,5 para 1,4 (células controlo vs células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

<sup>2</sup> Dados obtidos em colaboração com um membro do grupo (Ana Matias)

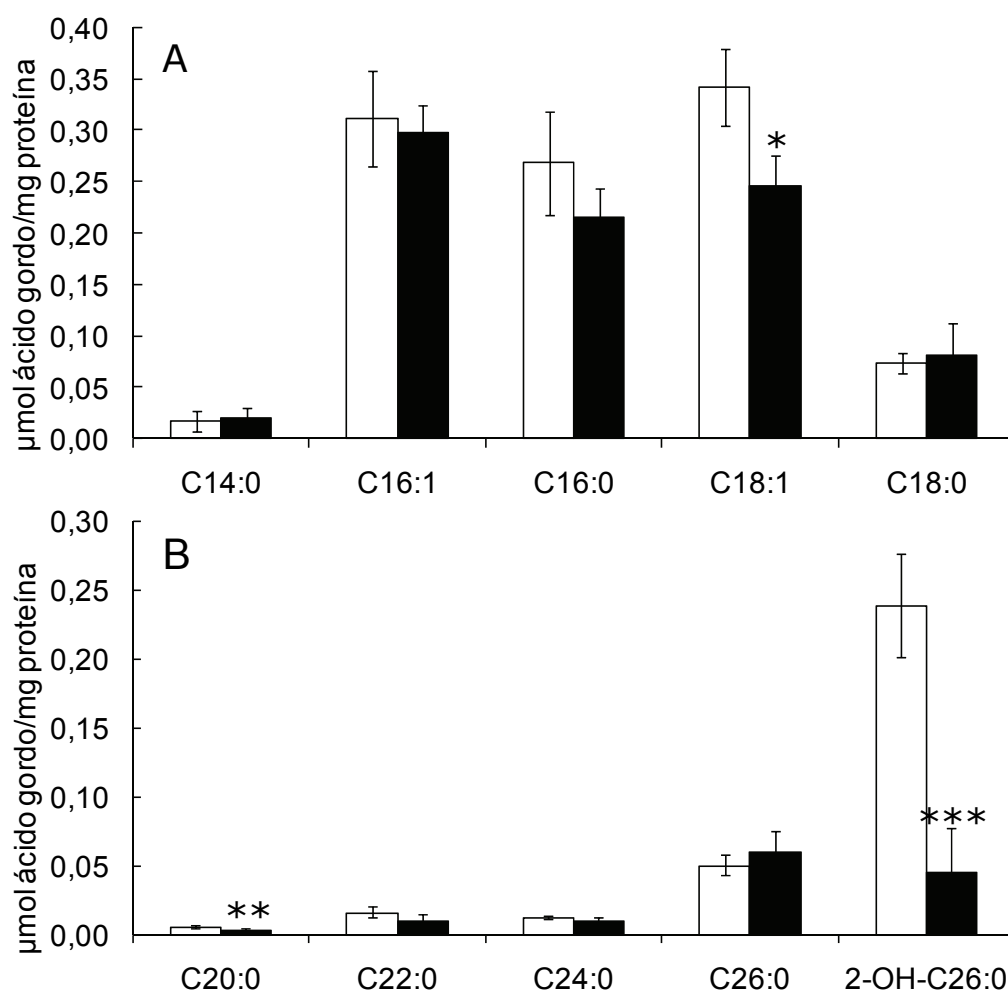


**Figura 25 – A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae* aumenta a razão entre os níveis de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina na membrana plasmática.**

Células controlo (barras brancas) e células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (barras pretas). PI – fosfatidilinositol; PS – fosfatidilserina; PC – fosfatidilcolina; PE – fosfatidiletanolamina; PA – ácido fosfatídico. Células adaptadas foram tratadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 90 minutos. Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. \*P<0,05 e \*\*P<0,01 versus controlo.

### 5.2.2 Análise do perfil de ácidos gordos da membrana plasmática de *S. cerevisiae*

Relativamente à composição de ácidos gordos da membrana plasmática o isolamento da mesma permitiu o estudo da sua composição (Figura 26). Observou-se então que os ácidos oleico (C18:1), palmitoleico (C16:1) e palmítico (C16:0) correspondem aos ácidos gordos de cadeia longa mais abundantes na membrana plasmática, o que se encontra em concordância com as observações relatadas na literatura para a composição em ácidos gordos da membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Tuller *et al.*, 1999). A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levou a alterações no perfil de ácidos gordos de cadeia longa da membrana plasmática, nomeadamente uma diminuição de 30% nos níveis de ácido oleico. Esta diminuição considerável teve como consequência uma diminuição da razão entre ácidos gordos saturados e insaturados nos ácidos gordos de cadeia longa ( $1,83 \pm 0,16$  nas células controlo e  $1,58 \pm 0,13$  nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, P<0,05). Esta alteração nos ácidos gordos associados aos glicerofosfolípidos na direcção de uma menor insaturação na presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é consistente não só com uma diminuição da fluidez da membrana plasmática (Folmer *et al.*, 2008) como com a diminuição da sua permeabilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004; Sousa-Lopes *et al.*, 2004) observada previamente durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 26 – A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca alterações no perfil de ácidos gordos da membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae*.**

A composição da membrana plasmática em ácidos gordos de cadeia longa (A) e ácidos gordos de cadeia muito longa (B) foi determinada para células controlo (barras brancas) e células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (barras pretas). Células adaptadas foram tratadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 90 minutos. Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. \*P<0,05, \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001 *versus* controlo.

Na levedura, com a exceção do fosfolípido fosfatidilinositol que contem pequenas quantidades de ácido gordo C26:0 esterificado na sua posição *sn*-1 (Schneiter *et al.*, 2004), os ácidos gordos de cadeia muito longa ou VLCFA (do inglês, **V**ery **L**ong **C**hain **F**atty **A**cids), encontram-se geralmente presentes nas ceramidas livres, nos esfingolípidos (Patton e Lester, 1991; Hechtberger *et al.*, 1994) e ainda nas âncoras lipídicas (constituídas na sua maioria por ceramidas mas também por diacilglicerol) de proteínas ligadas covalentemente ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Sipos *et al.*, 1997; Reggiori *et al.*, 1997). Os esfingolípidos complexos constituem aproximadamente 30 %

do conteúdo total de fosfolípidos da membrana plasmática (Patton e Lester, 1991). Dada esta elevada percentagem e a relevância destes componentes da membrana plasmática, optou-se por recorrer a um protocolo experimental de transesterificação que conseguisse hidrolisar também as ligações amida existentes nos esfingolípidos, que como já foi referido anteriormente, é onde se localizam a maioria dos VLCFAs.

Os VLCFAs que foram encontrados em maior quantidade na membrana plasmática (Figura 26) correspondem ao ácido hexacosanóico (C26:0) bem como a sua variante hidroxilada, ácido 2-hidroxi-hexacosanóico (2-OH-C26:0), tendo também sido encontradas pequenas quantidades de outros VLCFAs, como os ácidos lignocérico (C24:0), beénico (C22:0) e eicosanóico (C20:0), o que está de acordo com observações prévias presentes na literatura (Smith e Lester, 1974; Oh *et al.*, 1997; Guan e Wenk, 2006b).

Foi ainda observado que a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminuiu os níveis de C20:0 (em 50%) e os níveis de 2-OH-C26:0 (em 80%), bem como os níveis totais de VLCFAs, já que nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a quantidade total de VLCFAs na membrana plasmática, é cerca de 30% da quantidade presente nas células controlo (0,37 ± 0,07 μmol/mg proteína nas células controlo e 0,13 ± 0,03 μmol/mg proteína nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, P<0.001). Observou-se ainda que a quantidade total de VLCFAs diminuiu de cerca de 23%, relativamente à quantidade total de ácidos gordos na membrana plasmática nas células controlo para cerca de 13% nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tornando-se o ácido gordo C26:0 o VLCFA mais abundante na membrana plasmática das células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dado que não foram observadas diferenças nos níveis totais de fosfolípidos e de glicerofosfolípidos (via fósforo total), as alterações observadas ao nível do ácido 2-OH-C26:0 não podem ser explicadas por alterações ao nível dos esfingolípidos. Estas diferenças são muito provavelmente devidas a uma diminuição nos níveis de ceramidas livres presentes na membrana plasmática. Com efeito, foi previamente demonstrada a presença na membrana plasmática de ceramidas livres contendo a LCB fitoesfingosina ligada ao ácido 2-OH-C26:0 (Schneiter *et al.*, 1999). Estes resultados podem ser relacionados com as repressões observadas na expressão de vários genes relevantes para o metabolismo de lípidos aquando da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (relatadas no capítulo I dos resultados), nomeadamente os genes *FAS1*, *FEN1* e *SUR4* que codificam para enzimas envolvidos no processo de alongação dos ácidos gordos de cadeia longa C16 e C18 para ácidos gordos de cadeia muito longa (C20 a C26) (Oh *et al.*, 1997; Rossler *et al.*, 2003), bem como nos genes *LAC1* e *LIP1* que codificam para duas das três subunidades do enzima ceramida sintase. (Vallee e Riezman, 2005)

### 5.3 A adaptação de *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> altera a composição celular de esteróis mas não altera a composição de esteróis da membrana plasmática

Dado o conhecimento anterior relativo à existência de uma maior sensibilidade das estirpes mutantes no metabolismo do ergosterol *erg3Δ* e *erg6Δ* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004) e a alterações de fluidez da membrana plasmática durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Folmer *et al.*, 2008), levantou-se a hipótese de alterações nos níveis de ergosterol terem um papel fundamental nas alterações de permeabilidade que ocorrem na membrana plasmática durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae* (Branco *et al.*, 2004) e também em *S. pombe* na resposta ao stress oxidativo (Tafforeau *et al.*, 2006). Por outro lado, também foi possível observar que a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae* reprime a expressão de enzimas envolvidos na biossíntese do ergosterol como já foi referido anteriormente (capítulo 4.2). Assim, com vista a uma maior compreensão deste fenómeno e do papel exacto do ergosterol no fenómeno adaptativo, procedeu-se a uma análise temporal dos esteróis totais de *S. cerevisiae* durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Da análise dos esteróis totais, presentes nas células de *S. cerevisiae*, foi possível observar que o esteroide mais abundante é, como esperado, o ergosterol consistindo esta molécula em 70% do total de esteróis detectados (Quadro 32). Para além do ergosterol foi ainda observada a presença de várias moléculas intermediárias da via biossintética do ergosterol, sendo que os níveis de algumas delas se encontram alterados com a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### Quadro 32 – As quantidades relativas de intermediários da via do ergosterol variam durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

As células adaptadas foram tratadas com 150 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 15, 30 e 90 min. Os resultados correspondem a média ± desvio padrão de 4 experiências independentes. \*P<0,05, \*\*P<0,001 versus controlo

Esterol	Esteróis totais (%)			
	Células controlo	Células adaptadas ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
		15 min	30 min	90 min
Lanosterol	8,4±0,9	7,0±1,1	7,2±0,6	9,8±1,0
4,4-Dimetilzimosterol	2,1±0,3	4,0±0,8*	3,9±0,8*	2,9±0,2
Zimosterol	12,1±0,4	12,2±0,3	11,5±0,4	10,0±0,7**
Fecosterol	2,0±0,3	2,8±0,3*	2,8±0,3*	2,6±0,2
Episterol	1,0±0,1	1,6±0,1	1,8±0,03	2,0±0,1*
5,7,22,24-ergostatetraenol	0,9±0,4	0,7±0,1	0,5±0,1	0,4±0,3
Ergosterol	73,5±0,6	71,7±1,2	72,3±1,1	72,2±1,3

A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 min e 30 min levou a um aumento nos níveis relativos de 4,4-dimetilzimosterol e fecosterol (aproximadamente 100% e 50% respectivamente). Aos 90 min de adaptação, foi ainda possível observar uma diminuição de aproximadamente 20% nos níveis relativos de zimosterol e um aumento de aproximadamente 100% nos níveis de episterol. Surpreendentemente, não foram observadas alterações quer nos níveis relativos, quer nos níveis absolutos de ergosterol total durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quadro 32 e Quadro 33).

**Quadro 33 – A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae* leva a um aumento dos níveis de esqualeno e a uma manutenção dos níveis de ergosterol.**

As células adaptadas foram tratadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 15, 30 e 90 min. Os resultados correspondem a média ± desvio padrão de 4 experiências independentes. \*P<0,05, \*\*P<0,001 e \*\*\*P<0,02 versus controlo

Quantidade (µg/mg proteína)	Células controlo	Células adaptadas ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
		15 min	30 min	90 min
<b>Esqualeno total</b>	1,0±0,1	1,0±0,2	1,5±0,2*	2,4±0,3**
<b>Esqualeno da membrana plasmática</b>	11,5±2,1	-	-	24,0±4,4***
<b>Ergosterol total</b>	24,5±1,7	21,7±1,0	23,7±4,1	24,9±4,0
<b>Ergosterol da membrana plasmática</b>	215,8±23,5	-	-	221,8±32,8

O próximo passo consistiu em avaliar se as diferenças observadas ao nível dos esteróis totais se reflectiam nos níveis de esteróis da membrana plasmática. Mais uma vez foi possível observar que o ergosterol é o esterol mais abundante (80% dos esteróis presentes na membrana plasmática). Foi ainda observada a presença (Quadro 34) de apenas 3 precursores do ergosterol em pequenas quantidades (lanosterol, zimosterol e fecosterol). Em termos de diferenças nos níveis de esteróis entre as células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e as células controlo observou-se a inexistência de diferenças significativas nos níveis de ergosterol (relativo e total) e dos seus intermediários na membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Quadro 33 e Quadro 34).

**Quadro 34 – A composição em esteróis da membrana plasmática de *S. cerevisiae* não é alterada com a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Células adaptadas foram tratadas com 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 90 minutos. Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de 3-4 experiências independentes.

<b>Esteróis (%)</b>	<b>Células controlo</b>	<b>Células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>
<b>Lanosterol</b>	6,5±2,0	7,6±0,6
<b>Zimosterol</b>	5,0±1,7	4,9±1,0
<b>Fecosterol</b>	9,0±2,4	9,5±0,3
<b>Ergosterol</b>	79,4±6,0	78,0±1,5

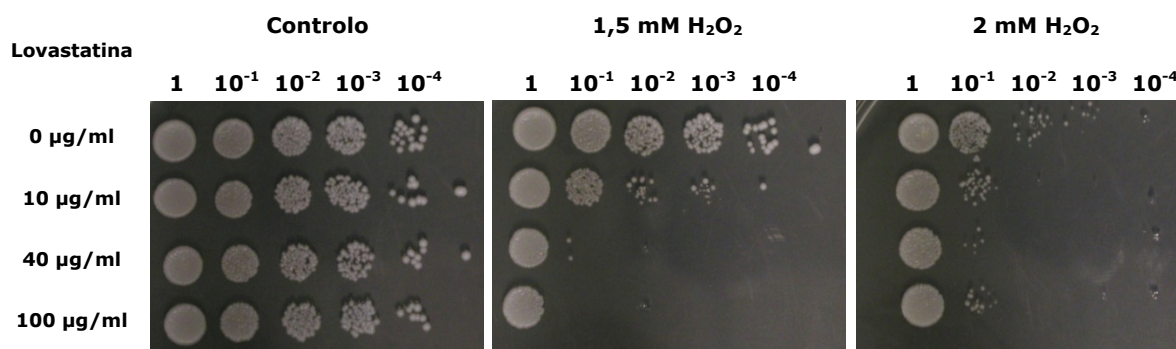
**5.3.1 Adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta os níveis de esqualeno em *S. cerevisiae***

Contrastando com a ausência de alterações nos níveis de ergosterol, os níveis de esqualeno total, um intermediário fulcral na biossíntese de ergosterol, duplicaram após adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 90 min (Quadro 33). Interessantemente, este aumento da concentração de esqualeno está em concordância com a repressão da expressão dos níveis de mRNA do gene *ERG1*, que codifica para o esqualeno epoxidase, o enzima responsável pela catálise da conversão do esqualeno em epóxido de esqualeno como já foi referido anteriormente (ver Resultados I). Face a estes resultados podemos inferir que a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possivelmente causa uma constricção nesta secção da via biossintética do ergosterol. Interessantemente este aumento nos níveis totais de esqualeno levou a uma maior inserção de esqualeno na membrana plasmática com os níveis de esqualeno na membrana plasmática a aumentarem mais de 100% nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparadas as células controlo (Quadro 33).

De modo a analisar mais em pormenor o papel do esqualeno na adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> optou-se por perturbar a via biossintética do ergosterol no ponto mais inicial possível recorrendo à lovastatina, um inibidor competitivo do enzima HMG-CoA redutase responsável pela catálise da conversão do HMG-CoA em mevalonato (Lorenz e Parks, 1990). Este inibidor permitiu estudar o efeito duma interrupção na parte inicial da via do ergosterol (antes da síntese de esqualeno) através da medição da sobrevivência celular durante a resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As células tratadas com lovastatina, de acordo com o descrito em 3.2.4, foram colocadas a crescer em meio sólido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, encontrando-se representada na Figura 27 os resultados de uma experiência representativa. Observando a Figura 27 é possível inferir que a lovastatina *per se* não afecta o normal crescimento das células, já que na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não se observam diferenças ao nível do crescimento entre células tratadas e o controlo, o que indica claramente que as doses utilizadas neste ensaio não possuem um efeito citotóxico sobre este microrganismo. Contudo, ao analisarmos o efeito do pré-tratamento com lovastatina sobre a

sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observamos que o crescimento celular das células tratadas é drasticamente afectado em meio sólido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta diferença de crescimento leva a concluir que existe uma maior sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando a via biossintética do ergosterol é interrompida e é consistente com a hipótese de que o aumento dos níveis de esqualeno observado nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode estar implicado na maior resistência das células de *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

De referir ainda que na literatura já foi efectuada uma associação entre os efeitos da lovastatina e a disrupção de jangadas membranares (Gower e Graham, 2001) o que levanta a questão da maior sensibilidade da células tratadas com lovastatina ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poder ser devida não ao papel de componentes individuais na membrana plasmática, mas devido ao seu papel nos microdomínios das jangadas membranares (ver capítulo 5.3.2).



**Figura 27- As células de *S. cerevisiae* pré-tratadas com lovastatina são mais sensíveis ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

As células de *S. cerevisiae* foram pré-tratadas com lovastatina (10, 40 e 100 µg/ml) durante 18 h e aplicadas em meio sólido YPD com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 48 h a 37°C foi tirada uma fotografia a cada placa encontrando-se nesta figura uma experiência representativa dos resultados obtidos (3 experiências independentes no total).

A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não levou à observação de mudanças nos níveis relativos de ergosterol e dos esteróis precursores que se encontram na membrana plasmática. Também se observou que a razão entre o ergosterol e as proteínas da membrana plasmática não mudou durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quadro 33). Contrariamente ao observado para os outros intermediários da via de biossintese do ergosterol, observou-se um aumento dos níveis totais de esqualeno induzido pela adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que também se traduziu numa maior quantidade de esqualeno incorporado na membrana plasmática. Assim, os níveis de esqualeno, uma molécula altamente apolar aumentaram mais de 2 vezes na membrana plasmática de células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparados com as células controlo. A importância da via biossintética do ergosterol foi



reforçada com a observação de uma maior sensibilidade de células, tratadas com lovastatina, ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

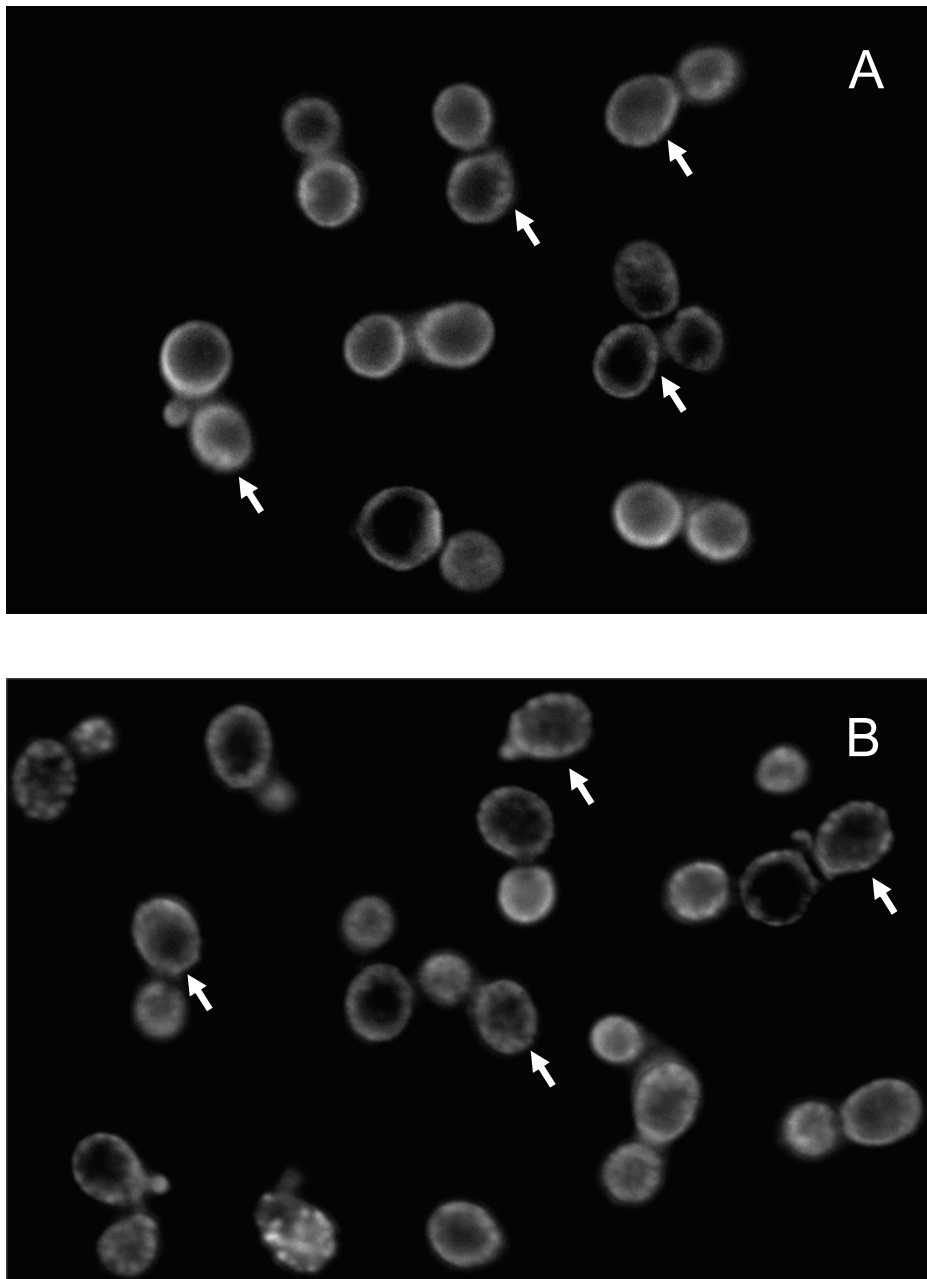
### **5.3.2 A adaptação da *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leva a uma redistribuição dos domínios ricos em esteróis e a aumento dos domínios ordenados na membrana plasmática<sup>3</sup>**

O ergosterol não apresenta uma distribuição homogénea na membrana plasmática e associa-se a esfingolípido com grupos acilo longos formando microdomínios na membrana plasmática denominados jangadas membranares (Simons e Ikonen, 1997). As alterações na distribuição do ergosterol na membrana plasmática também podem ocorrer noutras situações, como por exemplo, a despolarização da membrana (Grossmann *et al.*, 2007) tendo já sido proposto que as jangadas membranares possam estar envolvidas na resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de uma estirpe de *S. cerevisiae* mutante no gene que codifica para a subunidade β do sintase de ácidos gordos (*fas1Δ*) (Matias *et al.*, 2007). Assim, colocou-se a hipótese de durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorrer uma reorganização dos domínios membranares. Para testar esta hipótese optou-se por marcar os esteróis da membrana plasmática *in vivo* com filipina, um composto antifúngico fluorescente que interage com os 3'-β-hidroxi esteróis (Norman *et al.*, 1972).

A adição do fluoróforo filipina a células de *S. cerevisiae* revelou uma marcação não homogénea da membrana plasmática. Na verdade, a marcação apresentada revela uma elevada heterogeneidade sendo possível a distinção clara de microdomínios de ergosterol na membrana plasmática tanto nas células controlo como nas células expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 28). Usando o *software Image-Pro Plus*, foi feita uma análise do perfil de heterogeneidade de fluorescência da membrana plasmática de várias células de *S. cerevisiae* tendo-se obtido valores de  $2,26 \pm 0,145$  e  $4,08 \pm 0,14$  para células controlo e células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente. Esta clara diferença de perfil demonstrou que existe uma maior heterogeneidade nos domínios membranares ricos em esteróis nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta observação é então indicativa de uma reorganização celular dos microdomínios ricos em esteróis aquando da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na membrana plasmática de *S. cerevisiae*.

---

<sup>3</sup> Dados obtidos em colaboração com um membro do grupo (Ana Matias)

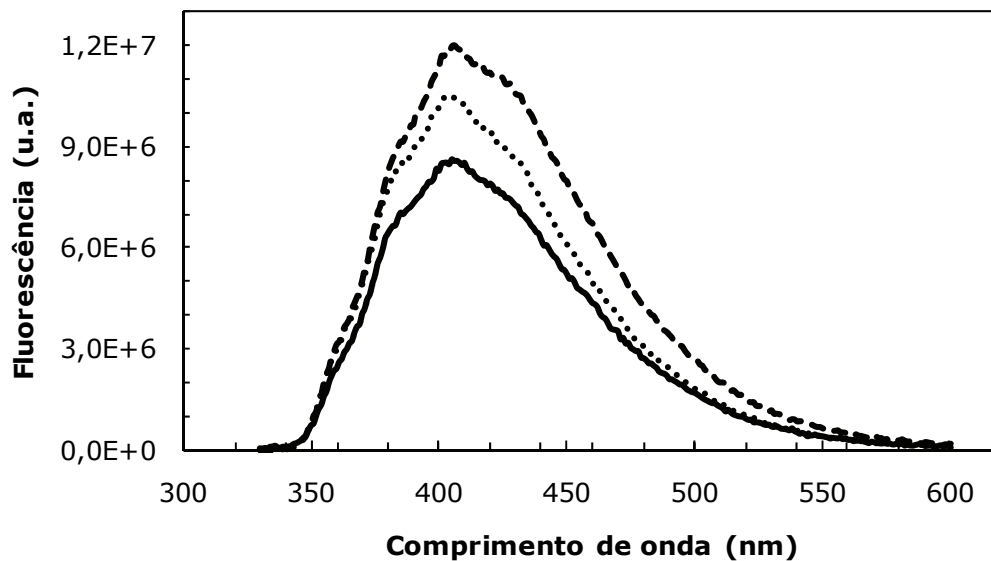


**Figura 28 – A heterogeneidade dos domínios ricos em esteróis aumenta na membrana plasmática de células de *S. cerevisiae* adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Imagens de fluorescência de células de *S. cerevisiae* marcadas com filipina mostrando a distribuição dos esteróis na membrana plasmática em células controlo (A) e células adaptadas (B) com 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 90 min. Um perfil de heterogeneidade da membrana plasmática foi obtido através da quantificação da fluorescência individual de várias células de *S. cerevisiae*, encontrando-se assinalados com setas brancas algumas das zonas heterogêneas.

De modo a confirmar os resultados obtidos com a filipina, recorreu-se a uma análise de parâmetros biofísicos com uma sonda fluorescente, neste caso uma sonda lipófila – o ácido *trans*-parinárico (t-Pna). O ácido *trans*-parinárico é um composto que emite fluorescência e que se insere nas zonas mais ordenadas da membrana plasmática

funcionando por isso como um bom indicador do aumento da ordem da membrana. O t-Pna insere-se na bicamada lipídica paralelamente às cadeias longas dos fosfolípidos e esfingolípidos. O fluoróforo, que é um polieno conjugado, é muito sensível a alterações da ordem da membrana (de Almeida *et al.*, 2002), já que a sua configuração *trans* leva a que o mesmo se ligue mais facilmente a zonas lipídicas ordenadas, razão pela qual se particiona preferencialmente em zonas muito ordenadas como os domínios gel ricos em esfingolípidos (Castro *et al.*, 2007). Para além disso quando este componente se localiza nestas zonas mais ordenadas dá-se o aparecimento de um decaimento de fluorescência entre 20 a 50 ns dependendo do tipo de domínio (microdomínios ou sólido) (Silva *et al.*, 2007). Este componente é responsável por um aumento considerável no rendimento quântico nesses domínios em comparação com as zonas fluidas da membrana. Logo a fluorescência emitida pelo t-Pna vem na sua maioria dos domínios ordenados sendo, conseqüentemente, as alterações de fluorescência observadas dependentes da quantidade ou da constituição em esteróis e esfingolípidos destes microdomínios rígidos. A partir da Figura 29 é possível inferir que aos 15 min e 90 min de adaptação ocorre um aumento do rendimento quântico de fluorescência o que é indicativo de uma maior ordenação de microdomínios na membrana plasmática de *S. cerevisiae*. O facto de aos 15 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> já se observarem alterações, está de acordo com dados anteriores do grupo ao nível de medições de anisotropia e constantes de permeabilidade (Folmer *et al.*, 2008). Este resultado vem reforçar as observações obtidas para a filipina, confirmando-se assim a existência de uma alteração ao nível dos microdomínios estruturais da membrana plasmática, que parece indicativa de um aumento do número de jangadas membranares.



**Figura 29 – Número de microdomínios ordenados aumenta na membrana plasmática de células de *S. cerevisiae* adaptadas ao  $H_2O_2$ .**

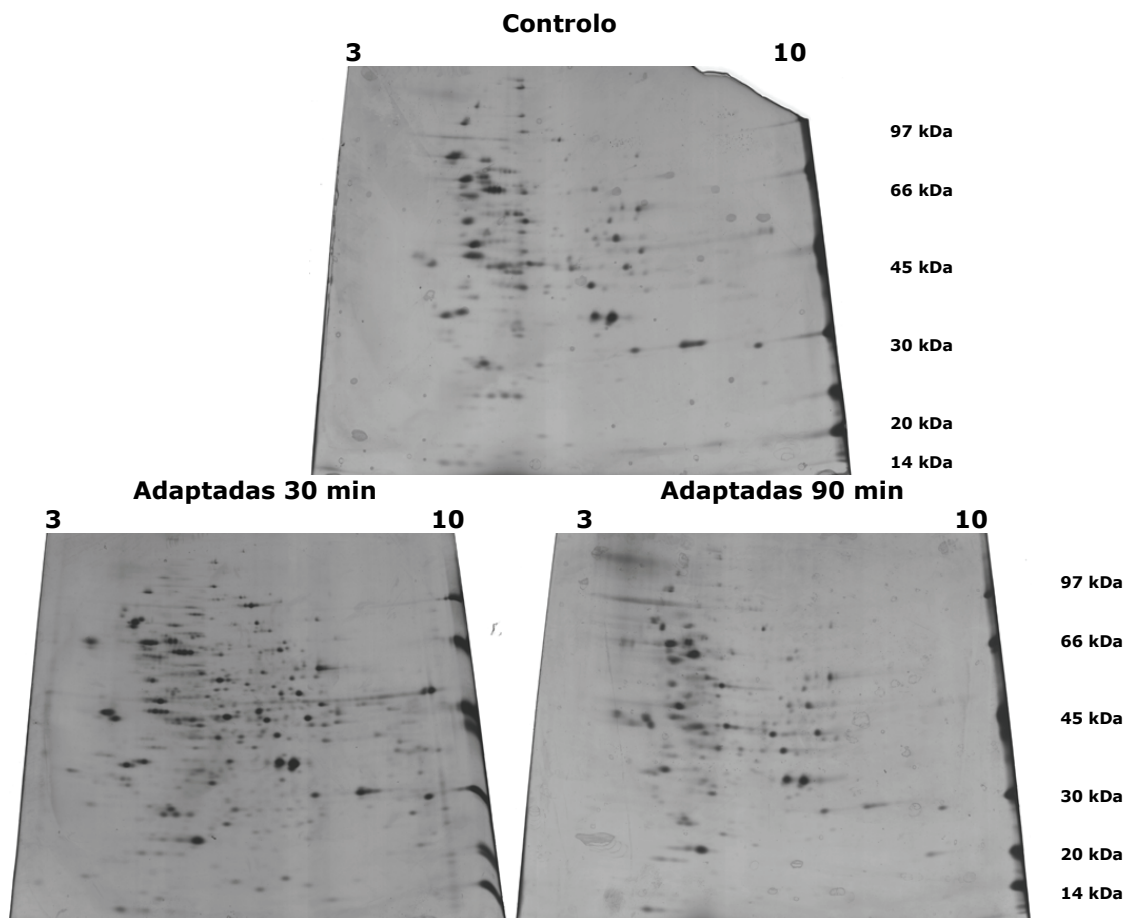
Espectro de emissão da sonda fluorescente ácido *trans*-parinárico incorporada em células controle (linha contínua) e em células adaptadas ao  $H_2O_2$  durante 15 min (linha tracejada) e 90 min (pontos). Os espectros correspondem à mediana de 3 experiências independentes.

## **6 Resultados III: Análise proteómica da membrana plasmática de *S. cerevisiae* durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Com o objectivo de caracterizar as possíveis alterações na composição da membrana plasmática de *S. cerevisiae* durante a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para além da análise dos lípidos da membrana, foi feita a análise e quantificação das proteínas cujos níveis se apresentavam alterados pela adaptação. Para a análise proteómica da membrana plasmática de células *S. cerevisiae* controlo e adaptadas através da adaptação a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário, seguiu-se a seguinte metodologia experimental:

1. Isolamento de membranas plasmáticas de células controlo e adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
2. Separação em géis bidimensionais dos extractos proteicos obtidos de membranas;
3. Análise qualitativa e quantitativa dos diferentes extractos proteicos a partir dos géis;
4. Identificação por espectrometria de massa das proteínas que apresentavam níveis significativamente diferentes nas células adaptadas, quando comparadas com as das células controlo;
5. Análise global dos padrões de expressão proteica;

A análise das proteínas da membrana plasmática de *S. cerevisiae* implica uma abordagem experimental com alguma complexidade, já que as proteínas de membrana apresentam uma elevada hidrofobia, devido aos seus domínios transmembranares que se encontram inseridos na zona mais interior e, conseqüentemente mais hidrófoba, das bicamadas lipídicas. Esta hidrofobia das proteínas membranares leva a que ocorram dificuldades na solubilização das mesmas em solventes aquosos (Navarre *et al.*, 2002) quando se pretende efectuar estudos com recurso à análise bidimensional, dado que esta análise bidimensional implica a utilização de detergentes mais “suaves” não iónicos, não sendo adequado recorrer a detergentes mais fortes (por exemplo, SDS) devido às suas interferências no processo de focagem isoeléctrica. O protocolo que foi usado neste trabalho, permitiu efectuar a separação de proteínas da membrana plasmática ou associadas à mesma, embora nunca seja de excluir a possibilidade de perda de alguma proteína mais resistente ao processo de solubilização utilizado. Assim, foram analisadas as proteínas extraídas de membranas plasmáticas puras (ver confirmação da pureza desta fracção no capítulo 3.2.6.1), de células controlo e células adaptadas através da adaptação a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em estado estacionário, durante 30 min e 90 min.

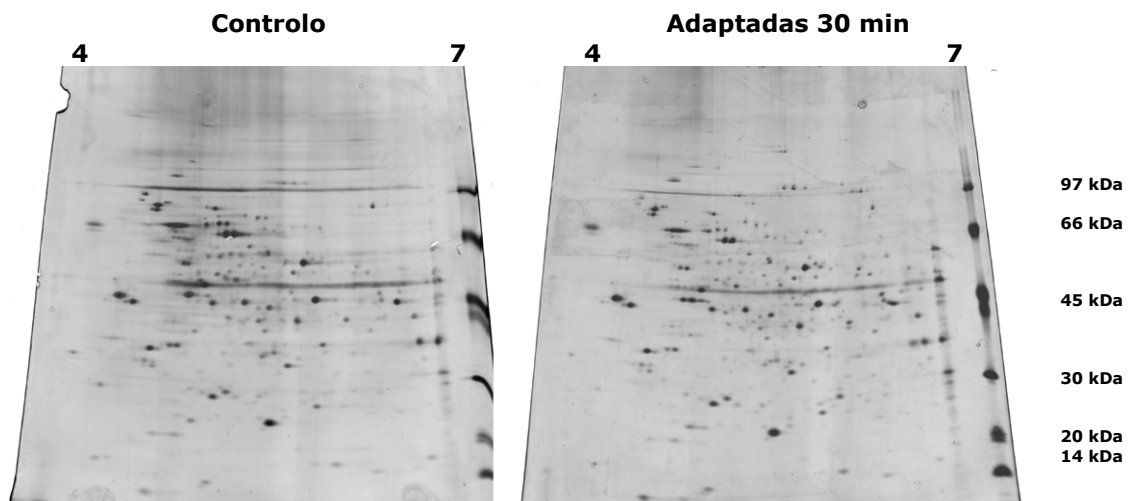


**Figura 30 – Separação bidimensional das proteínas da membrana plasmática em células controlo e adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

As células foram expostas a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 30 e 90 min. Os géis apresentados são representativos de electroforeses bidimensionais efectuadas, usando nitrato de prata como revelador e uma gama linear de ponto isoeléctrico entre 3-10.

Relativamente à separação das proteínas em géis bidimensionais, inicialmente optou-se por uma separação das proteínas das membranas das células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 90 min e respectivo controlo, usando na 1ª dimensão, uma gama ampla de pontos isoeléctricos (pI 3-10). A análise destes géis (Figura 30) mostrou a existência de um número médio de 300 proteínas na membrana plasmática de células controlo e adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Apesar do número de proteínas ser muito superior ao determinado anteriormente por Delom *et al.* (Delom *et al.*, 2006) para a membrana plasmática de *S. cerevisiae* (86 proteínas), o isolamento experimental utilizado neste estudo procede à eliminação das proteínas solúveis associadas à membrana justificando-se assim o maior número de proteínas presentes nos géis, nas nossas condições experimentais. Observou-se ainda que, nas nossas condições experimentais, as proteínas se encontravam na sua maioria num intervalo de pontos isoeléctricos ácidos. Como tal, optou-se por fazer uma

separação das proteínas na primeira dimensão no intervalo de ponto isoeléctrico de 4-7 aumentando deste modo a resolução na zona onde se tinha observado uma maior quantidade de proteínas (Figura 31).



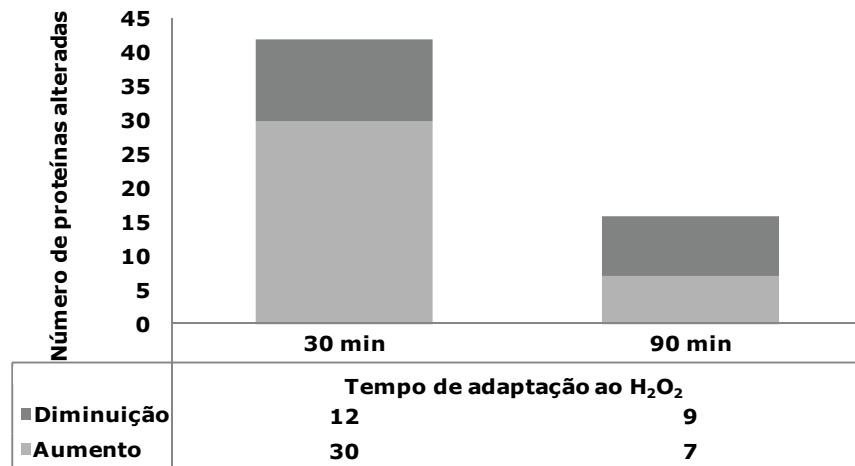
**Figura 31 – Separação bidimensional das proteínas da membrana plasmática em células controlo e adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

As células foram expostas a 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 30 min. Os géis apresentados são representativos de electroforeses bidimensionais efectuadas usando nitrato de prata como revelador e uma gama linear de ponto isoeléctrico entre 4-7.

Por outro lado, como os resultados experimentais obtidos a partir da análise com *microarrays* indicavam que as células respondem rapidamente à presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, optou-se por fazer também a análise das proteínas da membrana plasmática ao fim de 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de modo a comprovar a existência, ou não, de uma possível correlação entre a resposta transcricional de determinado mRNA e os níveis da respectiva proteína na membrana plasmática. Contudo, é possível a não existência desta correlação uma vez que este estudo incidiu sobre os níveis proteicos de uma membrana em particular – a membrana plasmática – o que naturalmente implica o envolvimento de um sistema de transporte de proteínas. Além disso, não se pode assumir que uma alteração ao nível do mRNA se irá traduzir automaticamente num aumento da respectiva proteína, já que a tradução é um fenómeno extremamente regulado em todas as células (Cyrne *et al.*, 2003).

Após o alinhamento dos géis e correspondente análise quantitativa efectuou-se a identificação das proteínas da membrana plasmática que apresentavam alterações estatisticamente relevantes durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e que constituíram o nosso alvo de estudo. Observou-se que aos 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorrem alterações em 42 proteínas (Figura 32), com uma predominância para que a alteração observada seja caracterizada por um aumento dos níveis dessas mesmas proteínas (30 proteínas

induzidas vs 12 proteínas reprimidas). Aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observou-se que o número de proteínas que apresentam variações é substancialmente menor (21 proteínas), o que se correlaciona com a presença de uma resposta transitória ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tal como se observou ao nível da resposta transcricional (Capítulo 4)



**Figura 32 – O proteoma da membrana plasmática é alterado durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Proteínas da membrana plasmática cujos níveis se alteraram significativamente ( $P < 0,05$ ) em células expostas a uma dose adaptativa de 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário durante 30 min e 90 min.



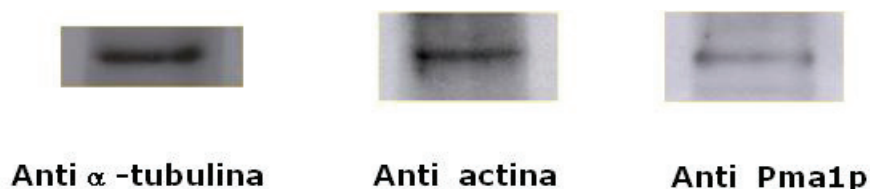
**Quadro 35 – Proteínas da membrana plasmática de *S. cerevisiae* cujo nível foi alterado durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Foi efectuada a análise das proteínas da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* após a exposição a um estado estacionário de 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min e 90 min. Foram consideradas apenas as alterações superiores ou inferiores a 1,5 vezes o valor determinado para o controlo e que apresentassem significância estatística ( $P < 0,05$  versus controlo). Algumas das proteínas identificadas apresentam mais do que um valor, o que é indicativo que algumas das proteínas da membrana plasmática, apresentam várias modificações pós-traducionais. As proteínas encontram-se ordenadas pela respectiva ORF e a função das proteínas listadas foi obtida a partir da descrição existente na base de dados *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>).

Gene	Proteína	Descrição sumariada da função	Variação vs controlo		Localização celular
			30 min	90 min	
YAL003W	Efb1	Factor de elongação 1 Beta	-2,7		Ribossomas
YAL012W	Cys3	Cistationina $\gamma$ -liase	7,6		Citoplasma
YAL038W	Pyk1	Piruvato cinase	2,1		Citoplasma
			1,6		
YBL099W	Atp1	Subunidade alfa do sector F1 do ATPase mitocondrial	2,0		Mitocôndrios
YBR052C	Rsf1	Proteína com função supressora da Rad55.	3,4	2,7	Mitocôndrios/Núcleo
YBR127C	Vma2	Subunidade B do ATPase vacuolar exportador de H <sup>+</sup>	-1,7	-2,2	Vacuolo/Citoplasma
YBR196C	Pgi1	Fosfoglucose isomerase	4,9		Mitocôndrios/Citoplasma
YCR012W	Pgk1	3-Fosfoglicerato cinase	1,8		Mitocôndrios/Citoplasma
YDL055C	Psa1	GDP-manose pirofosforilase	1,8		Citoplasma
YDL182W	Lys20	Homocitrato sintase	4,7		Mitocôndrios/Núcleo
YDR032C	Pst2	Proteína induzida por stress oxidativo de um modo dependente da proteína Yap1p	2,4		Mitocôndrios/Citoplasma
YDR304C	Cpr5	Rotamase	2,5	2,3	Citoplasma/Reticulo Endoplasmático
YDR353W	Trr1	Tiorredoxina redutase	3,3		Citoplasma
YER091C	Met6	Homocisteína metiltransferase	-2,4	-1,9	Citoplasma
YER165W	Pab1	Proteína de ligação à cadeia poli A do mRNA		-3,1	Citoplasma/Núcleo/Ribossomas
YGL202W	Aro8	Aminotransferase de aminoácidos aromáticos	1,5		Citoplasma
YGL148W	Aro2	Corimato sintase	3,6		Citoplasma
YGL253W	Hxk2	Hexocinase 2	-1,6		Mitocôndrios/Citoplasma/Núcleo
YGR086C	Pil1	Proteína que responde a bases de cadeia longa	1,5		Mitocôndrios/Citoplasma
			2,1		

YGR155W	Cys4	Cistationina β-sintase	-2,2	Mitocôndrios/Citoplasma
YGR209C	Trx2	Tiorredoxina 2	1,9	Citoplasma/Vacuolo
YHR183W	Gnd1	6-Fosfogluconato desidrogenase	2,2	Mitocôndrios/Citoplasma
YIL041W	Gvp36	Proteína presente nas vesículas do Golgi	-2,7	Citoplasma/Golgi
YIL034W	Kar2	ATPase envolvido no transporte e <i>folding</i> de proteínas no retículo endoplasmático	1,7	Retículo Endoplasmático
YJR064W	Cct5	Subunidade da chaperonina CCT	-1,8	Citoplasma/Citosqueleto
YJR121W	Atp2	Subunidade beta do sector F <sub>1</sub> do ATP sintase	3,6	Mitocôndrios
YKL056C	Tma19	Proteína homóloga da TCTP de mamífero	-2,9	Citoplasma/Mitocôndrios/Ribossomas
YKL060C	Fba1	1,6-Bifosfato de frutose aldolase	-1,5	Mitocôndrios/Citoplasma
YKL152C	Gpm1	Fosfoglicerato mutase	2,1	Mitocôndrios/Citoplasma
YLR058C	Shm2	Glicina hidroximetiltransferase	-3,1	Citoplasma
YLR109W	Ahp1	Hidropéroxido de alquilo reductase	4,1	Citoplasma
			4,3	
			3,9	
YLR293C	Gsp1	Proteína associada ao GTP envolvida na importação nuclear de proteínas	-4,1	Citoplasma/Núcleo
YLR304C	Aco1	Aconitase	2,3	Mitocôndrios/Citoplasma
YLR340W	Rpp0	Proteína ribossomal ácida	-1,7	Ribossomas
YLR354C	Tal1	Transaldolase	4,4	Citoplasma
YMR083W	Adh3	Álcool desidrogenase (isoenzima 3)	3,7	Mitocôndrios
			2,8	
YMR116C	Asc1	Proteína ortóloga da proteína RACK	2,3	Citoplasma/Ribossomas
YMR203W	Tom40	Componente da translocase da membrana externa mitocondrial	3,7	Mitocôndrios
YNL010W	-	Proteína com função semelhante aos fosfatases de fosfoserinas	-2,5	Citoplasma/Núcleo
YOR197W	Mca1	Protease de cisteína semelhante aos caspases dos mamíferos	-1,8	Núcleo
YOR285W	-	Proteína de função desconhecida	-2,1	Mitocôndrios/Retículo Endoplasmático
YPL061W	Ald6	Aldeído desidrogenase activada por magnésio	-2,2	Mitocôndrios/Citoplasma
YPL145C	Kes1	Membro da família de proteínas envolvidas no transporte de esteróis	-2,5	Citoplasma/Golgi
YPR173C	Vps4	Proteína reguladora do transporte de esteróis	-2,1	Membrana/Citoplasma/Retículo Endoplasmático

A identificação das proteínas cujos níveis sofrem alterações aos 30 min e 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quadro 35) revelou que não ocorreram alterações ao nível de proteínas membranares de referência como, por exemplo, a Pma1p, um H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática. Este facto poderia sempre levantar a questão, de não se ter efectuado uma completa solubilização das proteínas da membrana durante a preparação dos extractos a analisar nos géis bidimensionais. Assim, para responder a esta questão, foi feita a identificação por *Western blot* da proteína Pma1p nos extractos proteicos obtidos a partir da membrana plasmática recorrendo a um anticorpo específico anti-Pma1p. Na Figura 33 é possível observar que os referidos extractos proteicos contêm a proteína Pma1p, confirmando assim que o protocolo utilizado permite a extracção de proteínas intrínsecas da membrana plasmática. Uma vez que o objectivo deste estudo não era identificar todas as proteínas da membrana plasmática separadas através das electroforeses bidimensionais, mas sim identificar apenas aquelas cujos níveis apresentavam diferenças significativas relativamente às células controlo, pode-se concluir que os níveis das proteínas ditas de "referência", simplesmente não apresentaram alterações durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, muitas das proteínas identificadas nos géis bidimensionais correspondem a proteínas que não são tidas normalmente como proteínas localizadas na membrana plasmática, o que poderia levantar a questão de existir alguma contaminação ao nível do isolamento das membranas. No entanto, noutros trabalhos publicados, foram igualmente identificadas na fracção da membrana plasmática proteínas não membranares, em número muito considerável (Delom *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2002). Esta identificação é comum, mesmo quando foi utilizado um protocolo um pouco mais complexo para reduzir a possibilidade da ocorrência de fenómenos de formação de micelas da membrana plasmática com conseqüente internalização de contaminantes no seu interior (Delom *et al.*, 2006).



**Figura 33 – A fracção proteica de membrana plasmática de *S. cerevisiae* contém a proteína da membrana plasmática Pma1p e as proteínas do citosqueleto actina e  $\alpha$ -tubulina.**

Extractos de membrana plasmática obtidos a partir de células controlo, contendo 60 mg de proteína, foram analisados por *Western blot* para a presença da Pma1p uma proteína da membrana plasmática clássica e para a presença de proteínas do citosqueleto ( $\alpha$ -tubulina e actina).

Um facto igualmente importante é que o citosqueleto de actina das células de *S. cerevisiae* está intimamente associado à membrana plasmática através dos *patches* do córtex de actina (Mulholland *et al.*, 1994). No sentido de confirmar se a actina e a tubulina são co-purificadas com as membranas plasmáticas nas nossas condições experimentais, foi feita uma análise por *Western blot* dos extractos proteicos das membranas plasmáticas usando anticorpos específicos anti- $\alpha$ -tubulina e anti-actina. Os resultados obtidos (Figura 33) permitem demonstrar a existência de  $\alpha$ -tubulina e de actina nos extractos proteicos de membranas plasmáticas em estudo. Assim, na preparação das membranas plasmáticas, segundo o protocolo utilizado neste trabalho, é natural que sejam arrastadas proteínas associadas ao citosqueleto de actina e aos microtúbulos e que não estão integradas na membrana plasmática, mas que se encontram associadas à face interna da membrana, e têm um papel importante em diversas funções celulares (Cau e Hall, 2005). Dentro do conjunto de proteínas presentes no Quadro 35, foi possível identificar não só proteínas que apresentam interacções com o citosqueleto de actina (Efb1p) ou com o citosqueleto de tubulina (Tma19p), como ainda directamente envolvidas na organização estrutural do citosqueleto (Cct5p), comprovando-se assim a existência de várias interacções entre citosqueleto e membrana plasmática (Rinnerthaler *et al.*, 2006; Furukawa *et al.*, 2001; Stoldt *et al.*, 1996). Em resumo, a presença em extractos de membranas plasmáticas purificadas de proteínas cuja localização celular conhecida não é a membrana plasmática e cujo nível se alterou e o facto de não se terem observado alterações nos níveis de proteínas transmembranares durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderão estar relacionados com três factores:

1. O protocolo seguido neste trabalho para o isolamento das membranas não utiliza esferoblastos, o que leva a que sejam detectadas proteínas associadas à face exterior da membrana plasmática e/ou à parede celular;
2. O extracto de membranas plasmáticas obtido não exclui as proteínas que interagem com a membrana plasmática e, conseqüentemente, estão igualmente presentes proteínas que não fazem parte integrante da membrana plasmática;
3. A ausência de detecção de proteínas transmembranares pode ser apenas devida ao facto dos níveis destas proteínas não se alterarem quando há adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;

Considerando os dois primeiros pontos enumerados acima, devemos referir, que estamos perante extractos que contêm proteínas membranares e proteínas associadas às faces interior e exterior da membrana plasmática o que constitui, no nosso ponto de vista, uma vantagem extremamente importante no estudo de fenómenos de exocitose e também fenómenos de interacção e inserção de componentes celulares na membrana, não

excluindo os fenómenos associados à sinalização celular. Outro factor relevante é que no estudo das proteínas não se pode considerar somente a função clássica das mesmas (Jeffery, 1999), uma vez que certas proteínas desempenham funções distintas conforme a sua localização – as chamadas *moonlighting proteins* – ou seja, a função de determinada proteína está intimamente correlacionada com o ambiente celular que a rodeia.

### **6.1 Alterações nas proteínas da membrana plasmática devido à adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

As alterações observadas nos níveis de várias proteínas, dos extractos da membrana plasmática purificada, não se restringiram somente a um grupo funcional de proteínas, tendo sido observadas variações estatisticamente significativas em diversos grupos funcionais.

No Quadro 36 apresentam-se as proteínas obtidas a partir de extractos proteicos preparados a partir da fracção da membrana plasmática purificada, que apresentam uma alteração nos respectivos conteúdos devido à adaptação a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min e 90 min, agrupadas de acordo com a função que desempenham. No caso da adaptação durante 30 min, a análise destes extractos por electroforese bidimensional na gama de pI 4-7 e pI 3-10 levou à identificação de 18 e 22 proteínas, respectivamente, com conteúdos diferentes. Mesmo tratando-se de zonas de separação das proteínas com resoluções diferentes, observaram-se 2 proteínas comuns nas duas gamas de pontos isoeléctricos. A existência de somente 2 proteínas comuns nas duas gamas de pontos isoeléctricos, está provavelmente relacionada com questões de resolução da focagem realizada e também com a relação entre o número de proteínas que apresentam variações significativas e o número de proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF. Foram portanto identificadas variações significativas num total de 38 proteínas aos 30 min de adaptação a 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário. Relativamente ao estudo das fracções membranares aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os mesmos foram analisados na 1ª dimensão num intervalo de pontos isoeléctricos de 3 a 10. Nestas condições identificaram-se 14 proteínas alteradas com a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É de notar que o número de proteínas com conteúdos diferentes aos 90 min de adaptação é menor quando comparado com as diferenças obtidas aos 30 min de adaptação (total de 22 proteínas para a mesma zona de focagem), após análise nas mesmas condições. Esta diferença pode resultar do facto da resposta celular ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser rápida, estando aos 90 min as células já num estado de recuperação relativamente aos efeitos tóxicos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, o facto de se ter analisado os extractos proteicos dos 90 min de

adaptação apenas na gama de pI mais abrangente, pode ter resultado na não identificação de algumas proteínas por haver uma menor resolução nestas condições.

O agrupamento das proteínas identificadas como tendo os seus níveis alterados durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acordo com a sua função celular foi feito utilizando como guia a distribuição funcional utilizada em (Delom *et al.*, 2006), um estudo onde se aborda os efeitos do composto calcoflúor sobre a membrana plasmática de *S. cerevisiae*. Os agrupamentos determinados foram os seguintes:

- Transporte
- Biossíntese/Degradação
- Organização celular
- *Stress*
- Metabolismo
- Parede celular
- Distribuição e transporte vesicular
- Sinalização celular
- Processo biológico desconhecido

De referir que para as proteínas pertencentes aos grupos “organização celular” e “parede celular” só se observaram alterações nos seus níveis aos 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Analisando o Quadro 36 observa-se que algumas proteínas apresentam várias isoformas (Aph1, Adh3, Pil1, Pyk1), o que é indicativo que algumas das proteínas da membrana plasmática, cujos níveis se encontram alterados nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentam várias modificações pós-traducionais.

De seguida ir-se-á caracterizar as proteínas pertencentes a cada um destes grupos funcionais, e tentar compreender a razão das alterações dos seus conteúdos proteicos na membrana plasmática em células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Quadro 36 – Proteínas da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* cujo nível foi alterado devido à adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> organizadas de acordo com a sua função celular.**

Foi efectuada a análise das proteínas da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* após a exposição a um estado estacionário de 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Foram consideradas como significativas as alterações superiores ou inferiores a 1,5 vezes o valor determinado para o controlo tendo sido somente consideradas as variações que apresentavam uma ANOVA com um valor P<0,05. As proteínas identificadas foram correlacionadas com possíveis alterações de expressão dos níveis de mRNA, obtidas a partir de análise por *microarrays*. Algumas das proteínas identificadas apresentam mais do que um valor, o que é indicativo que algumas das proteínas da membrana plasmática, apresentam várias modificações pós-traduccionais. A função das proteínas listadas foi obtida a partir da descrição constante na base de dados *online Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>). N.S. = Não significativa.

Gene	Proteína	Massa (Da)	Ponto Isoeléctrico	Descrição resumizada da função	Variação vs controlo		Variação de mRNA vs controlo (tempo)
					30 min	90 min	
<b>Transporte</b>							
YBL099W	Atp1	58617	9,85	Subunidade α do F <sub>1</sub> do ATP sintase mitocondrial	2,0		N.S.
YJR121W	Atp2	54947	5,71	Subunidade β do F <sub>1</sub> do ATP sintase mitocondrial	3,6		N.S.
YBR127C	Vma2	57770	4,95	Subunidade B do H <sup>+</sup> -ATPase vacuolar (V-ATPase)	-1,7	-2,2	N.S.
<b>Biossíntese/Degradação</b>							
YAL003W	Efb1	22627	4,13	Factor de elongação 1-β	-2,7		N.S.
YER165W	Pab1	64344	5,71	Proteína de ligação à cadeia poli A do mRNA		-3,1	N.S.
YLR340W	Rpp0	33696	4,75	Proteína ribossomal ácida		-1,7	N.S.
<b>Organização Celular</b>							
YJR064W	Cct5	61152	5,33	Subunidade da chaperonina CCT	-1,8		N.S.
<b>Stress</b>							
YHR183W	Gnd1	53543	6,6	6-fosfogluconato desidrogenase	2,2		Indução (60 minutos)
YGR209C	Trx2	11180	4,79	Tiorredoxina 2	1,9	1,7	Indução ao longo dos 90 min
YLR109W	Ahp1	19274	5,01	Hidroperóxido de alquilo redutase	5,7	4,1	Indução (15,30 e 90 minutos)
					6,8	4,3	
YDR304C	Cpr5	25425	5,35	Rotamase	2,5	2,3	N.S.
YOR197W	Mca1	50788	5,63	Protease de cisteína semelhante aos caspases de mamíferos	-1,8		N.S.
YDR353W	Trr1	34238	5,8	Tiorredoxina redutase	3,3		Indução (15 e 30 minutos)
YKL056C	Tma19	18741	4,25	Proteína homóloga da TCTP de mamífero	-2,9		N.S.
YPL061W	Ald6	54414	5,18	Aldeído desidrogenase activado por magnésio		-2,2	N.S.





YPL145C	Kes1	49632	5,73	Membro da família de proteínas envolvidas no transporte de esteróis	-2,5	N.S.
<b>Sinalização celular</b>						
YGR086C	Pil1	38349	4,36	Proteína que responde a bases de cadeia longa	1,5	N.S.
YMR116C	Asc1	34898	5,8	Proteína ortóloga da proteína RACK	2,1 2,3	N.S.
<b>Processo biológico desconhecido</b>						
YOR285W	-	15413	6,35	Proteína de função desconhecida	-2,1	N.S.
YNL010W	-	27480	5,18	Proteína com função semelhante aos fosfatases de fosfoserinas	-2,5	N.S.
YIL041W	Gvp36	23078	5,15	Proteína presente nas vesículas do Golgi	-2,7	N.S.
YDR032C	Pst2	20966	5,61	Proteína induzida por <i>stress</i> oxidativo de um modo dependente da proteína Yap1p	2,4	Indução (15 minutos)
YBR052C	Rsf1	23078	5,15	Proteína com função supressora da Rad55.	3,4	N.S.
					2,7	

### 6.1.1 Transporte

Embora nas nossas condições experimentais as leveduras obtenham a sua energia maioritariamente através da fermentação da glucose, já que o seu meio de crescimento contém esta fonte fermentativa, observou-se que, relativamente às células controlo, ocorreu um aumento nos níveis das proteínas Atp1p e Atp2p respectivamente de 2 e 3,6 vezes, nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min. Estas duas proteínas são as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da subunidade F<sub>1</sub> do ATP sintase mitocondrial estando associadas ao processo respiratório (não fermentativo). A detecção destas proteínas foi inicialmente considerada como estando associada a uma ligeira contaminação mitocondrial no extracto de membranas plasmáticas. Contudo, podemos estar perante uma interacção entre a membrana mitocondrial e a membrana plasmática, necessária para a existência do transporte de electrões na membrana plasmática (Herst *et al.*, 2008), ou alternativamente, perante um fenómeno de *moonlighting proteins* (Jeffery, 1999), como referido anteriormente, e cuja existência foi reforçada através da análise da literatura (Reiner *et al.*, 2006; Lopez-Villar *et al.*, 2006). Em mutantes nos genes que codificam para as proteínas Atp1p e Atp2p e numa situação de anaerobiose foi observada uma alteração na distribuição celular de esteróis na membrana plasmática e partículas lipídicas. Para além da mutação destes dois genes afectar a distribuição de esteróis, numa estirpe mutante no gene que codifica a proteína Atp1p foi observado um forte efeito sobre a endocitose de esteróis, resultando em baixos níveis de esteróis livres e esterificados (Reiner *et al.*, 2006). Este efeito parece ocorrer ao nível da fase inicial do processo endocítico, provavelmente ao nível da membrana plasmática (Reiner *et al.*, 2006). Estes resultados levantam a possibilidade de num ambiente aeróbio existir também algum tipo de associação entre estas proteínas e a membrana plasmática. Assim, o aumento observado no Atp1p e Atp2p poderá estar relacionado com um possível papel no transporte de esteróis e não com a endocitose dos mesmos (Reiner *et al.*, 2006). É de ter em conta, no entanto, que estes estudos recorrem à suplementação de esteróis. Devido a este constrangimento experimental (ausência de suplementação com esteróis), não se pode colocar a hipótese de alterações da endocitose nas nossas condições experimentais. Assim, as alterações nos níveis de Atp1p e Atp2p durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estarão relacionadas com o transporte de esteróis, muito provavelmente devido às necessidades de ATP do mesmo, tal como já foi observado para o transporte de esteróis desde o retículo endoplasmático até à membrana plasmática (Sullivan *et al.*, 2006).

Foi observada igualmente uma diminuição em cerca de 2 vezes dos níveis da proteína Vma2p aos 30 min e 90 min de adaptação a 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário, o que indica uma diminuição dos níveis desta proteína na membrana plasmática ao longo

da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A proteína Vma2p é uma subunidade essencial do complexo V<sub>1</sub> do ATPase vacuolar que, quando separado do complexo V<sub>0</sub> possui actividade de MgATPase (Rizzo *et al.*, 2007). Embora esta proteína pertença a um de dois complexos proteicos que formam um H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar, num recente estudo de localização de proteínas, foi indicada uma localização citoplasmática para a Vma2p, para além da já referida localização vacuolar (Kumar *et al.*, 2002). Para além desta localização, foi também observado em mamíferos que o ATPase vacuolar, para além das funções clássicas ligadas à acidificação de organelos, também desempenha funções associadas à membrana plasmática (Kane, 2006). A proteína Vma2p poderá ter um papel de relevância na adaptação, pois já foi observado que a estirpe *vma2Δ* tem uma sensibilidade mais elevada ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, medida por mortalidade, e que nesta estirpe ocorre um estado de *stress* oxidativo crónico, em comparação com a estirpe selvagem (Milgrom *et al.*, 2007). Se a isto associarmos a diminuição dos níveis da proteína, quando associada à membrana plasmática, podemos inferir que a Vma2p pode ter um papel na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aquando da adaptação das células a este agente oxidante, sendo que este papel poderá estar associado a um controlo dos níveis de ATP. Esta associação entre a proteína Vma2p e a membrana plasmática é ainda reforçada pela existência de uma sensibilidade da estirpe *vma2Δ* à lovastatina e ao calcoflúor (Fei *et al.*, 2008; Ando *et al.*, 2007), restando saber se este papel ocorre apenas sobre a proteína Vma2p ou se ocorre sobre a totalidade do complexo ATPase vacuolar.

### **6.1.2 Biossíntese/Degradação**

A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min levou a uma diminuição de aproximadamente 3 vezes dos níveis da proteína Efb1p (do inglês, *translation elongation factor 1 beta*), a qual funciona como um factor de alongação da tradução (Kinzy e Woolford, Jr., 1995). Este factor catalisa a formação de GTP a partir de GDP de modo a formar o factor EF-1β ligado ao GTP, que facilita a ligação dos tRNA aos ribossomas (Kinzy e Woolford, Jr., 1995). O factor EF-1β para além de ser responsável pela ligação dependente de GTP do aminoacil tRNA ao local "A" do ribossoma na cadeia de alongação, também participa no *proof reading* do emparelhamento do codão-anticodão. Foi ainda atribuída a esta proteína um papel de ligação à actina (*actin-binding protein*) (Furukawa *et al.*, 2001) o que pode justificar a sua presença na fracção da membrana plasmática (ver Figura 33) uma vez que a actina se liga à membrana plasmática. É ainda referido na literatura que os níveis da proteína Efb1p diminuem na ausência de aminoácidos sendo que, nesta mesma situação, também se observou uma diminuição nos níveis da proteína Asc1p (Valerius *et al.*, 2007), uma proteína da subunidade ribossomal 40S, cujos níveis aumentam durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quadro 36). É possível que a ausência de alguns aminoácidos afecte os níveis destas duas proteínas, que estão directamente

envolvidas no processo de tradução. Por outro lado, o facto de encontrarmos estas duas proteínas associadas à membrana plasmática não é de estranhar, uma vez que a localização do mRNA nas células eucariotas, em diversos locais subcelulares, constitui um mecanismo importante para sequestrar a actividade de uma proteína, regular a expressão génica e estabelecer ou manter a polaridade celular (Shepard *et al.*, 2003). A localização de um mRNA junto à membrana plasmática irá facilitar um aumento da concentração dos produtos da sua tradução em certos locais específicos. Prevê-se, pois, que se possa dar a tradução nesses locais, o que faz com que toda a maquinaria de tradução aí se possa encontrar. Esta situação ocorre claramente durante a divisão celular da levedura com a presença de mRNA de proteínas de exocitose e polarização junto à membrana (Aronov *et al.*, 2007).

A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 90 min levou a diminuições significativas dos níveis de duas proteínas - Pab1p e Rpp0p - que se encontram envolvidas na biossíntese proteica. A proteína Pab1p (do inglês, **Poly(A)-binding protein**) liga-se à cauda poli(A) do mRNA evitando o *decapping* do mRNA. Por outro lado, a Pab1p interacciona com factores da tradução como, por exemplo, o eIF4G (do inglês, **eukaryotic translation initiation factor 4G**), interferindo directamente com a tradução e desadenilação do mRNA, podendo alterar a estabilidade do mRNA (Mangus *et al.*, 1998; Bernstein *et al.*, 1989). Cada uma destas situações pode estar a regular o conteúdo de uma dada proteína, por interferência da eficiência da tradução ou pela alteração da estabilidade dos mRNAs.

Quanto à proteína Rpp0p, ela faz parte do complexo pentamérico constituído pelas proteínas P0 (Rpp0p), P1 e P2 dando origem a um complexo ribossomal (*stalk*), onde a proteína Rpp0p tem um papel central, dado que interage com os factores de alongação durante a síntese proteica (Rodriguez-Gabriel *et al.*, 1998). Esta subunidade é passível de ser fosforilada e, embora a função ribossomal não seja afectada pela fosforilação, a tradução de algumas proteínas pode ser afectada. Este efeito da fosforilação da Rpp0p foi observado não só em *S. cerevisiae* como em células de mamífero (Rodriguez-Gabriel *et al.*, 1998; Maniratanachote *et al.*, 2006). Relativamente às células de mamífero observou-se a ocorrência de desfosforilação da proteína P0 em resposta a um composto citotóxico, tendo sido também observado este tipo de resposta na presença de uma dose moderada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Maniratanachote *et al.*, 2006). Será interessante avaliar futuramente se em *S. cerevisiae* também ocorre desfosforilação da proteína Rpp0p na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tal como referenciado anteriormente relativamente às proteínas Efb1p e Asc1p, a localização dos mRNAs junto à membrana plasmática irá facilitar um aumento da concentração dos produtos da sua tradução em certos locais específicos. Prevê-se, pois, que se possa dar a tradução nesses locais, o que faz com que toda a maquinaria de tradução aí se possa encontrar. Quer a Pab1p quer a Rpp0p são proteínas que fazem

parte dessa maquinaria, pelo que poderão estar a regular a tradução de certos mRNAs, interferindo a nível da elongação da tradução e/ou da estabilidade do mRNA.

### **6.1.3 Organização celular**

A proteína Cct5p, uma proteína fundamental para a organização do citosqueleto, apresenta uma diminuição de aproximadamente 2 vezes nos seus níveis aos 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta proteína – a Cct5p – é uma das subunidades do complexo *chaperone* CCT responsável pelo *folding* da actina e tubulina, proteínas fundamentais do citosqueleto de actina e dos microtúbulos (Stoldt *et al.*, 1996). Dada a importância das proteínas da família CCT em todos os processos celulares, esta repressão é indicativa de um forte efeito da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre o citosqueleto, nomeadamente ao nível da associação entre a membrana plasmática e a organização do citosqueleto. Relativamente a esta associação entre a membrana plasmática e o citosqueleto, foi também observado anteriormente que o citosqueleto de actina influencia a translocação de fosfatidiletanolamina na membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae* (Dixit e Gupta, 1998).

### **6.1.4 Stress**

Observaram-se alterações em 7 proteínas envolvidas em processos de resposta ao *stress* celular após 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em três destas proteínas de resposta ao *stress* celular, nomeadamente as proteínas Ahp1p (hidroperóxido de alquilo redutase), Trx1 (tiorredoxina redutase 1) e Trx2p (tiorredoxina 2), os aumentos observados nos seus níveis foram superiores a 2 vezes. Relativamente às proteínas Ahp1p e Trx2p observou-se a manutenção dos níveis elevados na membrana plasmática aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É ainda de referir que este aumento também foi observado nos níveis de estado estacionário dos mRNA respectivos após análise por *microarrays* (ver capítulo 4 e anexos). Nestes casos concretos, há uma coordenação entre o aumento de síntese do mRNA e as respectivas proteínas na membrana plasmática. A actividade do enzima Ahp1p é regulada pelas proteínas tiorredoxina/tiorredoxina redutase, já que a reciclagem *redox* da Ahp1p é dependente do fluxo de electrões produzido por essas enzimas (Nguyen-nhu e Knoops, 2002; Lee *et al.*, 1999b). Apesar deste aumento significativo, ainda não é claro que o enzima hidroperóxido de alquilo redutase seja essencial para a defesa das células de *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já que existem observações onde a mutação do gene que codifica para esta proteína não provoca um aumento significativo de sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lee *et al.*, 1999b). Contudo, observou-se que a mutação da proteína Ahp1p desempenha um papel importante na resposta à toxicidade de metais e à depleção dos níveis de glutathione (Nguyen-nhu e Knoops, 2002). Estas discrepâncias

entre os dados de literatura e os resultados experimentais obtidos neste trabalho (Quadro 36) devem-se, provavelmente, aos diferentes fundos genéticos das estirpes utilizadas ou mesmo a diferenças nas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou ainda poderão estar relacionados com a localização celular da proteína. Apesar desta aparente conflituosidade de resultados, não se pode excluir um papel importante do Ahp1p na eliminação dos efeitos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, isto se considerarmos que em *E. coli* o principal enzima responsável pela eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um hidroperóxido de alquilo redutase (Seaver e Imlay, 2001) análogo do Ahp1p de *S. cerevisiae*. Pode então dar-se o caso de que o enzima Ahp1p tenha um papel importante na eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na membrana plasmática.

Relativamente ao Ahp1p foram ainda observadas, como já referido anteriormente, várias isoformas (Quadro 36) um sinal indicativo de modificações pós-traducionais, tendo sido reportado na literatura que uma dessas modificações poderá ocorrer sobre a forma de ubiquitinação (Goehring *et al.*, 2003).

Quanto à localização celular destas três proteínas (Ahp1p, Trr1p e Trx2p) considera-se, normalmente, como estando presentes no citosol. Contudo, é de referir que anteriormente já se demonstrou uma associação da proteína Aph1p com a membrana plasmática (Delom *et al.*, 2006). Foi igualmente feita uma associação da Ahp1p a fenómenos de exocitose de proteínas aquando da biogénese da parede celular em células de *S. cerevisiae* sujeitas a uma degradação enzimática da parede (esferoblastos) (Pardo *et al.*, 2000). Reforçando ainda mais a hipótese de uma interacção entre estas enzimas e a membrana plasmática, foi recentemente observada a existência de uma associação directa entre as tiorredoxinas e os *lipid rafts*, através da presença de uma quantidade considerável de tiorredoxinas associadas à fracção insolúvel das membranas das células, na qual se incluem por sua vez os microdomínios (Takeuchi *et al.*, 2007). Dada a inexistência de domínios transmembranares nestas três proteínas, as mesmas poderão associar-se a proteínas associadas a jangadas membranares ou apresentar uma afinidade para os lípidos que constituem maioritariamente estes microdomínios como, por exemplo, os esfingolípidos e o ergosterol (Sievi *et al.*, 2001; Bagnat *et al.*, 2000). Todas as observações anteriores reforçam a nossa hipótese de que este trio de proteínas estará associado entre si e de algum modo à membrana plasmática ou ao espaço periplasmático, desempenhando um papel importante na resposta/adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Subjacente a esta hipótese, a existência destas alterações introduz a ideia de que, embora uma proteína não possua domínios transmembranares, a mesma não pode ser automaticamente excluída de qualquer interacção com a membrana, quer seja por ligação a outra proteína membranar ou pela existência de alguma afinidade com algum dos componentes lipídicos da membrana.

Ainda no grupo de proteínas associadas à resposta ao *stress* celular, também se observou um aumento de 2,5 vezes dos níveis da proteína Cpr5p (rotamase) aos 30 min

e 2,3 vezes aos 90 min de adaptação ao  $H_2O_2$ . A Cpr5p pertence a uma família de proteínas envolvidas na manutenção da estrutura de proteínas, estando associada ao retículo endoplasmático (Dolinski *et al.*, 1997). Dolinski K. *et al* (Dolinski *et al.*, 1997) observaram que a mutação em todas as proteínas desta família, não torna as células inviáveis; os mesmos autores consideram que estas proteínas desempenham um papel na manutenção estrutural de proteínas particulares, e não um papel essencial e geral de manutenção da resposta a alterações na estrutura de proteínas (Dolinski *et al.*, 1997). Em face destes resultados pode-se lançar a hipótese de que durante a adaptação ao  $H_2O_2$  ocorram possíveis alterações estruturais em proteínas membranares específicas, razão pela qual ocorrerá este aumento dos níveis da proteína Cpr5p.

Outra proteína ligada à resposta ao *stress* oxidativo é a proteína Tma19p, uma proteína ortóloga da proteína TCTP de mamífero, que interage com os microtúbulos e com os mitocôndrios (Rinnerthaler *et al.*, 2006). A Tma19p apresenta uma diminuição de 2,9 vezes nos seus níveis após 30 min de adaptação ao  $H_2O_2$  (Quadro 36). Rinnerthaler *et al.* (Rinnerthaler *et al.*, 2006) mostraram que a proteína Tma19p, quando sob a forma de uma quimera associada a GFP (proteína híbrida TCTP/GFP), migra para o mitocôndrio quando as células são sujeitas a *stress* oxidativo (Rinnerthaler *et al.*, 2006). Apesar de não se compreender muito bem a razão da migração para o mitocôndrio desta proteína em *S. cerevisiae*, por comparação com o observado nos sistemas de mamífero, é possível que esta transferência tenha uma função anti-apoptótica. Contrariamente ao esperado, a estirpe mutante no gene que codifica a Tma19p (*Tma19Δ*) apresenta um aumento de resistência ao  $H_2O_2$ , o que aponta para um papel importante da Tma19p na resposta celular à presença deste oxidante. Por outro lado, a proteína Tma19p interage com os microtúbulos, actuando na estabilização dos mesmos (Rinnerthaler *et al.*, 2006). O possível envolvimento dos microtúbulos na resposta da célula ao  $H_2O_2$  já tinha sido posto em evidência na análise da diminuição do conteúdo da Cct5p ao fim de 30 min de adaptação com  $H_2O_2$  (ver capítulo 6.1.3). Assim, o facto dos níveis desta proteína diminuírem na fracção da membrana plasmática parece sugerir que esta proteína migra da membrana plasmática para os mitocôndrios aquando da adaptação ao  $H_2O_2$ , o que parece ser indicativo de possível papel sinalizador por parte desta proteína neste processo.

Associada a este mecanismo de resposta à presença de  $H_2O_2$  poderá estar igualmente a proteína Mca1p que funciona como um pseudo-caspase, despoletando o processo apoptótico quando as células de *S. cerevisiae* são expostas ao  $H_2O_2$ , cujos níveis diminuíram 1,8 vezes aos 30 min de adaptação ao  $H_2O_2$ . Embora tenham provavelmente funções celulares contrárias, quer a estirpe *mca1Δ* quer a estirpe *tma19Δ*, são mais resistentes ao  $H_2O_2$  (Vachova e Palkova, 2007).

A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min também aumentou aproximadamente 2 vezes os níveis da proteína Gnd1p (6-fosfogluconato desidrogenase) que se sabe estar presente na parede celular nas células de *S. cerevisiae* (Motshwene *et al.*, 2003). Esta isoforma maioritária do 6-fosfogluconato desidrogenase é um enzima essencial no ramo oxidativo da via dos fosfatos de pentose, sendo responsável pela regeneração enzimática de NADPH. Este enzima assume um papel importante na resposta ao *stress* oxidativo, isto devido ao papel na formação de NADPH, um cofactor essencial para enzimas como, por exemplo, o catalase, o glutathione redutase e o tioredoxina redutase, essenciais na resposta celular ao *stress* oxidativo (Izawa *et al.*, 1998; Kirkman *et al.*, 1987). Correlacionado com este aumento do conteúdo proteico do 6-fosfogluconato desidrogenase, foi também observado ao nível do mRNA um aumento de expressão do respectivo gene. Este facto reforça o ponto de vista deste enzima para além de ter um papel fundamental na via metabólica dos fosfatos de pentose (ver 6.1.5), também ter um papel fundamental na chamada resposta geral ao *stress*.

Aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também se observou uma diminuição significativa (-2,2 vezes) dos níveis da proteína Ald6p. O enzima aldeído desidrogenase é responsável pelo catálise do processo de conversão de acetaldeído em acetato. Este enzima tem a particularidade de migrar para a membrana mitocondrial externa quando há exposição ao *stress*, o que indica que provavelmente o enzima migra da membrana plasmática para os mitocôndrios aquando adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, justificando assim a diminuição do seu conteúdo neste trabalho. Se assim for, este resultado é indicativo de um provável papel de sinalização celular por parte deste enzima (Rinnerthaler *et al.*, 2006).

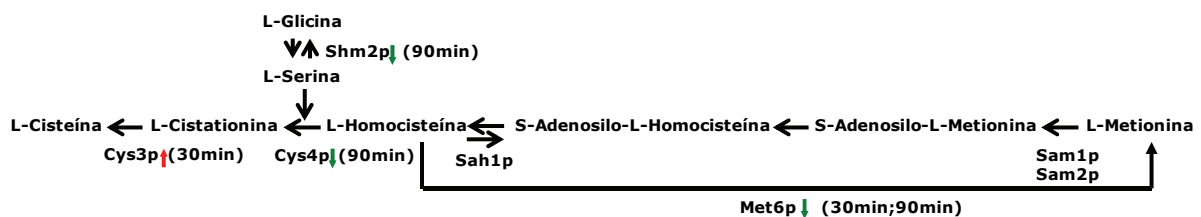
### **6.1.5 Metabolismo**

Neste grupo podem ser englobadas uma série de proteínas que se apresentam alteradas e que se associam a várias vias do metabolismo celular (Quadro 36), desde o metabolismo biossintético de proteínas e aminoácidos (Met6p, Cys3p, Cys4p, Shm2p, Aro2p, Lys20p e Aro8p), ao metabolismo de glícidos (Gpm1p, Pyk1p, Tal1p, Aco1p, Adh3p, Pgi1p, Fba1p, Pkg1p e Hxk2p).

Relativamente às vias biossintéticas de aminoácidos observou-se que ocorrem várias alterações de enzimas envolvidos no metabolismo da metionina/cisteína durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observa-se uma diminuição de 2,4 vezes dos níveis do enzima homocisteína metiltransferase (Met6p) (Figura 34) o que deverá resultar numa diminuição da transmetilação da homocisteína e, conseqüentemente, numa provável diminuição dos níveis de metionina. Por outro lado, observou-se um aumento de cerca de 8 vezes dos níveis do cistationina  $\gamma$ -liase (Cys3p) que deverá resultar num aumento dos níveis de cisteína. Aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observa-se a continuação da existência de uma diminuição nos níveis do enzima



Met6p (-1,9 vezes), bem como uma diminuição nos níveis dos enzimas glicina hidroximetiltransferase (Shm2p; -3,1 vezes) e cistationina  $\beta$ -sintase (Cys4p, -2,2 vezes). Analisando a Figura 34, onde se pretende demonstrar uma simplificação dos fluxos metabólicos, observa-se que, em face dos níveis de proteína observados na membrana plasmática, será de concluir que a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leva então a uma deslocação do fluxo metabólico no sentido da produção prioritária de cisteína e uma consequente diminuição dos níveis de metionina dada a ligação destas duas vias metabólicas. As alterações nos níveis dos enzimas Cys4p, Met6p e Smh2p parecem também indicar uma diminuição dos níveis de homocisteína, com um provável aumento nos níveis de S-adenosilmetionina (SAM). Estas alterações podem ter particular importância no metabolismo do ergosterol já que a SAM é um dos intermediários desta via, funcionando como um dador de grupos metilo. Esta hipótese é reforçada com a observação de que um mutante para a via do ergosterol apresenta uma acumulação de SAM (Shobayashi *et al.*, 2006).



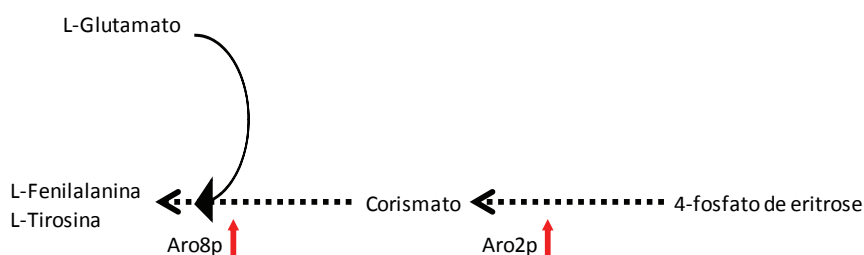
**Figura 34 – Efeito da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no metabolismo da metionina e cisteína.**

Na figura encontra-se esquematizada a associação entre as vias metabólicas dos aminoácidos cisteína e metionina encontrando-se assinaladas as alterações nos níveis de proteína na fracção isolada da membrana plasmática de *S. cerevisiae* durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (aumento setas a vermelho e diminuição setas a verde). Cys3p - cistationina  $\gamma$ -liase; Cys4p - cistationina  $\beta$ -sintase; Met6p - homocisteína metiltransferase; Sam1/2p - S-adenosilmetionina sintetase; Shm2p - serina hidroximetiltransferase; Sah1p - S-adenosilhomocisteína hidrolase.

Embora seja um enzima intimamente ligado ao metabolismo dos glícidos, nomeadamente ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos, o enzima aconitase (Aco1p) que catalisa a conversão de citrato em isocitrato apresentou um aumento de 2,3 vezes nos seus níveis relativamente ao controlo. O aconitase está presente no citosol e matriz mitocondrial e o enzima citosólico está envolvido no *shunt* do glioxalato (Regev-Rudzki *et al.*, 2005). Este aumento pode levar a um correspondente aumento de glioxalato e, conseqüentemente, a um aumento dos níveis de glicina. De referir ainda que a estirpe mutante para o gene *ACO1* é auxotrófica para o glutamato o que poderá ser relevante para as duas proteínas (Aro2p e Aro8p) referidas a seguir (Gangloff *et al.*, 1990).

Os níveis das proteínas Aro2p (corismato sintase) e Aro8p (aminoácido transferase de aminoácidos aromáticos) aumentaram respectivamente 3,6 e 1,5 vezes com a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min. Isto parece indicar um aumento das vias de produção de

aminoácidos aromáticos sendo a proteína Aro2p responsável pela produção de corismato, um dos primeiros metabolitos nas vias de produção de vários aminoácidos aromáticos e a Aro8p, um enzima que funciona como um aminotransferase (Figura 35) catalisando a formação (ou degradação) de aminoácidos aromáticos e utilizando como dador (ou receptor) do grupo amina o L-glutamato (ou o oxoglutarato). Alternativamente, estas alterações podem estar envolvidas também no metabolismo da metionina, já que o enzima Aro8p desempenha um papel no *salvage* da metionina a partir de subprodutos da S-adenosilmetionina (Pirkov *et al.*, 2008).

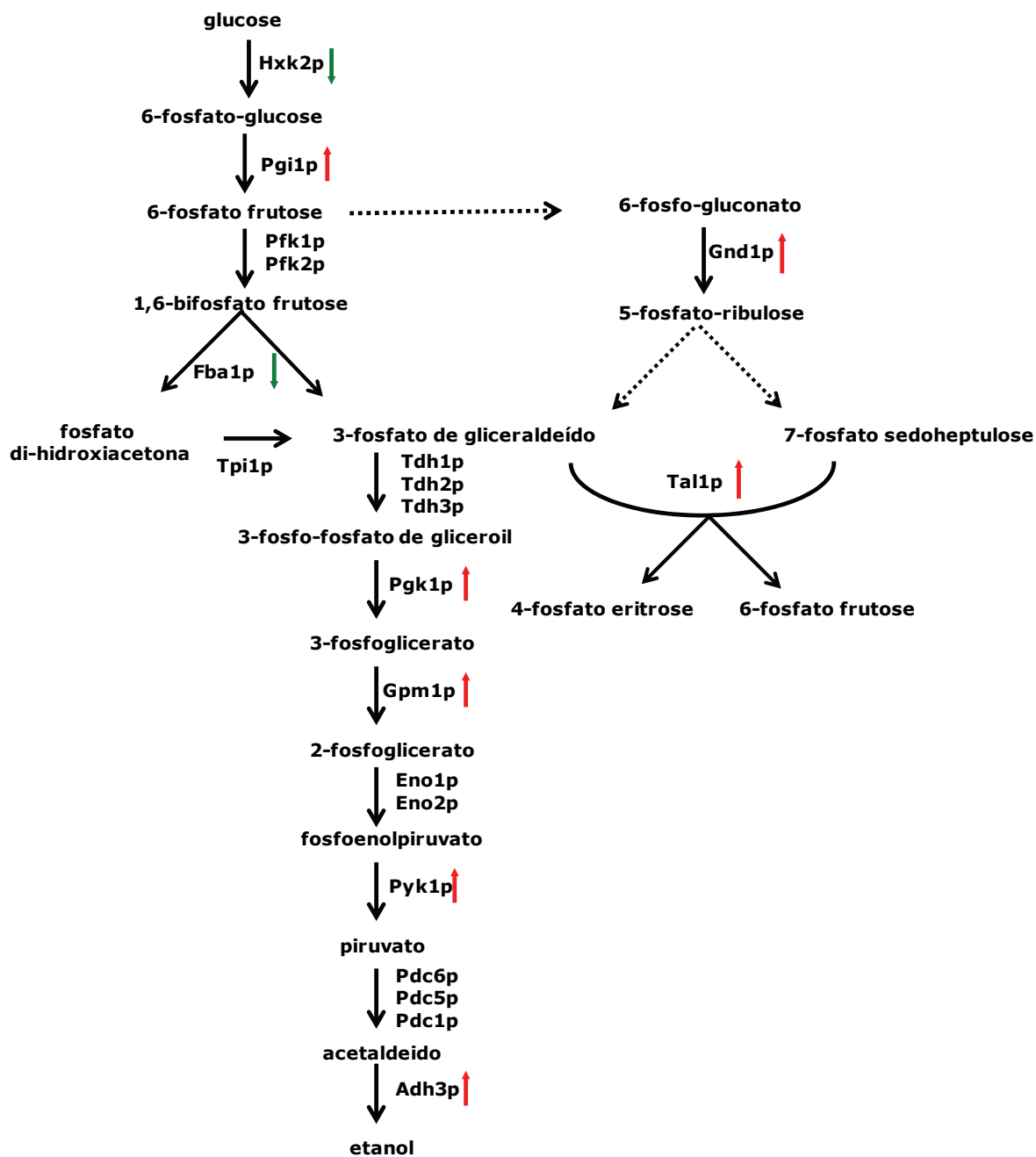


**Figura 35 – Alteração nas vias metabólicas de aminoácidos aromáticos durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Esquema simplificado das vias de aminoácidos aromáticos onde se encontra esquematizada a associação entre as vias metabólicas dos aminoácidos aromáticos e um intermediário da via dos fosfatos de pentose, encontrando-se assinaladas as alterações nos níveis de proteína na membrana plasmática de *S. cerevisiae* após 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (aumento setas a vermelho). Aro8p - aminoácido transferase de aminoácidos aromáticos; Aro2p - corismato sintase.

A questão que ressalta em face destes dados é saber porque estão estas proteínas associadas à membrana plasmática e qual é então a função destas proteínas nesta membrana, ou seja, qual o objectivo deste provável aumento de produção de alguns aminoácidos em particular. Estas alterações parecem indicar aparentemente um papel relevante do metabolismo de alguns aminoácidos na adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em particular a metionina e o seu intermediário SAM. Estas alterações poderão ter particular importância no metabolismo do ergosterol (Shobayashi *et al.*, 2006), ou na síntese *de novo* de fosfatidilcolina dado que a via biossintética deste glicerofosfolípido requer três passos de metilação dependentes de SAM (Malanovic *et al.*, 2008), embora não seja de excluir outro papel biológico dado a relevância do intermediário SAM como dador de grupos metilo.

Relativamente ao metabolismo de glícidos observou-se que as alterações observadas nos níveis de proteínas presentes nos extractos obtidos a partir da membrana plasmática incidem essencialmente sobre as vias de fosfatos de pentose e fermentação de glucose.



**Figura 36 – Variação nos níveis de enzimas envolvidos na via de fosfatos de pentose e na via glicolítica, durante a adaptação ao  $H_2O_2$ .**

Esquema simplificado da via dos fosfatos de pentose e da via glicolítica com indicação das alterações proteicas observadas na membrana plasmática de *S. cerevisiae* aos 30 min de adaptação ao  $H_2O_2$  (aumento setas a vermelho e diminuição setas a verde). Pyk1p – piruvato cinase; Adh3p – álcool desidrogenase; Eno1/2p – enolase; Pdc6/5/1p – piruvato descarboxilase; Gpm1p – fosfoglicerato mutase; Pgk1p – 3-fosfoglicerato cinase; Tdh1/2/3p – 3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase; Tal1p – transaldolase; Gnd1p – 6-fosfogluconato desidrogenase; Tpi1p – fosfato triose isomerase; Fba1p – 1,6-bifosfato de frutose aldolase, Pfk1/2p – fosfofrutocinase; Pgi1p – fosfoglicose isomerase; Hxk2p – hexocinase 2.

Analisando a Figura 36, observa-se que durante a adaptação ao  $H_2O_2$  ocorre um aumento dos níveis de dois enzimas da via dos fosfatos de pentose, o 6-fosfogluconato desidrogenase (Gnd1p) que está envolvido na resposta ao *stress* oxidativo pelo seu papel

na regeneração de equivalentes redutores essenciais à maioria dos processos de desintoxicação celular (ver secção 6.1.4 deste capítulo), e também o transaldolase (Tal1p). Estas alterações poderão levar a um aumento de 6-fosfato de frutose e 4-fosfato de eritrose e, em última análise, a um aumento dos níveis de 3-fosfato de gliceraldeído durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Observaram-se ainda uma série de alterações em enzimas que se encontram envolvidos no processo de fermentação de glucose, como se pode observar na Figura 36. A partir da análise da figura pode-se concluir que, embora haja uma diminuição dos níveis das proteínas Hxk2p e Fab1p durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a via é, no seu essencial, estimulada parecendo haver o objectivo último de aumentar os níveis de ATP através de uma diminuição do consumo de ATP nos passos iniciais da fermentação. Esta diminuição do consumo de ATP nas fases iniciais da via glicolítica poderá estar a ser suportada por um influxo de 3-fosfato de gliceraldeído devido ao aumento dos níveis da proteína Tal1p na via dos fosfatos de pentose. No entanto, o aumento nos níveis da proteína Tal1p e correspondente aumento dos níveis de 4-fosfato de eritrose poderá está relacionado com um aumento da formação de aminoácidos aromáticos (através do aumento das proteínas Aro2p e Aro8p) como é possível observar na Figura 35. A existência de proteínas da via fermentativa associadas à membrana plasmática já foi demonstrada em estudos anteriores com a identificação da proteína enolase (Eno2p) na membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Lopez-Villar *et al.*, 2006).

#### **6.1.6 Parede celular**

Observou-se que a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min induziu um aumento de 1,8 vezes dos níveis da proteína Psa1p (GDP-manose pirofosforilase), um enzima essencial da parede celular que sintetiza GDP-manose a partir de GTP e 1-fosfato de manose e que se encontra envolvido não só na biossíntese e manutenção da parede celular como também na biossíntese de dolicóis (Hashimoto *et al.*, 1997; Janik *et al.*, 2003). Este aumento dos níveis da proteína Psa1p indica que, apesar da parede celular não apresentar um papel directo nas alterações de permeabilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observadas durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004), em células em fase de crescimento exponencial, está envolvida na resposta celular ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como já foi observado para células em fase de crescimento estacionário onde a parede celular desempenha um papel parcial na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sousa-Lopes *et al.*, 2004).

#### **6.1.7 Distribuição e transporte vesicular**

A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min alterou os níveis de diversas proteínas envolvidas em processos de distribuição e transporte vesicular em *S. cerevisiae*. Observou-se uma

diminuição de aproximadamente duas vezes dos níveis da proteína Vps4p na fracção da membrana plasmática. Esta proteína é um ATPase do tipo AAA regulada pela proteína Vta1p e é necessária para a manutenção da morfologia e da actividade de transporte endossomal tardio sendo, portanto, importante na distribuição de proteínas para o vacúolo. A Vps4p apresenta estruturas oligoméricas dependentes da hidrólise do ATP, tendo uma estrutura dimérica quando associada a ADP ou quando há ligação a nucleótidos, e uma estrutura decamérica quando ligada ao ATP (Babst *et al.*, 1998). A proteína Vps4p pertence a uma família de proteínas que transportam proteínas ubiquitinadas e que formam complexos endossomais denominados ESCRTs (do inglês, **endosomal sorting complexes required for transport**). Os complexos ESCRTs estão envolvidos na formação dos MVB (do inglês, **multivesicular bodies**), que fazem parte do sistema endossomal, que coordena o tráfico intracelular entre os vários compartimentos subcelulares, incluindo o Golgi, a membrana plasmática e os lisossomas (Grossmann *et al.*, 2007). A perda da actividade de ATPase da proteína Vps4p leva à acumulação dos complexos proteicos ESCRTs nos compartimentos endossomais, comprometendo a via de distribuição dos MVB. Esta proteína é pois uma proteína que desempenha um papel relevante na formação de complexos responsáveis pela eliminação de proteínas ubiquitinadas (Azmi *et al.*, 2006; Piper e Katzmann, 2007).

A proteína Vps4p também está envolvida no transporte vesicular de lípidos (Wang *et al.*, 2005), tendo sido observada a sua interacção com dois membros da família OSH (do inglês, **oxysterol-binding protein homologue**), as proteínas Osh6 e Osh7, que têm um papel muito relevante no metabolismo e regulação da distribuição de esteróis (Wang *et al.*, 2005). As proteínas da família AAA, a que pertence a proteína Vps4p, podem regular o transporte de lípidos pelo controlo da associação/dissociação dos transportadores solúveis dos lípidos (Wang *et al.*, 2005). As proteínas Osh6 e Osh7 interagem com a proteína Vps4p, ficando estas proteínas retidas nas membranas quando a função da Vps4p está alterada. Não é, pois, de estranhar que a proteína Vps4p apresente o seu conteúdo diminuído na membrana plasmática durante a adaptação das células de *S. cerevisiae* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois poderá estar a ser mobilizada para as diferentes estruturas do sistema endossomal que transportam quer os lípidos quer proteínas entre a membrana plasmática e os outros compartimentos celulares. Interessantemente, aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observaram-se alterações numa das proteínas pertencentes à família OSH – a Kes1p. A proteína Kes1p (ou Osh4p) pertence igualmente à família de proteínas OSH que estão implicadas no transporte de esteróis e desempenham uma função de sensores de esteróis (Fairn e McMaster, 2007). Nas nossas condições experimentais observou-se que aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a proteína Kes1p apresenta uma diminuição de 2,5 vezes nos seus níveis nas células adaptadas. A proteína Kes1p, bem como outras proteínas da família OSH, estão envolvidas no transporte não vesicular de

esteróis da membrana plasmática para o retículo endoplasmático. Actualmente ainda não é claro se este transporte é feito directamente por esta proteína ou por via indirecta, através da regulação dos níveis de fosfoinositóis, já que a inactivação da proteína Kes1p leva ao aumento dos referidos compostos (Fairn e McMaster, 2007; Raychaudhuri *et al.*, 2006). Outro aspecto interessante, relativo à família de proteínas OSH, prende-se com o efeito que estas proteínas têm sobre a regulação dinâmica da actina necessária à endocitose, uma vez que se observa uma despolarização da actina e defeitos na endocitose em estirpes de levedura mutadas para a totalidade da família OSH e ainda efeitos sobre a promoção da polaridade celular via Cdc42p (Fairn e McMaster, 2007; Kozminski *et al.*, 2006).

A proteína Kes1p sobressai da família OSH também por, somente ela, ultrapassar a função essencial da proteína Sec14p. A proteína Sec14p é uma proteína essencial envolvida no transporte de fosfatidilcolina/fosfatidilinositol que, quando ausente, leva à inexistência de transporte vesicular a partir do Golgi. Surpreendentemente, a mutação da proteína Kes1p (que está envolvida numa via não vesicular) obvia o efeito da mutação da proteína Sec14p (que está envolvida numa via vesicular) o que leva a concluir que esta proteína tem, para além das funções já atribuídas, uma função de reguladora específica da proteína Sec14p (Fairn e McMaster, 2007). A proteína Sec14p apresenta ainda alguma homologia com uma proteína de mamífero denominada SPF (do inglês, ***Supernatant Protein Factor***), que aumenta a epoxidação do esqualeno funcionando como uma proteína transportadora deste composto (Shibata *et al.*, 2001; Stocker *et al.*, 2002).

A proteína Kes1p apresenta então um papel importante na regulação do transporte vesicular no Golgi através da regulação dos níveis de PI-4P (4-fosfato-fosfatidilinositol) neste organelo, sendo que a própria síntese de PI-4P no Golgi é essencial para que a proteína Kes1p se localize neste mesmo organelo (Fairn e McMaster, 2007). Em face de todos estes dados é importante notar que os membros desta família de proteínas e, em particular a Kes1p, estão envolvidos numa grande variedade de processos celulares, que vão desde o transporte vesicular e não vesicular de lípidos à interacção com os fenómenos de polarização localizada. A diminuição observada na proteína Kes1p indica que poderá existir algum *feedback* negativo no transporte não vesicular, ou mesmo uma alteração ao nível do transporte vesicular de esteróis, como demonstrado pela já referida interacção entre as proteínas Kes1p e Sec14p.

A adaptação durante 30 min aumentou os níveis de uma série de proteínas envolvidas na manutenção estrutural e no transporte de proteínas (Gsp1p, Kar2p e Tom40p) e que, interessantemente, foram encontradas nas nossas condições experimentais, associadas à membrana plasmática de *S. cerevisiae*. A Gsp1p é um GTPase *Ras-like*, homólogo da proteína de Ran de mamíferos, e que está envolvida na importação nuclear de proteínas. Para além da manutenção da organização nuclear, a Gsp1p parece estar envolvida no

processamento e transporte de RNA (Kadowaki *et al.*, 1993). Trabalho desenvolvido anteriormente (Stochaj *et al.*, 2000) propõe que certos tipos de *stress* como, por exemplo, o *stress* oxidativo provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induzem a libertação da Gsp1p das suas ligações nucleares, promovendo uma alteração no gradiente núcleo-citoplasma da Gsp1p. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vai alterar a distribuição celular da Gsp1p inibindo a importação clássica de proteínas para o núcleo. Como se sabe, o *stress* oxidativo induz a realocização de várias proteínas com actividade de cinase e de factores de transcrição para o núcleo, de modo a que a célula possa desencadear uma resposta celular a este *stress* (Jamieson, 1998). Um dos factores de transcrição que é deslocado para o núcleo, após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é o Yap1p, que é necessário à indução de uma série de genes de resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como, por exemplo, o gene *TRX2*. Em células não sujeitas a *stress*, a proteína Gsp1p tem um papel importante na deslocação citoplasma/núcleo/citoplasma do Yap1p. Quando no núcleo a proteína encontra-se na forma Gsp1p-GTP a qual, juntamente com a exportina nuclear Cmr1p, vai transportar o Yap1p para o citoplasma. Já no citoplasma, para que o complexo anterior liberte o Yap1p, é necessário que se dê a hidrólise GTP/GDP catalisada pelo Gsp1p, originando a forma Gsp1p-GDP. Em condições de *stress* oxidativo provocado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a proteína Yap1p vai formar uma ligação persulfureto intramolecular, o que vai impedir a associação do complexo Crm1p-Gsp1p-GTP. Deste modo, o Yap1p acumula-se no núcleo, para poder desempenhar as suas funções de factor de transcrição (Moye-Rowley, 2003). A importância da proteína Gsp1 é reforçada com a observação de alterações nos seus níveis também aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Contudo, relativamente a esta proteína observou-se um efeito bastante curioso que consiste num aumento dos seus níveis em membranas plasmáticas de células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aos 30 min, seguido de uma drástica diminuição desses mesmos níveis aos 90 min (**Quadro 36**). Este fenómeno está provavelmente relacionado com o facto da proteína Gsp1p estar envolvida em fenómenos de transporte nuclear de proteínas durante a resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dado que com a adaptação a este oxidante ocorre uma distribuição da Gsp1p para o citosol sendo que em células controlo esta proteína se encontra maioritariamente no núcleo (Stochaj *et al.*, 2000). Partindo destes dados pode-se colocar a hipótese de que, provavelmente, o fenómeno de importação nuclear é estimulado para tempos mais curtos de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e que aos 90 min ocorre uma diminuição dos níveis da proteína Gsp1p associada à membrana plasmática, já que a mesma se encontra provavelmente maioritariamente distribuída no núcleo, devido à sua função de importação de proteínas.

Os níveis da proteína Kar2p encontram-se aumentados (aproximadamente 2 vezes) na membrana plasmática das células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min. A proteína Kar2p é um ATPase essencial envolvido no transporte de proteínas para o retículo endoplasmático (RE) e pertencente à família HSP70 dos *chaperones* moleculares (Normington *et al.*,

1989; Rose *et al.*, 1989). Assim, a proteína Kar2p desempenha funções de *chaperone*, actuando no *folding* de proteínas no RE e desempenhando um papel na exportação das proteínas solúveis do RE. Mesmo tratando-se de um tratamento com doses baixas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 μM), uma dose em que os níveis de morte celular são baixos (Branco *et al.*, 2004), o *stress* induzido pela adaptação deverá ser suficiente para provocar problemas na organização estrutural de algumas proteínas, que necessitam de ser reparadas, o que poderá justificar a indução desta proteína.

Também se observou um aumento muito considerável dos níveis da proteína Tom40p (cerca de 4 vezes) após adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min. Esta proteína, sem domínios transmembranares, faz parte do complexo TOM, responsável pela importação de proteínas através da membrana externa mitocondrial, estando inserida no complexo de poro que atravessa a membrana mitocondrial, permitindo a importação de proteínas através da membrana mitocondrial (Rapaport e Neupert, 1999). Mais uma vez, a ideia de estarmos perante proteínas classicamente não associadas à membrana plasmática é contrariada por vários estudos (Navarre *et al.*, 2002; Pardo *et al.*, 2000; Delom *et al.*, 2006) onde foi observado claramente e consistentemente, a presença de uma série de proteínas sem domínios transmembranares associadas à membrana plasmática.

#### **6.1.8 Sinalização celular**

A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min induziu aumentos de aproximadamente 2 vezes no nível de duas proteínas envolvidas em processos de sinalização celular - Asc1p e Pil1p, sendo que somente a proteína Asc1p manteve os seus níveis alterados ao longo dos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A proteína Asc1p é uma proteína ortóloga da proteína RACK1 de mamífero, que faz parte da subunidade ribossomal 40S e que actua como um repressor da tradução. No entanto, a proteína RACK1 também se associa à isoforma βII do PKC, o que leva a pensar que a proteína Asc1p também possa estar associada a uma via de transdução de sinal (Gerbasí *et al.*, 2004). A recente identificação da proteína Asc1p como sendo a subunidade β da proteína G, que se liga à proteína Gpa2p, que desempenha um papel de sinalização em resposta a nutrientes, atribuiu uma nova função à Asc1p. A proteína Asc1p pode ligar-se ao efector enzimático adenilciclase (Cyr1) e diminuir a produção de cAMP em resposta a um estímulo pela glucose. Este efeito é oposto ao desempenhado pela Gpa2p, que promove a produção de cAMP através de um estímulo de glucose. A Asc1p desempenha assim múltiplas funções na célula, podendo desempenhar funções na transdução de sinal desde os receptores da superfície celular aos efectores intracelulares (Zeller *et al.*, 2007). Por outro lado, estudos efectuados anteriormente recorrendo à estirpe mutada no gene que codifica para a Asc1p, mostraram que há um aumento de sensibilidade destas células a fármacos que actuam



na parede celular, sugerindo, assim, que esta proteína é necessária à manutenção da integridade da parede celular (Valerius *et al.*, 2007).

Os níveis da proteína Pil1p (do inglês, *phosphorylation is inhibited by long chain bases*) encontram-se aumentados nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min. Esta proteína, assim como a proteína Lsp1 (do inglês, *long chain bases stimulate phosphorylation*), desempenham um papel de regulador negativo dos cinases PDK-like, dos cinases Pkh1p e Pkh2p, que actuam na cascata de sinalização dos cinases Pkc1p-MAP e na via Ypk1. Estas duas vias, que actuam em paralelo controlando a integridade da parede celular (Roelants *et al.*, 2002), são reguladas pelas LCB (do inglês, *long chain bases*), as bases de cadeia longa, precursoras dos esfingolípidos. As proteínas Pil1p e Lsp1p são proteínas substrato dos cinases Pkh1p e Pkh2p. As LCB inibem a fosforilação da Pil1p mas estimulam a fosforilação da Lsp1p. Estas vias de sinalização das LCB mediadas pelos cinases Pkh e os esfingolípidos são importantes para a endocitose de proteínas e lípidos (Grossmann *et al.*, 2007). Sabe-se igualmente que o aumento transitório dos níveis das LCB, em condições de *stress* térmico, inibe a fosforilação da Pil1p catalisada pelo cinase Pkh2, reduzindo a forma fosforilada da Pil1p-P (Zhang *et al.*, 2004). A Pil1p-P é a forma inibidora, permitindo assim que os cinases Pkh1/2p fosforilem a Pkc1p e os cinases Ypk1/2 activem as vias anteriores. Os processos finais destas vias estão relacionados com a integridade da parede celular e com a repolarização do citosqueleto de actina durante o *stress* térmico, sendo por isso importantes no controlo do crescimento e sobrevivências celulares (Zhang *et al.*, 2004).

Embora as proteínas Pil1p e Lsp1p tenham sido inicialmente caracterizadas como reguladoras da via de sinalização Pkh, recentemente foi demonstrada a existência de uma nova estrutura, denominada por eisossoma, do qual fazem parte estas proteínas (Walther *et al.*, 2006). Os eisossomas são estruturas estáticas que marcam os futuros locais de formação dos *patch* de actina, onde se inicia o recrutamento das proteínas necessárias à endocitose (Walther *et al.*, 2006). Os eisossomas encontram-se localizados por debaixo da membrana plasmática e sequestram um subgrupo de proteínas da membrana plasmática em domínios membranares, que colocalizam com os locais de endocitose de proteínas e lípidos (Walther *et al.*, 2006; Grossmann *et al.*, 2007). Os eisossomas desempenham, pois, um papel na endocitose, quer de proteínas, quer de lípidos. Experiências anteriores, em que foi utilizada a proteína híbrida Pil1-GFP, permitiram observar que esta proteína se encontra maioritariamente junto à membrana plasmática, não se detectando a Pil1-GFP na fracção solúvel da célula (Walther *et al.*, 2006). Tendo em atenção estes dados, é justificável a identificação da Pil1p na fracção proteica das membranas plasmáticas. A composição completa do eisossoma ainda não é conhecida, sabendo-se apenas que as proteínas Pil1p e Lsp1p são as subunidades mais importantes desta estrutura. A Pil1p funciona como a proteína organizadora dos

eisossomas, visto que a sua deleção leva ao colapso da organização normal dos eisossomas e à recolocação dos eisossomas remanescentes na periferia da célula (Walther *et al.*, 2006). Este efeito é específico da Pil1p, visto que a deleção da proteína Lsp1p não produz os mesmos efeitos na célula e também não induz um agravamento dos efeitos observados nas células de levedura na ausência da Pil1p. Os eisossomas parecem desempenhar um papel central na organização da membrana plasmática, visto que a deleção do gene *PIL1* codifica uma das subunidades que leva a que ocorra uma grande invaginação aberrante da membrana plasmática associada aos eisossomas remanescentes e uma perda de um domínio para a distribuição normal de várias proteínas e lípidos esteróis da membrana plasmática.

Para além das vias de sinalização LCB mediadas pelos cinases Pkh e dos esfingolípídeos serem importantes para os processos de endocitose, também os eisossomas regulam os processos endocíticos que modulam a organização da membrana plasmática visto que dois dos componentes desta estrutura, as proteínas Pil1p e Lsp1p são fosforiladas pelos cinases Pkh (Zhang *et al.*, 2004). A fosforilação da Pil1p pelos cinases Pkh altera a constante de associação da Pil1p, que no estado fosforilado está na forma livre, e no estado não fosforilado está na forma ligada, associada ao eisossoma (Walther *et al.*, 2006). Quando a Pil1p está hiperfosforilada o eisossoma desagrega-se, mas se a Pil1p está hipofosforilada formam-se os eisossomas.

O facto de nas electroforeses bidimensionais se terem identificado duas manchas correspondentes à proteína Pil1p, que se encontram aumentadas nas células adaptadas a 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 min, indica claramente a existência de modificações pós-traducionais e leva-nos a pôr a hipótese que cada uma poderá corresponder a uma das duas formas anteriores – a Pil1p fosforilada e a não fosforilada. Curiosamente também foi observado um aumento dos níveis da proteína Pil1p na membrana plasmática de *S. cerevisiae*, na presença do antifúngico calcoflúor (Delom *et al.*, 2006), o que vem demonstrar a resposta desta proteína não só à presença de um oxidante, como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  mas também a um composto que ataca a parede celular.

Estas duas proteínas, Asc1p e Pil1p, têm então em comum a interacção com as vias de sinalização celular, sendo particularmente interessante que a proteína Pil1p responda à presença de bases de cadeia longa, um dos componentes dos esfingolípídeos, que por seu lado são dos compostos mais abundantes na membrana plasmática de *S. cerevisiae*, particularmente nas jangadas membranares. Estas alterações em proteínas envolvidas em fenómenos de sinalização celular, podem ser pertinentes na indicação de quais os componentes relevantes na resposta celular ao nível da transdução de sinal durante a resposta adaptativa ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  em *S. cerevisiae*, bem como permitir fazer a ligação entre alterações relatadas ao nível dos lípidos membranares e um possível fenómeno de sinalização celular. A interacção da proteína Pil1p com bases de cadeia longa adquire

uma maior importância se considerarmos a diminuição significativa, na membrana plasmática das células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dos níveis de um dos VLCFA (2-OH-C26:0) (capítulo 5.2.2), um componente quer de ceramidas quer de esfingolípido (Dickson *et al.*, 2006).

### 6.1.9 Processo biológico desconhecido

Entre as proteínas presentes na fracção da membrana plasmática cujos níveis estão alterados devido à adaptação durante 30 min ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontram-se 5 proteínas cuja função é desconhecida.

A proteína *YOR285w* é uma proteína que foi identificada como estando localizada na membrana externa mitocondrial e que apresenta semelhanças com uma proteína de choque térmico de *Drosophila melanogaster* denominada 67B2 (Zahedi *et al.*, 2006).

A proteína *YNL010w* foi identificada como tendo uma função semelhante aos fosfatases de fosfoserinas (Valachovic *et al.*, 2006) e que, interessantemente, suprime o efeito da mutação do factor de transcrição *Upc2p* envolvido na regulação de uma série de genes que codificam enzimas fundamentais da via de biossíntese dos esteróis (Valachovic *et al.*, 2006).

```

Score = 182.5 bits (504), Expect = 5.3e-50, P = 5.3e-50
Identities = 99/207 (47%), Positives = 135/207 (65%), Gaps = 12/207 (5%)

Pst2p 1  MPRVAIIIIYTLYGHVXXXXXXXXXXXXXXXXXXDIYQVEET-----LSPEVVKALGGAPK 55
      MP+VAI+IY++  +                      +I+QV +      + E K      K
Rsf1p 1  MPKVAILIYSVDDIIATLAENEKKGIEIAGGEAEIFQVPDVSYKTEYATEEGKEAAKVAK 60

Pst2p 56  PD----YPIATQDTLTEYDAFLFGIPTFRFGNFFPAQWKAFWD-RTGGLWAKGALHGKVAGC 110
      +   Y I T++TL EYD +LFGIPT+FGNFFPA+WK+FWD  TGGLWAKG+LHGK+AG
Rsf1p 61  TNADFSYKILTRETLEVEYDYLLFGIPTKFGNFFPAEWKSFWDSENTGGLWAKGSLHGKIAGL 120

Pst2p 111 FVSTGTGG-GN-EATIMNSLSTLAHHGIIIFVPLGYKNVFAELTNMDEVHGGSPWGAGTIA 168
      FVS   G G+ E  IMN++STL HHG+I+VPLGYKN +  ELT+++V+G  WGAG ++
Rsf1p 121 FVSGAISGKGDTEMCIMNAMSTLVHGHVIVVPLGYKNAYKELTDVEDVNGSCAWGAGCVS 180

Pst2p 169 GSDGSRSPSALELQVHEIQGKTFYETV 195
      G DG R PS  EL+VH++QGK FY+ +
Rsf1p 181 GIDGGRPPSLSELRVHQLQGKAFYDRI 207

```

**Figura 37 – Alinhamento das sequências das proteínas Pst2p e Rsf1p**

A identidade entre as duas proteínas Pst2p e Rsf1p é demonstrada pelo alinhamento dos seus resíduos de aminoácidos, sendo o sinal + apresentado no alinhamento das sequências equivalente a mudanças de aminoácidos conservadoras. O alinhamento foi efectuado recorrendo ao software BLAST.

A proteína *Gvp36p* foi originalmente localizada nas vesículas do Golgi não tendo sido determinada a sua função (Inadome *et al.*, 2005).

As últimas duas proteínas identificadas foram as proteínas Pst2p e Rsf1p, apresentando um aumento nos seus níveis durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relativamente ao controlo. A proteína Pst2p responde ao *stress* oxidativo de um modo dependente do factor de transcrição Yap1, e encontra-se associada à biogénese da parede celular após a formação de protoplastos (Pardo *et al.*, 2000). A proteína Rsf1p desempenha uma função supressora da proteína Rad55 a qual está envolvida em mecanismos de reparação de DNA (Valencia-Burton *et al.*, 2006). Apesar de aparentemente terem funções distintas, estas duas proteínas (Pst2p e Rsf1p) apresentam semelhanças estruturais uma vez que possuem uma percentagem de identidade de 47% (Figura 37) e, mais importante ainda, a eliminação destas duas proteínas suprime os danos no DNA induzidos na estirpe *rad55Δ* pelo agente antitumoral campotecina (Valencia-Burton *et al.*, 2006). Esta observação indica que embora desempenhem funções diferentes na célula, as semelhanças estruturais existentes entre as proteínas Pst2p e Rsf1p traduzem-se num efeito de supressão dos danos existentes na estirpe *rad55Δ*.

Das 5 proteínas envolvidas em processos biológicos desconhecidos, observou-se que os níveis da proteína Rsf1p na membrana plasmática de células adaptadas de *S. cerevisiae* se mantinham elevados aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Em face dos resultados obtidos para as alterações proteicas da membrana plasmática de *S. cerevisiae* durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é possível inferir alguma informação acerca de possíveis modelos de respostas celulares à presença do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É contudo importante ter em conta que estes dados relativos à evolução temporal do proteoma da membrana plasmática, deverão ser sempre considerados meramente indicativos, já que o nosso estudo foi desenvolvido com mais detalhe sobre o tempo de 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e não sobre o tempo de 90 min de adaptação, visto que aos 90 min só se analisaram as proteínas na gama mais abrangente de pI. Esta maior incidência sobre um tempo de adaptação mais curto, também nos permitiu tirar mais informações acerca de possíveis fenómenos de sinalização celular, dada a elevada rapidez da resposta celular ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 7 Discussão geral

Este trabalho experimental teve como ponto de partida o conhecimento de que as células de *S. cerevisiae* apresentam a capacidade de se adaptarem à presença do  $H_2O_2$ , ou seja, as células adquirem resistência a esse mesmo oxidante tornando-se capazes de resistir a subsequentes doses letais de  $H_2O_2$  (Collinson e Dawes, 1992). O  $H_2O_2$ , devido a ser uma molécula pequena e neutra difunde-se através das membranas biológicas. No entanto, recentemente foi demonstrado que, contrariamente ao paradigma existente (Chance *et al.*, 1979), o  $H_2O_2$  não se difunde livremente através das membranas biológicas em linhas celulares de mamíferos e em *E. coli* (Antunes e Cadenas, 2000; Seaver e Imlay, 2001), o que leva à formação de gradientes de  $H_2O_2$  através dessas membranas. O trabalho de Branco *et al.* (Branco *et al.*, 2004) veio demonstrar que a membrana plasmática de *S. cerevisiae* também actua como barreira à difusão do  $H_2O_2$  e que durante a adaptação ao  $H_2O_2$  havia uma diminuição da permeabilidade dessa membrana ao  $H_2O_2$ . A existência de uma menor constante de permeabilidade para o  $H_2O_2$  na membrana plasmática de células adaptadas em conjunto com o aumento das actividades enzimáticas associadas aos processos catalíticos de remoção de  $H_2O_2$  demonstrou a elegância do mecanismo de adaptação ao  $H_2O_2$  neste microrganismo. Ou seja, a grande eficácia da protecção celular contra o  $H_2O_2$  na levedura *S. cerevisiae* deve-se a uma associação entre uma menor entrada de  $H_2O_2$  na célula, e um maior consumo interno do mesmo, resultando numa manutenção do equilíbrio celular *redox* face à exposição a uma dose letal de  $H_2O_2$ . Confirmando um papel da membrana plasmática nesta diminuição da permeabilidade para o  $H_2O_2$  durante a adaptação, foi também observada uma diminuição da fluidez desta membrana em células de *S. cerevisiae* adaptadas ao  $H_2O_2$  (Folmer *et al.*, 2008), comprovando deste modo a associação entre a alteração da permeabilidade ao  $H_2O_2$  e uma modulação das propriedades biofísicas da membrana plasmática durante a adaptação.

Tendo sido atribuído um papel à membrana plasmática na resposta adaptativa ao  $H_2O_2$ , tornou-se necessário obter um retrato mais claro das alterações celulares existentes na membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae* decorrentes da sua adaptação ao  $H_2O_2$ , nomeadamente as alterações na membrana plasmática que poderão ser responsáveis pela diminuição de permeabilidade e fluidez (Folmer *et al.*, 2008; Branco *et al.*, 2004). Tomando em conta o objectivo proposto de determinar os mecanismos moleculares que levam à diminuição da permeabilidade da membrana plasmática durante a adaptação ao  $H_2O_2$  procurou-se não só entender quais as mudanças a nível quantitativo que ocorriam na membrana plasmática subjacentes à resposta biológica ao  $H_2O_2$ , mas também se

procurou obter respostas relativamente a outros aspectos, com maior ênfase para as vias regulatórias, nomeadamente ao nível das alterações da expressão génica.

Ao longo deste trabalho experimental foi possível comprovar que a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela levedura *S. cerevisiae* implica várias alterações na expressão génica. Embora já existissem dados experimentais de alterações da expressão génica usando *microarrays* com doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário para este microrganismo (Gasch *et al.*, 2000), as nossas condições experimentais aproximam-se mais da adaptação a uma dose fisiológica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A utilização de uma menor concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levou a que, como foi possível observar no capítulo 4, o número de genes alterados fosse substancialmente menor. Esta menor alteração quanto ao número de genes constitui uma vantagem experimental, já que permitiu estudar a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sem que ocorresse uma alteração do equilíbrio redox tão profunda quanto a dos dados apresentados na literatura, evitando-se assim que as alterações observadas resultem não só da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como também de uma perda de homeostase celular. Para além da análise global destes dados, também foi possível observar em particular alterações nos níveis de expressão de genes relacionados com o metabolismo dos principais constituintes da membrana plasmática – esteróis, glicerofosfolípidos e esfingolípidos (van der Rest *et al.*, 1995). A resposta das células de *S. cerevisiae* à adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nível da expressão génica é rápida e transitória, e está associada com uma rápida alteração de permeabilidade da membrana plasmática, ocorrendo esta mais rapidamente que o referido numa publicação anterior do grupo (Branco *et al.*, 2004). Com este trabalho experimental foi possível demonstrar a elevada rapidez das alterações de permeabilidade da membrana plasmática ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante a adaptação, uma vez que estas são visíveis logo aos 15 min de adaptação, o que também se correlaciona com rápidas alterações de fluidez (aos 30 min) já observadas anteriormente (Folmer *et al.*, 2008).

A maior sensibilidade das estirpes *erg3Δ* e *erg6Δ* ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Branco *et al.*, 2004), bem como a identificação de alterações na expressão de vários genes associados ao metabolismo lipídico, levou à necessidade de efectuar uma análise destes componentes da membrana plasmática, tendo-se para tal efectuado o isolamento da mesma (Panaretou e Piper, 2006). Com o isolamento da membrana plasmática de *S. cerevisiae* foi possível obter uma informação mais completa acerca não só dos componentes lipídicos da membrana plasmática como ainda dos componentes proteicos permitindo deste modo obter um retrato completo dos acontecimentos biológicos decorrentes na membrana plasmática, durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

As observações prévias referidas anteriormente usando as estirpes *erg3Δ* e *erg6Δ* (Folmer *et al.*, 2008; Branco *et al.*, 2004), bem como alguns dos resultados obtidos durante este trabalho como, por exemplo, o forte efeito da lovastatina sobre a sensibilidade a este oxidante, e as alterações de expressão em vários genes envolvidos

no metabolismo do ergosterol, levou a que se esperasse que o ergosterol, ou algum dos seus intermediários, desempenhasse *per se* um papel muito relevante nas alterações de permeabilidade da membrana plasmática. Contudo, estas observações prévias não se traduziram em alterações ao nível dos esteróis presentes na membrana plasmática, em termos de quantidade ou composição dos vários esteróis, constituindo claramente uma comprovação da forte regulação a que esta via está sujeita, dada a sua importância para as propriedades e função da membrana plasmática. Apesar desta aparente ausência de um papel directo dos esteróis na regulação da permeabilidade da membrana plasmática durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a existência de jangadas membranares na membrana plasmática, formadas maioritariamente por esteróis associados a esfingolípidos com longas cadeias acilo (Simons e Ikonen, 1997), levou a que fosse necessário efectuar uma análise destes microdomínios durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A importância da organização dos microdomínios da membrana plasmática durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é comprovada com a observação de que, embora a alteração da permeabilidade da membrana plasmática resultante da adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não resulte em alterações quantitativas de esteróis ao nível da composição da membrana plasmática, o mesmo não se pode dizer ao nível da sua distribuição na membrana plasmática. Com efeito, há um aumento da heterogeneidade da membrana plasmática das células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provavelmente ao nível dos domínios MCC ricos em esteróis, dada a resposta ao composto fluorescente filipina que marca especificamente os esteróis, bem como um aumento dos domínios ordenados na membrana plasmática de células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da análise com ácido *trans*-parinárico. Estas alterações nos microdomínios podem estar associadas a uma diminuição no nível de ceramidas na membrana plasmática, o que é sugerido pela diminuição durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dos níveis de 2-OH-C26:0, um ácido gordo abundante nas ceramidas da membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Schneiter *et al.*, 1999). Já foi observado que mudanças na concentração relativa de bases de cadeia longa e/ou ceramidas ou esfingolípidos complexos afectam a organização dos microdomínios (Gaigg *et al.*, 2006) e apresentam também uma função na regulação da associação e função dos eisossomas, que funcionam como base para os microdomínios MCC (Walther *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2008). As ceramidas foram ainda implicadas directamente nas alterações de permeabilidade das biomembranas (Goni e Alonso, 2006) e na formação de canais através das mesmas (Siskind *et al.*, 2006).

Para além da diminuição dos níveis do VLCFA 2-OH-C26:0, observou-se também uma diminuição nos níveis do VLCFA C20:0 durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que pode indicar que em simultâneo com as alterações da composição dos microdomínios, as alterações observadas nos VLCFA também podem contribuir para a diminuição de permeabilidade

observada na membrana plasmática de *S. cerevisiae*, em consequência de um fenómeno de interdigitação (Niemela *et al.*, 2006).

A hipótese dos microdomínios estarem envolvidos nas alterações da permeabilidade da membrana plasmática durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é ainda reforçada pelo facto de se ter observado um aumento dos níveis da proteína Pil1p. Esta proteína desempenha um papel relevante na organização dos microdomínios da membrana plasmática nomeadamente através da regulação dos eisossomas (Grossmann *et al.*, 2007) respondendo ainda à presença de bases de cadeia longa, um dos componentes essenciais dos esfingolípidos (Zhang *et al.*, 2004). Os resultados obtidos com o estudo do proteoma da membrana plasmática durante a adaptação parecem indicar a existência de um módulo geral de resposta à presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> onde provavelmente intervêm as proteínas Pil1p e Asc1p devido ao seu papel como componentes da via de integridade celular.

Conclui-se então que, mesmo não ocorrendo alterações quantitativas ao nível dos esteróis, existem claramente alterações qualitativas na distribuição de esteróis nos microdomínios, suportadas pela análise da heterogeneidade e número de domínios ordenados na membrana plasmática, como também pelas alterações nos VLCFAs que são compatíveis tanto com as alterações biofísicas como com a diminuição da permeabilidade da membrana ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observadas previamente. Tomando em consideração estas alterações, o aumento nos níveis de Pil1p (bem como as suas funções descritas a literatura) parece indicar a presença de uma associação entre a sinalização celular (via Asc1p) e a composição lipídica da membrana plasmática. Reforçando esta interacção entre o proteoma da membrana plasmática e a composição em lípidos da mesma, observaram-se alterações nas proteínas Kes1p e Vsp4p, duas proteínas envolvidas no transporte de lípidos. Estes dados são indicativos que a composição lipídica da membrana plasmática é alterada durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através de um mecanismo complexo que envolve as vertentes vesicular e não vesicular. A complexidade deste mecanismo de transporte, implica o envolvimento do citosqueleto cujo papel na adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi reforçado com as alterações observadas na proteína Cct5p, envolvida na regulação do citosqueleto de tubulina (Stoldt *et al.*, 1996).

Relativamente aos outros lípidos presentes na membrana plasmática, observou-se que a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levou a uma alteração de perfil de outros ácidos gordos além dos VLCFAs, nomeadamente uma diminuição do grau de insaturação dos ácidos gordos de cadeia longa, devido a uma diminuição dos níveis de ácido oleico, o que constitui um mecanismo pelo qual as membranas podem apresentar uma diminuição de fluidez e permeabilidade tal como descrito anteriormente (van der Rest *et al.*, 1995). O papel dos ácidos gordos na adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é reforçado com a observação de que uma estirpe de levedura *fas1Δ* apresenta uma maior resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Matias *et al.*, 2007). A composição lipídica desta estirpe, embora significativamente diferente da estirpe



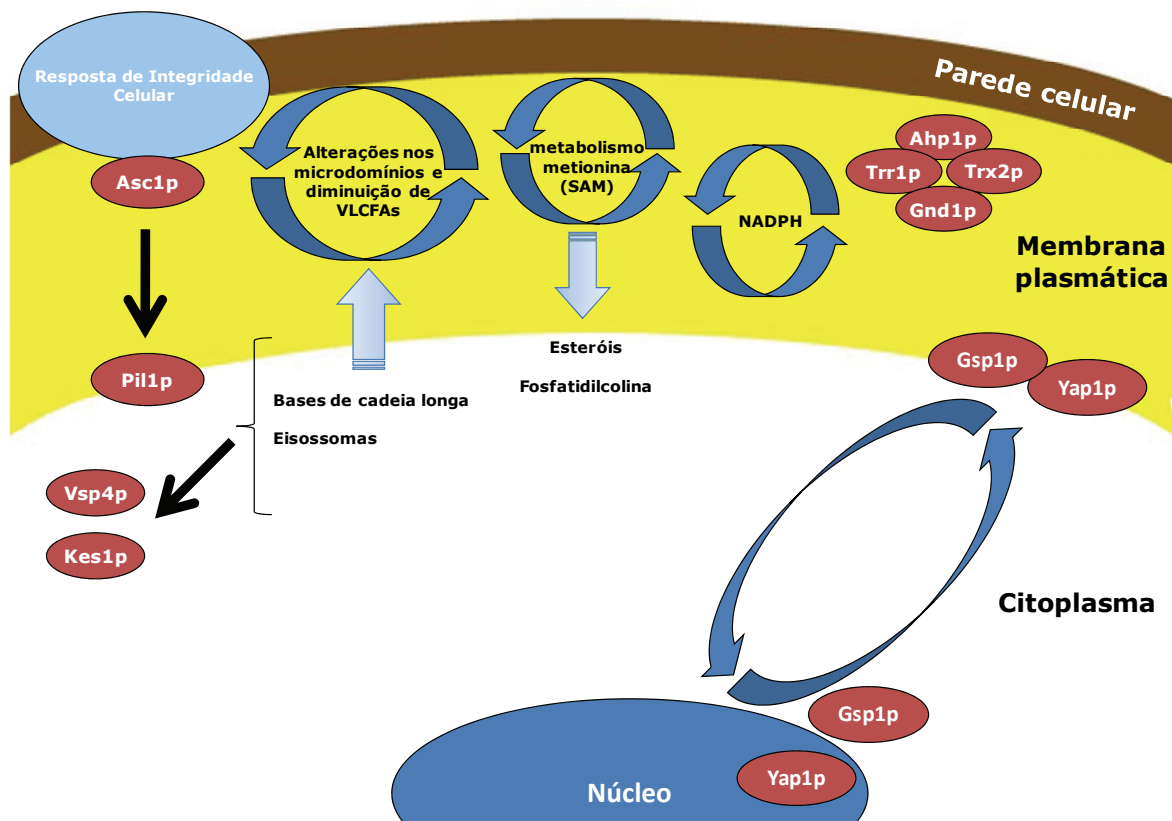
selvagem, sugere também que alterações na composição de VLCFAs da membrana plasmática podem desempenhar um papel relevante na resistência ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Matias *et al.*, 2007).

Foi também observado um aumento nos níveis de esqualeno, um importante intermediário da via biossintética do ergosterol, que embora não seja estruturalmente um esterol, é uma molécula com um elevado grau de hidrofobicidade sendo que foi proposto que esta se apresente distribuída no plano médio existente na junção das duas camadas lipídicas que constituem uma bicamada, diminuindo assim a permeabilidade da membrana plasmática (Haus *et al.*, 2002). Deste modo, o aumento de duas vezes nos níveis desta molécula em comparação com as células controlo pode também contar parcialmente para a diminuição de permeabilidade observada nas células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Analisando os valores relativos aos lípidos totais, observou-se que os níveis de esqualeno aumentam somente a partir dos 30 min, enquanto que os níveis da constante de permeabilidade da membrana plasmática apresentavam alterações aos 15 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Folmer *et al.*, 2008). Esta observação sugere que, embora as alterações nos níveis de esqualeno possam contribuir para uma maior resistência à passagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela membrana, esta pode não ser o principal factor associado a este aumento de resistência dada a diferença temporal observada entre o aumento dos níveis totais de esqualeno e a diminuição da constante de permeabilidade para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Contudo também podemos estar, nesta fase, perante um fenómeno de mobilização celular que antecipe o processo mais lento de desvio da via biossintética para a produção de esqualeno.

O aumento observado na membrana plasmática de células adaptadas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para a razão PC/PE favorece também uma diminuição de permeabilidade, devido às características estruturais destes dois glicerofosfolípidos. A PC apresenta uma estrutura cilíndrica e que se prefere organizar sobre a forma de uma bicamada (de Kroon, 2007) enquanto que a PE é um lípido de tipo 2, apresentando uma estrutura tendencialmente cónica e tendo também tendência para formar estruturas que não bicamadas, nomeadamente estruturas como as fases HII (*HII phase - inverted hexagonal phase*) (de Kroon, 2007; Boumann *et al.*, 2006) Este diferente aspecto estrutural destes dois glicerofosfolípidos é particularmente importante porque os lípidos que formam tendencialmente bicamadas apresentam um raio de curvatura intrínseco diferente dos lípidos com tendência a formar estruturas que não as bicamadas, o que leva a que alterações de proporção se traduzam em alterações de propriedades da membrana como, por exemplo, a curvatura intrínseca (Gruner, 1985) e em particular a permeabilidade da mesma. De acordo com este efeito biofísico já foi observado anteriormente, em modelos de vesículas contendo fosfolípidos, que a diminuição da razão PC/PE se correlaciona com

um aumento da permeabilidade para a glucose (Berglund *et al.*, 2002; Berglund *et al.*, 2004).

Estas observações permitem concluir que existem várias alterações na composição da membrana plasmática que contribuem para as alterações de fluidez já observadas anteriormente na resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas ocorrem, quer ao nível dos lípidos e esteróis da membrana plasmática, quer ao nível do proteoma com a existência de alterações nos níveis de proteínas envolvidas na organização e regulação desses mesmos componentes (Figura 38)



**Figura 38 – A adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca alterações nos lípidos e proteínas da membrana plasmática de *S. cerevisiae*.**

Tendo por base os resultados obtidos, procedeu-se à elaboração das possíveis respostas celulares a decorrer na membrana plasmática de *S. cerevisiae* no decurso da adaptação a uma dose de 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estado estacionário. Entre as respostas celulares identificadas encontra-se um mecanismo de sinalização celular que envolve proteínas Asc1p e Pil1p com possível efeito sobre a composição lipídica da membrana plasmática, um mecanismo de transporte nucleocitoplasmático (Gsp1p) com efeito sobre a regulação da expressão gênica, um possível mecanismo de eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na membrana (Ahp1p) e duas alterações metabólicas com vista quer ao aumento da regeneração de equivalentes redutores (NADPH) quer a alterações nos níveis de intermediários do metabolismo da metionina (SAM).

As alterações observadas também lançam a possibilidade de existir um mecanismo de eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na membrana plasmática devido aumento dos níveis da proteína Ahp1p (sob a forma de várias isoformas distintas). Devido à oxidação do seu centro

activo durante a sua actividade enzimática, este deverá encontrar-se associado a um "complexo" de proteínas, constituído pelos enzimas Trx1p, Trx2p e Gnd1p (cujos níveis também aumentaram com a adaptação), já que a associação a este trio de proteínas permitirá manter um fluxo de equivalentes redutores constante com vista à redução do enzima Ahp1p e consequente manutenção da sua actividade enzimática. A favor desta hipótese encontra-se o facto de já ter sido observada uma interacção física da proteína Ahp1p com a proteína Trx2p (Vignols *et al.*, 2005). Embora o catalase citosólico e o citocromo *c* peroxidase sejam os principais enzimas em *S. cerevisiae* envolvidos na catálise da eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Izawa *et al.*, 1996; Minard e McAlister-Henn, 2001), o forte aumento observado para o enzima Ahp1p na membrana plasmática, durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode indicar que na membrana plasmática este enzima tenha um papel fulcral na eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à semelhança do papel que o catalase apresenta a nível citosólico (Figura 38).

Qualquer mecanismo de sinalização celular durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> implicará a existência de alterações de expressão génica (que foram observadas). Estas alterações de expressão génica são dependentes da regulação transcricional exercida por factores de transcrição. Face aos resultados obtidos parece-nos que a proteína Gsp1p deverá desempenhar um papel relevante na regulação transcricional da expressão génica durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A proteína Gsp1p apresentou uma oscilação dos seus níveis na membrana plasmática ao longo do tempo de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É possível que o aumento dos seus níveis aos 30 min, seja fruto de uma provável alteração do gradiente núcleo/citoplasma em função da exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enquanto que aos 90 min, a diminuição observada parece decorrer de uma movimentação da proteína Gsp1p da membrana plasmática para o núcleo, possivelmente associada a um aumento do *shuttle* de proteínas para o núcleo. O papel desempenhado pela proteína Gsp1p durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae* é, de acordo com os nossos dados experimentais, o seguinte:

1. Uma movimentação inicial para a membrana plasmática da Gsp1p, provavelmente induzida por um mecanismo de sinalização, onde se irá associar a alguma proteína alvo (presumivelmente o factor de transcrição Yap1p).
2. Uma deslocação da mesma proteína da membrana para o núcleo, tendo como função efectuar o transporte da proteína à qual se associou, resultando assim na diminuição dos seus níveis na membrana plasmática, tal como observado aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para além das proteínas referidas acima, também se observaram várias alterações em enzimas associados a vias metabólicas. Embora seja uma tarefa complexa estabelecer

um qualquer tipo de modelo hipotético com base nessas respostas, dado que não possuímos qualquer confirmação de que as vias metabólicas em causa estejam intactas na membrana plasmática, a análise destas alterações parece globalmente indicar um aumento do mecanismo de regeneração de equivalentes redutores e produção de ATP e uma alteração do metabolismo da metionina e vias biossintéticas de aminoácidos associadas. A importância do aumento da actividade do mecanismo de regeneração dos equivalentes redutores na adaptação ao  $H_2O_2$  e na resposta antioxidante já foi referenciado anteriormente (Ng *et al.*, 2008; Minard e McAlister-Henn, 2001). Contudo coloca-se uma questão relativa ao papel desta alteração na membrana plasmática, já que este aumento da regeneração de equivalentes redutores terá uma função na membrana plasmática de *S. cerevisiae* que ainda não foi claramente identificada. Parte deste aumento poderá estar destinado à regeneração do enzima Ahp1p, como já foi referido acima. As alterações observadas no metabolismo da metionina durante a adaptação ao  $H_2O_2$ , poderão ter a ver com alterações dos níveis do seu intermediário SAM, o poderá ter particular importância no metabolismo do ergosterol (Shobayashi *et al.*, 2006) ou, alternativamente, no metabolismo dos glicerofosfolípidos (Malanovic *et al.*, 2008), nomeadamente no metabolismo da fosfatidilcolina cujos níveis aumentaram na membrana plasmática durante a adaptação ao  $H_2O_2$ . Contudo, não se pode excluir outro papel biológico do SAM, dada a relevância deste intermediário como dador de grupos metilo, visto que foi já observado que na protecção contra o *stress* ácido, o SAM aumenta a capacidade de sobrevivência das células expostas a esta forma de *stress* (Malakar *et al.*, 2006).

Todas as variações observadas ao longo deste trabalho experimental deverão ter um papel importante na adaptação ao  $H_2O_2$ , e não somente as supra referidas. Contudo, estabelecer uma clara correlação entre as alterações observadas e um qualquer fenómeno biológico é sempre um passo complexo pelo que pensamos que futuros e mais complexos modelos da resposta adaptativa ao  $H_2O_2$ , terão obrigatoriamente de ser complementados com aproximações experimentais alternativas, pelo que deverão futuramente ser analisados experimentalmente os seguintes aspectos:

- 1.** Isolamento de microdomínios, sendo que este aspecto experimental é particularmente complexo dado que a qualidade dos métodos de isolamento existentes tem sido posta em causa. O isolamento dos microdomínios é particularmente importante já que permitirá em primeiro lugar associar alterações observadas ao nível dos lípidos com outras proteínas e, em segundo lugar, identificar proteínas associadas directamente a esses domínios, sendo provavelmente um dos aspectos mais relevantes na alteração da permeabilidade da membrana plasmática durante a adaptação ao  $H_2O_2$ .

- 2.** Análise das modificações pós-traducionais observadas para algumas proteínas, já que estas modificações poderão ser particularmente relevantes na associação à membrana plasmática, e podem igualmente estar envolvidas nas cascatas de sinalização com a informação para o núcleo, para uma resposta celular.
- 3.** Efectuar um estudo da função da proteína Ahp1p, nomeadamente a determinação da sua actividade enzimática na membrana plasmática assim como a determinação das suas modificações pós-traducionais.
- 4.** Identificar o papel exacto da enorme quantidade de enzimas solúveis que se identificaram como associados à membrana plasmática, nomeadamente se os mesmos se encontram isolados ou pelo contrário se parte substancial da sua via se encontra localizada junto à membrana plasmática.
- 5.** Efectuar uma titulação de estado estacionário com vista à determinação da concentração mínima que induz adaptação e proceder ao estudo de regulação da expressão génica nessas mesmas condições, de modo a esclarecer quais as alterações subjacentes, com vista a aproximarmo-nos cada vez mais das alterações iniciais na resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que induzem alterações na membrana plasmática.

Todos estes aspectos deverão ser futuramente analisados, embora tomando sempre em consideração, que o objectivo essencial de toda esta linha de investigação é perceber exactamente qual ou quais os componentes responsáveis pela alteração de permeabilidade/fluidez da membrana plasmática. Contudo, e apesar das dúvidas colocadas relativamente ao papel exacto de cada um dos componentes alterados, estes resultados claramente demonstram pela primeira vez que a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca alterações na composição da membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae*. Foi comprovado que as alterações na membrana plasmática não se restringem somente à sua composição lipídica, sendo também observadas alterações ao nível do seu proteoma durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta análise global permitiu concluir que existe uma interacção entre a composição proteica e a composição lipídica da membrana plasmática dada a ocorrência de alterações em proteínas intervenientes no metabolismo de lípidos ou que respondem à presença dos mesmos.

Todos estes resultados apontam claramente para existência de uma resposta global complexa e multifactorial durante a adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*, com a resposta celular a ocorrer ao nível da expressão génica, composição lipídica e proteoma da

membrana plasmática, comprovando-se assim que as alterações observadas anteriormente, ao nível da constante de permeabilidade/fluidez da membrana plasmática (Branco *et al.*, 2004; Folmer *et al.*, 2008), são dependentes de vários componentes da membrana plasmática, e embora tenha sido comprovado que os microdomínios desempenham um papel relevante na adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*, não foi possível atribuir um papel determinante, a nenhum componente da membrana plasmática em particular.

## 8 Referências

- Amoros,M. e Estruch,F. (2001). Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol. Microbiol.* **39**, 1523-1532.
- Ando,A., Nakamura,T., Murata,Y., Takagi,H., e Shima,J. (2007). Identification and classification of genes required for tolerance to freeze-thaw stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *FEMS Yeast Res.* **7**, 244-253.
- Antunes,F. e Cadenas,E. (2000). Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* **475**, 121-126.
- Antunes,F. e 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**, 1008-1018.
- Antunes,F., Salvador,A., Marinho,H.S., Alves,R., e Pinto,R.E. (1996). Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. I. An integrative kinetic model. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 917-943.
- Aronov,S., Gelin-Licht,R., Zipor,G., Haim,L., Safran,E., e Gerst,J.E. (2007). mRNAs encoding polarity and exocytosis factors are cotransported with the cortical endoplasmic reticulum to the incipient bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **27**, 3441-3455.
- Ashburner,M., Ball,C.A., Blake,J.A., Botstein,D., Butler,H., Cherry,J.M., Davis,A.P., Dolinski,K., Dwight,S.S., Eppig,J.T., Harris,M.A., Hill,D.P., Issel-Tarver,L., Kasarskis,A., Lewis,S., Matese,J.C., Richardson,J.E., Ringwald,M., Rubin,G.M., e Sherlock,G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **25**, 25-29.
- Azmi,I., Davies,B., Dimaano,C., Payne,J., Eckert,D., Babst,M., e Katzmann,D.J. (2006). Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *J. Cell Biol.* **172**, 705-717.
- Babst,M., Wendland,B., Estepa,E.J., e Emr,S.D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* **17**, 2982-2993.
- Bagnat,M., Keranen,S., Shevchenko,A., Shevchenko,A., e Simons,K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 3254-3259.
- Barja,G. (1993). Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free Radic. Res. Commun.* **18**, 63-70.
- Bensalem,N., Masscheleyn,S., Mozo,J., Vallee,B., Brouillard,F., Trudel,S., Ricquier,D., Edelman,A., Guerrero,I.C., e Miroux,B. (2007). High sensitivity identification of membrane proteins by MALDI TOF-MASS spectrometry using polystyrene beads. *J. Proteome. Res.* **6**, 1595-1602.
- Berglund,A.H., Larsson,K.E., e Liljenberg,C.S. (2004). Permeability behaviour of lipid vesicles prepared from plant plasma membranes--impact of compositional changes. *Biochim. Biophys. Acta* **1682**, 11-17.
- Berglund,A.H., Quartacci,M.F., Calucci,L., Navari-Izzo,F., Pinzino,C., e Liljenberg,C. (2002). Alterations of wheat root plasma membrane lipid composition induced by copper stress result in changed physicochemical properties of plasma membrane lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1564**, 466-472.
- Bernstein,P., Peltz,S.W., e Ross,J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol. Cell Biol.* **9**, 659-670.
- Bienert,G.P., Moller,A.L., Kristiansen,K.A., Schulz,A., Moller,I.M., Schjoerring,J.K., e Jahn,T.P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* **282**, 1183-1192.
- Bienert,G.P., Schjoerring,J.K., e Jahn,T.P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 994-1003.
- Biteau,B., Labarre,J., e Toledano,M.B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425**, 980-984.
- Bjerrum,O.J. and Schafer-Nielsen (1986). C. Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. In *Analytical electrophoresis*, M.J.Dunn, ed. Weinheim:Verlag Chemie), pp. 315-317.

- Blagovic,B., Rupcic,J., Mesaric,M., e Maric,V. (2005). Lipid analysis of the plasma membrane and mitochondria of brewer's yeast. *Folia Microbiol. (Praha)* *50*, 24-30.
- Bossie,M.A. e Martin,C.E. (1989). Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity. *J. Bacteriol.* *171*, 6409-6413.
- Boumann,H.A., Gubbens,J., Koorengel,M.C., Oh,C.S., Martin,C.E., Heck,A.J., Patton-Vogt,J., Henry,S.A., de Kruijff,B., e de Kroon,A.I. (2006). Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a eukaryote. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1006-1017.
- Boyle,E.I., Weng,S., Gollub,J., Jin,H., Botstein,D., Cherry,J.M., e Sherlock,G. (2004). GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics.* *20*, 3710-3715.
- Brachmann,C.B., Davies,A., Cost,G.J., Caputo,E., Li,J., Hieter,P., e Boeke,J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* *14*, 115-132.
- Branco,M.R., Marinho,H.S., Cyrne,L., e 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*, 6501-6506.
- Bruun,A.W., Svendsen,I., Sorensen,S.O., Kielland-Brandt,M.C., e Winther,J.R. (1998). A high-affinity inhibitor of yeast carboxypeptidase Y is encoded by TFS1 and shows homology to a family of lipid binding proteins. *Biochemistry* *37*, 3351-3357.
- Cadenas,E. (1998). Mechanisms of Antioxidant Action. In *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants*, Ozben, ed. Plenum Press), pp. 237-251.
- Cai,H. (2005). NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ. Res.* *96*, 818-822.
- Carman,G.M. e Zeimetz,G.M. (1996). Regulation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *271*, 13293-13296.
- Carmel-Harel,O. e Storz,G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* *54*, 439-461.
- Casey,P.J. e Seabra,M.C. (1996). Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* *271*, 5289-5292.
- Castro,B.M., de Almeida,R.F., Silva,L.C., Fedorov,A., e Prieto,M. (2007). Formation of ceramide/sphingomyelin gel domains in the presence of an unsaturated phospholipid: a quantitative multiprobe approach. *Biophys. J.* *93*, 1639-1650.
- Cau,J. e Hall,A. (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J. Cell Sci.* *118*, 2579-2587.
- 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., e Young,R.A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* *12*, 323-337.
- Chae,H.Z., Chung,S.J., e Rhee,S.G. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* *269*, 27670-27678.
- Chance,B., Sies,H., e Boveris,A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* *59*, 527-605.
- Chatterjee,M.T., Khalawan,S.A., e Curran,B.P. (1997). Alterations in cellular lipids may be responsible for the transient nature of the yeast heat shock response. *Microbiology* *143 ( Pt 9)*, 3063-3068.
- Chatterjee,M.T., Khalawan,S.A., e Curran,B.P. (2000). Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology* *146 ( Pt 4)*, 877-884.
- Chernoff,Y.O. (2007). Stress and prions: lessons from the yeast model. *FEBS Lett.* *581*, 3695-3701.
- Cherry,J.M. (1995). Genetic nomenclature guide. *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Genet.* 11-12.



Chougnnet,C. e Hildeman,D.A. (2007). It's hard to get downstream without a raft: a commentary on "reactive oxygen species promote raft formation in T lymphocytes". *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 933-935.

Christie,W.W. (1989). *Gas Chromatography and Lipids*. Oily Press Ltd).

Cipak,A., Hasslacher,M., Tehlivets,O., Collinson,E.J., Zivkovic,M., Matijevic,T., Wonisch,W., Waeg,G., Dawes,I.W., Zarkovic,N., e 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**, 897-906.

Collinson,E.J., Wheeler,G.L., Garrido,E.O., Avery,A.M., Avery,S.V., e Grant,C.M. (2002). The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* **277**, 16712-16717.

Collinson,L.P. e Dawes,I.W. (1992). Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 329-335.

Costa,V.M., Amorim,M.A., Quintanilha,A., e 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**, 1507-1515.

Cyrne,L., Martins,L., Fernandes,L., e Marinho,H.S. (2003). Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 385-393.

Davies,J.M., Lowry,C.V., e Davies,K.J. (1995). Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 1-6.

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

de Kroon,A.I. (2007). Metabolism of phosphatidylcholine and its implications for lipid acyl chain composition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 343-352.

Delaunay,A., Isnard,A.D., e Toledano,M.B. (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* **19**, 5157-5166.

Delaunay,A., Pflieger,D., Barrault,M.B., Vinh,J., e Toledano,M.B. (2002). A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**, 471-481.

Delom,F., Szponarski,W., Sommerer,N., Boyer,J.C., Bruneau,J.M., Rossignol,M., e Gibrat,R. (2006). The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor. *Proteomics.* **6**, 3029-3039.

Dickson,R.C., Sumanasekera,C., e Lester,R.L. (2006). Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Lipid Res.* **45**, 447-465.

Dittmer,J.C. e Wells,M.A. (1969). Quantitative and Qualitative Analysis of Lipids and Lipid Components. *Methods Enzymol.* **14**, 482-529.

Dixit,B.L. e Gupta,C.M. (1998). Role of the actin cytoskeleton in regulating the outer phosphatidylethanolamine levels in yeast plasma membrane. *Eur. J. Biochem.* **254**, 202-206.

Dolinski,K., Muir,S., Cardenas,M., e Heitman,J. (1997). All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 13093-13098.

Dwight,S.S., Harris,M.A., Dolinski,K., Ball,C.A., Binkley,G., Christie,K.R., Fisk,D.G., Issel-Tarver,L., Schroeder,M., Sherlock,G., Sethuraman,A., Weng,S., Botstein,D., e Cherry,J.M. (2002). *Saccharomyces Genome Database (SGD)* provides secondary gene annotation using the Gene Ontology (GO). *Nucleic Acids Res.* **30**, 69-72.

Dynowski,M., Schaaf,G., Loque,D., Moran,O., e Ludewig,U. (2008). Plant plasma membrane water channels conduct the signaling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochem. J.*

Fairn,G.D. e McMaster,C.R. (2007). Emerging roles of the oxysterol-binding protein family in metabolism, transport, and signaling. *Cell Mol. Life Sci.*

- Fei,W., Alfaro,G., Muthusamy,B.P., Klaassen,Z., Graham,T.R., Yang,H., e Beh,C.T. (2008). Genome-wide analysis of sterol-lipid storage and trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 7, 401-414.
- Flattery-O'Brien,J.A. e Dawes,I.W. (1998). Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *J. Biol. Chem.* 273, 8564-8571.
- Folch,J., Lees,M., e Stanley,G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Folmer,V., Pedroso,N., Matias,A.C., Lopes,S.C.D.N., Antunes,F., Cyrne,L., e 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, 1141-1147.
- 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, 926-932.
- Forsburg,S.L. (2005). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravit. Space Biol. Bull.* 18, 3-9.
- Foury,F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* 195, 1-10.
- Furukawa,R., Jinks,T.M., Tishgarten,T., Mazzawi,M., Morris,D.R., e Fechheimer,M. (2001). Elongation factor 1beta is an actin-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1527, 130-140.
- Gaber,R.F., Copple,D.M., Kennedy,B.K., Vidal,M., e Bard,M. (1989). The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol. Cell Biol.* 9, 3447-3456.
- Gagny,B., Wiederkehr,A., Dumoulin,P., Winsor,B., Riezman,H., e Haguenaer-Tsapis,R. (2000). A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 18), 3309-3319.
- Gaigg,B., Timischl,B., Corbino,L., e Schneiter,R. (2005). Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *J. Biol. Chem.* 280, 22515-22522.
- Gaigg,B., Toulmay,A., e Schneiter,R. (2006). Very long-chain fatty acid-containing lipids rather than sphingolipids per se are required for raft association and stable surface transport of newly synthesized plasma membrane ATPase in yeast. *J. Biol. Chem.* 281, 34135-34145.
- Gangloff,S.P., Marguet,D., e Lauquin,G.J. (1990). Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (ACO1) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Mol. Cell Biol.* 10, 3551-3561.
- Garcera,A., Barreto,L., Piedrafita,L., Tamarit,J., e Herrero,E. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochem. J.* 398, 187-196.
- Gasch,A.P., Spellman,P.T., Kao,C.M., Carmel-Harel,O., Eisen,M.B., Storz,G., Botstein,D., e Brown,P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241-4257.
- Georgiou,G. (2002). How to flip the (redox) switch. *Cell* 111, 607-610.
- Gerbasi,V.R., Weaver,C.M., Hill,S., Friedman,D.B., e Link,A.J. (2004). Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol. Cell Biol.* 24, 8276-8287.
- Giannattasio,S., Guaragnella,N., Corte-Real,M., Passarella,S., e Marra,E. (2005). Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene* 354, 93-98.
- Giorgio,M., Trinei,M., Migliaccio,E., e Pelicci,P.G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 722-728.
- Godon,C., Lagniel,G., Lee,J., Buhler,J.M., Kieffer,S., Perrot,M., Boucherie,H., Toledano,M.B., e Labarre,J. (1998). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 22480-22489.

- Goehring,A.S., Rivers,D.M., e Sprague,G.F., Jr. (2003). Attachment of the ubiquitin-related protein Urm1p to the antioxidant protein Ahp1p. *Eukaryot. Cell* 2, 930-936.
- 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., e Oliver,S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-546, 567.
- Goni,F.M. e Alonso,A. (2006). Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1902-1921.
- Gower,T.L. e Graham,B.S. (2001). Antiviral activity of lovastatin against respiratory syncytial virus in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1231-1237.
- Grant,C.M., Maciver,F.H., e Dawes,I.W. (1996). Stationary-phase induction of GLR1 expression is mediated by the yAP-1 transcriptional regulatory protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 22, 739-746.
- Grossmann,G., Opekarova,M., Malinsky,J., Weig-Meckl,I., e Tanner,W. (2007). Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J.* 26, 1-8.
- Gruner,S.M. (1985). Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 3665-3669.
- Guan,X.L. e Wenk,M.R. (2006b). Mass spectrometry-based profiling of phospholipids and sphingolipids in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 465-477.
- Guan,X.L. e Wenk,M.R. (2006a). Mass spectrometry-based profiling of phospholipids and sphingolipids in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 465-477.
- Halliwell,B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147-1150.
- Halliwell,B., Clement,M.V., e Long,L.H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 486, 10-13.
- Halliwell,B. e Gutteridge,J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14.
- Hasan,R., Leroy,C., Isnard,A.D., Labarre,J., Boy-Marcotte,E., e 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, 233-241.
- Hashimoto,H., Sakakibara,A., Yamasaki,M., e Yoda,K. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* VIG9 encodes GDP-mannose pyrophosphorylase, which is essential for protein glycosylation. *J. Biol. Chem.* 272, 16308-16314.
- Hauss,T., Dante,S., Dencher,N.A., e Haines,T.H. (2002). Squalane is in the midplane of the lipid bilayer: implications for its function as a proton permeability barrier. *Biochim. Biophys. Acta* 1556, 149-154.
- Hechtberger,P., Zinser,E., Saf,R., Hummel,K., Paltauf,F., e Daum,G. (1994). Characterization, quantification and subcellular localization of inositol-containing sphingolipids of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 225, 641-649.
- Herst,P.M., Perrone,G.G., Dawes,I.W., Bircham,P.W., e Berridge,M.V. (2008). Plasma membrane electron transport in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the presence of mitochondrial respiratory subunits. *FEMS Yeast Res.* 8, 897-905.
- Higgins,V.J., Alic,N., Thorpe,G.W., Breitenbach,M., Larsson,V., e Dawes,I.W. (2002). Phenotypic analysis of gene deletant strains for sensitivity to oxidative stress. *Yeast* 19, 203-214.
- Hong,E.L., Balakrishnan,R., Dong,Q., Christie,K.R., Park,J., Binkley,G., Costanzo,M.C., Dwight,S.S., Engel,S.R., Fisk,D.G., Hirschman,J.E., Hitz,B.C., Krieger,C.J., Livstone,M.S., Miyasato,S.R., Nash,R.S., Oughtred,R., Skrzypek,M.S., Weng,S., Wong,E.D., Zhu,K.K., Dolinski,K., Botstein,D., e Cherry,J.M. (2008). Gene Ontology annotations at SGD: new data sources and annotation methods. *Nucleic Acids Res.* 36, D577-D581.
- Huh,W.K., Lee,B.H., Kim,S.T., Kim,Y.R., Rhie,G.E., Baek,Y.W., Hwang,C.S., Lee,J.S., e Kang,S.O. (1998). D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 30, 895-903.
- Imlay,J.A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395-418.

- Inadome,H., Noda,Y., Adachi,H., e Yoda,K. (2005). Immunoisolation of the yeast Golgi subcompartments and characterization of a novel membrane protein, Svp26, discovered in the Sed5-containing compartments. *Mol. Cell Biol.* *25*, 7696-7710.
- Inoue,Y., Matsuda,T., Sugiyama,K., Izawa,S., e Kimura,A. (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *274*, 27002-27009.
- Izawa,S., Inoue,Y., e Kimura,A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* *320 ( Pt 1)*, 61-67.
- Izawa,S., Maeda,K., Miki,T., Mano,J., Inoue,Y., e Kimura,A. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* *330 ( Pt 2)*, 811-817.
- Jamieson,D.J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 1511-1527.
- Janik,A., Sosnowska,M., Kruszewska,J., Krotkiewski,H., Lehle,L., e Palamarczyk,G. (2003). Overexpression of GDP-mannose pyrophosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae* corrects defects in dolichol-linked saccharide formation and protein glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* *1621*, 22-30.
- Jeffery,C.J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 8-11.
- Jelinsky,S.A. e Samson,L.D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 1486-1491.
- Kadowaki,T., Goldfarb,D., Spitz,L.M., Tartakoff,A.M., e Ohno,M. (1993). Regulation of RNA processing and transport by a nuclear guanine nucleotide release protein and members of the Ras superfamily. *EMBO J.* *12*, 2929-2937.
- Kaeberlein,M., Kirkland,K.T., Fields,S., e Kennedy,B.K. (2004). Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS. Biol.* *2*, E296.
- Kane,P.M. (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *70*, 177-191.
- Kennedy,M.A., Barbuch,R., e Bard,M. (1999). Transcriptional regulation of the squalene synthase gene (ERG9) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* *1445*, 110-122.
- Kinzy,T.G. e Woolford,J.L., Jr. (1995). Increased expression of *Saccharomyces cerevisiae* translation elongation factor 1 alpha bypasses the lethality of a TEF5 null allele encoding elongation factor 1 beta. *Genetics* *141*, 481-489.
- Kirkman,H.N., Galiano,S., e Gaetani,G.F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *J. Biol. Chem.* *262*, 660-666.
- Kobayashi,H., Yokoo,H., Yanagita,T., Satoh,S., Kis,B., Deli,M., Niwa,M., e Wada,A. (2006). Induction of aquaporin 1 by dexamethasone in lipid rafts in immortalized brain microvascular endothelial cells. *Brain Res.* *1123*, 12-19.
- Koland,J.G. e Hammes,G.G. (1986). Steady state kinetic studies of purified yeast plasma membrane proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* *261*, 5936-5942.
- Kozminski,K.G., Alfaro,G., Dighe,S., e Beh,C.T. (2006). Homologues of oxysterol-binding proteins affect Cdc42p- and Rho1p-mediated cell polarization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic.* *7*, 1224-1242.
- Kuge,S. e Jones,N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* *13*, 655-664.
- Kumar,A., Agarwal,S., Heyman,J.A., Matson,S., Heidtman,M., Piccirillo,S., Umansky,L., Drawid,A., Jansen,R., Liu,Y., Cheung,K.H., Miller,P., Gerstein,M., Roeder,G.S., e Snyder,M. (2002). Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.* *16*, 707-719.
- Kunimoto,M., Inoue,K., e Nojima,S. (1981). Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *646*, 169-178.
- Kwon,M., Chong,S., Han,S., e Kim,K. (2003). Oxidative stresses elevate the expression of cytochrome c peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* *1623*, 1-5.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Le Moan,N., Clement,G., Le Maout,S., Tacnet,F., e Toledano,M.B. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J. Biol. Chem.* 281, 10420-10430.

Lee,J., Godon,C., Lagniel,G., Spector,D., Garin,J., Labarre,J., e Toledano,M.B. (1999a). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 16040-16046.

Lee,J., Spector,D., Godon,C., Labarre,J., e Toledano,M.B. (1999b). A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 4537-4544.

Lee,M.C., Hamamoto,S., e Schekman,R. (2002). Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H<sup>+</sup>-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277, 22395-22401.

Li,X., Rivas,M.P., Fang,M., Marchena,J., Mehrotra,B., Chaudhary,A., Feng,L., Prestwich,G.D., e Bankaitis,V.A. (2002). Analysis of oxysterol binding protein homologue Kes1p function in regulation of Sec14p-dependent protein transport from the yeast Golgi complex. *J. Cell Biol.* 157, 63-77.

Loewen,C.J., Gaspar,M.L., Jesch,S.A., Delon,C., Ktistakis,N.T., Henry,S.A., e Levine,T.P. (2004). Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science* 304, 1644-1647.

Lopez-Villar,E., Monteoliva,L., Larsen,M.R., Sachon,E., Shabaz,M., Pardo,M., Pla,J., Gil,C., Roepstorff,P., e Nombela,C. (2006). Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. *Proteomics*. 6 *Suppl 1*, S107-S118.

Lorenz,R.T. e Parks,L.W. (1990). Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1660-1665.

Lu,S.P., Lin Feng,M.H., Huang,H.L., Huang,Y.C., Tsou,W.I., e Lai,M.Z. (2007). Reactive oxygen species promote raft formation in T lymphocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 936-944.

Luo,G., Gruhler,A., Liu,Y., Jensen,O.N., e Dickson,R.C. (2008). The Sphingolipid Long-chain Base-Pkh1/2-Ypk1/2 Signaling Pathway Regulates Eisosome Assembly and Turnover. *J. Biol. Chem.* 283, 10433-10444.

Lushchak,V.I. e Gospodaryov,D.V. (2005). Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol. Int.* 29, 187-192.

Malakar,D., Dey,A., e Ghosh,A.K. (2006). Protective role of S-adenosyl-L-methionine against hydrochloric acid stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 1298-1303.

Malanovic,N., Streith,I., Wolinski,H., Rechberger,G., Kohlwein,S.D., e Tehlivets,O. (2008). S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, key enzyme of methylation metabolism, regulates phosphatidylcholine synthesis and triacylglycerol homeostasis in yeast: implications for homocysteine as a risk factor of atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 283, 23989-23999.

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

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

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

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

Mangus,D.A., Amrani,N., e Jacobson,A. (1998). Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Mol. Cell Biol.* 18, 7383-7396.

Maniratanachote,R., Minami,K., Katoh,M., Nakajima,M., e Yokoi,T. (2006). Dephosphorylation of ribosomal protein P0 in response to troglitazone-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 166, 189-199.

- Matias,A.C., Pedroso,N., Teodoro,N., Marinho,H.S., Antunes,F., Nogueira,J.M., Herrero,E., e 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*, 1458-1465.
- McCord,J.M. e Fridovich,I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* *244*, 6049-6055.
- Milgrom,E., Diab,H., Middleton,F., e Kane,P.M. (2007). Loss of vacuolar proton-translocating ATPase activity in yeast results in chronic oxidative stress. *J. Biol. Chem.* *282*, 7125-7136.
- Minard,K.I. e McAlister-Henn,L. (2001). Antioxidant function of cytosolic sources of NADPH in yeast. *Free Radic. Biol. Med.* *31*, 832-843.
- Molzahn,S.W. e Woods,R.A. (1972). Polyene resistance and the isolation of sterol mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* *72*, 339-348.
- Monteiro,P.T., Mendes,N.D., Teixeira,M.C., d'Orey,S., Tenreiro,S., Mira,N.P., Pais,H., Francisco,A.P., Carvalho,A.M., Lourenco,A.B., Sa-Correia,I., Oliveira,A.L., e Freitas,A.T. (2008). YEASTRACT-DISCOVERER: new tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *36*, D132-D136.
- Moradas-Ferreira,P., Costa,V., Piper,P., e Mager,W. (1996). The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol. Microbiol.* *19*, 651-658.
- Morgan,B.A., Banks,G.R., Toone,W.M., Raitt,D., Kuge,S., e Johnston,L.H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *16*, 1035-1044.
- Morrisson,W.R. e Smith ,L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride--methanol. *J. Lipid Res.* *5*, 600-608.
- Motshwene,P., Brandt,W., e Lindsey,G. (2003). Significant quantities of the glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase are present in the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* *369*, 357-362.
- Moye-Rowley,W.S. (2003). Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot. Cell* *2*, 381-389.
- Mulholland,J., Preuss,D., Moon,A., Wong,A., Drubin,D., e Botstein,D. (1994). Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* *125*, 381-391.
- Navarre,C., Degand,H., Bennett,K.L., Crawford,J.S., Mortz,E., e Boutry,M. (2002). Subproteomics: identification of plasma membrane proteins from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteomics.* *2*, 1706-1714.
- Nelson,D.A. and Cox,M.M. (2004). *Lehninger, Principles of Biochemistry.* W. H. Freeman).
- Ng,C.H., Tan,S.X., Perrone,G.G., Thorpe,G.W., Higgins,V.J., e Dawes,I.W. (2008). Adaptation to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of NADPH-generating systems and the SKN7 transcription factor. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 1131-1145.
- Nguyen,D.T., Alarco,A.M., e Raymond,M. (2001). Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator FLR1 gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J. Biol. Chem.* *276*, 1138-1145.
- Nguyen-nhu,N.T. e Knoops,B. (2002). Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicol. Lett.* *135*, 219-228.
- Niemela,P.S., Hyvonen,M.T., e Vattulainen,I. (2006). Influence of chain length and unsaturation on sphingomyelin bilayers. *Biophys. J.* *90*, 851-863.
- Nikawa,J., Yata,M., Motomura,M., Miyoshi,N., Ueda,T., e Hisada,D. (2006). Ternary complex formation of Ino2p-Ino4p transcription factors and Apl2p adaptin beta subunit in yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *70*, 2604-2612.
- Norman,A.W., Demel,R.A., de Kruijff,B., e van Deenen,L.L. (1972). Studies on the biological properties of polyene antibiotics. Evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol. *J. Biol. Chem.* *247*, 1918-1929.

- Normington,K., Kohno,K., Kozutsumi,Y., Gething,M.J., e Sambrook,J. (1989). *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* 57, 1223-1236.
- Oh,C.S., Toke,D.A., Mandala,S., e Martin,C.E. (1997). ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J. Biol. Chem.* 272, 17376-17384.
- Oliveira-Marques,V., Cyrne,L., Marinho,H.S., e 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, 3893-3902.
- Opekarova,M., Malinska,K., Novakova,L., e Tanner,W. (2005). Differential effect of phosphatidylethanolamine depletion on raft proteins: further evidence for diversity of rafts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1711, 87-95.
- Palhano,F.L., Orlando,M.T., e Fernandes,P.M. (2004). Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 139-145.
- Panaretou,B. e Piper,P. (2006). Isolation of yeast plasma membranes. *Methods Mol. Biol.* 313, 27-32.
- Pardo,M., Ward,M., Bains,S., Molina,M., Blackstock,W., Gil,C., e Nombela,C. (2000). A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. *Electrophoresis* 21, 3396-3410.
- Park,S.G., Cha,M.K., Jeong,W., e Kim,I.H. (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 5723-5732.
- Parks,L.W., Smith,S.J., e Crowley,J.H. (1995). Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast--a review. *Lipids* 30, 227-230.
- Patton,J.L. e Lester,R.L. (1991). The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J. Bacteriol.* 173, 3101-3108.
- Perego,P., Jimenez,G.S., Gatti,L., Howell,S.B., e Zunino,F. (2000). Yeast mutants as a model system for identification of determinants of chemosensitivity. *Pharmacol. Rev.* 52, 477-492.
- Pereira,M.D., Eleutherio,E.C., e Panek,A.D. (2001). Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC. Microbiol.* 1, 11.
- Perrone,G.G., Grant,C.M., e Dawes,I.W. (2005). Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 16, 218-230.
- Peterson,G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- Petrova,V.Y., Drescher,D., Kujumdzieva,A.V., e Schmitt,M.J. (2004). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* 380, 393-400.
- Phillips,K.M., Ruggio,D.M., e Bailey,J.A. (1999). Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 732, 17-29.
- Philpott,C.C., Protchenko,O., Kim,Y.W., Boretsky,Y., e Shakoury-Elizeh,M. (2002). The response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of siderophore-based systems of iron uptake. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 698-702.
- Pike,L.J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44, 655-667.
- Piper,R.C. e Katzmann,D.J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 519-547.
- Pirkov,I., Norbeck,J., Gustafsson,L., e Albers,E. (2008). A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS J.* 275, 4111-4120.
- Praekelt,U.M. e Meacock,P.A. (1990). HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol. Gen. Genet.* 223, 97-106.

- Protchenko,O., Rodriguez-Suarez,R., Androphy,R., Bussey,H., e Philpott,C.C. (2006). A screen for genes of heme uptake identifies the FLC family required for import of FAD into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *281*, 21445-21457.
- Raha,S., McEachern,G.E., Myint,A.T., e Robinson,B.H. (2000). Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* *29*, 170-180.
- Raitt,D.C., Johnson,A.L., Erkin,A.M., Makino,K., Morgan,B., Gross,D.S., e Johnston,L.H. (2000). The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* *11*, 2335-2347.
- Rapaport,D. e Neupert,W. (1999). Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J. Cell Biol.* *146*, 321-331.
- Rasband, W. S. ImageJ. U. S. National Institutes of Health. 1997. Bethesda, Maryland.  
Ref Type: Generic
- Raychaudhuri,S., Im,Y.J., Hurley,J.H., e Prinz,W.A. (2006). Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *J. Cell Biol.* *173*, 107-119.
- Regev-Rudzki,N., Karniely,S., Ben Haim,N.N., e Pines,O. (2005). Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing. *Mol. Biol. Cell* *16*, 4163-4171.
- Reggiori,F., Canivenc-Gansel,E., e Conzelmann,A. (1997). Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *16*, 3506-3518.
- Reiner,S., Micolod,D., e Schneiter,R. (2005). *Saccharomyces cerevisiae*, a model to study sterol uptake and transport in eukaryotes. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 1186-1188.
- Reiner,S., Micolod,D., Zellnig,G., e Schneiter,R. (2006). A genomewide screen reveals a role of mitochondria in anaerobic uptake of sterols in yeast. *Mol. Biol. Cell* *17*, 90-103.
- Ren,J., Wen,L., Gao,X., Jin,C., Xue,Y., e Yao,X. (2008). CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng Des Sel.*
- Rep,M., Proft,M., Remize,F., Tamas,M., Serrano,R., Thevelein,J.M., e Hohmann,S. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol. Microbiol.* *40*, 1067-1083.
- Rinnerthaler,M., Jarolim,S., Heeren,G., Palle,E., Perju,S., Klinger,H., Bogengruber,E., Madeo,F., Braun,R.J., Breitenbach-Koller,L., Breitenbach,M., e Laun,P. (2006). MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1757*, 631-638.
- Rizzo,J.M., Tarsio,M., Martinez-Munoz,G.A., e Kane,P.M. (2007). Diploids heterozygous for a vma13Delta mutation in *Saccharomyces cerevisiae* highlight the importance of V-ATPase subunit balance in supporting vacuolar acidification and silencing cytosolic V1-ATPase activity. *J. Biol. Chem.* *282*, 8521-8532.
- Rodriguez-Gabriel,M.A., Remacha,M., e Ballesta,J.P. (1998). Phosphorylation of ribosomal protein P0 is not essential for ribosome function but can affect translation. *Biochemistry* *37*, 16620-16626.
- Roelants,F.M., Torrance,P.D., Bezman,N., e Thorner,J. (2002). Pkh1 and pkh2 differentially phosphorylate and activate ypk1 and ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3005-3028.
- Rose,M.D., Misra,L.M., e Vogel,J.P. (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* *57*, 1211-1221.
- Rosslar,H., Rieck,C., Delong,T., Hoja,U., e Schweizer,E. (2003). Functional differentiation and selective inactivation of multiple *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in very-long-chain fatty acid synthesis. *Mol. Genet. Genomics* *269*, 290-298.



- Sales,K., Brandt,W., Rumbak,E., e Lindsey,G. (2000). The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1463, 267-278.
- Santiago,T.C. e Mamoun,C.B. (2003). Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p. *J. Biol. Chem.* 278, 38723-38730.
- Sato,M., Fujisaki,S., Sato,K., Nishimura,Y., e Nakano,A. (2001). Yeast *Saccharomyces cerevisiae* has two cis-prenyltransferases with different properties and localizations. Implication for their distinct physiological roles in dolichol synthesis. *Genes Cells* 6, 495-506.
- Schneider,R., Brugger,B., Amann,C.M., Prestwich,G.D., Epand,R.F., Zellnig,G., Wieland,F.T., e Epand,R.M. (2004). Identification and biophysical characterization of a very-long-chain-fatty-acid-substituted phosphatidylinositol in yeast subcellular membranes. *Biochem. J.* 381, 941-949.
- Schneider,R., Brugger,B., Sandhoff,R., Zellnig,G., Leber,A., Lampl,M., Athenstaedt,K., Hrastnik,C., Eder,S., Daum,G., Paltauf,F., Wieland,F.T., e Kohlwein,S.D. (1999). Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 146, 741-754.
- Schulz,T.A. e Prinz,W.A. (2007). Sterol transport in yeast and the oxysterol binding protein homologue (OSH) family. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 769-780.
- Schwank,S., Ebbert,R., Rautenstrauss,K., Schweizer,E., e Schuller,H.J. (1995). Yeast transcriptional activator INO2 interacts as an Ino2p/Ino4p basic helix-loop-helix heteromeric complex with the inositol/choline-responsive element necessary for expression of phospholipid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23, 230-237.
- Schweizer,M., Roberts,L.M., Holtke,H.J., Takabayashi,K., Hollerer,E., Hoffmann,B., Muller,G., Kottig,H., e Schweizer,E. (1986). The pentafunctional FAS1 gene of yeast: its nucleotide sequence and order of the catalytic domains. *Mol. Gen. Genet.* 203, 479-486.
- Seaver,L.C. e Imlay,J.A. (2001). Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 7182-7189.
- Shaw,J.D., Cummings,K.B., Huyer,G., Michaelis,S., e Wendland,B. (2001). Yeast as a model system for studying endocytosis. *Exp. Cell Res.* 271, 1-9.
- Shenhar,G. e Kassir,Y. (2001). A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 21, 1603-1612.
- Shepard,K.A., Gerber,A.P., Jambhekar,A., Takizawa,P.A., Brown,P.O., Herschlag,D., DeRisi,J.L., e Vale,R.D. (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 11429-11434.
- Sherman,F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350, 3-41.
- Shibata,N., Arita,M., Misaki,Y., Dohmae,N., Takio,K., Ono,T., Inoue,K., e Arai,H. (2001). Supernatant protein factor, which stimulates the conversion of squalene to lanosterol, is a cytosolic squalene transfer protein and enhances cholesterol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2244-2249.
- Shobayashi,M., Mukai,N., Iwashita,K., Hiraga,Y., e Iefuji,H. (2006). A new method for isolation of S-adenosylmethionine (SAM)-accumulating yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 704-710.
- Sies,H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol* 82, 291-295.
- Sievi,E., Suntio,T., e Makarow,M. (2001). Proteolytic function of GPI-anchored plasma membrane protease Yps1p in the yeast vacuole and Golgi. *Traffic.* 2, 896-907.
- Silva,L.C., de Almeida,R.F.M., Castro,B.M., Fedorov,A., e Prieto,M. (2007). Ceramide-domain formation and collapse in lipid rafts: Membrane reorganization by an apoptotic lipid. *Biophysical Journal* 92, 502-516.
- Simons,K. e Ikonen,E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

- Sipos,G., Reggiori,F., Vionnet,C., e Conzelmann,A. (1997). Alternative lipid remodelling pathways for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *16*, 3494-3505.
- Siskind,L.J., Kolesnick,R.N., e Colombini,M. (2006). Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion.* *6*, 118-125.
- Sivadon,P., Bauer,F., Aigle,M., e Crouzet,M. (1995). Actin cytoskeleton and budding pattern are altered in the yeast *rvs161* mutant: the *Rvs161* protein shares common domains with the brain protein amphiphysin. *Mol. Gen. Genet.* *246*, 485-495.
- Smith,A., Ward,M.P., e Garrett,S. (1998). Yeast PKA represses *Msn2p/Msn4p*-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* *17*, 3556-3564.
- Smith,S.J., Crowley,J.H., e Parks,L.W. (1996). Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *16*, 5427-5432.
- Smith,S.W. e Lester,R.L. (1974). Inositol phosphorylceramide, a novel substance and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate. *J. Biol. Chem.* *249*, 3395-3405.
- Sousa-Lopes,A., Antunes,F., Cyrne,L., e 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*, 152-156.
- Stephen,D.W., Rivers,S.L., e Jamieson,D.J. (1995). The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* *16*, 415-423.
- Stochaj,U., Rassadi,R., e Chiu,J. (2000). Stress-mediated inhibition of the classical nuclear protein import pathway and nuclear accumulation of the small GTPase *Gsp1p*. *FASEB J.* *14*, 2130-2132.
- Stocker,A., Tomizaki,T., Schulze-Briese,C., e Baumann,U. (2002). Crystal structure of the human supernatant protein factor. *Structure.* *10*, 1533-1540.
- Stoldt,V., Rademacher,F., Kehren,V., Ernst,J.F., Pearce,D.A., e Sherman,F. (1996). Review: the Cct eukaryotic chaperonin subunits of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts. *Yeast* *12*, 523-529.
- Stone,J.R. e Yang,S. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid. Redox. Signal.* *8*, 243-270.
- Stone,R.L., Matarese,V., Magee,B.B., Magee,P.T., e Bernlohr,D.A. (1990). Cloning, sequencing and chromosomal assignment of a gene from *Saccharomyces cerevisiae* which is negatively regulated by glucose and positively by lipids. *Gene* *96*, 171-176.
- Sugiyama,K., Izawa,S., e Inoue,Y. (2000). The *Yap1p*-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 15535-15540.
- Sullivan,D.P., Ohvo-Rekila,H., Baumann,N.A., Beh,C.T., e Menon,A.K. (2006). Sterol trafficking between the endoplasmic reticulum and plasma membrane in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 356-358.
- Suzuki,Y.J., Forman,H.J., e Sevanian,A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* *22*, 269-285.
- Swain,E., Stukej,J., McDonough,V., Germann,M., Liu,Y., Sturley,S.L., e Nickels,J.T., Jr. (2002). Yeast cells lacking the *ARV1* gene harbor defects in sphingolipid metabolism. Complementation by human *ARV1*. *J. Biol. Chem.* *277*, 36152-36160.
- Swiecilo,A., Krawiec,Z., Wawryn,J., Bartosz,G., e Bilinski,T. (2000). Effect of stress on the life span of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim. Pol.* *47*, 355-364.
- Tafforeau,L., Le Blastier,S., Bamps,S., Dewez,M., Vandenhoute,J., e Hermand,D. (2006). Repression of ergosterol level during oxidative stress by fission yeast F-box protein *Pof14* independently of *SCF*. *EMBO J.* *25*, 4547-4556.
- Takeuchi,Y., Nomura,W., Ohdate,T., Tamasu,S., Masutani,H., Murata,K., Izawa,S., Yodoi,J., e Inoue,Y. (2007). Release of thioredoxin from *Saccharomyces cerevisiae* with environmental stimuli: solubilization of thioredoxin with ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *75*, 1393-1399.
- Teixeira,M.C., Monteiro,P., Jain,P., Tenreiro,S., Fernandes,A.R., Mira,N.P., Alenquer,M., Freitas,A.T., Oliveira,A.L., e Sa-Correia,I. (2006). The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *34*, D446-D451.

- 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), pp. 241-303.
- Tuller,G., Nemec,T., Hrastnik,C., e Daum,G. (1999). Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeast* 15, 1555-1564.
- Vachova,L. e Palkova,Z. (2007). Caspases in yeast apoptosis-like death: facts and artefacts. *FEMS Yeast Res.* 7, 12-21.
- Valachovic,M., Bareither,B.M., Shah Alam,B.M., Eckstein,J., Barbuch,R., Balderes,D., Wilcox,L., Sturley,S.L., Dickson,R.C., e Bard,M. (2006). Cumulative mutations affecting sterol biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* result in synthetic lethality that is suppressed by alterations in sphingolipid profiles. *Genetics* 173, 1893-1908.
- Valencia-Burton,M., Oki,M., Johnson,J., Seier,T.A., Kamakaka,R., e Haber,J.E. (2006). Different mating-type-regulated genes affect the DNA repair defects of *Saccharomyces* RAD51, RAD52 and RAD55 mutants. *Genetics* 174, 41-55.
- Valerius,O., Kleinschmidt,M., Rachfall,N., Schulze,F., Lopez,M.S., Hoppert,M., Streckfuss-Bomeke,K., Fischer,C., e Braus,G.H. (2007). The *Saccharomyces* homolog of mammalian RACK1, Cpc2/Asc1p, is required for FLO11-dependent adhesive growth and dimorphism. *Mol. Cell Proteomics.* 6, 1968-1979.
- Vallee,B. e Riezman,H. (2005). Lip1p: a novel subunit of acyl-CoA ceramide synthase. *EMBO J.* 24, 730-741.
- van den Hazel,H.B., Pichler,H., do Valle Matta,M.A., Leitner,E., Goffeau,A., e Daum,G. (1999). PDR16 and PDR17, two homologous genes of *Saccharomyces cerevisiae*, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs. *J. Biol. Chem.* 274, 1934-1941.
- van der Rest,M.E., Kamminga,A.H., Nakano,A., Anraku,Y., Poolman,B., e Konings,W.N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59, 304-322.
- Veen,M. e Lang,C. (2004). Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 635-646.
- Veen,M. e Lang,C. (2005). Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1178-1181.
- Vignols,F., Brehelin,C., Surdin-Kerjan,Y., Thomas,D., e Meyer,Y. (2005). A yeast two-hybrid knockout strain to explore thioredoxin-interacting proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 16729-16734.
- Vik,A. e Rine,J. (2001a). Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 21, 6395-6405.
- Vik,A. e Rine,J. (2001b). Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 21, 6395-6405.
- Viladevall,L., Serrano,R., Ruiz,A., Domenech,G., Giraldo,J., Barcelo,A., e Arino,J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 43614-43624.
- Vivancos,A.P., Jara,M., Zuin,A., Sanso,M., e Hidalgo,E. (2006a). Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, different response pathways. *Mol. Genet. Genomics* 276, 495-502.
- Vivancos,A.P., Jara,M., Zuin,A., Sanso,M., e Hidalgo,E. (2006b). Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, different response pathways. *Mol. Genet. Genomics* 276, 495-502.
- Wachtler,V. e Balasubramanian,M.K. (2006). Yeast lipid rafts?--an emerging view. *Trends Cell Biol.* 16, 1-4.
- Walker-Caprioglio,H.M., Casey,W.M., e Parks,L.W. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2853-2857.
- Walther,T.C., Aguilar,P.S., Frohlich,F., Chu,F., Moreira,K., Burlingame,A.L., e Walter,P. (2007). Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *EMBO J.* 26, 4946-4955.
- Walther,T.C., Brickner,J.H., Aguilar,P.S., Bernales,S., Pantoja,C., e Walter,P. (2006). Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998-1003.

- Wang,P., Zhang,Y., Li,H., Chieu,H.K., Munn,A.L., e Yang,H. (2005). AAA ATPases regulate membrane association of yeast oxysterol binding proteins and sterol metabolism. *EMBO J.* *24*, 2989-2999.
- Ward,M.P., Gimeno,C.J., Fink,G.R., e Garrett,S. (1995). SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol. Cell Biol.* *15*, 6854-6863.
- Welihinda,A.A., Beavis,A.D., e Trumbly,R.J. (1994). Mutations in LIS1 (ERG6) gene confer increased sodium and lithium uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* *1193*, 107-117.
- Willson,R.L. (1979). Oxygen Free Radicals and Tissue Damage. In Ciba Found. Symp. n°65, F.W.Fitzsimmons, ed. Amsterdam: Excerta Medica), pp. 19-42.
- Winzeler,E.A., Shoemaker,D.D., Astromoff,A., Liang,H., Anderson,K., Andre,B., Bangham,R., Benito,R., Boeke,J.D., Bussey,H., Chu,A.M., Connelly,C., Davis,K., Dietrich,F., Dow,S.W., El Bakkoury,M., Foury,F., Friend,S.H., Gentalen,E., Giaever,G., Hegemann,J.H., Jones,T., Laub,M., Liao,H., Liebundguth,N., Lockhart,D.J., Lucau-Danila,A., Lussier,M., M'Rabet,N., Menard,P., Mittmann,M., Pai,C., Rebischung,C., Revuelta,J.L., Riles,L., Roberts,C.J., Ross-MacDonald,P., Scherens,B., Snyder,M., Sookhai-Mahadeo,S., Storms,R.K., Veronneau,S., Voet,M., Volckaert,G., Ward,T.R., Wysocki,R., Yen,G.S., Yu,K., Zimmermann,K., Philippsen,P., Johnston,M., e Davis,R.W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* *285*, 901-906.
- Wu,C.C. e Yates,J.R., III (2003). The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat. Biotechnol.* *21*, 262-267.
- Yan,J.X., Wait,R., Berkelman,T., Harry,R.A., Westbrook,J.A., Wheeler,C.H., e Dunn,M.J. (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* *21*, 3666-3672.
- Yang,B., Oo,T.N., e Rizzo,V. (2006). Lipid rafts mediate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prosurvival effects in cultured endothelial cells. *FASEB J.* *20*, 1501-1503.
- You,K.M., Rosenfield,C.L., e Knipple,D.C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 1499-1503.
- Zahedi,R.P., Sickmann,A., Boehm,A.M., Winkler,C., Zufall,N., Schonfisch,B., Guiard,B., Pfanner,N., e Meisinger,C. (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1436-1450.
- Zeller,C.E., Parnell,S.C., e Dohlman,H.G. (2007). The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J. Biol. Chem.* *282*, 25168-25176.
- Zhang,D.X. e Gutterman,D.D. (2007). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* *292*, H2023-H2031.
- Zhang,X., Lester,R.L., e Dickson,R.C. (2004). Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J. Biol. Chem.* *279*, 22030-22038.
- Zinser,E., Sperka-Gottlieb,C.D., Fasch,E.V., Kohlwein,S.D., Paltauf,F., e Daum,G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *173*, 2026-2034.

## 9 Anexos

### Quadro 37 – Agrupamento dos genes alterados aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por factor de transcrição através de análise *in silico*.

Os genes cuja expressão foi alterada com adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram agrupados *in silico* em função dos factores de transcrição responsáveis pela regulação dos mesmos (Teixeira *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2008).

<b>Factor de Transcrição</b>	<b>%</b>	<b>ORF/Genes</b>
<b>Msn4p</b>	43, 8 %	<i>GPX2; TRR1; TRX2; SOD2; CCP1; AHP1; TSA1;</i>
<b>Yap1p</b>	43, 8 %	<i>GPX2; TRR1; TRX2; SOD1; CCP1; AHP1; TSA1;</i>
<b>Msn2p</b>	43, 8 %	<i>GPX2; TRR1; TRX2; SOD2; CCP1; AHP1; TSA1;</i>
<b>Skn7p</b>	37, 5 %	<i>GPX2; TRR1; TRX2; CCP1; AHP1; TSA1;</i>
<b>Fhl1p</b>	31, 2 %	<i>CIT2; TRR1; SOD2; SOD1; TSA1;</i>
<b>Yap7p</b>	25, 0 %	<i>TRX2; SOD2; SOD1; AHP1;</i>
<b>Cin5p</b>	25, 0 %	<i>TRX2; HXT12; CCP1; AHP1;</i>
<b>Hap1p</b>	18, 8 %	<i>SOD1; AHP1; TSA1;</i>
<b>Cad1p</b>	18, 8 %	<i>PRX1; SOD2; AHP1;</i>
<b>Ino4p</b>	18, 8 %	<i>SOD1; AHP1; ACC1;</i>
<b>Put3p</b>	18, 8 %	<i>PRX1; AHP1; TSA1;</i>
<b>Phd1p</b>	18, 8 %	<i>HXT12; AHP1; ACC1;</i>
<b>Yap5p</b>	12, 5 %	<i>CIT2; TSA1;</i>
<b>Nrg1p</b>	12, 5 %	<i>HXT12; CCP1;</i>
<b>Ino2p</b>	12, 5 %	<i>SOD1; ACC1;</i>
<b>Rgt1p</b>	12, 5 %	<i>CIT2; AHP1;</i>
<b>Rpn4p</b>	12, 5 %	<i>CIT2; TRX2;</i>
<b>Mcm1p</b>	6, 2 %	<i>CCP1;</i>
<b>Hsf1p</b>	6, 2 %	<i>AHP1;</i>
<b>Pdr1p</b>	6, 2 %	<i>AHP1;</i>
<b>Mss11p</b>	6, 2 %	<i>CBF5;</i>
<b>Zap1p</b>	6, 2 %	<i>TSA1;</i>
<b>Tos8p</b>	6, 2 %	<i>ACC1;</i>
<b>Flo8p</b>	6, 2 %	<i>ACC1;</i>
<b>Ste12p</b>	6, 2 %	<i>ACC1;</i>
<b>Sok2p</b>	6, 2 %	<i>ACC1;</i>
<b>Hcm1p</b>	6, 2 %	<i>ACC1;</i>
<b>Fkh2p</b>	6, 2 %	<i>TSA1;</i>
<b>Leu3p</b>	6, 2 %	<i>UBX4;</i>
<b>Gal4p</b>	6, 2 %	<i>ACC1;</i>
<b>Mbp1p</b>	6, 2 %	<i>TSA1;</i>
<b>Yap6p</b>	6, 2 %	<i>HXT12;</i>
<b>Hap4p</b>	6, 2 %	<i>GPX2;</i>
<b>Hap5p</b>	6, 2 %	<i>GPX2;</i>

<b>Hap3p</b>	6, 2 %	GPX2;
<b>Hap2p</b>	6, 2 %	GPX2;
<b>Ume6p</b>	6, 2 %	PRX1;
<b>Crz1p</b>	6, 2 %	GPX2;
<b>Rtg3p</b>	6, 2 %	CIT2;
<b>Upc2p</b>	6, 2 %	CIT2;
<b>Xbp1p</b>	6, 2 %	HXT12;
<b>Cup2p</b>	6, 2 %	SOD1;
<b>Rim101p</b>	6, 2 %	HXT12;
<b>Mig1p</b>	6, 2 %	HXT12;
<b>Tec1p</b>	6, 2 %	CIT2;
<b>Aft2p</b>	6, 2 %	SOD2;
<b>Gcn4p</b>	6, 2 %	SOD1;

**Quadro 38 – Agrupamento dos genes alterados aos 60 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por factor de transcrição através de análise *in silico*.**

Os genes cuja expressão foi alterada com adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram agrupados *in silico* em função dos factores de transcrição responsáveis pela regulação dos mesmos (Teixeira *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2008).

<b>Factor de Transcrição</b>	<b>%</b>	<b>ORF/Genes</b>
<b>Skn7p</b>	20,0 %	GPX2; TRR1; TRX2; CCP1; YLR294c; ATP14; EXG1; YAP1; TSA1; DDR48; SCW10;
<b>Fhl1p</b>	18,2 %	TRR1; RPS27b; RNR2; RPS21a; SHM2; RPS28b; EXG1; RPS25b; TSA1; RPS1b;
<b>Msn4p</b>	16,4 %	GPX2; TRR1; BTN2; TRX2; CCP1; YAP1; TSA1; COX14; DDR48;
<b>Msn2p</b>	16,4 %	GPX2; TRR1; BTN2; TRX2; SSC1; CCP1; YAP1; TSA1; DDR48;
<b>Rap1p</b>	14,5 %	MET6; RPS27b; RNR2; RPS21a; RPS28b; RPS25b; ECM19; RPS1b;
<b>Yap1p</b>	12,7 %	GPX2; TRR1; TRX2; CCP1; YAP1; TSA1; DDR48;
<b>Fkh2p</b>	12,7 %	Hhf1; HHT1; CPR6; EXG1; TSA1; RPS1b; YPL142c;
<b>Ste12p</b>	10,9 %	URA2; CPR6; EXG1; YMR074c; DDR48; SCW10;
<b>Sok2p</b>	10,9 %	RNR2; ATP14; EXG1; GLO1; DDR48; SCW10;
<b>Ino4p</b>	9,1 %	YCL004w; MET6; ACS2; SUR4; SAP30;
<b>Ifh1p</b>	9,1 %	RPS27b; RPS21a; RPS28b; RPS25b; RPS1b;
<b>Cin5p</b>	9,1 %	TRX2; CCP1; SHM2; DDR48; LIP1;
<b>Sfp1p</b>	9,1 %	RPS27b; RPS21a; RPS28b; RPS25b; RPS1b;
<b>Cbf1p</b>	7,3 %	MET6; RPS21a; DRS1; SKY1;
<b>Aft1p</b>	7,3 %	PPA1; YHR039c-a; YLR137w; COX14;
<b>Phd1p</b>	7,3 %	MET6; YLR137w; RPS1b; SCW10;
<b>Yap5p</b>	7,3 %	SHM2; GLO1; TSA1; RPS1b;
<b>Mbp1p</b>	7,3 %	EXG1; GLO1; TSA1; SCW10;
<b>Yap6p</b>	7,3 %	SHM2; YLR294c; ATP14; DDR48;

---

<b>Put3p</b>	7,3 %	<i>PRX1; YLR137w; ACS2; TSA1;</i>
<b>Abf1p</b>	7,3 %	<i>YCL004w; MLC1; RPS28b; SKY1;</i>
<b>Hap2p</b>	5,5 %	<i>GPX2; YLR294c; ATP14;</i>
<b>Swi4p</b>	5,5 %	<i>ACS2; EXG1; SCW10;</i>
<b>Hap1p</b>	5,5 %	<i>ACS2; YAP1; TSA1;</i>
<b>Reb1p</b>	5,5 %	<i>PPA1; YHR039c-a; COX14;</i>
<b>Tec1p</b>	5,5 %	<i>URA2; DDR48; SCW10;</i>
<b>Hsf1p</b>	5,5 %	<i>BTN2; SSC1; CPR6;</i>
<b>Hap5p</b>	5,5 %	<i>GPX2; YLR294c; ATP14;</i>
<b>Mcm1p</b>	5,5 %	<i>PAM17; CCP1; SCW10;</i>
<b>Flo8p</b>	5,5 %	<i>RNR2; ACS2; EXG1;</i>
<b>Hap4p</b>	5,5 %	<i>GPX2; YLR294c; ATP14;</i>
<b>Hap3p</b>	5,5 %	<i>GPX2; YLR294c; ATP14;</i>
<b>Rpn4p</b>	5,5 %	<i>BTN2; TRX2; YAP1;</i>
<b>Leu3p</b>	5,5 %	<i>PPA1; URA2; SHM2;</i>
<b>Gcn4p</b>	3,6 %	<i>URA2; DRS1;</i>
<b>Sko1p</b>	3,6 %	<i>DRS1; DDR48;</i>
<b>Smp1p</b>	3,6 %	<i>EXG1; ECM19;</i>
<b>Rim101p</b>	3,6 %	<i>CAF4; DDR48;</i>
<b>Swi5p</b>	3,6 %	<i>EXG1; DDR48;</i>
<b>Ace2p</b>	3,6 %	<i>GLO1; YAP1;</i>
<b>Ash1p</b>	3,6 %	<i>EXG1; SCW10;</i>
<b>Mga1p</b>	3,6 %	<i>CDC14; EXG1;</i>
<b>Bas1p</b>	3,6 %	<i>MET6; SHM2;</i>
<b>Cad1p</b>	3,6 %	<i>PRX1; SHM2;</i>
<b>Xbp1p</b>	3,6 %	<i>DDR48; SCW10;</i>
<b>Fkh1p</b>	3,6 %	<i>GND1; EXG1;</i>
<b>Hir2p</b>	3,6 %	<i>HHF1; HHT1;</i>
<b>Rds2p</b>	1,8 %	<i>ACS2;</i>
<b>Swi6p</b>	1,8 %	<i>SCW10;</i>
<b>Gcr2p</b>	1,8 %	<i>RPS28b;</i>
<b>Zap1p</b>	1,8 %	<i>TSA1;</i>
<b>Spt23p</b>	1,8 %	<i>SUR4;</i>
<b>Mga2p</b>	1,8 %	<i>SUR4;</i>
<b>Azf1p</b>	1,8 %	<i>YAP1;</i>
<b>Stb5p</b>	1,8 %	<i>YAP1;</i>
<b>Rlm1p</b>	1,8 %	<i>EXG1;</i>
<b>Dot6p</b>	1,8 %	<i>COX14;</i>
<b>Yox1p</b>	1,8 %	<i>GND1;</i>
<b>Met32p</b>	1,8 %	<i>MET6;</i>

---

<b>Mot3p</b>	1,8 %	<i>BTN2</i> ;
<b>Rtg3p</b>	1,8 %	<i>BTN2</i> ;
<b>Met31p</b>	1,8 %	<i>MET6</i> ;
<b>Met4p</b>	1,8 %	<i>MET6</i> ;
<b>Ume6p</b>	1,8 %	<i>PRX1</i> ;
<b>Crz1p</b>	1,8 %	<i>GPX2</i> ;
<b>Yap7p</b>	1,8 %	<i>TRX2</i> ;
<b>Gat1p</b>	1,8 %	<i>GND1</i> ;
<b>Aft2p</b>	1,8 %	<i>YLR137w</i> ;
<b>Ino2p</b>	1,8 %	<i>ACS2</i> ;
<b>Nrg1p</b>	1,8 %	<i>CCP1</i> ;
<b>Tye7p</b>	1,8 %	<i>RPS21a</i> ;
<b>Rfx1p</b>	1,8 %	<i>RNR2</i> ;
<b>Rph1p</b>	1,8 %	<i>SSC1</i> ;
<b>Gln3p</b>	1,8 %	<i>ACS2</i> ;

**Quadro 39 – Agrupamento dos genes alterados aos 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por factor de transcrição através de análise *in silico*.**

Os genes cuja expressão foi alterada com adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram agrupados *in silico* em função dos factores de transcrição responsáveis pela regulação dos mesmos (Teixeira *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2008).

<b>Factor de Transcrição</b>	<b>%</b>	<b>ORF/Genes</b>
<b>Cin5p</b>	21,3 %	<i>HSP26 ;HSP31 ;IES6 ;HSP12 ;LEU1 ;TRX2 ;SOL4 ;GTT1 ;CCP1 ;AHP1 ;FRE1 ;MSC1 ;YML131w ;ALD3 ;DDR48 ;YMR173w-a ;YMR196w ;FAA4 ;FIT2 ;</i>
<b>Fhl1p</b>	20,2 %	<i>TPS1 ;GLK1 ;YDL124w ;TRR1 ;IES6 ;PRB1 ;SOD2 ;RNR2 ;PRY1 ;ILV3 ;SOD1 ;APE2 ;TFS1 ;REH1 ;TSA1 ;FET3 ;FAA4 ;FLC1 ;</i>
<b>Cad1p</b>	20,2 %	<i>PRX1 ;HSP26 ;HSP31 ;IES6 ;NUG1 ;HSP12 ;SOL4 ;SOD2 ;YJR096w ;AHP1 ;TFS1 ;FRE1 ;MSC1 ;PGM2 ;ALD3 ;YMR196w ;GAD1 ;GOR1 ;</i>
<b>Sok2p</b>	19,1 %	<i>HSP26 ;NPL4 ;IES6 ;PRB1 ;SIT1 ;HOR2 ;HSP12 ;HKK1 ;HXT4 ;GTT1 ;RNR2 ;PRY1 ;YKR075c ;ECM4 ;YML131w ;DDR48 ;YGP1 ;</i>
<b>Msn4p</b>	18,0 %	<i>HSP26 ;GPX2 ;TRR1 ;TSA2 ;OLE1 ;TRX2 ;SOD2 ;CCP1 ;AHP1 ;YAP1 ;TSA1 ;YML131w ;DDR48 ;YMR173w-a ;YGP1 ;FIT2 ;</i>
<b>Skn7p</b>	18,0 %	<i>GPX2 ;TRR1 ;TSA2 ;IES6 ;LSB3 ;OLE1 ;TRX2 ;PRY1 ;CCP1 ;YKR075c ;AHP1 ;FRE1 ;YAP1 ;TSA1 ;DDR48 ;YMR173w-a ;</i>
<b>Rap1p</b>	15,7 %	<i>PIM1 ;GLK1 ;IES6 ;HSP12 ;RNR2 ;PRY1 ;YKL151c ;APE2 ;UBI4 ;FRE1 ;REH1 ;GAD1 ;FIT2 ;FLC1 ;</i>
<b>Msn2p</b>	15,7 %	<i>GPX2 ;TRR1 ;TSA2 ;HSP12 ;TRX2 ;SOD2 ;CCP1 ;AHP1 ;FRE1 ;YAP1 ;TSA1 ;DDR48 ;YMR173w-a ;YGP1 ;</i>
<b>Yap1p</b>	15,7 %	<i>GPX2 ;TRR1 ;HSP31 ;IES6 ;TRX2 ;SOD1 ;CCP1 ;AHP1 ;YAP1 ;TSA1 ;YML131w ;DDR48 ;YMR173w-a ;YGP1 ;</i>
<b>Ste12p</b>	14,6 %	<i>HSP31 ;HSP12 ;HKK1 ;GTT1 ;PRY1 ;ELO1 ;ECM4 ;KAP95 ;DDR48 ;FAA4 ;YGP1 ;YNL208w ;FLC1 ;</i>
<b>Tec1p</b>	14,6 %	<i>CDC48 ;HSP12 ;HKK1 ;HXT4 ;ELO1 ;APE2 ;KAP95 ;DDR48 ;FAA4 ;YGP1 ;YNL208w ;FIT2 ;FLC1 ;</i>
<b>Yap5p</b>	14,6 %	<i>HSP26 ;YCL033c ;HSP31 ;HSP12 ;SOL4 ;GTT1 ;ILV3 ;TSA1 ;DAK1 ;MSC1 ;ALD3 ;YMR196w ;SFB2 ;</i>
<b>Yap6p</b>	14,6 %	<i>HSP26 ;HSP31 ;IES6 ;HSP12 ;SOL4 ;HXT4 ;TFS1 ;MSC1 ;YML131w ;ALD3 ;DDR48 ;YMR173w-a ;YMR196w ;</i>
<b>Adr1p</b>	14,6 %	<i>ETR1 ;YBR056w ;TPS1 ;ARA1 ;HKK1 ;OLE1 ;STF2 ;SOL4 ;YKR075c ;TFS1 ;PGM2 ;ALD3 ;YMR196w ;</i>
<b>Phd1p</b>	12,4 %	<i>YDL124w ;IES6 ;PRB1 ;SIT1 ;HOR2 ;PRY1 ;MET14 ;UBI4 ;AHP1 ;FRE1 ;YML131w ;</i>
<b>Put3p</b>	11,2 %	<i>PRX1 ;PRB1 ;SIT1 ;LSB3 ;OLE1 ;ARN2 ;AHP1 ;FRE1 ;TSA1 ;FIT2 ;</i>
<b>Aft1p</b>	10,1 %	<i>EDE1 ;PRB1 ;SIT1 ;ARN2 ;ELO1 ;RPT1 ;FRE1 ;FET3 ;FIT2 ;</i>



---

<b>Ino4p</b>	10,1 %	<i>CDC48 ;HSP12 ;HXK1 ;GTT1 ;SOD1 ;AHP1 ;DPH5 ;YML131w ;GSP2 ;</i>
<b>Yap7p</b>	10,1 %	<i>YDL124w ;RTN2 ;HSP31 ;TRX2 ;SOD2 ;SOD1 ;APE2 ;AHP1 ;YML131w ;</i>
<b>Sko1p</b>	9,0 %	<i>NUG1 ;OLE1 ;HXT4 ;LAC1 ;DDR48 ;YMR173w-a ;SFB2 ;BRX1 ;</i>
<b>Aft2p</b>	9,0 %	<i>PRB1 ;LSB3 ;OLE1 ;SOD2 ;YJL068c ;PRY1 ;FRE1 ;FET3 ;</i>
<b>Stb5p</b>	7,9 %	<i>GLK1 ;IES6 ;PRB1 ;ELO1 ;YAP1 ;GOR1 ;GCY1 ;</i>
<b>Swi4p</b>	7,9 %	<i>CDC48 ;TSA2 ;HSP12 ;PRY1 ;ELO1 ;LAC1 ;FLC1 ;</i>
<b>Hap1p</b>	7,9 %	<i>OLE1 ;SOL4 ;SOD1 ;AHP1 ;FRE1 ;YAP1 ;TSA1 ;</i>
<b>Pdr1p</b>	7,9 %	<i>HSP31 ;IES6 ;HXK1 ;STF2 ;LAC1 ;AHP1 ;YML131w ;</i>
<b>Mcm1p</b>	6,7 %	<i>IES6 ;HSP12 ;PRY1 ;ELO1 ;CCP1 ;YGP1 ;</i>
<b>Mbp1p</b>	6,7 %	<i>PIM1 ;ELO1 ;LAC1 ;YKL151c ;TSA1 ;GOR1 ;</i>
<b>Rpn4p</b>	6,7 %	<i>PIM1 ;TRX2 ;RPT1 ;MIA40 ;UBI4 ;YAP1 ;</i>
<b>Rgt1p</b>	5,6 %	<i>HOR2 ;HXT4 ;YKR075c ;ECM4 ;AHP1 ;</i>
<b>Ash1p</b>	5,6 %	<i>CDC48 ;FMP52 ;ELO1 ;FET3 ;FIT2 ;</i>
<b>Nrg1p</b>	5,6 %	<i>IES6 ;ELO1 ;CCP1 ;YKR075c ;YML131w ;</i>
<b>Fkh2p</b>	5,6 %	<i>OLE1 ;ELO1 ;UBI4 ;TSA1 ;PGM2 ;</i>
<b>Gcn4p</b>	5,6 %	<i>IES6 ;ILV3 ;SOD1 ;YMR196w ;GAD1 ;</i>
<b>Cbf1p</b>	5,6 %	<i>IES6 ;OLE1 ;LAC1 ;YMR196w ;FLC1 ;</i>
<b>Rim101p</b>	5,6 %	<i>HSP26 ;PRB1 ;GTT1 ;DDR48 ;YMR173w-a ;</i>
<b>Dal82p</b>	5,6 %	<i>YCL033c ;YDL124w ;ARN2 ;GTT1 ;BRX1 ;</i>
<b>Hsf1p</b>	5,6 %	<i>HSP26 ;HSP12 ;UBI4 ;AHP1 ;KAP95 ;</i>
<b>Mga2p</b>	4,5 %	<i>OLE1 ;ELO1 ;LAC1 ;FAA4 ;</i>
<b>Pdr3p</b>	4,5 %	<i>GLK1 ;LAC1 ;FAA4 ;YGP1 ;</i>
<b>Abf1p</b>	4,5 %	<i>LAC1 ;MIA40 ;SET3 ;BRX1 ;</i>
<b>Spt23p</b>	4,5 %	<i>OLE1 ;ELO1 ;LAC1 ;FAA4 ;</i>
<b>Leu3p</b>	4,5 %	<i>FMP52 ;MET14 ;FET3 ;FIT2 ;</i>
<b>Yox1p</b>	3,4 %	<i>YBR056w ;YDL124w ;SOL4 ;</i>
<b>Mss11p</b>	3,4 %	<i>NUG1 ;OLE1 ;LAC1 ;</i>
<b>Rph1p</b>	3,4 %	<i>TPS1 ;PRB1 ;YJL068c ;</i>
<b>Swi5p</b>	3,4 %	<i>YML131w ;DDR48 ;YMR173w-a ;</i>
<b>Tos8p</b>	2,2 %	<i>YML131w ;BRX1 ;</i>
<b>Mal33p</b>	2,2 %	<i>HXT4 ;YJL068c ;</i>
<b>Swi6p</b>	2,2 %	<i>GTT1 ;ELO1 ;</i>
<b>Ace2p</b>	2,2 %	<i>YKL151c ;YAP1 ;</i>
<b>Ume6p</b>	2,2 %	<i>PRX1 ;UBI4 ;</i>
<b>Xbp1p</b>	2,2 %	<i>DDR48 ;YMR173w-a ;</i>
<b>Ixr1p</b>	2,2 %	<i>YKR075c ;ECM4 ;</i>
<b>Tye7p</b>	2,2 %	<i>PIM1 ;YMR196w ;</i>
<b>Dot6p</b>	2,2 %	<i>LAC1 ;FIT2 ;</i>
<b>Gcr2p</b>	2,2 %	<i>IES6 ;ELO1 ;</i>
<b>Reb1p</b>	2,2 %	<i>NPL4 ;GCY1 ;</i>

---

<b>Rox1p</b>	2,2 %	<i>IES6 ;LAC1 ;</i>
<b>Flo8p</b>	2,2 %	<i>RNR2 ;FET3 ;</i>
<b>Crz1p</b>	2,2 %	<i>TPS1 ;GPX2 ;</i>
<b>Gcr1p</b>	2,2 %	<i>GLK1 ;HXT4 ;</i>
<b>Dal81p</b>	2,2 %	<i>IES6 ;SIT1 ;</i>
<b>Cha4p</b>	1,1 %	<i>LAC1 ;</i>
<b>Fkh1p</b>	1,1 %	<i>APE2 ;</i>
<b>Hcm1p</b>	1,1 %	<i>GAD1 ;</i>
<b>Azf1p</b>	1,1 %	<i>YAP1 ;</i>
<b>Zap1p</b>	1,1 %	<i>TSA1 ;</i>
<b>Met4p</b>	1,1 %	<i>MET14 ;</i>
<b>Ecm22p</b>	1,1 %	<i>YGP1 ;</i>
<b>Gal4p</b>	1,1 %	<i>GCY1 ;</i>
<b>Sum1p</b>	1,1 %	<i>FRE1 ;</i>
<b>Mac1p</b>	1,1 %	<i>FRE1 ;</i>
<b>Mig1p</b>	1,1 %	<i>HXT4 ;</i>
<b>Hap2p</b>	1,1 %	<i>GPX2 ;</i>
<b>Stp1p</b>	1,1 %	<i>IES6 ;</i>
<b>Mot3p</b>	1,1 %	<i>PRB1 ;</i>
<b>Bas1p</b>	1,1 %	<i>IES6 ;</i>
<b>Hap3p</b>	1,1 %	<i>GPX2 ;</i>
<b>Hap5p</b>	1,1 %	<i>GPX2 ;</i>
<b>Hap4p</b>	1,1 %	<i>GPX2 ;</i>
<b>Rds2p</b>	1,1 %	<i>PRB1 ;</i>
<b>Thi2p</b>	1,1 %	<i>ARN2 ;</i>
<b>Gat3p</b>	1,1 %	<i>MET14 ;</i>
<b>Met28p</b>	1,1 %	<i>MET14 ;</i>
<b>Ino2p</b>	1,1 %	<i>SOD1 ;</i>
<b>Cup2p</b>	1,1 %	<i>SOD1 ;</i>
<b>Rfx1p</b>	1,1 %	<i>RNR2 ;</i>
<b>Sfp1p</b>	1,1 %	<i>YJL068c ;</i>
<b>Met32p</b>	1,1 %	<i>MET14 ;</i>

**Quadro 40 – Agrupamento dos genes alterados aos 15 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por factor de transcrição através de análise *in silico*.**

Os genes cuja expressão foi alterada com adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram agrupados *in silico* em função dos factores de transcrição responsáveis pela regulação dos mesmos (Teixeira *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2008).

<b>Factor de Transcrição</b>	<b>%</b>	<b>ORF/Genes</b>
------------------------------	----------	------------------

<b>Sok2p</b>	17,0 %	HSP26; ECM33; NPL4; MCM7; AAD3; AAD4; EFT2; UTR2; PRB1; SIT1; PIC2; FCY2; ALD5; HSP12; HXK1; PNC1; ERG25; YGR130c; TIF4631; TIM13; PFK1; PUP2; FSH1; SFB3; YHR138c; RHR2; GTT1; BET4; MET3; YKL071w; YKL091c; FAS1; ECM4; SRP40; YPT6; FKS1; YLR460c; GLO1; YML131w; ADI1; YET2; DDR48; ICY1; PFK2; HOR7; PBI2; ZWF1; GRE2; HSP10; DCS2; SRL1; TKL1;
<b>Ino4p</b>	15,1 %	UMP1; SPB1; FEN1; TUP1; AAD4; EFT2; YDR391c; PUF6; EMI1; UTR2; SAH1; PIC2; FCY2; HSP12; HXK1; HNM1; PPT1; YGR130c; PRE9; PFK1; PUP2; FSH1; OYE2; RHR2; GUT2; GTT1; SOD1; EBP2; FAS1; ERG3; EMP70; YLR108c; AHP1; YEF3; SUR4; IKI3; YML002w; YML131w; ICY1; KRE33; KEX2; HOL1; HSP10; GSP2; YOR289w; SVS1;
<b>Cin5p</b>	14,1 %	FLR1; HSP26; PST2; PSP1; HSP31; ALD5; HSP12; LEU1; TRX2; SOL4; ARN1; FSH1; YHR138c; OYE2; GTT1; BET4; SRX1; CYT2; LAP4; LTV1; FAS1; CCP1; GPT2; MHT1; AHP1; FRE1; SYM1; MID2; YLR460c; ATR1; MSC1; YML131w; YMR090w; ALD3; DDR48; YMR173w-a; GCV2; ICY1; ZWF1; ARG1; GRE2; FIT2; GDB1;
<b>Cad1p</b>	13,1 %	PRX1; FLR1; HSP26; PHO89; YCF1; HPT1; HSP31; NUG1; HSP12; ADE5,7; SOL4; ARN1; SOD2; FSH1; GSH1; YJR096w; YKL071w; SRX1; CYT2; LAP4; MRS4; RPF2; YLR108c; AHP1; TFS1; FRE1; SYM1; ATR1; MSC1; YMR090w; PGM2; ALD3; GCV2; GAD1; YMR315w; YNL134c; GOR1; DCS2; OYE3; GDB1;
<b>Fhl1p</b>	12,8 %	YBR016w; OM14; GRX1; GLK1; TUP1; TSR1; YDL124w; LYS20; HEM1; TRR1; EFT2; SXM1; RIB3; PRB1; ALD5; PMA1; ERG1; PUP2; SOD2; YHR020w; NCP1; RHR2; GUT2; ILV3; SOD1; RSM7; PRS1; SRP40; YLR162w; TFS1; TMA10; ILV5; REH1; TSA1; ADI1; ICY1; HOR7; DSK2; YNL305c;
<b>Rap1p</b>	12,5 %	PHO5; MCM7; GLK1; TSR1; SSB1; YCF1; UTP4; YDR391c; RIB3; PUF6; UTR2; HSP12; YPI1; PMA1; ADE5,7; MRP13; NSR1; ERG1; PFK1; PUP2; RHR2; MTR4; RSM7; YKL151c; PRS1; FAS1; SRP40; UBI4; FRE1; TMA10; REH1; ADI1; GAD1; PRT1; FIT2; SVS1; OYE3; NEW1;
<b>Yap5p</b>	12,1 %	BUD14; CHS2; HSP26; PHO3; MCM7; AAD3; CLB3; PST2; MRH1; UTP4; HSP31; HSP12; ADE5,7; ERG1; HGH1; XKS1; SOL4; PUP2; YHR087w; GTT1; BET4; IKS1; ILV3; SYM1; YLR460c; GLO1; TSA1; MSC1; YMR090w; ALD3; GCV2; PBI2; YNR036c; ARG1; LEU9; RRP12; TKL1;
<b>Phd1p</b>	11,8 %	TOS1; MCM7; PHO89; TSR1; YDL124w; EFT2; HPT1; UTR2; PRB1; SIT1; ERG25; TIM13; ARN1; NCP1; BAT1; RHR2; MET3; MET14; LAP4; YKR011c; UBI4; YLR108c; AHP1; TIS11; FRE1; TMA10; ATR1; YML131w; ADI1; ICY1; HOR7; KRE33; ZWF1; ARG1; ISU2; NAN1;
<b>Tec1p</b>	11,5 %	BUD14; ECM33; PHO5; TOS1; MCM7; AAD3; LYS20; GCD6; EFT2; UTR2; FCY2; ALD5; HSP12; HXK1; PNC1; ERG25; TIF4631; URA2; RSM7; LAP4; YKR011c; MID2; FKS1; ERB1; DDR48; ICY1; HOR7; KRE33; YNL208w; ZWF1; ARG1; SRL1; FIT2; SVS1; OYE3;
<b>Ste12p</b>	10,8 %	BUD14; ECM33; TOS1; LYS20; GCD6; EFT2; HSP31; UTR2; PIC2; HSP12; HXK1; ERG25; MRP13; TIF4631; TIM13; GTT1; URA2; RSM7; LAP4; YKR011c; ECM4; MID2; FKS1; ERB1; YMR074c; DDR48; ICY1; PFK2; HOR7; KRE33; YNL208w; SRL1; SVS1;
<b>Yap7p</b>	10,8 %	FLR1; YDL124w; RTN2; AAD4; YCF1; HSP31; AAD6; TRX2; SOD2; FSH1; OYE2; FMP34; BET4; GSH1; SOD1; YKL071w; SRX1; CYT2; LAP4; MRS4; UBP11; YLR108c; AHP1; ECM38; YLR460c; ATR1; YML131w; YNL134c; ARG1; GRE2; DCS2; ISU2; OYE3;
<b>Msn2p</b>	10,2 %	GPX2; LYS20; MRH1; TRR1; TSA2; HSP12; PNC1; TRX2; SOD2; TPK1; YKL071w; SRX1; CYT2; MRS4; CCP1; GPT2; YLR108c; AHP1; MAS1; FRE1; GSY2; YAP1; TSA1; TSL1; ATR1; DDR48; YMR173w-a; YMR315w; YNL134c; YNL155w; ISU2;
<b>Yap1p</b>	10,2 %	FLR1; GPX2; LYS20; YCF1; TRR1; HSP31; YER067w; AAD6; ERG25; TRX2; OYE2; GSH1; SOD1; SRX1; CYT2; MRS4; CCP1; SRP40; YLR108c; AHP1; YLR460c; YAP1; TSA1; ATR1; YML131w; DDR48; YMR173w-a; YNL134c; GRE2; ISU2; OYE3;

<b>Msn4p</b>	9,8 %	<i>HSP26; GPX2; LYS20; TRR1; TSA2; TRX2; ARN1; SOD2; YHR087w; YKL071w; MRS4; CCP1; GPT2; YLR108c; AHP1; YAP1; TSA1; TSL1; ATR1; YML131w; DDR48; YMR173w-a; HOR7; YMR315w; YNL134c; ZWF1; DCS2; ISU2; FIT2; OYE3;</i>
<b>Adr1p</b>	9,5 %	<i>RIB5; TSR1; TRM1; YER067w; HXK1; PNC1; STF2; PPT1; SDA1; SOL4; YHR087w; GUT2; IKS1; YKL071w; SRX1; YLR149c; TFS1; GSY2; DCS1; ECM38; TMA10; TSL1; PGM2; ALD3; HOR7; NOP2; ZWF1; YNL305c; RPA135;</i>
<b>Yap6p</b>	9,5 %	<i>HSP26; ECM33; AAD3; CLB3; PUF6; HSP31; UTR2; HSP12; ERG1; SOL4; OYE2; BET4; TFS1; YLR294c; YLR460c; TSL1; ATR1; MSC1; YML131w; YMR090w; ALD3; DDR48; YMR173w-a; YMR315w; KRE33; YNL134c; ZWF1; ARG1; GRE2;</i>
<b>Pdr1p</b>	8,9 %	<i>FLR1; ECM33; NOP14; HSP31; HXK1; PMA1; PNC1; STF2; NSR1; SDA1; YHR087w; LAC1; YKL091c; FAS1; YLR108c; AHP1; FKS1; YML131w; ICY1; HOR7; YNL134c; ZWF1; GRE2; DCS2; SRL1; RPA135; GDB1;</i>
<b>Aft1p</b>	7,9 %	<i>AAD3; MRP10; CLB3; PRB1; SIT1; PRP43; HGH1; ARN1; NMD3; LAP4; MRS4; MET1; TIS11; FRE1; YPT6; YET2; GCV2; FMP42; DBP2; ZWF1; ALA1; FIT2; PUS1; TKL1;</i>
<b>Skn7p</b>	7,9 %	<i>ECM33; GPX2; LYS20; TRR1; TSA2; PMA1; TRX2; SRX1; CYT2; MRS4; CCP1; YLR108c; AHP1; FRE1; GSY2; YLR294c; YAP1; TSA1; DDR48; YMR173w-a; HOR7; PBI2; ARG1; ISU2;</i>
<b>Gcn4p</b>	7,9 %	<i>TOS1; RIB5; RSA4; GLT1; LYS20; TRM1; EMI1; ALD5; ADE5,7; YHR020w; URA2; ILV3; SOD1; LAP4; MRS4; ILV5; ATR1; GCV2; ICY1; GAD1; NCE103; ARG1; LEU9; DED1;</i>
<b>Sko1p</b>	7,9 %	<i>URA7; FLR1; MAK5; RSA4; TSR1; MAK21; NUG1; PIC2; KAP123; NOP7; NSR1; FSH1; DBP8; LAC1; RPF2; SRP40; DDR48; YMR173w-a; NOP2; BRX1; GRE2; DCS2; SRL1; RRP12;</i>
<b>Mcm1p</b>	7,5 %	<i>CHS2; ECM33; PHO3; MCM7; SPB1; PST2; MRH1; UTR2; KAP123; HSP12; PMA1; SFB3; CCP1; GPT2; MET1; ERG3; EMP70; YPT6; MID2; FKS1; MIC17; ARG1; SRL1;</i>
<b>Swi4p</b>	7,5 %	<i>ECM33; TOS1; SPB1; LYS20; YDR222w; TSA2; UTR2; HSP12; PMA1; PNC1; LAC1; LAP4; YKR011c; SRP40; ERG3; YLR162w; MID2; FKS1; TSL1; ICY1; SRL1; NAN1; SVS1;</i>
<b>Abf1p</b>	7,5 %	<i>URA7; ECM33; NGR1; NOP14; LYS4; EFT2; ADE5,7; PUP2; FMP34; LAC1; LTV1; EBP2; MIA40; SET3; RPF2; ERG3; NCE103; YNR036c; BRX1; DED1; NOP58; RRP12; MRPS16;</i>
<b>Yox1p</b>	7,2 %	<i>RBG1; MCM7; SPB1; FEN1; YDL124w; PPT1; PRE9; ERG1; TIM13; SOL4; BAT1; YKL071w; YKL091c; SRP40; IKI3; MIC17; FMP42; SSB2; YOL092w; ALA1; NEW1; TKL1;</i>
<b>Fkh2p</b>	7,2 %	<i>CHS2; ECM33; PHO3; PHO5; SPB1; MRH1; YDR222w; UTP4; UTR2; PIC2; YER067w; PMA1; NOP7; NSR1; UBI4; TSA1; ATR1; PGM2; ZWF1; HSP10; DCS2; SRL1;</i>
<b>Hap1p</b>	6,6 %	<i>YBR016w; LYS4; PIC2; ERG25; ERG1; SOL4; MES1; GUT2; GSH1; SOD1; FAS1; ERG3; YLR108c; AHP1; HMX1; FRE1; YAP1; TSA1; HOR7; YNL155w;</i>
<b>Put3p</b>	5,9 %	<i>PRX1; AAD3; PRB1; SIT1; MRP13; ERG1; ARN1; FMP34; MRS4; YLR108c; AHP1; TIS11; HMX1; FRE1; TSA1; ATR1; DBP2; FIT2;</i>
<b>Leu3p</b>	5,9 %	<i>LYS21; YCF1; FMP52; MXR1; PFK1; OYE2; URA2; MET3; MET14; URA1; MET1; HMX1; MIC17; UBX4; GCV2; MTQ1; LEU9; FIT2;</i>
<b>Tos8p</b>	4,9 %	<i>ECM33; OM14; AAD4; ARN1; NCP1; FMP34; MTR4; SPT10; YKL091c; YLR460c; YML131w; NOP2; BRX1; ISU2; TKL1;</i>
<b>Mbp1p</b>	4,9 %	<i>ECM33; GCD6; YDR222w; PRE1; PMA1; ERP5; LAC1; LAP4; YKL151c; FKS1; GLO1; TSA1; TSL1; GOR1; SRL1;</i>

<b>Hcm1p</b>	4,9 %	<i>RRP8; ARN1; YHR138c; TID3; HMX1; YLR460c; GAD1; DBP2; YNL134c; GRE2; ISU2; OYE3; BMS1; RPA135; TKL1;</i>
<b>Rpn4p</b>	4,9 %	<i>PMT1; NOP14; LYS20; PRE1; AAD6; YPI1; PRE9; TRX2; PUP2; MIA40; UBI4; RPN13; YAP1; DSK2; YNL155w;</i>
<b>Cbf1p</b>	4,9 %	<i>SAH1; ERG25; NCP1; SFB3; GSH1; MET3; LAC1; DPH2; YLR149c; PCD1; ICY1; NCE103; MTQ1; VPH1; OYE3;</i>
<b>Hsf1p</b>	4,9 %	<i>HSP26; HSP12; PMA1; PNC1; XKS1; FSH1; UBI4; YLR108c; AHP1; TMA10; TSL1; HOR7; MTQ1; YNL134c; HSP10;</i>
<b>Aft2p</b>	4,3 %	<i>ECM33; PHO89; AAD3; PRB1; YGR130c; SOD2; LAP4; MRS4; TIS11; HMX1; FRE1; ZWF1; ISU2;</i>
<b>Rtg3p</b>	4,3 %	<i>AAD3; LYS20; EFT2; KAP123; YKL071w; URA1; GSY2; DBP9; TMA10; HOR7; NCE103; YNL134c; RRP12;</i>
<b>Reb1p</b>	4,3 %	<i>NPL4; MRP10; CLB3; GCD11; PRP43; FAS1; MET1; YET2; GCV2; FMP42; GCY1; ALA1; TKL1;</i>
<b>Flo8p</b>	3,9 %	<i>MCM7; EFT2; UTR2; PRE1; PIC2; FCY2; ALD5; ERG25; TIM13; ARN1; FKS1; HOR7;</i>
<b>Rox1p</b>	3,9 %	<i>OM14; AAD3; CLB3; UTR2; ALD5; ADE5,7; LAC1; IMD4; YMR315w; NCE103; YNL134c; RPA135;</i>
<b>Swi6p</b>	3,9 %	<i>ECM33; UTR2; PRE1; GTT1; MTR4; TPK1; LAP4; URA1; YKR011c; FKS1; SRL1; SVS1;</i>
<b>Stb5p</b>	3,9 %	<i>GLK1; MRH1; HEM1; PRB1; YLR149c; YKE2; YAP1; YMR315w; ZWF1; GOR1; GCY1; TKL1;</i>
<b>Swi5p</b>	3,6 %	<i>ERG25; PUP2; YHR138c; DBP9; TSL1; YML131w; DDR48; YMR173w-a; HOR7; KEX2; ZWF1;</i>
<b>Mss11p</b>	3,6 %	<i>URA7; RSA4; AAD3; NUG1; NOP7; NSR1; ERG1; DBP8; LAC1; CBF5; DCS2;</i>
<b>Nrg1p</b>	3,3 %	<i>PHO89; AAD3; UTR2; YHR138c; CCP1; GPT2; YML131w; ICY1; HOR7; ISU2;</i>
<b>Ume6p</b>	3,0 %	<i>PRX1; RLI1; MES1; YHR138c; TID3; UBI4; YET2; ICY1; YOL092w;</i>
<b>Dal82p</b>	3,0 %	<i>YDL124w; CLB3; GLT1; GTT1; LAP4; SYM1; HOR7; DSK2; BRX1;</i>
<b>Rim101p</b>	2,6 %	<i>HSP26; AAD3; PRB1; ADE5,7; GTT1; ATR1; DDR48; YMR173w-a;</i>
<b>Ash1p</b>	2,6 %	<i>PHO89; AAD3; FMP52; DBP8; YKL071w; YMR315w; ZWF1; FIT2;</i>
<b>Ace2p</b>	2,6 %	<i>OM14; AAD6; PMA1; YKL151c; GLO1; YAP1; TSL1; ZWF1;</i>
<b>Dal81p</b>	2,3 %	<i>GLT1; LYS20; SIT1; LAP4; SRP40; ICY1; ARG1;</i>
<b>Gal4p</b>	2,3 %	<i>YBR016w; KAP104; NGR1; AAD3; CLB3; NOP7; GCY1;</i>
<b>Spt23p</b>	2,3 %	<i>URA7; VRG4; ERG1; LAC1; FAS1; ERG3; SUR4;</i>
<b>Mal33p</b>	2,3 %	<i>ECM33; OM14; AAD3; NCP1; RPN13; ZWF1; YNR036c;</i>
<b>Mga2p</b>	2,3 %	<i>URA7; VRG4; ERG1; LAC1; FAS1; ERG3; SUR4;</i>
<b>Pdr3p</b>	2,0 %	<i>PHO89; GLK1; LAC1; ICY1; HOR7; DED1;</i>
<b>Pho2p</b>	2,0 %	<i>AAD3; MRH1; ADE5,7; LAP4; NCE103; ZWF1;</i>
<b>Fkh1p</b>	2,0 %	<i>ECM33; UTP4; YPI1; FMP34; TSL1; NEW1;</i>

---

<b>Mga1p</b>	2,0 %	<i>MCM7; AAD3; ERG25; TIM13; ERG7; HOL1;</i>
<b>Ixr1p</b>	2,0 %	<i>FLR1; RSA4; PIC2; ECM4; GSY2; OYE3;</i>
<b>Gat1p</b>	2,0 %	<i>PSP1; OYE2; UBP11; YPT6; YNR036c; BMS1;</i>
<b>Stp1p</b>	1,6 %	<i>LYS20; YPT6; TSL1; ARG1; BMS1;</i>
<b>Met4p</b>	1,6 %	<i>ERG25; MRP13; GSH1; MET3; MET14;</i>
<b>Gln3p</b>	1,6 %	<i>GLT1; PMA1; LAP4; SRP40; ARG1;</i>
<b>Yhp1p</b>	1,6 %	<i>NRP1; ARN1; ERP5; YKE2; TKL1;</i>
<b>Dot6p</b>	1,6 %	<i>KAP104; ERP5; TPK1; LAC1; FIT2;</i>
<b>Hap5p</b>	1,6 %	<i>GPX2; EFT2; FAS1; YLR294c; ICY1;</i>
<b>Ino2p</b>	1,6 %	<i>UTR2; SAH1; PUP2; SOD1; FAS1;</i>
<b>Pho4p</b>	1,6 %	<i>PHO5; PHO89; GRX1; PUP2; BMS1;</i>
<b>Rds2p</b>	1,6 %	<i>MAK5; GLT1; PRB1; ERG3; ICY1;</i>
<b>Thi2p</b>	1,6 %	<i>PHO3; PHO5; EMI1; ARN1; OYE2;</i>
<b>Tye7p</b>	1,3 %	<i>IMD1; SSB1; NCP1; PUS1;</i>
<b>Xbp1p</b>	1,3 %	<i>AAD3; DDR48; YMR173w-a; NCE103;</i>
<b>Gcr2p</b>	1,3 %	<i>ERG25; PFK1; YPT6; PFK2;</i>
<b>Rph1p</b>	1,3 %	<i>AAD3; PRB1; TSL1; ZWF1;</i>
<b>Rtg1p</b>	1,3 %	<i>SPB1; YKL071w; UBP11; YPT6;</i>
<b>Rds1p</b>	1,3 %	<i>YBR016w; AAD3; ERG1; ZWF1;</i>
<b>Mig1p</b>	1,3 %	<i>YCF1; YPI1; PRT1; GDB1;</i>
<b>Bas1p</b>	1,3 %	<i>ADE5,7; ADE6; GSH1; GCV2;</i>
<b>Rlm1p</b>	1,3 %	<i>UTR2; MID2; FKS1; TSL1;</i>
<b>Met28p</b>	1,0 %	<i>ERG25; GSH1; MET14;</i>
<b>Mot3p</b>	1,0 %	<i>RRP8; PRB1; NCE103;</i>
<b>Arg81p</b>	1,0 %	<i>PHO5; OYE2; ARG1;</i>
<b>Ecm22p</b>	1,0 %	<i>MRP10; ERG3; SVS1;</i>
<b>Sum1p</b>	1,0 %	<i>KAP104; DID2; FRE1;</i>
<b>Ifh1p</b>	1,0 %	<i>YHR020w; YLR149c; ERB1;</i>
<b>Met32p</b>	1,0 %	<i>RBG1; MET3; MET14;</i>
<b>Hap2p</b>	1,0 %	<i>GPX2; GLT1; YLR294c;</i>
<b>Crz1p</b>	1,0 %	<i>GPX2; AAD3; CLB3;</i>
<b>Hap3p</b>	1,0 %	<i>GPX2; GLT1; YLR294c;</i>

---

---

<b>Cha4p</b>	1,0 %	<i>MRP13; LAC1; LTV1;</i>
<b>Hal9p</b>	0,7 %	<i>YLR460c; YNL134c;</i>
<b>Azf1p</b>	0,7 %	<i>YAP1; DBP2;</i>
<b>Rgt1p</b>	0,7 %	<i>ECM4; AHP1;</i>
<b>Uga3p</b>	0,7 %	<i>PPT1; ZWF1;</i>
<b>Zap1p</b>	0,7 %	<i>MRP13; TSA1;</i>
<b>Hap4p</b>	0,7 %	<i>GPX2; YLR294c;</i>
<b>Smp1p</b>	0,7 %	<i>TSR1; UTR2;</i>
<b>Ime4p</b>	0,7 %	<i>AAD3; BMS1;</i>
<b>Oaf1p</b>	0,7 %	<i>RBG1; NCP1;</i>
<b>Gat3p</b>	0,7 %	<i>CLB3; MET14;</i>
<b>Gzf3p</b>	0,7 %	<i>AAD3; ZWF1;</i>
<b>Aro80p</b>	0,7 %	<i>UTR2; YHR138c;</i>
<b>Rfx1p</b>	0,7 %	<i>SSB1; ERG3;</i>
<b>Ime1p</b>	0,3 %	<i>YLR460c;</i>
<b>Pip2p</b>	0,3 %	<i>RBG1;</i>
<b>Rme1p</b>	0,3 %	<i>IMD4;</i>
<b>Sfp1p</b>	0,3 %	<i>LEU9;</i>
<b>Mac1p</b>	0,3 %	<i>FRE1;</i>
<b>Yap3p</b>	0,3 %	<i>EFT1;</i>
<b>Mig2p</b>	0,3 %	<i>NOP4;</i>
<b>Sfl1p</b>	0,3 %	<i>FMP42;</i>
<b>Opi1p</b>	0,3 %	<i>FAS1;</i>
<b>Gcr1p</b>	0,3 %	<i>GLK1;</i>
<b>Arr1p</b>	0,3 %	<i>AAD3;</i>
<b>Rgm1p</b>	0,3 %	<i>CLB3;</i>
<b>Yrm1p</b>	0,3 %	<i>FLR1;</i>
<b>Cup2p</b>	0,3 %	<i>SOD1;</i>
<b>Yrr1p</b>	0,3 %	<i>FLR1;</i>
<b>Ppr1p</b>	0,3 %	<i>URA1;</i>
<b>Cup9p</b>	0,3 %	<i>UTR2;</i>
<b>Sip4p</b>	0,3 %	<i>UBP11;</i>

---

**Quadro 41 – Alterações decorrentes na expressão de vários genes aos 15min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*.**

Os dados dos *microarrays* apresentados relativamente à indução ou repressão de genes estão representados sobre a forma da média do log2 (da razão das medianas) de duas experiências independentes. As razões foram consideradas significativas quando log2 era igual ou superior a 1,0 ou -1,0.

<b>Gene</b>	<b>ORF</b>	<b>Expressão mRNA</b>
<i>FUN11</i>	<i>YAL036C</i>	-1,0
<i>BUD14</i>	<i>YAR014C</i>	-1,1
<i>IMD1</i>	<i>YAR073W</i>	-1,0
<i>URA7</i>	<i>YBL039C</i>	-2,1
<i>PRX1</i>	<i>YBL064C</i>	4,4
<i>FLR1</i>	<i>YBR008C</i>	3,6
	<i>YBR016W</i>	1,1
<i>KAP104</i>	<i>YBR017C</i>	-1,1
<i>CHS2</i>	<i>YBR038W</i>	-1,0
<i>HSP26</i>	<i>YBR072W</i>	2,0
<i>ECM33</i>	<i>YBR078W</i>	-1,4
<i>PHO3</i>	<i>YBR092C</i>	-2,2
<i>PHO5</i>	<i>YBR093C</i>	-1,2
<i>MAK5</i>	<i>YBR142W</i>	-1,0
<i>TOS1</i>	<i>YBR162C</i>	-1,4
<i>NPL4</i>	<i>YBR170C</i>	1,2
<i>UMP1</i>	<i>YBR173C</i>	1,2
<i>CDC47</i>	<i>YBR202W</i>	-1,2
<i>NGR1</i>	<i>YBR212W</i>	1,1
<i>OM14</i>	<i>YBR230C</i>	1,4
<i>GPX2</i>	<i>YBR244W</i>	4,8
<i>RIB5</i>	<i>YBR256C</i>	1,3
<i>PHO89</i>	<i>YBR296C</i>	-1,1
<i>HBN1</i>	<i>YCL027C-a</i>	5,8
<i>GRX1</i>	<i>YCL035C</i>	1,7
<i>GLK1</i>	<i>YCL040W</i>	1,1
<i>SPB1</i>	<i>YCL054W</i>	-1,4
<i>FEN1</i>	<i>YCR034W</i>	-1,3
<i>RSA4</i>	<i>YCR072C</i>	-1,2
<i>TUP1</i>	<i>YCR084C</i>	-1,3
<i>AAD3</i>	<i>YCR107W</i>	2,9
<i>NOP1</i>	<i>YDL014W</i>	1,7
<i>MRP10</i>	<i>YDL045W-A</i>	1,2
<i>TSR1</i>	<i>YDL060W</i>	-1,5
<i>PMT1</i>	<i>YDL095W</i>	-1,0
	<i>YDL124W</i>	1,6
<i>LYS21</i>	<i>YDL131W</i>	1,7
<i>NOP14</i>	<i>YDL148C</i>	-1,4
<i>CLB3</i>	<i>YDL155W</i>	1,7
<i>NRP1</i>	<i>YDL167C</i>	-1,1
<i>GLT1</i>	<i>YDL171C</i>	-2,6
<i>LYS20</i>	<i>YDL182W</i>	2,9
<i>RTN2</i>	<i>YDL204W</i>	1,6
<i>SSB1</i>	<i>YDL229W</i>	-1,5
<i>AAD4</i>	<i>YDL243C</i>	1,0
<i>PST2</i>	<i>YDR032C</i>	1,2



MRH1	YDR033W	-1,5
MAK21	YDR060W	-1,4
RRP8	YDR083W	-1,0
RLI1	YDR091C	-1,6
TRM1	YDR120C	-1,5
YCF1	YDR135C	1,7
SUP35	YDR172W	-1,2
GCD6	YDR211W	-1,0
	YDR222W	-1,2
HEM1	YDR232W	-1,2
LYS4	YDR234W	-1,8
UTP4	YDR324C	-1,2
TRR1	YDR353W	3,9
EFT2	YDR385W	-1,3
YDR391C	YDR391C	1,4
SXM1	YDR395W	-1,2
HPT1	YDR399W	-1,5
TSA2	YDR453C	6,4
RIB3	YDR487C	2,0
PUF6	YDR496C	-1,7
PSP1	YDR505C	-1,0
EMI1	YDR512C	1,9
GRX2	YDR513W	2,8
HSP31	YDR533C	3,2
UTR2	YEL040W	-1,1
PRB1	YEL060C	1,3
SIT1	YEL065W	1,5
FMP52	YER004W	1,2
NUG1	YER006W	-1,5
PRE1	YER012W	1,3
GCD11	YER025W	-1,2
MRX1	YER042W	1,1
SAH1	YER043C	-1,1
PIC2	YER053C	1,3
FCY2	YER056C	-1,6
YER067W	YER067W	2,4
ALD5	YER073W	-1,8
KAP123	YER110C	-1,6
HSP12	YFL014W	2,8
AAD6	YFL056C	3,3
YPI1	YFR003C	1,3
HXK1	YFR053C	1,3
PMA1	YGL008C	-1,9
LEU1	YGL009C	-3,3
PNC1	YGL037C	1,4
HNM1	YGL077C	-1,1
DBP3	YGL078C	-1,6
PRP43	YGL120C	-1,4
VRG4	YGL225W	-1,4
ADE5	YGL234W	-1,5
STF2	YGR008C	2,2
ERG25	YGR060W	-1,0
ADE6	YGR061C	-1,2
MRP13	YGR084C	1,0

<i>NOP7</i>	<i>YGR103W</i>	-1,2
<i>PPT1</i>	<i>YGR123C</i>	-1,1
	<i>YGR130C</i>	-1,3
<i>PRE9</i>	<i>YGR135W</i>	1,2
<i>NSR1</i>	<i>YGR159C</i>	-1,7
<i>TIF4631</i>	<i>YGR162W</i>	-1,4
<i>ERG1</i>	<i>YGR175C</i>	-2,2
<i>TIM13</i>	<i>YGR181W</i>	1,2
<i>HGH1</i>	<i>YGR187C</i>	-1,0
<i>XKS1</i>	<i>YGR194C</i>	1,0
<i>TRX2</i>	<i>YGR209C</i>	3,7
<i>PFK1</i>	<i>YGR240C</i>	-1,1
<i>SDA1</i>	<i>YGR245C</i>	-1,1
<i>SOL4</i>	<i>YGR248W</i>	2,5
<i>PUP2</i>	<i>YGR253C</i>	1,0
<i>MES1</i>	<i>YGR264C</i>	-1,2
<i>PRS3</i>	<i>YHL011C</i>	-1,3
<i>ARN1</i>	<i>YHL040C</i>	1,4
<i>SOD2</i>	<i>YHR008C</i>	3,6
	<i>YHR020W</i>	-1,0
<i>NCP1</i>	<i>YHR042W</i>	-1,1
<i>FSH1</i>	<i>YHR049W</i>	1,5
<i>CIC1</i>	<i>YHR052W</i>	-1,4
<i>ERG7</i>	<i>YHR072W</i>	-1,4
<i>RTC3</i>	<i>YHR087W</i>	2,3
<i>SFB3</i>	<i>YHR098C</i>	-1,1
<i>TRR2</i>	<i>YHR106W</i>	2,7
<i>ERP5</i>	<i>YHR110W</i>	1,1
	<i>YHR138C</i>	1,7
<i>DBP8</i>	<i>YHR169W</i>	-1,0
<i>NMD3</i>	<i>YHR170W</i>	-1,5
<i>OYE2</i>	<i>YHR179W</i>	1,4
<i>AIM46</i>	<i>YHR199C</i>	1,6
<i>BAT1</i>	<i>YHR208W</i>	-1,5
<i>PUR5</i>	<i>YHR216W</i>	-1,0
<i>RHR2</i>	<i>YIL053W</i>	-1,6
<i>TID3</i>	<i>YIL144W</i>	1,0
<i>GUT2</i>	<i>YIL155C</i>	1,3
<i>HYR1</i>	<i>YIR037W</i>	1,0
<i>GTT1</i>	<i>YIR038C</i>	1,2
<i>BET4</i>	<i>YJL031C</i>	1,1
<i>MTR4</i>	<i>YJL050W</i>	-1,2
<i>IKS1</i>	<i>YJL057C</i>	1,3
<i>GSH1</i>	<i>YJL101C</i>	1,8
<i>SPT10</i>	<i>YJL127C</i>	1,1
<i>URA2</i>	<i>YJL130C</i>	-1,2
<i>PKA1</i>	<i>YJL164C</i>	1,1
<i>MPP10</i>	<i>YJR002W</i>	-1,1
<i>MET3</i>	<i>YJR010W</i>	1,0
<i>ILV3</i>	<i>YJR016C</i>	-2,6
	<i>YJR096W</i>	1,8
<i>SOD1</i>	<i>YJR104C</i>	2,5
<i>RSM7</i>	<i>YJR113C</i>	1,3
<i>MET14</i>	<i>YKL001C</i>	2,3

LAC1	YKL008C	-1,3
	YKL071W	5,8
SRX1	YKL086W	7,5
CYT2	YKL087C	2,4
SFH1	YKL091C	1,4
UTP11	YKL099C	1,0
LAP4	YKL103C	2,5
LTV1	YKL143W	-1,2
YKL151C	YKL151C	1,3
EBP2	YKL172W	-1,1
PRS1	YKL181W	-1,2
FAS1	YKL182W	-1,6
DPH2	YKL191W	-1,2
MIA40	YKL195W	1,2
ADD66	YKL206C	1,4
URA1	YKL216W	-1,1
	YKR011C	2,2
SET3	YKR029C	2,0
DID2	YKR035W-A	1,3
MRS4	YKR052C	2,0
CCP1	YKR066C	3,4
GPT2	YKR067W	2,0
MET1	YKR069W	1,6
ECM4	YKR076W	5,2
RPF2	YKR081C	-1,3
SRP40	YKR092C	-1,1
UBP11	YKR098C	1,5
UBI4	YLL039C	1,7
MHT1	YLL062C	1,1
ERG3	YLR056W	-1,6
EMP70	YLR083C	-1,1
	YLR108C	2,1
AHP1	YLR109W	2,2
TIS11	YLR136C	2,6
	YLR149C	1,3
PCD1	YLR151C	1,1
	YLR162W	1,1
MAS1	YLR163C	1,4
CBF5	YLR175W	-1,3
TFS1	YLR178C	3,0
SIK1	YLR197W	-1,3
YKE2	YLR200W	1,0
MSS51	YLR203C	1,1
QRI5	YLR204W	1,7
HMX1	YLR205C	2,9
FRE1	YLR214W	2,0
YEF3	YLR249W	-1,3
SYM1	YLR251W	1,3
GSY2	YLR258W	1,2
YPT6	YLR262C	1,2
DCS1	YLR270W	1,4
DBP9	YLR276C	-1,2
	YLR282C	1,6
	YLR294C	1,5

<i>ECM38</i>	<i>YLR299W</i>	1,0
<i>TMA10</i>	<i>YLR327C</i>	1,2
<i>MID2</i>	<i>YLR332W</i>	-1,6
<i>FKS1</i>	<i>YLR342W</i>	-1,1
	<i>YLR345W</i>	1,1
<i>ILV5</i>	<i>YLR355C</i>	-1,7
<i>SUR4</i>	<i>YLR372W</i>	-1,2
<i>IKI3</i>	<i>YLR384C</i>	-1,0
<i>REH1</i>	<i>YLR387C</i>	1,4
<i>RPN13</i>	<i>YLR421C</i>	1,1
	<i>YLR460C</i>	2,4
	<i>YML002W</i>	1,2
<i>GLO1</i>	<i>YML004C</i>	1,7
<i>YAP1</i>	<i>YML007W</i>	1,2
<i>TSA1</i>	<i>YML028W</i>	2,4
<i>AIM31</i>	<i>YML030W</i>	1,6
<i>IMD4</i>	<i>YML056C</i>	-1,5
	<i>YML079W</i>	1,0
<i>TSL1</i>	<i>YML100W</i>	1,4
<i>ATR1</i>	<i>YML116W</i>	1,2
<i>MSC1</i>	<i>YML128C</i>	2,1
	<i>YML131W</i>	5,2
<i>MIC17</i>	<i>YMR002W</i>	1,6
<i>ADI1</i>	<i>YMR009W</i>	1,4
<i>YET2</i>	<i>YMR040W</i>	1,7
<i>ERB1</i>	<i>YMR049C</i>	-1,4
<i>UBX4</i>	<i>YMR067C</i>	1,7
	<i>YMR074C</i>	1,3
	<i>YMR090W</i>	4,0
<i>PGM2</i>	<i>YMR105C</i>	1,7
<i>FMP24</i>	<i>YMR115W</i>	1,5
<i>ALD3</i>	<i>YMR169C</i>	2,1
<i>ALD2</i>	<i>YMR170C</i>	2,0
<i>DDR48</i>	<i>YMR173W</i>	2,5
	<i>YMR173W-a</i>	2,2
<i>GSV2</i>	<i>YMR189W</i>	-1,1
<i>ICY1</i>	<i>YMR195W</i>	1,3
<i>PFK2</i>	<i>YMR205C</i>	-1,1
<i>FMP42</i>	<i>YMR221C</i>	-1,1
<i>GAD1</i>	<i>YMR250W</i>	1,5
<i>HOR7</i>	<i>YMR251W-a</i>	1,1
<i>DSK2</i>	<i>YMR276W</i>	1,6
<i>NIP1</i>	<i>YMR309C</i>	-1,1
<i>GLC8</i>	<i>YMR311C</i>	1,1
	<i>YMR315W</i>	1,0
<i>PBI2</i>	<i>YNL015W</i>	1,1
<i>NCE103</i>	<i>YNL036W</i>	1,4
<i>NOP2</i>	<i>YNL061W</i>	-1,5
<i>MTQ1</i>	<i>YNL063W</i>	1,5
<i>DBP2</i>	<i>YNL112W</i>	-1,6
<i>KRE33</i>	<i>YNL132W</i>	-1,7
	<i>YNL134C</i>	1,6
	<i>YNL155W</i>	1,0
	<i>YNL208W</i>	2,1

SSB2	YNL209W	-1,4
KEX2	YNL238W	-1,0
ZWF1	YNL241C	1,3
MRPL17	YNL252C	1,0
GOR1	YNL274C	1,2
	YNL305C	1,2
	YNR036C	1,1
HOL1	YNR055C	-1,4
ARG1	YOL058W	1,6
PRS5	YOL061W	-1,1
BRX1	YOL077C	-1,4
MSH2	YOL090W	-1,1
	YOL092W	-1,0
	YOL150C	2,4
GRE2	YOL151W	2,8
HSP10	YOR020C	1,2
LEU9	YOR108W	-1,3
GCY1	YOR120W	2,2
EFT1	YOR133W	-1,3
DCS2	YOR173W	1,2
GSP2	YOR185C	1,1
DED1	YOR204W	-1,3
ISU2	YOR226C	1,1
PUS7	YOR243C	-1,2
SRL1	YOR247W	-1,2
VPH1	YOR270C	-1,0
YOR289W	YOR289W	1,7
NOP58	YOR310C	-1,2
ALA1	YOR335C	-1,2
PRT1	YOR361C	-1,2
FIT2	YOR382W	1,2
RRP12	YPL012W	-1,3
MRPS16	YPL013C	1,1
NOP4	YPL043W	-1,3
NAN1	YPL126W	-1,6
SVS1	YPL163C	-1,5
OYE3	YPL171C	1,6
PUS1	YPL212C	-1,0
BMS1	YPL217C	-1,1
NEW1	YPL226W	-1,4
RPA135	YPR010C	-1,4
TKL1	YPR074C	-1,1
GDB1	YPR184W	1,5

**Quadro 42 – Alterações decorrentes na expressão de vários genes aos 30 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*.**

Os dados dos *microarrays* apresentados relativamente à indução ou repressão de genes estão representados sobre a forma da média do log<sub>2</sub> (da razão das medianas) de duas experiências independentes. As razões foram consideradas significativas quando log<sub>2</sub> era igual ou superior a 1,0 ou -1,0.

Gene	ORF	Expressão mRNA
PIM1	YBL022C	1,5
EDE1	YBL047C	1,0
PRX1	YBL064C	3,4

<i>ETR1</i>	<i>YBR026C</i>	1,3
	<i>YBR056W</i>	1,0
<i>HSP26</i>	<i>YBR072W</i>	2,0
<i>TPS1</i>	<i>YBR126C</i>	1,3
<i>ARA1</i>	<i>YBR149W</i>	1,2
<i>NPL4</i>	<i>YBR170C</i>	1,4
<i>GPX2</i>	<i>YBR244W</i>	3,1
	<i>YCL033C</i>	1,4
<i>GLK1</i>	<i>YCL040W</i>	1,5
	<i>YCR016W</i>	-1,1
<i>NOP1</i>	<i>YDL014W</i>	1,1
	<i>YDL124W</i>	1,3
<i>CDC48</i>	<i>YDL126C</i>	1,0
<i>RTN2</i>	<i>YDL204W</i>	2,0
<i>TRR1</i>	<i>YDR353W</i>	2,4
<i>TSA2</i>	<i>YDR453C</i>	10,6
<i>GRX2</i>	<i>YDR513W</i>	1,2
<i>HSP31</i>	<i>YDR533C</i>	2,3
<i>SNU13</i>	<i>YEL026W</i>	-1,1
<i>IES6</i>	<i>YEL044W</i>	1,0
<i>PRB1</i>	<i>YEL060C</i>	1,6
<i>SIT1</i>	<i>YEL065W</i>	1,9
<i>FMP52</i>	<i>YER004W</i>	1,4
<i>NUG1</i>	<i>YER006W</i>	-1,0
<i>HOR2</i>	<i>YER062C</i>	1,1
<i>HSP12</i>	<i>YFL014W</i>	2,6
<i>LSB3</i>	<i>YFR024C-A</i>	1,0
<i>HXK1</i>	<i>YFR053C</i>	2,0
<i>LEU1</i>	<i>YGL009C</i>	-1,2
<i>OLE1</i>	<i>YGL055W</i>	1,1
<i>STF2</i>	<i>YGR008C</i>	1,4
<i>TRX2</i>	<i>YGR209C</i>	2,9
<i>SOL4</i>	<i>YGR248W</i>	1,9
<i>ARN2</i>	<i>YHL047C</i>	1,6
<i>SOD2</i>	<i>YHR008C</i>	1,8
<i>HXT4</i>	<i>YHR092C</i>	1,1
<i>GTT1</i>	<i>YIR038C</i>	1,5
<i>RNR2</i>	<i>YJL026W</i>	1,1
<i>MPM1</i>	<i>YJL066C</i>	1,0
	<i>YJL068C</i>	1,1
<i>PRY1</i>	<i>YJL079C</i>	1,1
<i>ELO1</i>	<i>YJL196C</i>	1,2
<i>ILV3</i>	<i>YJR016C</i>	-1,1
	<i>YJR096W</i>	1,7
<i>SOD1</i>	<i>YJR104C</i>	1,8
<i>MET14</i>	<i>YKL001C</i>	1,0
<i>LAC1</i>	<i>YKL008C</i>	-1,4
<i>RPT1</i>	<i>YKL145W</i>	1,0
<i>YKL151</i>		
<i>C</i>	<i>YKL151C</i>	1,1
<i>APE2</i>	<i>YKL157W</i>	1,4
<i>MIA40</i>	<i>YKL195W</i>	1,0
<i>SET3</i>	<i>YKR029C</i>	1,3
<i>CCP1</i>	<i>YKR066C</i>	1,0
	<i>YKR075C</i>	1,1

ECM4	YKR076W	3,0
UBI4	YLL039C	1,4
AHP1	YLR109W	1,9
DPH5	YLR172C	-1,0
TFS1	YLR178C	2,3
FRE1	YLR214W	1,4
KAP95	YLR347C	1,1
REH1	YLR387C	1,1
YAP1	YML007W	1,1
TSA1	YML028W	2,2
DAK1	YML070W	1,1
MSC1	YML128C	2,5
	YML131W	3,0
FET3	YMR058W	1,1
PGM2	YMR105C	2,1
ALD3	YMR169C	1,8
DDR48	YMR173W	1,9
	YMR173W-a	2,1
GYL1	YMR192W	-1,0
	YMR196W	1,2
FAA4	YMR246W	1,1
GAD1	YMR250W	1,9
SFB2	YNL049C	1,4
YGP1	YNL160W	1,4
	YNL208W	1,7
GOR1	YNL274C	1,8
BRX1	YOL077C	-1,0
DNL4	YOR005C	1,1
GCY1	YOR120W	2,2
GSP2	YOR185C	1,0
FIT2	YOR382W	1,6
FLC1	YPL221W	8,0

**Quadro 43 – Alterações decorrentes na expressão de vários genes aos 60 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*.**

Os dados dos *microarrays* apresentados relativamente à indução ou repressão de genes estão representados sobre a forma da média do log<sub>2</sub> (da razão das medianas) de duas experiências independentes. As razões foram consideradas significativas quando log<sub>2</sub> era igual ou superior a 1,0 ou -1,0.

<b>Gene</b>	<b>ORF</b>	<b>Expressão mRNA</b>
PRX1	YBL064C	1,4
HHF1	YBR009C	-1,2
HHT1	YBR010W	-1,2
GPX2	YBR244W	2,9
PGS1	YCL003W	-1,4
TRR1	YDR353W	1,7
MET6	YER091C	-1,1
CDC14	YFR028C	-1,4
MLC1	YGL106W	-1,1
BTN2	YGR142W	-1,1
TRX2	YGR209C	1,9
RPS27B	YHR021C	-1,0
PPA1	YHR026W	-1,0
VMA10	YHR039C-B	-1,2

<i>GND1</i>	<i>YHR183W</i>	1,1
<i>THS1</i>	<i>YIL078W</i>	-1,2
<i>RNR2</i>	<i>YJL026W</i>	1,1
<i>URA2</i>	<i>YJL130C</i>	1,2
<i>SSC1</i>	<i>YJR045C</i>	-1,1
<i>SRP21</i>	<i>YKL122C</i>	-1,0
<i>CAF4</i>	<i>YKR036C</i>	1,2
<i>RPS25A</i>	<i>YKR057W</i>	-1,7
<i>PAM17</i>	<i>YKR065C</i>	-1,5
<i>CCP1</i>	<i>YKR066C</i>	1,7
<i>DRS1</i>	<i>YLL008W</i>	-1,1
<i>SHM2</i>	<i>YLR058C</i>	-1,7
	<i>YLR137W</i>	-1,1
<i>ACS2</i>	<i>YLR153C</i>	1,0
<i>CPR6</i>	<i>YLR216C</i>	-1,1
<i>RPS33B</i>	<i>YLR264W</i>	-1,2
	<i>YLR269C</i>	-1,0
	<i>YLR282C</i>	-1,2
	<i>YLR294C</i>	-1,3
<i>ATP14</i>	<i>YLR295C</i>	-1,1
<i>EXG1</i>	<i>YLR300W</i>	1,1
<i>RPS31B</i>	<i>YLR333C</i>	-1,1
<i>SUR4</i>	<i>YLR372W</i>	-1,1
<i>ECM19</i>	<i>YLR390W</i>	1,4
<i>GLO1</i>	<i>YML004C</i>	1,5
<i>YAP1</i>	<i>YML007W</i>	-1,0
<i>PPZ1</i>	<i>YML016C</i>	1,4
<i>TSA1</i>	<i>YML028W</i>	1,4
<i>RP10B</i>	<i>YML063W</i>	-1,0
<i>COX14</i>	<i>YML129C</i>	-1,0
	<i>YMR074C</i>	-1,0
<i>NUP53</i>	<i>YMR153W</i>	1,7
<i>DDR48</i>	<i>YMR173W</i>	1,3
<i>GYL1</i>	<i>YMR192W</i>	1,5
<i>EFR3</i>	<i>YMR212C</i>	1,2
<i>SKY1</i>	<i>YMR216C</i>	1,4
<i>SAP30</i>	<i>YMR263W</i>	1,7
<i>PGM3</i>	<i>YMR278W</i>	1,0
<i>LIP1</i>	<i>YMR298W</i>	-1,8
<i>SCW10</i>	<i>YMR305C</i>	-1,6
	<i>YPL142C</i>	1,3

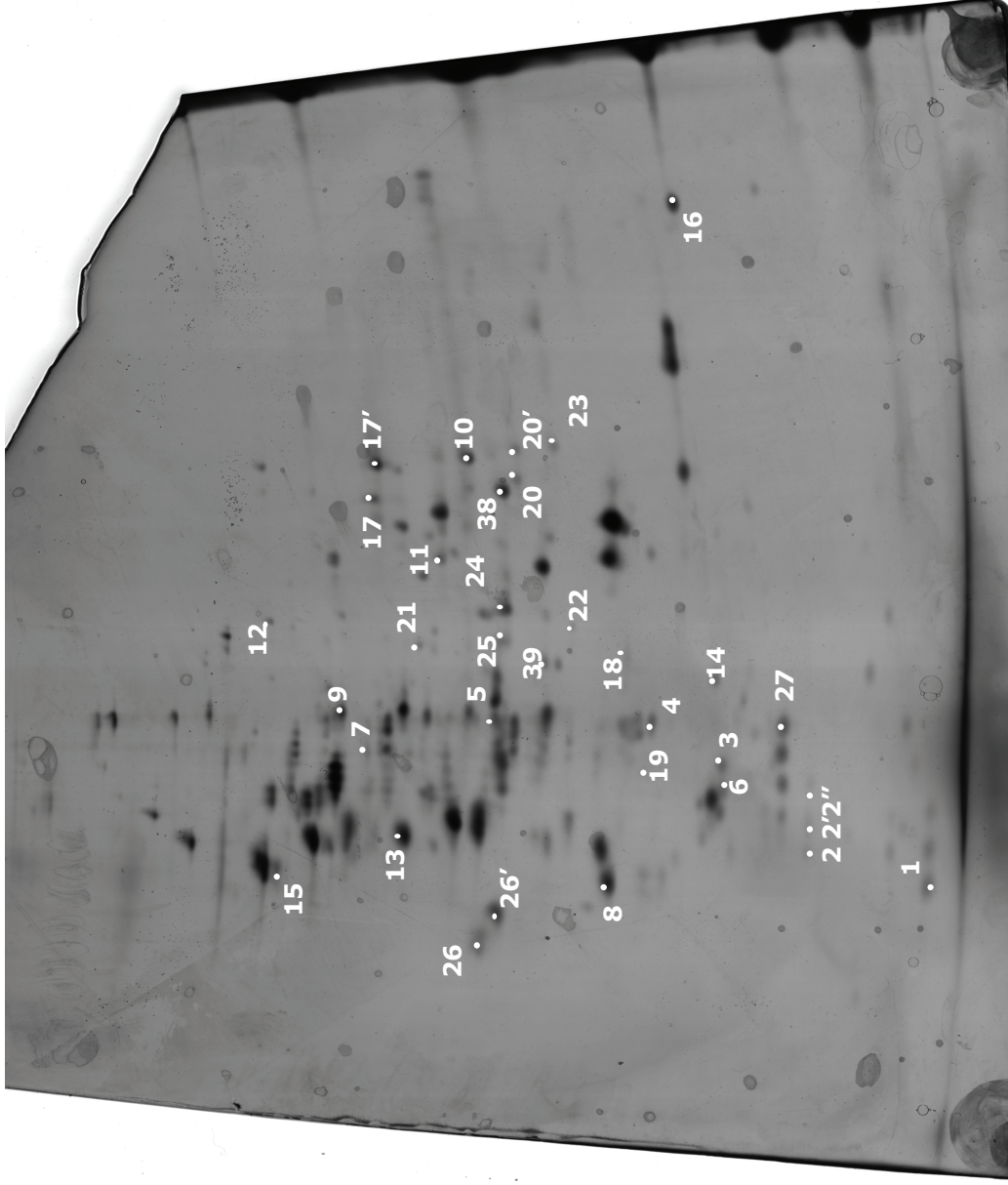
**Quadro 44 – Alterações decorrentes na expressão de vários genes aos 90 min de adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *S. cerevisiae*.**

Os dados dos *microarrays* apresentados relativamente à indução ou repressão de genes estão representados sobre a forma da média do log<sub>2</sub> (da razão das medianas) de duas experiências independentes. As razões foram consideradas significativas quando log<sub>2</sub> era igual ou superior a 1,0 ou -1,0.

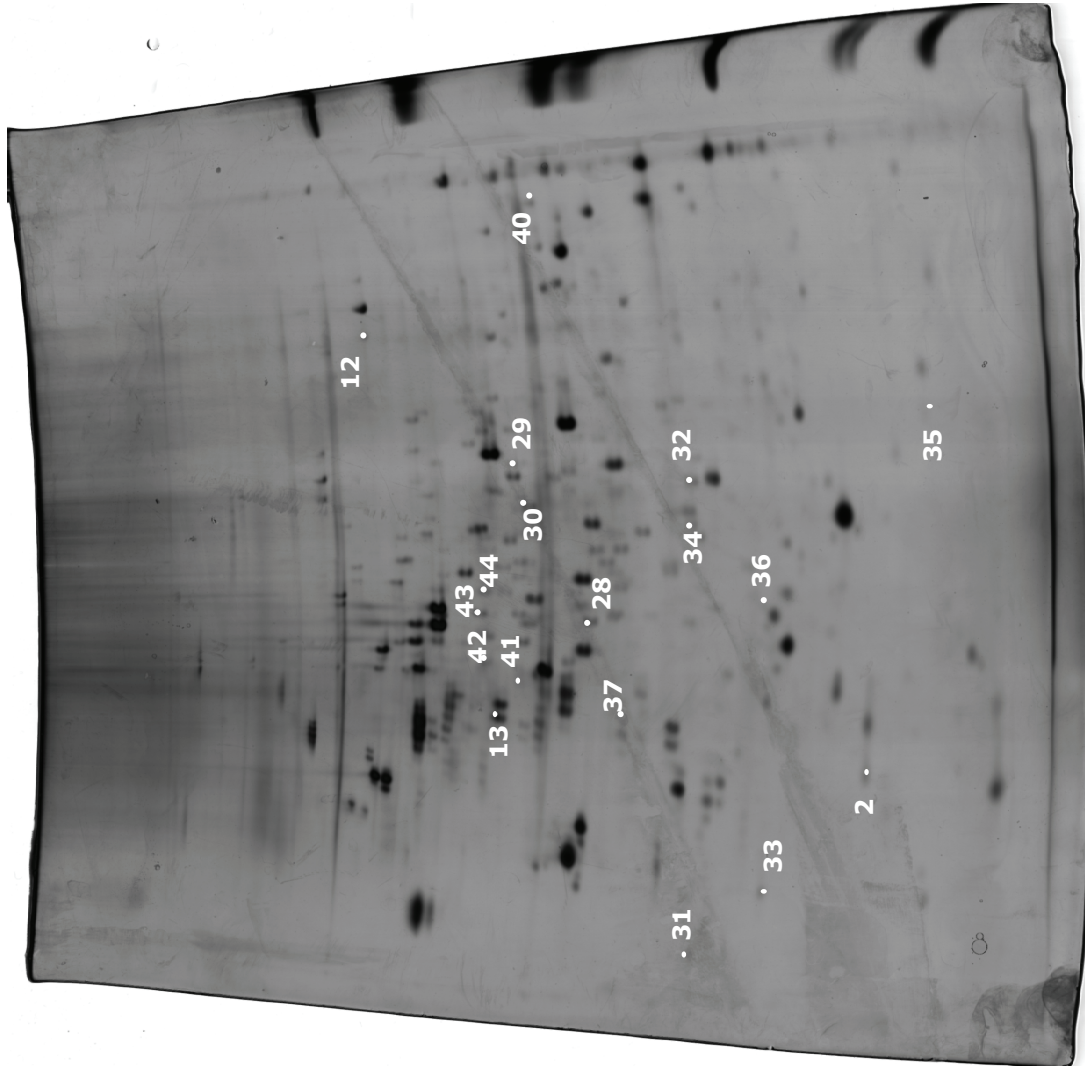
<b>Gene</b>	<b>ORF</b>	<b>Expressão mRNA</b>
<i>PRX1</i>	<i>YBL064C</i>	1,7
<i>GPX2</i>	<i>YBR244W</i>	2,4
<i>SHM1</i>	<i>YBR263W</i>	1,3
<i>CIT2</i>	<i>YCR005C</i>	1,1
<i>TRR1</i>	<i>YDR353W</i>	1,6



<i>TRX2</i>	<i>YGR209C</i>	1,2
<i>SOD2</i>	<i>YHR008C</i>	1,3
<i>HXT12</i>	<i>YIL170W</i>	1,2
<i>SOD1</i>	<i>YJR104C</i>	1,0
<i>CCP1</i>	<i>YKR066C</i>	1,3
<i>AHP1</i>	<i>YLR109W</i>	1,2
<i>CBF5</i>	<i>YLR175W</i>	3,2
<i>TSA1</i>	<i>YML028W</i>	1,5
<i>UBX4</i>	<i>YMR067C</i>	1,1
<i>ACC1</i>	<i>YNR016C</i>	1,3
<i>MSY1</i>	<i>YPL097W</i>	2,7



**Figura 39** – Identificação das localizações das proteínas da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* cujo nível foi alterado devido à adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O gel apresentado é representativo de uma electroforese bidimensional efectuada usando nitrato de prata como revelador e uma gama linear de ponto isoelectrico entre 3-10.



**Figura 40 - Identificação das localizações das proteínas da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* cujo nível foi alterado devido à adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**  
O gel apresentado é representativo de uma electroforese bidimensional efectuada usando nitrato de prata como revelador e uma gama linear de ponto isoelectrico entre 4-7.

**Quadro 45 – Proteínas da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* cujo nível foi alterado devido à adaptação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Foi efectuada a análise das proteínas da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* após a exposição a um estado estacionário de 150 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Foram consideradas como significativas as alterações superiores ou inferiores a 1,5 vezes o valor determinado para o controlo tendo sido somente consideradas as variações que apresentavam uma ANOVA com um valor P < 0,05. O posicionamento das proteínas identificadas encontra-se efectuado nos géis representativos acima. Algumas das proteínas identificadas apresentam mais do que um valor, o que é indicativo que algumas das proteínas da membrana plasmática, apresentam várias modificações pós-traducionais. A função das proteínas listadas foi obtida a partir da descrição constante na base de dados *online Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>).

Identificação	Nº de	Gene	Proteína	Descrição sumariada da função	Variação vs controlo	
					30 min	90 min
31		YAL003W	Efb1	Factor de elongação 1 Beta	-2,7	
22		YAL012W	Cys3	Cistationina γ-liase	7,6	
17		YAL038W	Pyk1	Piruvato cinase	2,1	
17'					1,6	
24		YBL099W	Atp1	Subunidade alfa do sector F1 do ATPase mitocondrial	2,0	
6		YBR052C	Rsf1	Proteína com função supressora da Rad55.	3,4	2,7
13		YBR127C	Vma2	Subunidade B do ATPase vacuolar exportador de H <sup>+</sup>	-1,7	-2,2
21		YBR196C	Pgi1	Fosfoglucose isomerase	4,9	
38		YCR012W	Pgk1	3-Fosfoglicerato cinase	1,8	
39		YDL055C	Psa1	GDP-manose pirofosforilase	1,8	
40		YDL182W	Lys20	Homocitrato sintase	4,7	
27		YDR032C	Pst2	Proteína induzida por stress oxidativo de um modo dependente da proteína Yap1p	2,4	
3		YDR304C	Cpr5	Rotamase	2,5	2,3
32		YDR353W	Trr1	Tiorredoxina redutase	3,3	
12		YER091C	Met6	Homocisteína metiltransferase	-2,4	-1,9
9		YER165W	Pab1	Proteína de ligação à cadeia poli A do mRNA		-3,1
29		YGL202W	Aro8	Aminotransferase de aminoácidos aromáticos	1,5	
23		YGL148W	Aro2	Corismato sintase	3,6	
42		YGL253W	Hxk2	Hexocinase 2	-1,6	
26		YGR086C	Pil1	Proteína que responde a bases de cadeia longa	1,5	
26'					2,1	
11		YGR155W	Cys4	Cistationina β-sintase		-2,2
1		YGR209C	Trx2	Tiorredoxina 2	1,9	1,7

25	YHR183W	Gnd1	6-Fosfogluconato desidrogenase	2,2
37	YIL041W	Gvp36	Proteína presente nas vesículas do Golgi	-2,7
15	YJL034W	Kar2	ATPase envolvido no transporte e <i>folding</i> de proteínas no retículo endoplasmático	1,7
43	YJR064W	Cct5	Subunidade da chaperonina CCT	-1,8
30	YJR121W	Atp2	Subunidade beta do sector F <sub>1</sub> do ATP sintase	3,6
33	YKL056C	Tma19	Proteína homóloga da TCTP de mamífero	-2,9
34	YKL060C	Fba1	1,6-Bifosfato de frutose aldolase	-1,5
16	YKL152C	Gpm1	Fosfoglicerato mutase	2,1
10	YLR058C	Shm2	Glicina hidroximetiltransferase	-3,1
2	YLR109W	Ahp1	Hidroperóxido de alquilo redutase	4,1
2'				4,3
2''				3,9
14	YLR293C	Gsp1	Proteína associada ao GTP envolvida na importação nuclear de proteínas	-4,1
19	YLR304C	Aco1	Aconitase	2,3
8	YLR340W	Rpp0	Proteína ribossomal ácida	-1,7
18	YLR354C	Tal1	Transaldolase	4,4
20	YMR083W	Adh3	Álcool desidrogenase (isoenzima 3)	3,7
20'				2,8
4	YMR116C	Asc1	Proteína ortóloga da proteína RACK	2,3
28	YMR203W	Tom40	Componente da translocase da membrana externa mitocondrial	3,7
36	YNL010W	-	Proteína com função semelhante aos fosfatases de fosfoserinas	-2,5
44	YOR197W	Mca1	Protease de cisteína semelhante aos caspases dos mamíferos	-1,8
35	YOR285W	-	Proteína de função desconhecida	-2,1
7	YPL061W	Ald6	Aldeído desidrogenase activada por magnésio	-2,2
5	YPL145C	Kes1	Membro da família de proteínas envolvidas no transporte de esteróis	-2,5
41	YPR173C	Vps4	Proteína reguladora do transporte de esteróis	-2,1